



DIAGSOL : développement d'un nouveau marqueur fonctionnel d'exposition aux herbicides β -tricétones dans un sol agricole

Clémence Thiour Mauprivez

► To cite this version:

Clémence Thiour Mauprivez. DIAGSOL : développement d'un nouveau marqueur fonctionnel d'exposition aux herbicides β -tricétones dans un sol agricole. Sciences agricoles. Université de Perpignan, 2020. Français. NNT : 2020PERP0025 . tel-03119802

HAL Id: tel-03119802

<https://theses.hal.science/tel-03119802>

Submitted on 25 Jan 2021

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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale **ED305**
Et des unités de recherche

Spécialité : Biologie

Biocapteurs-Analyses-Environnement (BAE-LBBM), équipe projet du
LBBM USR 3579 Sorbonne Université-CNRS, Perpignan.

AgroSup Dijon, INRAE, UMR1347 Agroécologie, Dijon.

Présentée par **Clémence THIOUR MAUPRIVEZ**

**DIAGSOL : Développement d'un nouveau
marqueur des herbicides β -tricétones
dans les sols agricoles.**

Soutenue le 28 octobre 2020

devant le jury composé de

Aurélié CEBRON, CR CNRS, HDR, UMR LIEC, Vandœuvre-lès-Nancy

Rapporteure

Laure MAMY, DR INRAE, UMR EcoSys, Paris-Saclay

Rapporteure

Isabelle BATISSON, MCF UCA, HDR, UMR LMGE, Clermont-Ferrand

Examinatrice

Christophe CALVAYRAC, MCF UPVD, BAE-LBBM, Perpignan

Examineur

Thierry NOGUER, PR UPVD, BAE-LBBM, Perpignan

Examineur

Lise BARTHELMEBS, PR UPVD, BAE-LBBM, Perpignan

Directrice de thèse

Fabrice MARTIN-LAURENT, DR INRAE, UMR AgroEcologie, Dijon

Codirecteur de thèse

UNIVERSITÉ
PERPIGNAN
VIA
DOMITIA



A Ayman.

Remerciements

Aux membres du jury :

Je remercie tout d'abord Laure Mamy et Aurélie Cébron d'avoir accepté d'être rapporteuses de ce travail. Merci également à Isabelle Batisson qui est à la fois examinatrice de ce travail et aussi présidente de mon comité de suivi de thèse. De ce comité faisaient également partie Céline Cosseau et Lionel Alletto. Je les remercie tous les trois pour les conseils qu'ils m'ont apportés durant ces trois années.

Egalement membres de mon jury et du laboratoire BAE, Thierry Noguer et Christophe Calvayrac. Merci à Thierry de m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'y faire régner la bonne humeur et d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Un grand merci également à Christophe de m'avoir épaulée dans les longues manips de chimie et de s'être autant impliqué dans ce projet.

A mes directeurs de thèse :

Je remercie vivement Lise Barthelmebs et Fabrice Martin-Laurent. Ces trois années ont été très enrichissantes tant sur le plan scientifique que personnel et c'est en grande partie grâce à vous. Merci de m'avoir soutenue, donné confiance en mon travail et avoir été aussi bienveillants. Je re-signe pour trois années supplémentaires sans hésitations !

Aux perpignanais :

A ma première maison, le laboratoire BAE et tous ses membres, pour leur soutien, leur bonne humeur et les pauses cafés et repas partagées autour de mille et une sucreries !

A toute la promo 2017-2020 avec qui j'ai pu partager de très bons moments tout au long de cette aventure. Un merci tout particulier à Lisa, ma coloc d'une demi-année, Mégane, mon binôme de congrès, Aurian, mon catalan préféré, Adina, ma roumaine préférée et Kaitlyn, ma néo-zélandaise préférée.

A mi-chemin entre le Nord et le Sud, je remercie les époux Gambas, Emilie et Cyril, les époux Elhombre, Chloé et Raph' et mon cher et tendre, Vitalys. Nous n'aurons jamais réussi à gagner une partie de Greenville mais je vous aime quand même. Mention spéciale pour ma labpartner, hiking buddy et coach de fitness, Beverly.

Aux dijonnais :

A ma seconde maison, l'équipe EMFEED de l'INRA de Dijon. Là-haut aussi j'ai pu profiter des pauses cafés, des restos d'équipe et de votre joie de vivre. Un merci tout particulier à Marion, avec qui j'ai passé de longues heures à m'initier à la bioinfo en embêtant Aymé et Arnaud qui se sont toujours rendus disponibles pour m'aider. Merci également à David, partenaire de mes sorties footing, et Jérémie pour vous être acharnés sur les PCRs capricieuses ! Merci à Nadine pour le café toujours coulé à 9h qu'il pleuve, qu'il vente, ou qu'il neige !

A toutes les doctorantes de l'équipe, Loren, Tiffany, Sarah et Laly, pour les apéros et sorties sportives du week-end. Un jour peut-être nous arriverons à terminer une rando sans se perdre ! Un merci tout particulier à Sana pour l'initiation à l'escalade infructueuse mais aussi pour tous les conseils, avis et longues discussions que l'on a pu partager durant ces trois années.

Merci également à Audrey et Simon de m'avoir hébergée lors de mes transitions Dijon-Perpignan, cela aurait été largement plus difficile sans vous !

Aux lyonnais :

A Céline Lavire et Thibault Meyer, mes encadrants de Master, avec qui j'ai pu continuer de collaborer et écrire une revue sur le monde merveilleux d'*Agrobacterium*, éloigné de mon sujet de thèse, mais toujours aussi passionnant !

A ma BM, best binôme de TP ever qui me suit depuis la L1 ! Et à ma Laura, Petrouchka n'a qu'à bien se tenir et la quatrième année, de toute façon, tu n'en as pas besoin, tu es déjà la meilleure ! Merci à vous deux pour ces week-ends lyonnais qui furent de réelles bouffées d'oxygène.

A mes colocos d'internat et meilleures alliées Lorène, Manon et Morgane. La vie a tendance à nous éloigner ces dernières années mais votre place dans mon cœur reste intacte.

A mes parents :

Mention spéciale à ma maman pour avoir transformé son appartement en garde-meubles et m'avoir soutenue dans la logistique de tous ces déménagements et aller-retours entre Dijon et Perpi. Et à mon père pour son soutien !

A tous ceux que j'ai oublié :

Et qui ont contribué à rendre ma vie plus douce et m'ont soutenue pendant ces longues d'années d'études.

Sommaire

Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	15
1) Santé, environnement, écosystèmes	17
a) De l'importance des services écosystémiques	17
b) Importance des microorganismes dans les sols	22
2) Les communautés microbiennes au temps de l'anthropocène	27
a) Anthropocène et utilisation des produits phytosanitaires.....	27
b) L'écotoxicologie microbienne	32
c) Evaluer l'effet des produits phytosanitaires sur les microorganismes du sol	36
3) Impact écotoxicologique des herbicides de la famille des β -tricétones	39
a) Origine et utilisation des herbicides β -tricétones	39
a) Mode d'action des herbicides β -tricétones	45
b) Les impacts des herbicides β -tricétones sur les communautés microbiennes	48
Présentation du sujet de thèse	53
Chapitre II : Le gène <i>hppd</i> comme biomarqueur des herbicides β-tricétones dans les sols.....	59
Résumé de la publication	61
Article 1	65
Chapitre III : Effets des herbicides β-tricétones sur des HPPDs bactériennes modèles	77
Introduction.....	79
Article 2 (à soumettre)	83
Résultats complémentaires.....	103
Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire pour l'étude de l'abondance et de la diversité de la communauté bactérienne <i>hppd</i> des sols	105
Introduction.....	107
Article 3	111
Chapitre V : Validation de l'outil moléculaire développé par une approche des microcosmes aux champs (lab-to-field)	115
Introduction.....	117
Article 4	119
Résultats complémentaires.....	129
Chapitre VI : Discussion, conclusion et perspectives	131
Résumé des principaux résultats obtenus	133
Discussion	137
Conclusion et perspectives.....	142
Références.....	143
Annexes.....	155

Liste des figures

Figure I.1 : Les différentes classes de services écosystémiques.

Figure I.2 : La division du sol en « hot-spots » (tirée de Kuzyakov and Blagodatskaya 2015).

Figure I.3 : Les différents types de sols français et pratiques culturales (d'après CGDD 2015).

Figure I.4 : Nombre de taxons bactériens dans les sols français (tirée de Terrat *et al.*, 2017).

Figure I.5 : Relations entre communautés microbiennes et écosystèmes (adaptée de Ghiglione *et al.*, 2016).

Figure I.6 : Le cycle de l'azote dans les sols (tirée de Pajares and Bohannan 2016).

Figure I.7 : Illustration des différents scénarios de l'effet d'une perturbation sur la diversité des fonctions écologiques soutenues par une communauté microbienne.

Figure I.8 : Relations entre polluants et écosystèmes (adaptée de Ghiglione *et al.*, 2016).

Figure I.9 : Nombre (A) et concentrations (B) de résidus de produits phytosanitaires retrouvés dans les sols européens (tirée de Silva *et al.*, 2019).

Figure I.10 : Relations entre communautés microbiennes et polluants (adaptée de Ghiglione *et al.*, 2016).

Figure I.11 : Les différentes réponses d'une communauté microbienne face à un stress.

Figure I.12 : Représentation conceptuelle de l'écotoxicologie microbienne (d'après Ghiglione *et al.*, 2016).

Figure I.13 : Principe de la méthode PICT (tirée de Bérard *et al.*, 2016).

Figure I.14 : Devenir des PP dans l'environnement (inspirée de Romdhane 2016a).

Figure I.15 : Le métabolisme de la tyrosine et l'implication de l'HPPD (tirée de Moran 2005).

Figure I.16 : Liaison de la sulcotrione au site actif de l'HPPD de *Arabidopsis thaliana* (tirée de Dayan *et al.*, 2007).

Figure I.17 : Alignements protéiques des HPPDs végétales de *Zea mays*, de *A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota*, *Coleus blumei* et de l'HPPD bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* (tirée de Fritze *et al.*, 2004).

Figure I.18 : Sites actifs de l'enzyme HPPD chez le maïs (*Z. mays* L.), *A. thaliana* et *P. fluorescens* F113 (tirée de Fritze *et al.*, 2004).

Figure I.19 : Voies de biodégradation des herbicides β -tricétones (d'après Romdhane *et al.*, 2016b; Romdhane *et al.*, 2017).

Figure I.20 : Etat des connaissances concernant l'impact écotoxicologique des herbicides β -tricétones sur les communautés microbiennes du sol.

Figure I.21 : Evaluation de l'exposition des sols aux herbicides grâce à l'utilisation de marqueurs microbiens (tirée de Thiour-Mauprivez *et al.*, 2019).

Figure I.22 : Organisation des différents axes de la thèse dans ce manuscrit.

Figure II.1 : Intégration du chapitre II dans l'étude.

Figure II.2 : Le monde des herbicides selon la classification HRAC (<https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2020-map>).

Figure III.1 : Intégration du chapitre III dans l'étude.

Figure III.2 : Effet du Decano® sur l'activité de l'HPPD des six souches modèles.

Figure III.3 : CE₅₀ de *S. oneidensis* MR-1 (A) et *B. cereus* ATCC14579 (B) exposées à différents β -tricétones.

Figure IV.1 : Intégration du chapitre IV dans l'étude.

Figure IV.2 : Arbre phylogénétique des séquences protéiques d'HPPD bactériennes disponibles dans Pfam.

Figure V.1 : Intégration du chapitre V dans l'étude.

Figure V.2 : Pratiques culturales et traitements appliqués aux sols agricoles de l'étude.

Figure V.3 : Occurrence de l'OTU-229 dans les microcosmes de sols traités au Decano®.

Figure VI.1 : Développement d'un marqueur d'exposition ou d'effet des herbicides dans les sols.

Figure VI.2 : Schématisation des principaux résultats de l'étude.

Figure VI.3 : Production de fumarate à partir du cycle de l'urée (d'après Mendz and Hazell 1996).

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Evaluation du risque via les organismes du sol en fonction des recommandations de l'UE (d'après Miyamoto *et al.*, 2011).

Tableau I.2 : Caractéristiques de la sulcotrione, de la mésotrione et de la tembotrione : des herbicides β -tricétones.

Tableau III.1 : Isolats bactériens décrits comme possédant une HPPD et intégrés au soucier.

Tableau III.2 : Récapitulatif des résultats obtenus suite à l'exposition des isolats à différentes concentrations de molécules actives β -tricétones.

Tableau V.I : Echantillons dépassant au moins une fois le seuil de détection en RT-qPCR.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1) Santé, environnement, écosystèmes

a) De l'importance des services écosystémiques

En 2000, Kofi Annan, alors secrétaire de l'Organisation des Nations Unies, alerte les autorités sur le besoin de surveiller et gérer durablement les écosystèmes afin de maintenir le bien-être humain. En 2001 est créé un groupe de surveillance scientifique en charge de l'évaluation des écosystèmes pour le nouveau millénaire (Millenium Ecosystem Assessment). Et le constat est amer : plus de la moitié des services écosystémiques sont dégradés ou utilisés de façon non durable (Tallis and Kareiva 2005). Gretchen Daily définit les services écosystémiques comme des conditions et des procédés par lesquels les écosystèmes naturels et les espèces qui les peuplent, participent à et améliorent la vie humaine (Daily 2012). Ces services sont donc essentiels à la vie sur Terre. Parmi les plus populaires se compte la pollinisation : de nombreuses plantes dépendant de la pollinisation animale, un déclin des pollinisateurs pourrait, à terme, faire décliner le nombre d'espèces végétales sauvages et altérer le rendement des plantes cultivées et ainsi mettre en péril la nutrition animale et humaine (Klein *et al.*, 2007). Les services écosystémiques peuvent être classés en différents groupes, comme le suggère un rapport du Millenium Ecosystem Assesment (**figure I.1**) (Corvalán *et al.*, 2005). Les services de soutien tels que le cycle de l'eau ou la formation du sol sont essentiels à la production des autres services et sont donc à la base de cette classification. Vont découler des services de soutien, les services régulant ou modulant les phénomènes naturels telle que la pollinisation ; les produits potentiellement commercialisables tirés de certains services ; et enfin, les bénéfices non-matériels des écosystèmes profitables à l'Homme tels que les services culturels.

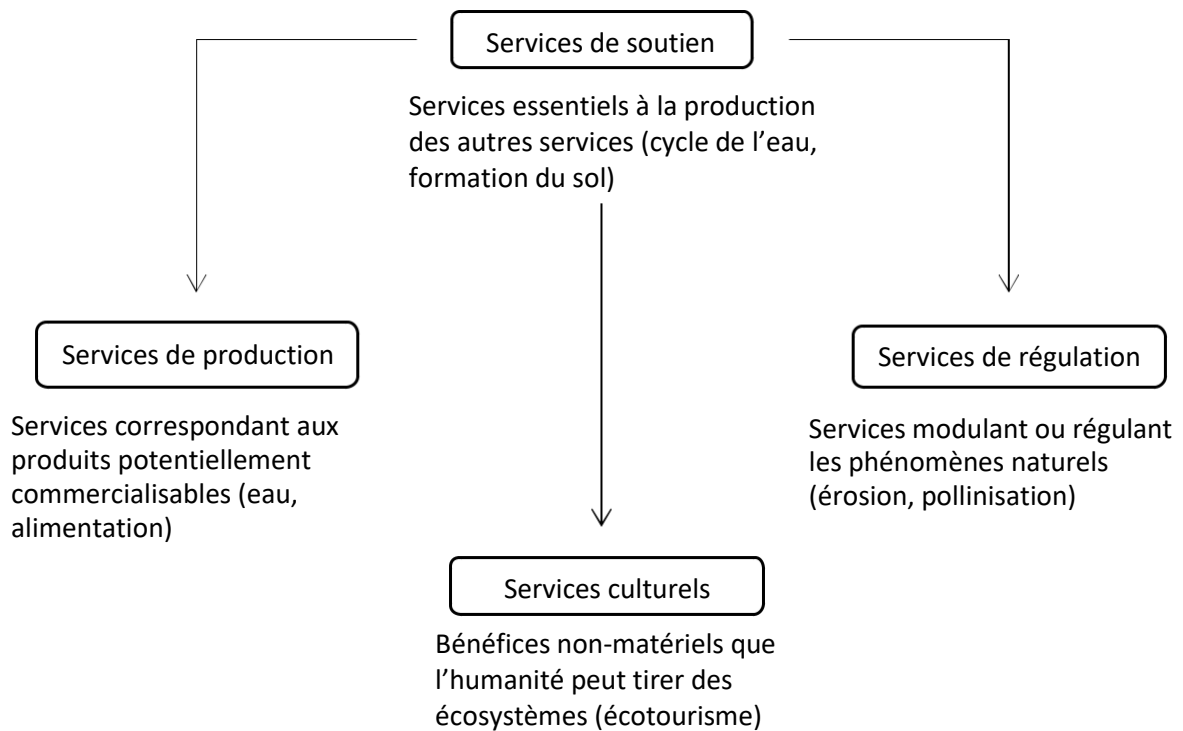


Figure I.1 : Les différentes classes de services écosystémiques

En France, les écosystèmes et leurs services sont évalués depuis 2012 *via* l'initiative EFESE (Evaluation Française des Ecosystèmes et des Services Ecosystémiques). Des groupes de travail ont été constitués pour étudier les services rendus par les six principaux écosystèmes présents sur le territoire français : les écosystèmes forestiers ; les écosystèmes agricoles ; les écosystèmes urbains ; les milieux humides ; les milieux marins et littoraux ; les zones rocheuses et de haute montagne. Le rapport intermédiaire de l'EFESE publié en 2016 alerte sur le fait que seulement 22% des habitats et 28% des espèces d'intérêt communautaire (ou espèces protégées) apparaissent en état « favorable » de conservation (EFESE 2016). Or, c'est l'état écologique des écosystèmes (favorable, défavorable inadéquat, défavorable mauvais ou inconnu) qui conditionne leur capacité à fournir durablement des services.

Haut lieu des services écosystémiques, les sols stockent plus de carbone que l'atmosphère et la végétation réunies : environ 2000 milliards de tonnes de carbone y sont stockées sous forme de matière organique (IPCC 2013). De plus, ils renfermeraient près du quart de la biodiversité mondiale actuellement décrite (Decaëns *et al.*, 2006). Le sol ne fait pourtant pas l'objet d'une protection spécifique comme l'eau ou l'air et il a fallu attendre 2006 pour que la commission européenne reconnaisse officiellement le besoin de protéger les sols aux vues de leur dégradation sans précédent (European Commission 2006a).

La diversité des sols s'observe à la fois à l'échelle macroscopique mais également à des échelles plus fines, jusqu'à l'échelle microscopique. A cette échelle, différents habitats peuvent être caractérisés. Ceux-ci, appelés « hot-spots », sont contenus dans un faible volume dans lequel les interactions sont plus intenses. Ils sont classés en fonction de l'apport en carbone libre de la zone considérée (Kuzakov and Blagodatskaya 2015) (**figure I.2**) :

-La rhizosphère (**2A**) est le sol sous l'influence des racines des plantes et le carbone y est apporté principalement par les exsudats racinaires (Hartmann *et al.*, 2008).

-La détritosphère (**2B**) est le sol sous l'influence des résidus végétaux et le carbone y est présent sous forme complexe, peu assimilable, comme la lignine (Neergaard and Magid 2015).

-La drilosphère (**2C**) est le sol sous l'influence de l'activité des vers de terre. Le carbone y est présent dans les turricules (fèces du ver) à la fois sous forme labile, facilement assimilable, et sous forme plus complexe (Schlatter *et al.*, 2019).

-Les agrégats (macro et micro) (**2D**) de sol contiennent de la matière organique apportée par lessivage de la détritosphère et de la rhizosphère (Kaiser and Kalbitz 2012).

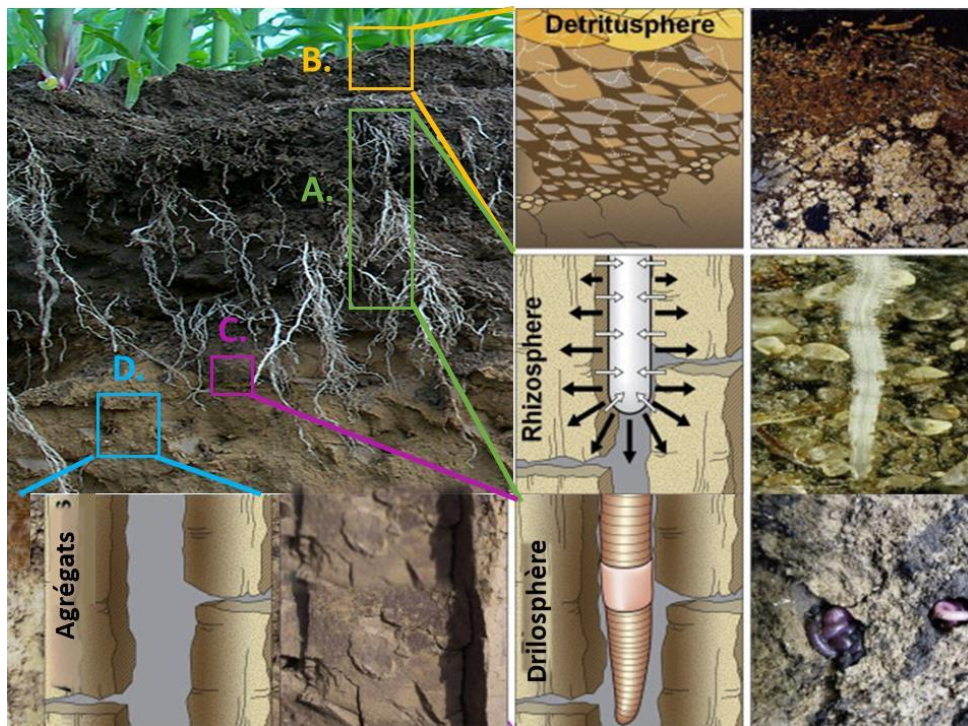


Figure I.2 : La division du sol en « hot-spots » (tirée de Kuzakov and Blagodatskaya 2015). Quatre « hot-spots » peuvent être définis dans le sol : la rhizosphère (A), la détritosphère (B), la drilosphère (C) et les macro- et micro-agrégats (D).

Au niveau macroscopique, les sols peuvent être perçus à différentes échelles : du champ et du paysage agricole jusqu'à la région voire le pays en prenant en compte de multiples facteurs. On peut considérer la diversité du sol au niveau de sa texture, comme présenté en **figure 1.3A**, mais également en fonction de ses propriétés physico-chimiques telles que son pH, sa teneur en carbone, en phosphore, et, plus globalement, en nutriments ou en eau. C'est autant d'éléments qui sont pris en compte pour l'exploitation des sols et c'est pourquoi les deux cartes (**figure 1.3A et B**) qui présentent les différents types de sols français et les pratiques culturales sur le territoire national sont quasiment superposables.

Le caractère hétérogène à la fois à l'échelle microscopique et macroscopique va grandement influencer l'activité biologique des sols qui est soutenue à près de 90% par les microorganismes qui accomplissent de nombreuses fonctions soutenant les services écosystémiques rendus par les sols (Wall *et al.*, 2013).

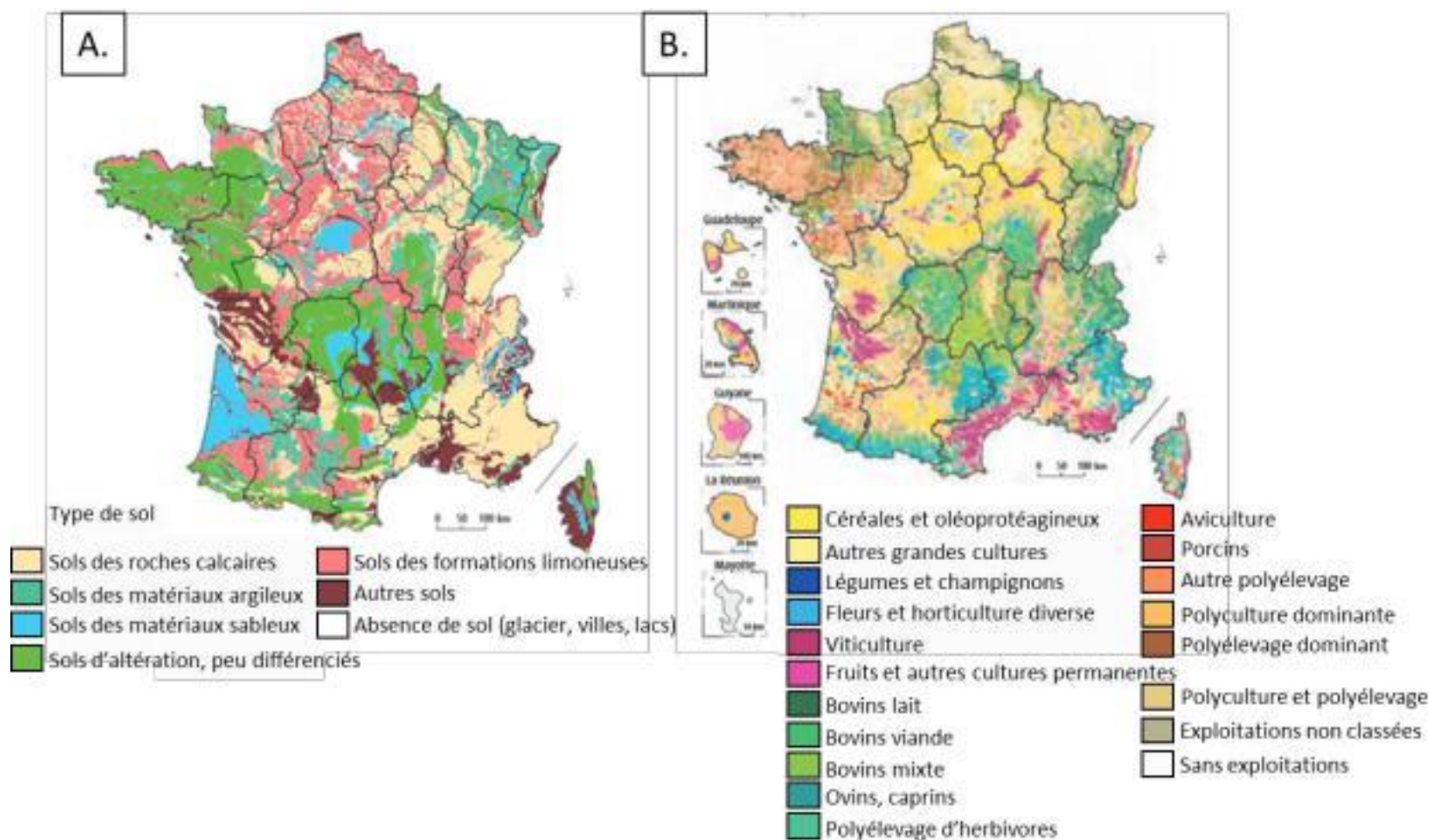


Figure I.3 : Les différents types de sols français et pratiques culturales (d'après CGDD 2015). La carte A représente les différentes textures de sol retrouvées en France. La carte B montre les pratiques culturales du territoire français.

b) Importance des microorganismes dans les sols

Les microorganismes sont les organismes vivants les plus nombreux et les plus diverses du sol : un gramme de sol contient plusieurs millions d'espèces bactériennes et plusieurs centaines de milliers d'espèces fongiques (Schloss and Handelsman 2006). Récemment, dans le cadre du réseau de mesure de la qualité des sols (RMQS), la composition et la diversité microbienne des sols français ont été déterminées par séquençage d'amplicons du gène codant l'ARN ribosomique 16S pour les bactéries et de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique pour les champignons obtenus par PCR à partir d'ADN extrait directement du sol. L'hétérogénéité de la répartition spatiale de la richesse bactérienne, estimée par le nombre de taxons bactériens identifiés (**figure I.4**), est expliquée en majorité par les propriétés physico-chimiques du sol considéré et également par le mode d'usage du sol (vignes, forêts, cultures ou prairies) (Terrat *et al.*, 2017).

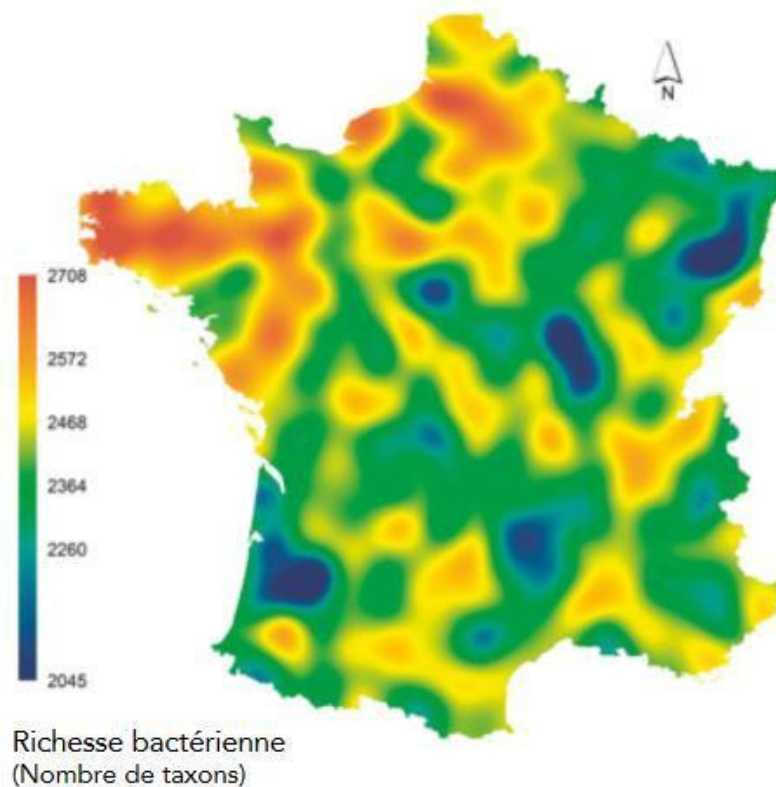


Figure I.4 : Nombre de taxons bactériens dans les sols français (tirée de Terrat *et al.*, 2017). Les zones géographiques oranges sont les plus riches en diversité bactérienne alors que les zones géographiques bleues sont les plus faibles.

Devant une si grande diversité taxonomique, il apparaît essentiel de comprendre les interactions qu'entretiennent les microorganismes entre eux et avec leur environnement afin de mieux

appréhender les services qu'ils peuvent rendre aux écosystèmes : c'est le but de l'écologie microbienne (**figure I.5**) (Barton and Northup 2011; Graham *et al.*, 2016).

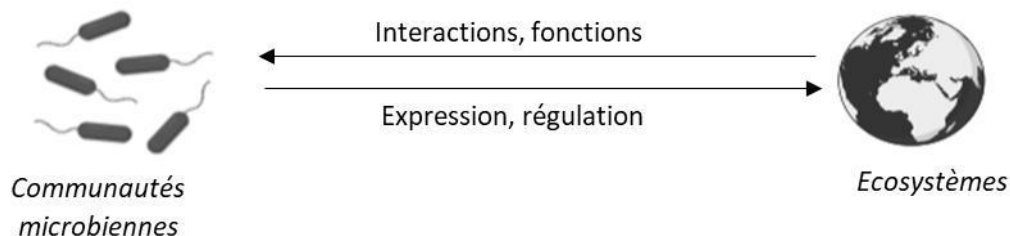


Figure I.5 : Relations entre communautés microbiennes et écosystèmes (adaptée de Ghiglione *et al.*, 2016).

Un microorganisme ou individu vit au sein d'une population, c'est-à-dire un groupe d'individus apparentés à la même espèce. Les populations microbiennes occupant un même habitat sont appelées « communautés » (Friedrich 2011). L'ensemble des microorganismes vivant dans le sol forme la communauté microbienne du sol. Dans cette communauté, chaque individu au sein de chaque population va avoir un rôle et contribuer à remplir une fonction écologique. C'est la diversité de ces fonctions, ou diversité fonctionnelle, qui va faire le lien entre la biodiversité et les fonctions d'un écosystème. La diversité fonctionnelle est d'ailleurs de plus en plus reconnue comme étant le moteur des services écosystémiques (Escalas *et al.*, 2019). Elle n'est pas toujours corrélée à la diversité taxonomique mais elle soutient une fonction écologique qui est définie comme la capacité d'un organisme (un individu) ou d'un groupe d'organismes (population et/ou communauté) à réaliser une tâche dans le but de servir l'écosystème. Les populations remplissant la même fonction, sans distinction d'espèce, appartiennent à la même communauté fonctionnelle (encore appelée *guilde fonctionnelle*). On considèrera que les communautés fonctionnelles habitant le même écosystème occuperont la même niche écologique, concept qui prend en compte à la fois les conditions nécessaires au maintien des espèces dans l'écosystème mais également leur rôle dans celui-ci (Polechová and Storch 2019). Les bactéries dénitrifiantes sont, par exemple, l'ensemble des bactéries capables de remplir les fonctions de dénitrification, qu'elles appartiennent au groupe des α -, β -, ou γ -protéobactéries, avec pour point commun de porter les gènes *narG*, *nirK*, *nirS* et *nosZ* codant les sous-unités des enzymes dénitrifiantes transformant les nitrates (NO_3^-) disponibles pour la plante en oxyde d'azote (NO et N_2O), de puissants des gaz à effet de serre contribuant au réchauffement climatique (Braker *et al.*, 2000; Kandeler *et al.*, 2006). La communauté fixatrice d'azote, quant à elle, transforme l'azote atmosphérique (N_2) en nitrate (NO_3^-) ou en ammonium (NH_4^+) pour le restituer aux plantes et ce, grâce à une enzyme appelée *nitrogénase* codée par les gènes *nif* (Masson-Boivin and Sachs 2018).

Cette relation symbiotique s'effectue au sein de nodosités, comme c'est le cas pour les *Rhizobium* en symbiose avec les légumineuses, ou sous forme libre, donnant lieu à une relation moins spécifique, dans le cas de *Azospirillum* (van Rhijn and Vanderleyden 1995; Steenhoudt and Vanderleyden 2000). Ces interactions avec les bactéries permettent aux plantes de survivre dans des environnements pauvres en azote. A la fois essentiel pour les plantes, ce procédé fait partie intégrante du cycle de l'azote, service écosystémique de soutien, illustré dans la **figure I.6**.

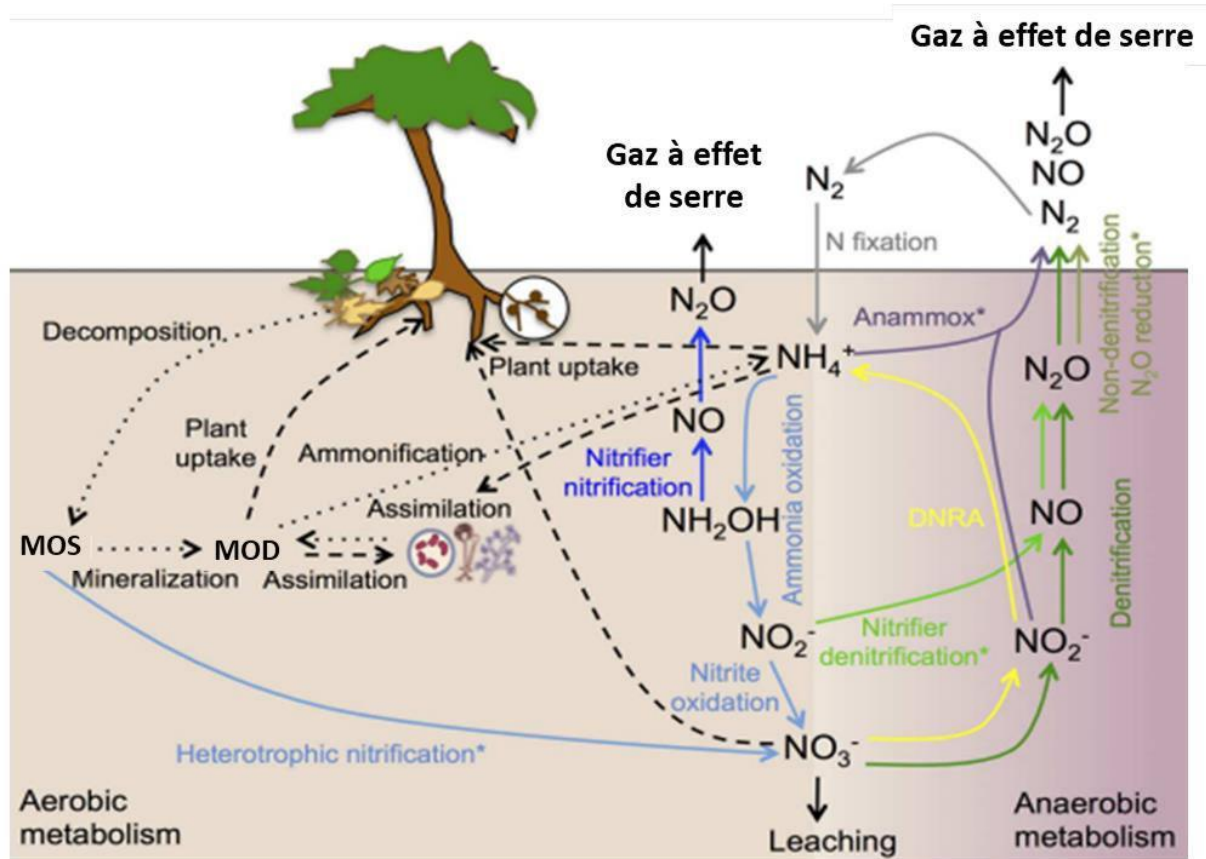


Figure I.6 : Le cycle de l'azote dans les sols (tirée de Pajares and Bohannan 2016). Les flèches en pointillés correspondent aux processus de décomposition et celles en tirets aux processus assimilateurs. Les flèches pleines correspondent aux processus dissimilateurs : gris pour la fixation d'azote, bleu pour la nitrification, vert pour la dénitrification, violet pour l'anammox et jaune pour la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA). MOS : matière organique du sol ; MOD : matière organique dissoute.

Il a été montré que lorsque 75% de la diversité de la communauté bactérienne dénitrifiante était perdue, une baisse de 83% de l'activité dénitrifiante potentielle était mesurable (Philippot *et al.*, 2013). Le cycle de l'azote fait intervenir une série de guildes microbiennes assimilatrices et dissimilatrices et, sans elles, l'équilibre de ce cycle est donc menacé et, par extension, celui de l'écosystème aussi. Afin de comprendre de quelle manière est modifié cet équilibre, certains auteurs ont dressé des hypothèses qui expliqueraient l'effet de la perturbation d'un écosystème sur la diversité

des espèces qui le peuplent et les fonctions écologiques qui y sont associées (**figure 1.7**). Il ne s'agit pas là de considérer qu'une seule hypothèse est vérité mais plutôt le fait que : étant donné le grand nombre de fonctions régies par les microorganismes du sol et leur grande diversité, plusieurs scénarios sont envisageables dans un seul et même écosystème.

- L'hypothèse linéaire (Schulze and Mooney 1994) : le nombre de fonctions d'un écosystème est directement proportionnel au nombre d'espèces qui le constituent. Par conséquent, l'élimination d'une espèce provoque l'élimination de la fonction qu'elle remplit. Chaque espèce fournirait donc un élément clé pour le fonctionnement de l'écosystème.
- L'hypothèse des rivets (Ehrlich 1981) : en fonction du nombre initial d'espèces, appelées « rivets », la perte successive de ces dernières limitera la capacité de l'écosystème à fonctionner correctement. Il existerait donc un seuil de tolérance des écosystèmes qui, lorsqu'il est dépassé, provoque la perte irréversible de ses fonctions.
- L'hypothèse de la redondance (Walker 1992) : elle considère que l'écosystème a un taux de fonctions distinctes qui augmente jusqu'à un niveau déterminé à partir duquel l'addition d'espèces ne représente pas d'augmentation des interactions. Ainsi, puisque plusieurs espèces remplissent les mêmes fonctions, une perturbation de l'écosystème aura un effet sur le fonctionnement de celui-ci mais il sera visible à plus long terme.
- L'hypothèse d'idiosyncrasie (Steele 1991) : elle assume que le fonctionnement de l'écosystème est dynamique et change avec la richesse des espèces qui le constituent. Ainsi, l'effet d'une perturbation serait imprévisible du fait de la variété et la complexité des rôles de chacune d'entre elles.
- L'hypothèse des espèces clés (Mills *et al.*, 1993) : elle soutient que la perte de certaines espèces, voire une seule (notion d'espèce clef de voûte), est suffisante pour changer le fonctionnement de l'écosystème. Les espèces étant fortement liées à un processus écologique, une perturbation pourrait donc engendrer un problème de fonctionnement de l'écosystème voire même un effet « domino » de perte d'espèces et de fonctions.

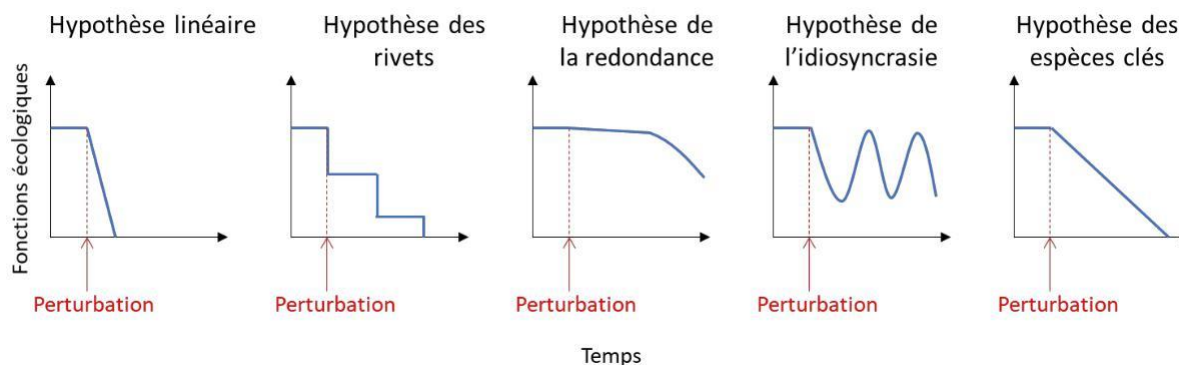


Figure I.7 : Illustration des différents scénarios de l'effet d'une perturbation sur la diversité des fonctions écologiques soutenues par une communauté microbienne. Selon les fonctions soutenues par la communauté microbienne, une perturbation aura divers effets.

Le fonctionnement d'un écosystème dépend donc en grande partie des microorganismes qui le composent, en raison des fonctions écologiques qu'ils soutiennent. Comme évoqué, l'équilibre du sol reste fragile et l'arrivée de perturbations peut donc avoir des conséquences irréversibles sur les espèces qui le composent et, par extension, sur son fonctionnement.

Cependant, le pool de gènes communs d'une communauté microbienne n'aboutit pas nécessairement à la réalisation d'une fonction commune. Lorsque l'on s'intéresse par exemple aux communautés capables de dégrader des polluants tels que les hydrocarbures, la capacité de la communauté à métaboliser ces molécules n'a pas pour but direct de servir l'écosystème et ne peut donc pas être qualifiée de fonction écologique. Cependant, les populations microbiennes impliquées dans la dégradation de ces molécules partagent un pool de gènes de dégradation : elles forment une communauté métabolique. C'est le cas du gène *pcaH*, communément retrouvé chez les bactéries telluriques et impliqué dans la dégradation du protocatechuate, intermédiaire de la dégradation de certains hydrocarbures aromatiques selon la voie métabolique des β -cétoadipates. Les auteurs parlent ainsi de communauté *pca* du sol (El Azhari *et al.*, 2007). Dans cette même voie métabolique, une autre communauté métabolique peut être identifiée : celle des bactéries possédant le gène *catA*, qui lui code une enzyme impliquée dans la première étape de dégradation du catéchol. Une étude a même montré que la communauté *catA* était très abondante dans un sol pollué aux hydrocarbures aromatiques, suggérant que ces polluants favorisaient le développement de cette communauté métabolique (El Azhari *et al.*, 2010). Sur certains sites pollués aux hydrocarbures, un suivi par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) des gènes codant des dioxygénases bactériennes permettant la dégradation de ces polluants a montré que la communauté dégradante pouvait représenter jusqu'à 1% de la communauté bactérienne totale (Cébron *et al.*, 2008).

Les perturbations, qu'elles soient naturelles ou anthropiques, abiotiques ou biotiques, peuvent donc modifier la composition, la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol. Les microorganismes du sol évoluent ainsi dans un milieu complexe soumis à de nombreux stress auxquels ils doivent sans cesse s'adapter.

2) Les communautés microbiennes au temps de l'anthropocène

a) **Anthropocène et utilisation des produits phytosanitaires**

Selon certains géologues, nous sommes désormais dans l'ère de l'anthropocène : l'ère où l'activité humaine joue un rôle prépondérant voire plus important que les phénomènes naturels sur l'évolution de l'environnement à l'échelle planétaire (Corlett 2015). Bien que l'entrée dans cette nouvelle ère, qui mettrait l'Homme au centre de la géologie fasse encore débat, il est évident que le triplement de la population mondiale depuis 1950 nous a obligé à changer nos habitudes de production et de consommation. Nourrir sept milliards d'habitants nous contraint à pratiquer l'agriculture intensive avec une utilisation massive d'intrants. Parmi ces intrants, les produits phytosanitaires (PPs), formulation composée d'une substance active (avec un pouvoir herbicide par exemple) et d'adjuvants (substances renforçant l'action de la molécule active) sont utilisés pour prévenir les maladies des végétaux et contrôler les populations d'insectes (insecticides), de moisissures (fongicides) et de plantes indésirables poussant dans un champ cultivé sans y avoir été intentionnellement installée et entrant en compétition avec la plante de rente, appelées plantes adventices (herbicides). L'Europe est d'ailleurs le continent qui en achète le plus avec 12 milliards de dollars de PPs vendus en 2012 (Science 2013). La France, avec 33 millions d'hectares de surface agricole utile, est l'un des plus gros consommateurs en PPs en Europe derrière l'Italie et les Pays-Bas (CGDD 2018). En 2008, à l'issue du Grenelle de l'Environnement, le ministère en charge de l'Agriculture et de l'Alimentation lance le plan ECOPHYTO1 avec pour objectif de baisser de 50% d'ici à 2018 l'utilisation de PPs. Ce plan s'est avéré être un échec puisque l'utilisation de PPs a augmenté de 20% en moyenne durant cette période malgré les dispositions prises par le gouvernement français. Les ambitions ont donc été revues à la baisse dans le plan ECOPHYTO2 qui a repoussé l'échéance à 2025 (Guichard *et al.*, 2017). Bien que les PPs ne soient pas, à proprement parler, des polluants, leur mauvaise utilisation et/ou leurs résidus peuvent, eux, mener à des phénomènes de pollution. On parlera de :

- Pollution ponctuelle lorsque les bonnes pratiques de l'utilisation des PPs n'auront pas été respectées (ex : déversement sauvage d'effluents phytosanitaires) ou en cas d'accident (ex :

transport). Ce type de pollution est caractérisé par une forte dose de polluant localisée dans un périmètre restreint.

- Pollution diffuse issue de l'application du PP sur les parcelles agricoles et de sa dispersion dans l'environnement. Ce type de pollution est caractérisé par une plus faible dose de polluants mais sur une plus grande surface et un plus grand pas de temps.

Il apparaît donc essentiel de comprendre le devenir dans l'environnement des résidus de PPs et de leurs produits de transformation afin d'appréhender au mieux leur potentiels effets sur les organismes vivants dans les sols et sur les fonctions écosystémiques qu'ils supportent (**figure I.8**).

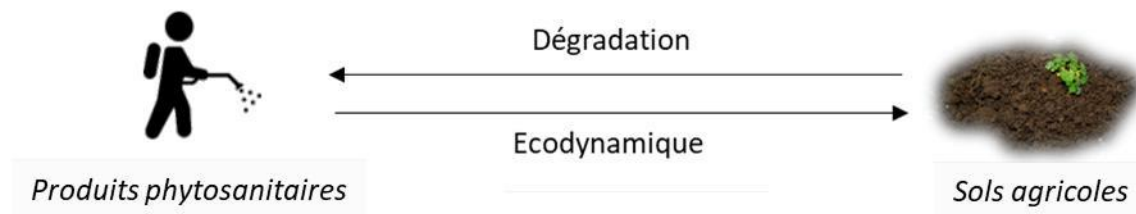


Figure I.8 : Relations entre polluants et écosystèmes (adaptée de Ghiglione *et al.*, 2016).

Parmi les PPs, ce sont les herbicides qui ont l'IFT (indicateur de fréquence de traitement) le plus élevé en France (CGDD 2017). Cet indicateur permet d'observer l'intensité d'utilisation des PPs par culture. Les herbicides représentent environ 70% des PPs commercialisés en France. Etant les plus vendus et les plus utilisés, les résidus d'herbicides sont les plus fréquemment retrouvés dans les sols et, par des phénomènes de ruissellement et de lessivage, se retrouvent respectivement dans les ressources aquatiques de surface et souterraines. Une étude menée au Danemark a révélé que certains herbicides étaient retrouvés jusqu'à $1,1\mu\text{g/L}$ dans les nappes phréatiques (Sjerps *et al.*, 2019). En France, il est encore retrouvé des métabolites de l'atrazine, un herbicide interdit à la vente en 2003, dans les eaux non traitées, à des doses pouvant aller jusqu'à $0,09\mu\text{g/L}$ (Guillon *et al.*, 2019). Cependant, les auteurs soulignent le fait que, une fois l'eau traitée par ultrafiltration et au charbon actif, processus pouvant être employé dans le traitement des eaux, les concentrations en métabolites répondent aux normes européennes concernant la qualité de l'eau. Depuis 1998 et la révision de la directive cadre sur l'eau (European commission 1998), la concentration en résidus d'un PP dans l'eau potable ne doit pas excéder $0,1\mu\text{g/L}$ et $0,5\mu\text{g/L}$ pour un mélange de produits. Ce seuil, fixé à l'époque au seuil de détection du matériel analytique, est maintenant discuté par certains auteurs. Il est par exemple jugé trop bas lorsque comparé aux normes en vigueur aux Etats-Unis ou encore en Australie (Dolan *et al.*, 2013) mais reconnu comme ayant un effet bénéfique pour la santé des européens pour qui 50% de

l'eau consommée provient des eaux souterraines, d'où l'importance de surveiller de près la qualité de cette ressource (Völker and Borchardt 2019; Gunnarsdottir *et al.*, 2020).

La réduction de l'utilisation des PP est un enjeu crucial en matière de santé publique mais également en matière de protection de l'environnement, de nombreux résidus de PP étant retrouvés dans les sols européens (**figure I.9**). L'étude dont est tirée cette figure a analysé 76 résidus de PP dans 317 sols agricoles européens. Quatre-vingt-trois pourcents des sols étudiés présentaient au moins un résidu à des concentrations pouvant aller jusqu'à 2,87mg/kg avec une médiane à 0,15mg/kg de sol (Silva *et al.*, 2019). Les auteurs alertent ainsi sur le fait que la mesure des résidus de PP devrait être un des paramètres pris en compte dans les programmes de phytopharmacovigilance qui ne sont pour l'instant pas inscrits dans la réglementation européenne étant donné l'absence de l'adoption de la directive cadre sur la protection des sols proposée en première lecture à la commission européenne il y a presque 20 ans. Le dispositif de pharmacovigilance a pour but de suivre les effets indésirables des PP déjà commercialisés et entre donc dans le cadre de l'évaluation du risque *a posteriori*, qui permet de surveiller les effets indésirables des PP sur les êtres vivants mais également dans les différents réservoirs eau, air et sol (European commission 2010). Le fait que ce dispositif soit encore au stade de projet de recherche en ce qui concerne le compartiment « sol » montre une difficulté d'évaluation du risque *a posteriori*. L'évaluation *a priori* du risque de la matière active est effectivement préférée pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché des PP *via* des études toxicologiques menées sur des organismes modèles. Une étude toxicologique s'intéresse à tester l'effet du PP à l'échelle d'un organisme et, par extrapolation, à tirer des conclusions quant au possible effet de ce PP sur l'environnement dans lequel vit cet organisme (Kroll 2009). Une étude écotoxicologique inclura la dimension environnementale dans le test en échantillonnant directement dans les compartiments environnementaux (Valavanidis and Vlachogianni 2017). Dans les réglementations européennes, la distinction entre ces deux types de tests n'est pas clairement précisée (CSTEE 2000). La commission européenne liste un panel d'organismes pouvant servir d'indicateurs de l'écotoxicité des PP sur les écosystèmes aquatiques mais ces tests sont, par définition, des tests de toxicité puisqu'ils ne tiennent compte que de l'organisme, isolé de son environnement (Directive 91/414/EEC). Parmi ces organismes modèles, le crustacé *Daphnia magna* est sensible à un large panel de composés organiques, dont des PP (Wogram and Liess 2001). Cet organisme fait l'objet de tests de toxicité aiguë et/ou chronique afin de représenter au mieux, selon les recommandations de l'OCDE, les pollutions ponctuelles et/ou diffuses qui peuvent

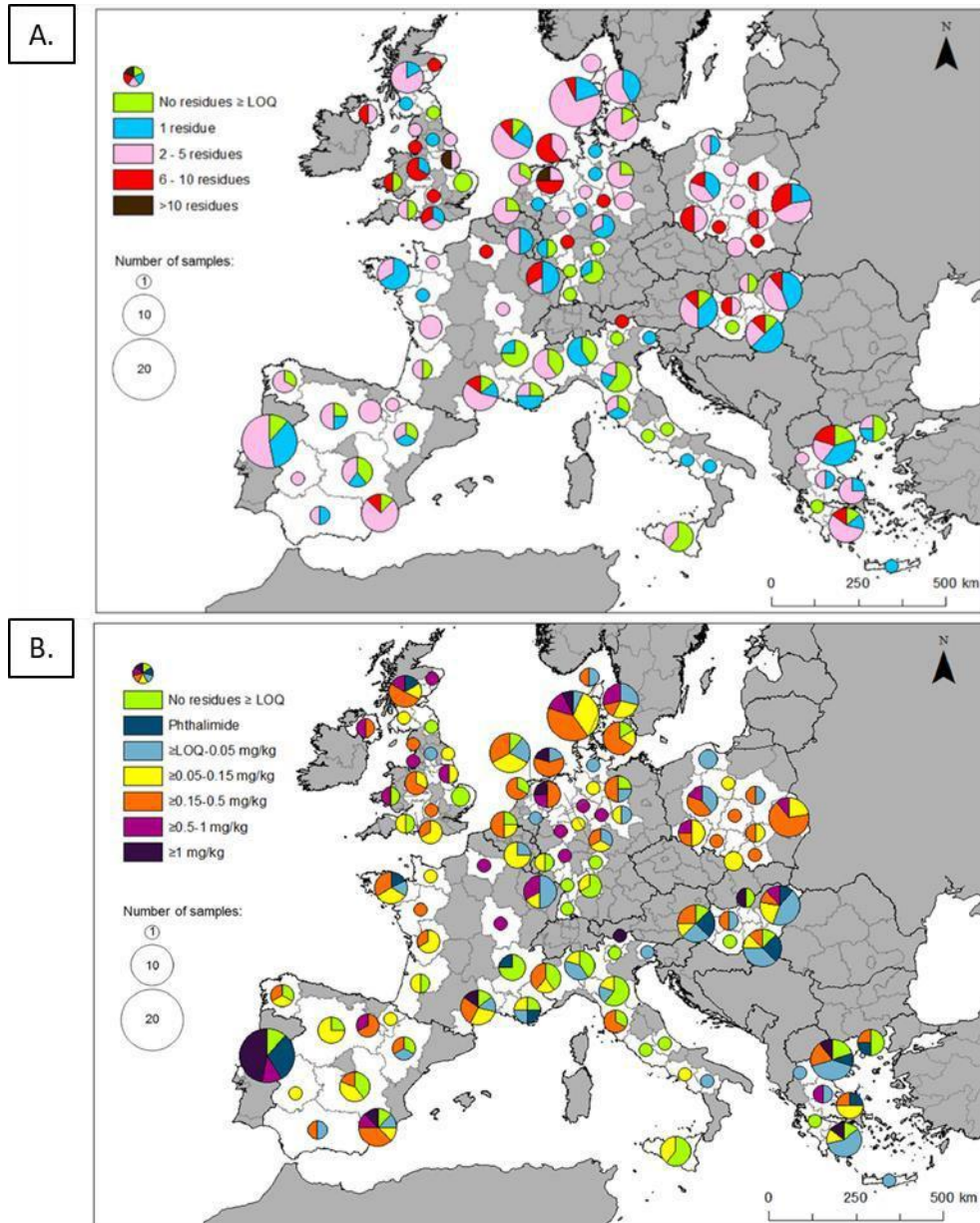


Figure I.9 : Nombre (A) et concentrations (B) de résidus de produits phytosanitaires retrouvés dans les sols européens (tirée de Silva *et al.*, 2019). Sur la carte A, le graphique circulaire représente la proportion d'échantillons de sol avec 0, 1 ou plusieurs résidus de PP. Sur la carte B, cette proportion est ramenée à la concentration en résidus de PP, tous confondus. En raison de la méthode analytique choisie, la concentration en phthalimide n'a pas pu être déterminée. C'est la fréquence d'apparition de ce composé qui est donc illustrée ici. Sur les deux cartes, la taille du graphique circulaire est proportionnelle au nombre d'échantillons testés.

avoir lieu dans les écosystèmes aquatiques. Une exposition aiguë permettra ainsi de mesurer une dose à laquelle on observe 50% de létalité (DL50) et une exposition chronique durera dans le temps, par exemple, 21 jours pour une exposition à l'herbicide propanil à des concentrations sublétales (Villarroel *et al.*, 2003). De ces résultats devront être tirées des conclusions plus générales quant au possible effet néfaste des résidus de PP sur l'écosystème aquatique. Le métabolite ainsi que sa substance active seront qualifiés de "écotoxicologiquement pertinents" et une concentration où il n'y a aucun effet inacceptable sur les organismes aquatiques devra être définie (Directive 91/414/EEC).

Des organismes modèles sont également utilisés pour les études toxicologiques au niveau du sol. Parmi eux, le ver de fumier *Eisenia foetida* sur lequel les effets des résidus de PP sont régulièrement testés en raison de sa grande sensibilité à diverses substances (Frampton *et al.*, 2006). Les vers de terre sont parmi les invertébrés les plus importants du sol du fait de leur rôle clé au sein de cet écosystème *via* leur mode de nutrition qui permet la décomposition de la matière organique rendant les nutriments plus accessibles aux autres espèces ou encore *via* leur rôle d'ingénieur en construisant des galeries, qui, comme nous l'avons évoqué précédemment, constituent de véritables « hot-spots » pour la vie souterraine (Miglani and Bisht 2019). S'ils sont utiles pour la vie des communautés microbiennes telluriques, la réciproque est aussi vraie : leur microbiote intestinal abrite des espèces capables de s'adapter aux conditions environnementales rencontrées, leur assurant une source d'énergie continue (Liu *et al.*, 2018).

En raison des nombreuses fonctions écologiques qu'elles réalisent, les communautés microbiennes peuvent également être considérées comme acteurs clés de la composante biotique des sols. L'écotoxicologie microbienne aura ainsi pour objectif de tester l'effet des PP et, plus largement, des polluants, sur les communautés microbiennes rencontrées au sein de divers écosystèmes (**figure I.10**).

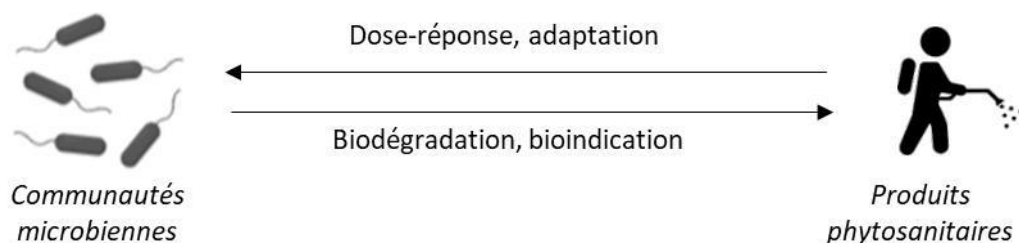


Figure I.10 : Relations entre communautés microbiennes et polluants (adaptée de Ghiglione *et al.*, 2016).

b) L'écotoxicologie microbienne

En écologie, la stabilité est définie comme la capacité d'un système à continuer de fonctionner sous des conditions changeantes (Orwin and Wardle 2004). Face à un stress, la stabilité de la communauté microbienne peut être perturbée. Quatre réponses sont alors possibles (**figure I.11**) : i) un phénomène de résistance permettant à la communauté de répondre à ce stress en maintenant sa composition et ses fonctions ; ii) un phénomène de résilience avec, dans un premier temps, une perturbation de la communauté puis, dans un second temps, un retour à la normale lorsque le stress est levé ; iii) un phénomène de redondance fonctionnelle où, en raison du fait que certaines espèces d'une communauté microbienne remplissent des fonctions similaires à d'autres espèces de cette même communauté, bien qu'une partie de la communauté soit altérée par le stress subi, les fonctions sont maintenues au niveau initial par l'autre partie de la population ; iv) une altération à plus long terme de la communauté, même après la fin de l'application du stress, en raison du fait que cette dernière n'arrive pas à surmonter le stress subi (Shade *et al.*, 2012; Louca *et al.*, 2018). Dans les trois premiers cas, la stabilité de la communauté est maintenue. Toutefois, la résilience de la communauté microbienne peut conduire à un état stable alternatif, différent de l'état initial comme dans le cas d'une altération à long terme.

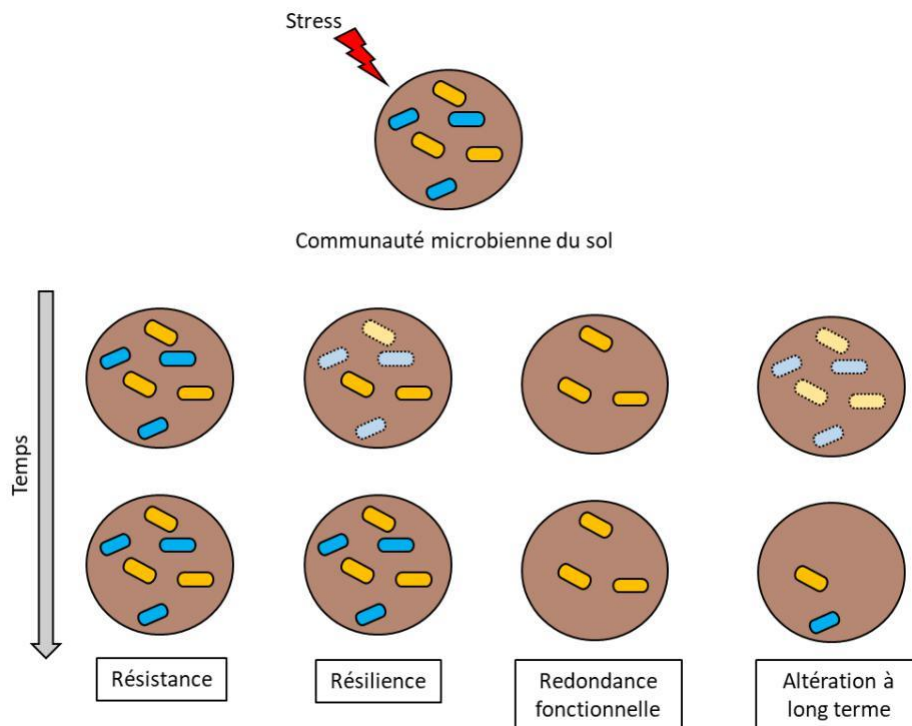


Figure I.11 : Les différentes réponses d'une communauté microbienne face à un stress. A la suite de l'exposition à un stress, la stabilité de la communauté peut être momentanément perturbée, perturbée à plus long terme voire pas du tout perturbée.

Les herbicides et leurs résidus peuvent constituer un stress pour la communauté microbienne induisant différents types de réponse. Certaines populations bactériennes ont su évoluer afin de pouvoir les dégrader selon la voie métabolique et en tirer profit comme nutriments et source d'énergie pour leur croissance. C'est une dégradation faisant appel au métabolisme énergétique de la cellule qui a été mise en place *via* des processus adaptatifs comme l'acquisition de gènes codant les enzymes de dégradation en réponse à des expositions chroniques à ces PP. Un autre type de biodégradation fait intervenir la notion de co-métabolisme qui, elle, ne nécessite pas d'exposition préalable au PP et suppose donc une dégradation plus rapide mais moins spécifique de la molécule par des enzymes dites à large spectre. Ce processus a été décrit entre 1957 et 1996 pour la biodégradation de l'atrazine, un herbicide de la famille des s-triazines largement utilisé sur les cultures de maïs avant que le gouvernement français ne l'interdise en 2003. Sa biodégradation était connue pour être catalysée par le cytochrome P450 et former des métabolites tels que le déséthyl atrazine ou le déisopropyl atrazine (Nagy *et al.*, 1995). Puis, la voie de dégradation métabolique de l'atrazine a été identifiée chez *Pseudomonas* sp. ADP, une bactérie dégradante isolée par l'équipe de Mike Sadowski et Larry Wackett de l'Université du Minnesota (USA). Les gènes *atzA*, *atzB*, *atzC* et *atzDEF* codant les enzymes catalysant la dégradation de l'atrazine sont localisés sur le plasmide conjugatif pADP1, suggérant le possible transfert de la fonction de dégradation de l'atrazine à d'autres bactéries du sol par conjugaison bactérienne (Martinez *et al.*, 2001). Cette hypothèse de transfert a été confirmée par l'étude de Devers *et al.*, (2005) qui a montré le transfert de pADP1 d'une souche donneuse à la communauté microbienne d'un sol cultivé avec du maïs et traité avec cet herbicide (Devers *et al.*, 2005). Par ailleurs, elle a été renforcée par l'isolement, dans divers sols, de 17 souches capables de dégrader l'atrazine et chez lesquelles différentes combinaisons de gènes codant des enzymes impliquées dans la transformation de l'atrazine (*trzN-atzBC*, *atzABC-trzD* et *atzABCDEFG*) ont été retrouvées sur des plasmides ou au niveau de cassettes entourées de séquences d'insertions (Devers *et al.*, 2007). Le maintien de ce pool de gènes étant coûteux pour une seule cellule, plusieurs études rapportent la coopération catabolique de populations bactériennes dégradantes spécialisées dans des étapes clefs de la dégradation de l'atrazine (Smith *et al.*, 2005; Udiković-Kolić *et al.*, 2012). Plus récemment, Billet *et al.*, (2019) ont reconstitué une communauté bactérienne synthétique dégradant l'atrazine et ont montré, *via* une étude d'écologie évolutive, que les populations coopèrent pour partager le coût du maintien de la fonction de dégradation au sein de la communauté dégradante de l'atrazine (Billet *et al.*, 2019). Les phénomènes de détoxification cellulaire peuvent également être considérés comme mécanismes de résistance. Par exemple, *Streptomyces hygroscopicus* possède le gène *bar* qui produit une enzyme capable de réaliser une N-acétylation sur le glufosinate, un herbicide, afin de le rendre inoffensif pour la cellule (Thompson *et al.*, 1987). D'autres mécanismes, similaires à ceux utilisés par la cellule pour résister aux antibiotiques, sont envisagés par certains auteurs comme par exemple la mise

en place de pompes à efflux ou des systèmes de transports actifs qui permettraient à la bactérie de rejeter dans le milieu extracellulaire l'herbicide (Kurenbach *et al.*, 2015).

La résilience de la communauté bactérienne en réponse à l'exposition à un PP peut être observée, lorsque le PP est dissipé, par la mesure de l'abondance, de la composition et/ou de la diversité de la communauté microbienne. Des études en microcosmes ont par exemple mis en évidence un effet du tebuconazole, un fongicide, à des doses agronomiques, sur la diversité des communautés bactériennes au bout de 35 jours d'exposition. A la fin de l'expérience, à 100 jours, les auteurs ont pu observer une résilience de la communauté bactérienne, la diversité étant revenue à son niveau de départ (Storck *et al.*, 2018). Ce même fongicide a également un impact sur le taux de nitrification de la communauté bactérienne nitrifiante du sol. Une étude en mésocosmes a montré une inhibition du taux de nitrification pendant 30 jours suite à une exposition à des doses agronomiques. Cette inhibition était ensuite levée jusqu'à la fin de l'expérience alors que la diversité de la communauté nitrifiante restait altérée tout au long de l'expérience (Muñoz-Leoz *et al.*, 2011). Cette observation illustre le phénomène de redondance fonctionnelle : la diversité reste modifiée mais l'activité mesurée retrouve son niveau de départ suite à l'exposition au fongicide, maintenant ainsi la stabilité de la communauté microbienne considérée.

Cependant, l'effet des PPs sur la stabilité des communautés microbiennes dépend grandement des propriétés physicochimiques du sol et de la matière active dont dépendent son devenir, sa biodisponibilité et ses effets (Griffiths and Philippot 2013). Il apparaît donc essentiel d'intégrer l'écosystème d'intérêt dans l'étude des relations entre les microorganismes et les PPs, comme le propose la représentation conceptuelle de l'écotoxicologie microbienne (**figure I.12**).

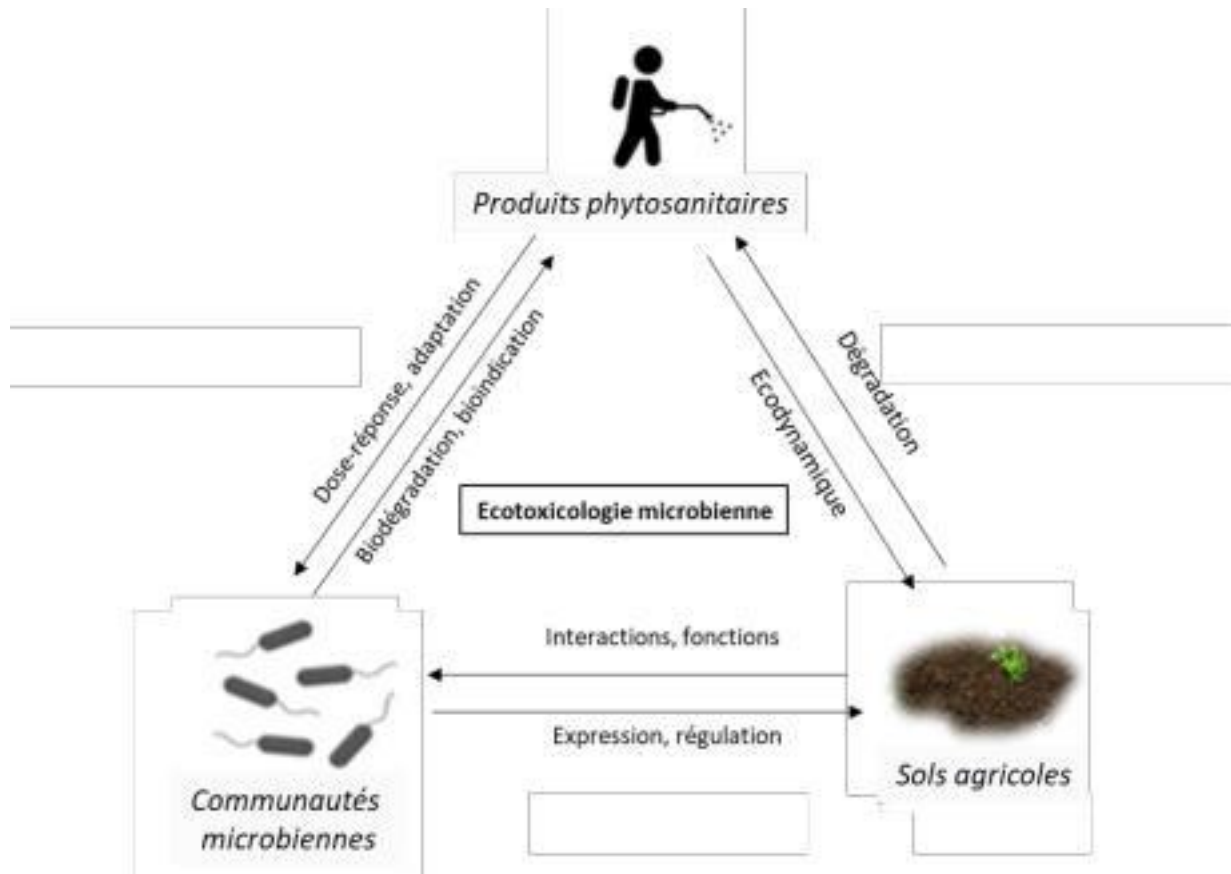


Figure I.12 : Représentation conceptuelle de l'écotoxicologie microbienne (d'après Ghiglione *et al.*, 2016). L'écotoxicologie microbienne étudie les relations entre les communautés microbiennes et les polluants (ici, les PP) en prenant en compte l'écosystème qui les abrite (ici, le sol).

Cette discipline scientifique relativement récente a pour objectifs de : i) étudier les impacts écotoxicologiques de pollutions chimiques ou biologiques à l'échelle des microorganismes et/ou des nombreuses fonctions qu'ils assurent dans l'écosystème ; ii) comprendre le rôle des communautés microbiennes dans l'écodynamique des contaminants (Ghiglione *et al.*, 2016).

L'un des enjeux de cette discipline est de mettre en lumière l'effet de diverses perturbations sur le microbiote peuplant différentes niches de l'écosystème afin de possiblement s'en servir comme indicateurs pouvant révéler l'impact écotoxicologique de différentes perturbations sur les fonctions de l'environnement, bien qu'ils soient, aujourd'hui encore, inconsiderés dans l'évaluation des risques (Pesce *et al.*, 2020).

c) Evaluer l'effet des produits phytosanitaires sur les microorganismes du sol

La directive cadre européenne (EU-Regulation 1107/2009/EC) définit les conditions requises pour obtenir les autorisations de mise sur le marché des PP. Parmi elles, l'industriel doit fournir les éléments nécessaires pour démontrer que la molécule active est efficace et qu'elle n'a pas d'effets inacceptables sur l'Homme mais également sur les écosystèmes aquatiques ou terrestres (European commission 2009). Au niveau des organismes vivants dans le sol, ces effets sont testés par des études écotoxicologiques menées sur différents organismes modèles présentés dans le **tableau I.1**.

Tableau I.1 : Evaluation du risque via les organismes du sol en fonction des recommandations de l'UE (d'après Miyamoto *et al.*, 2011).

Organismes du sol	Tests proposés	Caractère obligatoire du test
Vers de terre	Toxicité aiguë	Obligatoire
	Toxicité chronique (effets sur la reproduction)	Sous conditions
	Tests aux champs	Sous conditions
Microorganismes	Mesure du taux de nitrification et de la minéralisation du carbone	Obligatoire
	Tests aux champs	Sous conditions
Autres macroorganismes	Effets sur la reproduction des collemboles et des mites	Sous conditions
	« Litter bag test » : mesure de la capacité à décomposer la matière organique	Sous conditions

Seuls deux de ces tests doivent être obligatoirement conduits avant la mise sur le marché d'une substance active. Les autres tests seront effectués si les résultats des premiers tests révèlent un effet inacceptable en réponse à l'exposition à cette substance active. Il est à noter que l'ensemble des études écotoxicologiques requises par l'EFSA (European Food Safety Authority) dans l'évaluation du risque *a priori* est réalisée sur la substance active et non sur le PP commercialisé qui comprend, non seulement, la substance active mais également des adjuvants qui permettent une moindre volatilisation du produit ou encore sa meilleure adhérence et absorption par la plante. Bien que les adjuvants entrant dans la composition du PP soient soumis à la directive REACH (European Commission 2006b) et bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché, la liste des adjuvants entrant dans la composition d'un PP reste généralement secrète, impliquant une difficulté à évaluer l'écotoxicité du PP appliqué au champ.

Si l'on regarde plus en détails la liste des tests obligatoires pour évaluer le risque écotoxicologique *a priori* d'une substance active, pour les microorganismes du sol, seules la mesure du potentiel de nitrification ou de la minéralisation du carbone sont requises (OECD 216, 2000; OECD 218, 2004). Dans le détail, au bout de 28 jours post-exposition à la substance active, si la différence entre les sols traités et non traités est supérieure à 25%, les mesures de nitrification ou de minéralisation du carbone sont prolongées pendant 100 jours. Ces tests globaux ne permettent pas de rendre compte de l'écotoxicité des PP sur l'abondance, la diversité et l'activité des communautés microbiennes qui remplissent de nombreuses fonctions soutenant les services écosystémiques rendus par les sols (Martin-Laurent *et al.*, 2013; Karpouzas *et al.*, 2016). C'est dans ce contexte que l'EFSA a souligné l'importance de définir de nouveaux objectifs spécifiques de protection pour préserver les services écosystémiques des sols agricoles (EFSA 2010). Les microorganismes, classés comme organismes non-cibles par la réglementation européenne, par opposition aux organismes cibles à éradiquer par le PP (European commission 2009), doivent être protégés en raison de leur importance écologique au sein de l'écosystème sol.

Dans leur revue, Imfeld et Vuilleumier se sont intéressés aux différentes méthodes disponibles pour mesurer l'effet des PP sur les communautés microbiennes (Imfeld and Vuilleumier 2012). Exit les méthodes « culture-dépendantes », place aux méthodes « culture-indépendantes ». Parmi elles est citée la méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) (**figure I.13**).

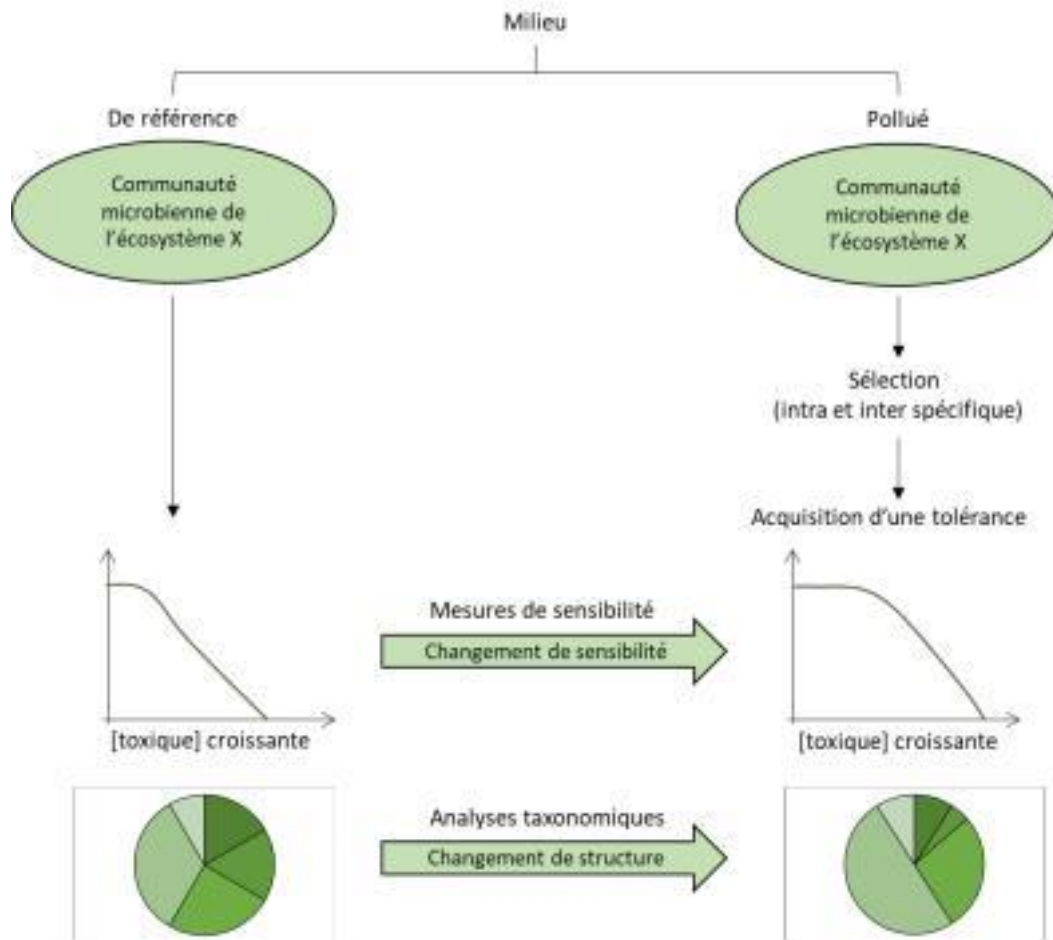


Figure I.13 : Principe de la méthode PICT (tirée de Bérard *et al.*, 2016). Une communauté microbienne issue d'un milieu pollué sera moins sensible qu'une communauté n'ayant jamais rencontré le polluant.

Cette méthode suggère que l'exposition à un composé toxique sélectionnera les organismes les plus tolérants et/ou la mise en place de systèmes de détoxification au sein d'une communauté et que, la communauté résultante de cette exposition aura une tolérance supérieure face au composé toxique déjà rencontré par rapport à la communauté initiale. C'est la différence de réponse, au niveau structurel par exemple, entre les deux communautés, qui sera mesurée et donnera une indication sur la potentielle exposition préalable des communautés échantillonnées au composé toxique considéré (Pesce *et al.*, 2010). Cette méthode se révèle utile pour évaluer les effets à long terme des herbicides sur les communautés microbiennes (Larras *et al.*, 2016). Avec l'avènement des techniques de métagénomique, sont également suggérées la mesure de l'abondance (par PCR quantitative ou qPCR), de la composition et de la diversité (par séquençage haut-débit de marqueurs phylogénétiques) des communautés microbiennes pour évaluer l'effet de leur exposition à un PP précis (Imfeld and Vuilleumier 2012). Cependant, ces études suggèrent la mise en place de contrôles non traités afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur les environnements (microcosmes de sol par exemple) exposés aux PPs. Or, ces contrôles non traités s'avèrent parfois difficiles à mettre en place lorsque l'on

travaille sur le sol compte tenu de tous les paramètres physico-chimiques pouvant influencer l'abondance, la composition et la diversité des communautés microbiennes. L'idéal étant de définir un seuil de normalité (notion de « normal operating range ») propre au paramètre mesuré dans le sol étudié, comme le suggèrent certains auteurs (Inceoglu *et al.*, 2013).

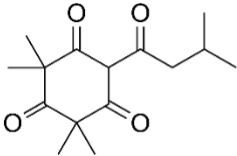
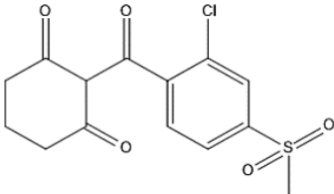
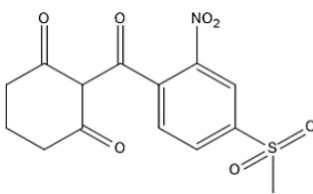
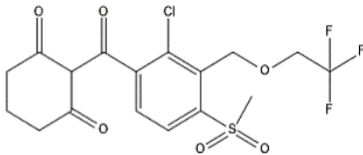
Ces techniques sont largement appliquées pour l'étude de l'impact écotoxicologique des herbicides et ont été partiellement appliquées sur la famille des β -tricétones, cas d'étude qui fait l'objet du prochain chapitre.

3) Impact écotoxicologique des herbicides de la famille des β -tricétones

a) Origine et utilisation des herbicides β -tricétones

C'est en 1977 que des chercheurs de chez Stauffer Chemicals ont remarqué qu'aucune plante ne poussait sous le rince-bouteille *Callistemon citrinus*. Ils ont alors extrait de cette plante une molécule agissant naturellement comme herbicide : la leptospermone (Beaudegnies *et al.*, 2009). Cependant, cette molécule n'a un effet herbicide sur les plantes adventices qu'à une dose d'application élevée (1000 g/ha) et n'est donc pas commercialisable en l'état. Son activité herbicide sera tout de même brevetée en 1980 (Gray *et al.*, 1980). À la suite de cela, de nouvelles molécules dérivées de la leptospermone furent successivement commercialisées. Parmi elles, on compte la sulcotrione, commercialisée en 1993 (Schulz *et al.*, 1993), la mésotrione en 2001 (Mitchell *et al.*, 2001) et la tembotrione en 2003 (Lee *et al.*, 2008) (**Tableau I.2**). Leurs structures chimiques ayant été optimisées pour améliorer leur efficacité, ces herbicides de synthèse sont appliqués à des doses agronomiques variant de 100 à 300 g/ha. Par ailleurs, étant dérivés d'une substance naturelle, ils ont pour réputation d'avoir un faible impact environnemental. Ces deux propriétés font que la sulcotrione et la mésotrione apparaissent dans le top 5 des herbicides les plus vendus en Europe entre 1999 et 2003, la tembotrione n'apparaissant pas encore dans les statistiques (Eurostat 2007).

Tableau I.2 : Caractéristiques de la sulcotrione, de la mésotrione et de la tembotrione : des herbicides β -tricétones.

Molécule	Leptospermone	Sulcotrione	Mésotrione	Tembotrione
Structure chimique				
Nom IUPAC	(2,2,4,4-Tetraméthyl-6-(3-méthylbutanoyl)cyclohexane-1,3,5-trione)	2-(2-Chloro-4-(méthylsulfonyl)benzoyl)cyclohexane-1,3-dione	2-(4-mesyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione	2-(2-Chloro-4-(méthylsulfonyl)-3-((2,2,2-trifluoroéthoxy)méthyl)benzoyl)cyclohexane-1,3-dione
Masse molaire (g/mol)	266,3	324,8	339,3	440,8
Dose agronomique d'application pour le maïs doux (g/ha)	1000	300	150	100
Exemple de formulation commerciale	Non commercialisée	Decano®	Callisto®	Laudis®
Utilisation sur culture de	Non utilisée	Maïs, sorgho, lin textile	Maïs, colza, lin textile, canne à sucre, pavot œillette	Maïs, pavot œillette
Mode d'application	Non appliquée	Pré-levée	Post-levée	Pré- et/ou post-levée

De façon générale, l'impact environnemental d'un PP dépend de son devenir dans l'environnement qui conditionne l'exposition des organismes vivants à ce composé (**figure I.14**). Les mesures de ce devenir et de cet impact sont réalisées de manière systématique et de nouvelles méthodes de mesures sont régulièrement proposés (Pelosi *et al.*, 2017).

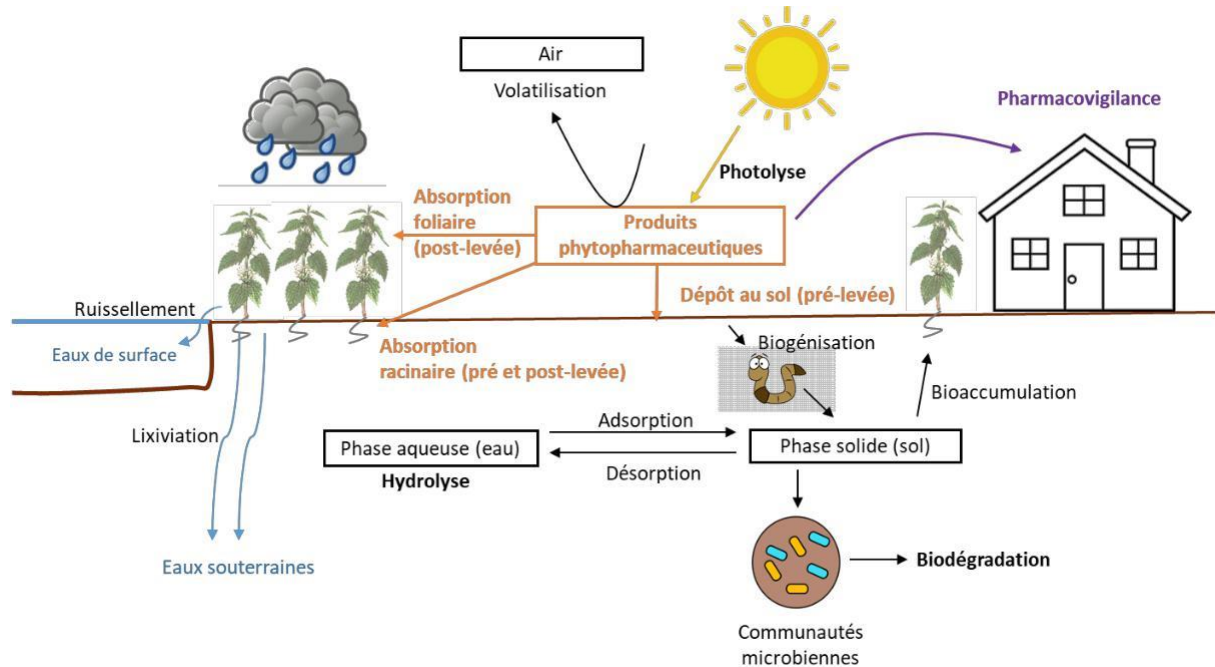


Figure I.14 : Devenir des PP dans l'environnement (inspirée de Romdhane 2016a). Le devenir direct du PP à la suite de son application est montré en orange. Les phénomènes de dégradations abiotique et biotique sont surlignés en gras. La pharmacovigilance, en violet, assurée par l'Anses depuis 2014 permet de surveiller les effets indésirables des PP commercialisés.

Suite à son application, une partie du PP peut être soumise à la dérive sous l'action de la force éolienne et aller se déposer en dehors de la parcelle agricole. Une autre partie peut se volatiliser dans l'air et contaminer l'atmosphère. Dans les environs de Oysonville, zone rurale entourée de champs, ont été retrouvés entre 2006 et 2013 au niveau des champs, à 1km des premières habitations, *via* un échantillonneur d'air, 41 résidus de PPs sur les 58 testés pendant l'étude à des taux sans risques pour la santé de l'Homme (Coscollà *et al.*, 2017). Ensuite, pour les herbicides par exemple, en fonction du mode d'application, ceux-ci vont se retrouver au contact du sol ou être absorbés par les feuilles des végétaux. Un herbicide pré-levée, comme c'est le cas du Decano®, sera appliqué directement sur le sol, avant la levée de la culture, afin de supprimer les plantes adventices dès leur germination. Un herbicide post-levée, comme le Callisto®, sera, lui, appliqué après la levée de la culture, dans une stratégie de rattrapage en présence de plantes adventices dites « difficiles » et sera absorbé par ces dernières. En fonction du type de plante et du métabolisme de cette dernière, des phénomènes de dégradation de la molécule herbicide peuvent déjà entrer en jeu à ce stade et influencer le devenir du

PP (Doublet *et al.*, 2009). Dans les deux cas, par des phénomènes de ruissellement, une partie des résidus des PP peut s'échapper de la parcelle agricole où ils ont été appliqués et se retrouver dans les eaux de surface. En cas de fortes pluies, un phénomène de lessivage peut avoir lieu et entraînera les résidus dans les eaux souterraines ou, dans le cas des parcelles drainées, vers les ruisseaux de drainage puis, vers les cours d'eaux. En fonction des propriétés physicochimiques de la molécule active du PP et du sol, plus ou moins de résidus seront lessivés. Avec un GUS (Groundwater Ubiquity Score) supérieur à 2,8 dans deux sols différents, la mésotrione et la sulcotrione ont un haut potentiel de mouvement vers les eaux souterraines (Chaabane *et al.*, 2008).

Entre le complexe argilo-humique et l'eau du sol ont lieu des phénomènes d'adsorption/désorption. Le temps de dissipation d'une molécule dans le sol peut être estimé en calculant le temps nécessaire pour que sa concentration atteigne 50% de sa valeur initiale : c'est le temps de demi-vie ou DT_{50} . Ce temps dépend non seulement de la molécule mais également des propriétés du sol dans lequel elle est testée. Les phénomènes d'adsorption/désorption sont indirectement reliés à la valeur de la constante de distribution (K_d) et le coefficient de distribution relatif à l'eau et au carbone organique (K_{oc}). Ces données sont mesurées pour toutes les substances actives entrant dans la composition des PP mis sur le marché et font partie de la détermination quantitative de la relation structure-activité (*Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR), modèle permettant de prédire le devenir des PP à partir de leurs propriétés moléculaires (Mamy *et al.*, 2015). Une substance active présentant une adsorption rapide et une désorption lente présentera ainsi une pollution différée dans le temps (Calvet 1989). Comme c'est le cas pour l'atrazine, interdite depuis 2003, mais qui continue de percoler dans l'environnement (Loos *et al.*, 2010). Les valeurs de DT_{50} , de la sulcotrione, de la mésotrione et de la tembotrione dans différents sols sont présentées dans le **tableau I.3** (Dumas *et al.*, 2017).

Tableau I.3 : Devenir des herbicides β -tricétones dans les sols (tiré de Dumas *et al.*, 2017).

	Sulcotrione	Mésotrione	Tembotrione
DT_{50} (en jours)	4 à 144	3,2 à 50	4 à 56
K_d (en L/kg)	0,13 à 5	0,08 à 5	nd
K_{oc}	17 à 144	16 à 183	20 à 131

Ces données montrent en fait que les herbicides β -tricétones ont une affinité modérée pour les sols (Dyson *et al.*, 2002; Chaabane *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2019), ce qui confirmerait leur caractère « eco-friendly », à faible impact environnemental.

Récemment, une étude a montré le rôle des vers de terre dans les processus de transfert du glyphosate vers le sol, suggérant d'intégrer ce phénomène de biogénisation dans l'étude du devenir

des PP dans l'environnement (Yang *et al.*, 2019). La bioaccumulation des PP par les plantes, comme c'est le cas pour l'atrazine qui est accumulée par certaines graminées, ce qui contribue à sa dégradation, est également une notion à considérer dans ces évaluations (Sui and Yang 2013).

Enfin, sont soulignés en gras dans la **figure I.14**, les trois phénomènes principaux entraînant la dégradation des résidus de PP. La photolyse et l'hydrolyse sont des phénomènes de dégradation dits abiotiques » car indépendants des êtres vivants. Le potentiel de dégradation abiotique d'un PP dépend en grande partie du pH du milieu mais également de sa constante d'acidité ou pK_a . Les herbicides β -tricétones étant des acides faibles (pK_a de 2,8 pour la sulcotrione), un pH bas facilitera leur dégradation abiotique (Barchanska *et al.*, 2016). A pH équivalent, la leptospermone, avec un pK_a de 5,4, aura un temps de photolyse plus long que la sulcotrione ou que la tembotrione (Chaabane *et al.*, 2007; Calvayrac *et al.*, 2013; Romdhane *et al.*, 2017). La biodégradation microbienne est le principal mécanisme de transformation biotique des PP dans les sols. Nous verrons dans le paragraphe **3.c** que la biodégradation diffère au sein de la famille des β -tricétones.

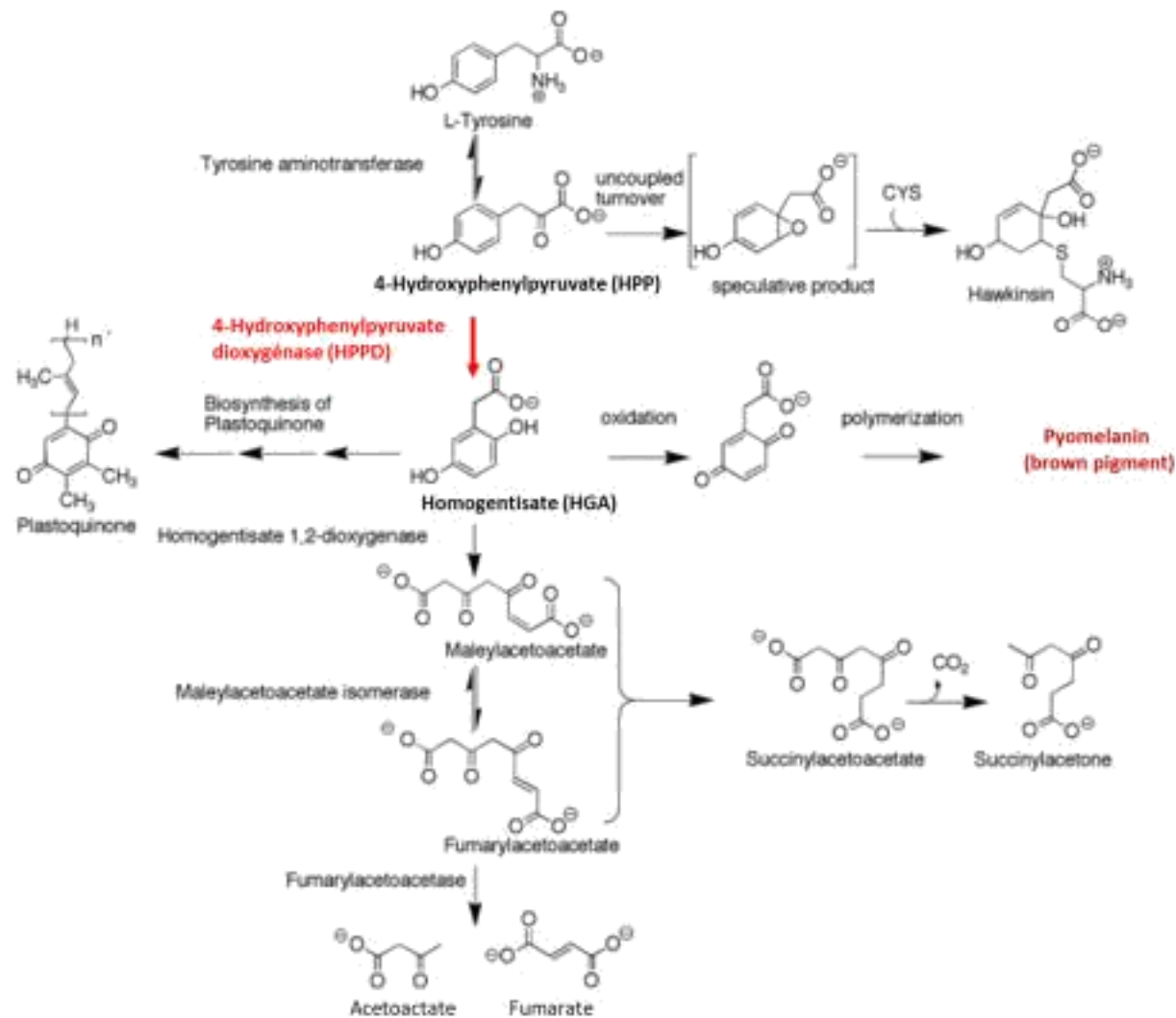


Figure I.15 : Le métabolisme de la tyrosine et l'implication de l'HPPD (tirée de Moran 2005). L'HPPD en rouge, convertit l'HPP en HGA qui entrera dans la voie de biosynthèse des plastoquinones, du fumarate ou de l'acétoacétate.

a) Mode d'action des herbicides β -tricétones

Chez les dicotylédones cibles, les herbicides β -tricétones inhibent la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD ; EC 1.13.11.27), une enzyme impliquée dans le métabolisme de la tyrosine (**figure I.15**). Chez les végétaux, l'HPPD est une oxygénase de 40 à 50kDa à fer non hémique qui convertit le 4-hydroxyphénylpyruvate (HPP) en homogentisate (HGA) *via* une décarboxylation oxydative, une hydroxylation aromatique du HPP et un réarrangement de son groupe carboxyméthyle (Dayan *et al.*, 2007). Une fois synthétisé, le HGA va entrer : i) dans des voies de biosynthèse de l'acétoacétate et du fumarate, deux molécules qui pourront ensuite rejoindre le cycle de Krebs ou le métabolisme du pyruvate (Arias-Barrau *et al.*, 2004) ; ii) dans les voies de biosynthèse de huit pigments différents dont un essentiel au métabolisme des plantes : la phénylquinone. Cette dernière est un cofacteur essentiel à la production de plastoquinones, antioxydants protecteurs des plantes impliqués dans la photosynthèse (Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2019). Les β -tricétones vont agir comme inhibiteur compétitif du substrat de l'HPPD et ainsi entraîner chez les plantes adventices un blocage de la synthèse des plastoquinones. Sans ces molécules protectrices, les plantes sont exposées aux radicaux libres de l'oxygène et la photosynthèse est perturbée : elles blanchissent, se nécrosent et meurent (Dayan *et al.*, 2009).

Les β -tricétones se lient à l'HPPD par chélation de l'ion ferreux présent dans le site actif de l'enzyme (**figure I.16**).

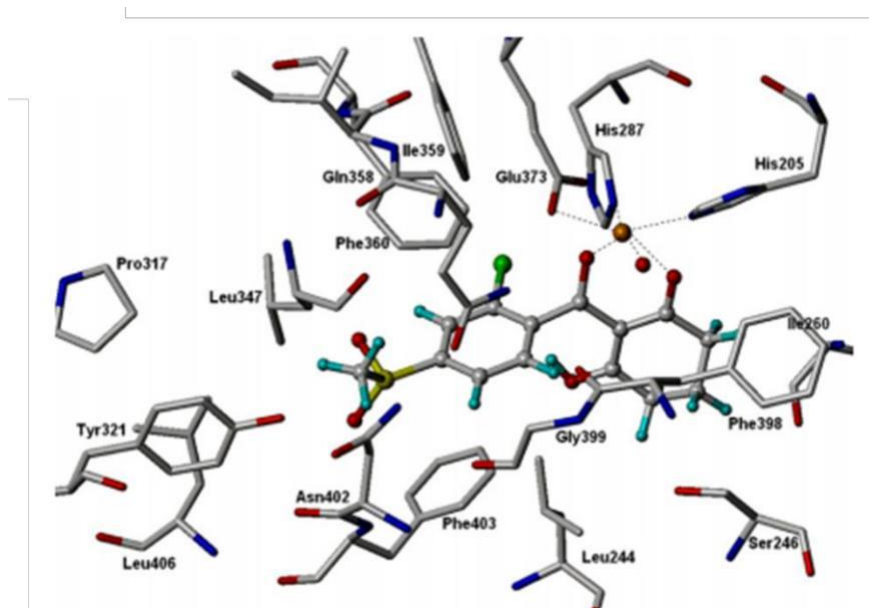


Figure I.16 : Liaison de la sulcotrione au site actif de l'HPPD de *Arabidopsis thaliana* (tirée de Dayan *et al.*, 2007). L'ion ferreux est représenté en orange et sa liaison au site actif de l'enzyme (Glu 373, His287 et His205) est représentée par des pointillés noirs.

Le site actif de l'HPPD (Glu 373, His287 et His205) est d'ailleurs bien conservé parmi les êtres vivants (**figure I.17**).

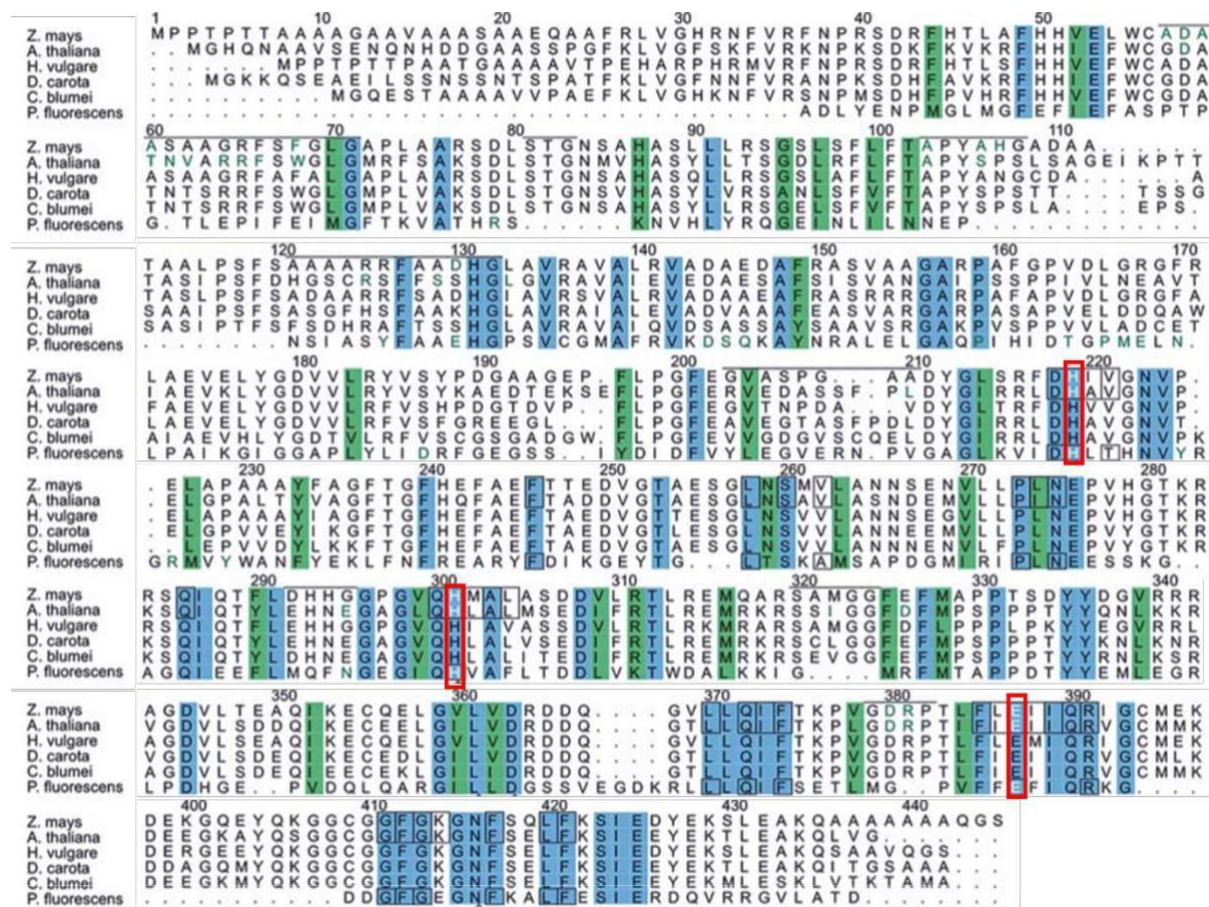


Figure I.17 : Alignements protéiques des HPPDs végétales de *Zea mays*, de *A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota*, *Coleus blumei* et de l'HPPD bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* (tirée de Fritze *et al.*, 2004). Les acides aminés conservés sont surlignés en bleu et ceux surlignés en vert font l'objet de mutations silencieuses. Les acides aminés constituant le site actif de l'enzyme sont encadrés en rouge et sont conservés chez toutes les séquences décrites.

En comparant les structures cristallisées des HPPDs du maïs et de *A. thaliana*, on remarque une conformation particulière de l'HPPD du maïs (**figure I.18**). Couplée à un mécanisme de détoxification métabolique rapide, ces paramètres expliquent la résistance du maïs face aux herbicides β -tricétones (Mitchell *et al.*, 2001).

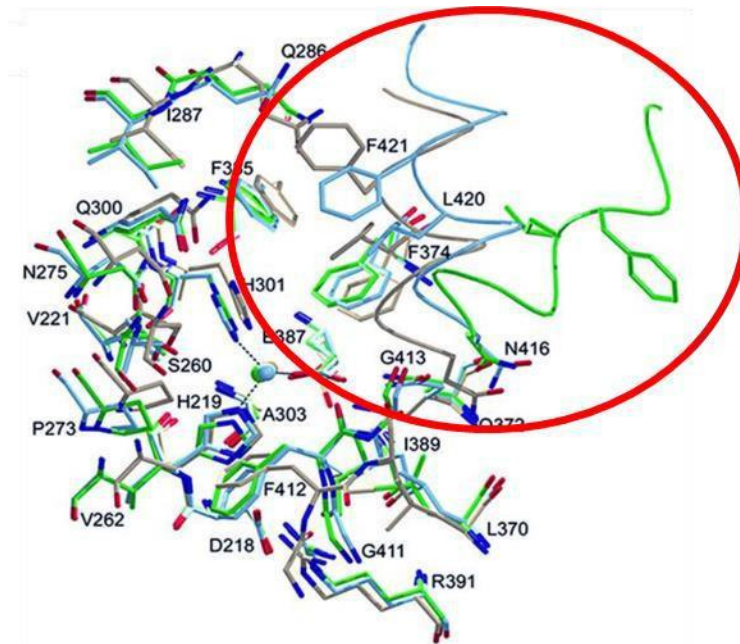


Figure I.18 : Sites actifs de l'enzyme HPPD chez le maïs (*Z. mays* L.), *A. thaliana* et *P. fluorescens* F113 (tirée de Fritze *et al.*, 2004). Le site actif de l'enzyme du maïs est représenté en bleu et celui de *A. thaliana* en vert. On remarque qu'un des feuillets de *A. thaliana* est « ouvert », permettant aux β -tricétones d'accéder au site actif alors que, chez le maïs, il est en position « fermée », empêchant ainsi l'accès au site actif. En gris, est représentée la structure de l'HPPD de la bactérie *P. fluorescens* F113.

Largement décrite chez les plantes en raison de son intérêt « agronomique », l'HPPD est également décrite chez quelques microorganismes. Elle est étudiée chez quelques champignons opportunistes pathogènes de l'Homme en raison de son supposé rôle dans leur virulence. Chez *Aspergillus fumigatus* par exemple, la mélanine, pigment produit par l'HPPD suite à l'oxydation et à la polymérisation de l'HGA, a un rôle protecteur vis-à-vis des peroxydases produites par le système immunitaire de l'hôte, favorisant ainsi la colonisation des poumons des patients infectés par ce champignon (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009). Chez les bactéries, ce rôle protecteur de la mélanine face à un stress oxydatif est également décrit chez *Shewanella oneidensis* MR-1 (Turick *et al.*, 2009). Ainsi, le rôle protecteur de la mélanine pourrait être utilisé pour mettre au point de nouveaux produits liés à la santé humaine tels que des crèmes solaires, des antioxydants ou encore des molécules anticancéreuses et ce, en la faisant produire par des bactéries, à grande échelle (Pavan *et al.*, 2020). Au-delà de l'acquisition de connaissances en écologie microbienne, il existe un intérêt appliqué à s'intéresser à la voie de synthèse de la mélanine bactérienne. La structure de l'HPPD est cristallisée chez la bactérie PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) *P. fluorescens* F113 depuis une vingtaine d'années (Serre *et al.*, 1999) et chez la bactérie *Streptomyces avermitilis* depuis 2004 (Brownlee *et al.*, 2004). Cependant, bien que de nombreuses bactéries possédant l'HPPD soient régulièrement isolées à partir du sol (Lee *et al.*, 2008), seule une poignée d'études s'intéresse aux potentiels impacts écotoxicologiques que pourraient avoir

les herbicides β -tricétones sur ces communautés microbiennes alors même qu'elles supportent des fonctions clefs pour les écosystèmes.

b) Les impacts des herbicides β -tricétones sur les communautés microbiennes

Les herbicides β -tricétones peuvent, d'une part, être utilisés comme source d'énergie et de nutriments pour la croissance de populations microbiennes dégradantes et, d'autre part, avoir des impacts écotoxicologiques sur les microorganismes du sol.

Ainsi, ils peuvent être dégradés par certaines bactéries appartenant à différents genres bactériens. De ces processus de dégradation vont résulter différents métabolites en fonction du β -tricétone considéré : le produit principal de la biodégradation de la sulcotrione est le CMBA, ceux de la mésotrione sont le MNBA et l'AMBA et les formules chimiques de ceux issues de la biodégradation de la leptospermone ont été identifiées (**figure I.19**).

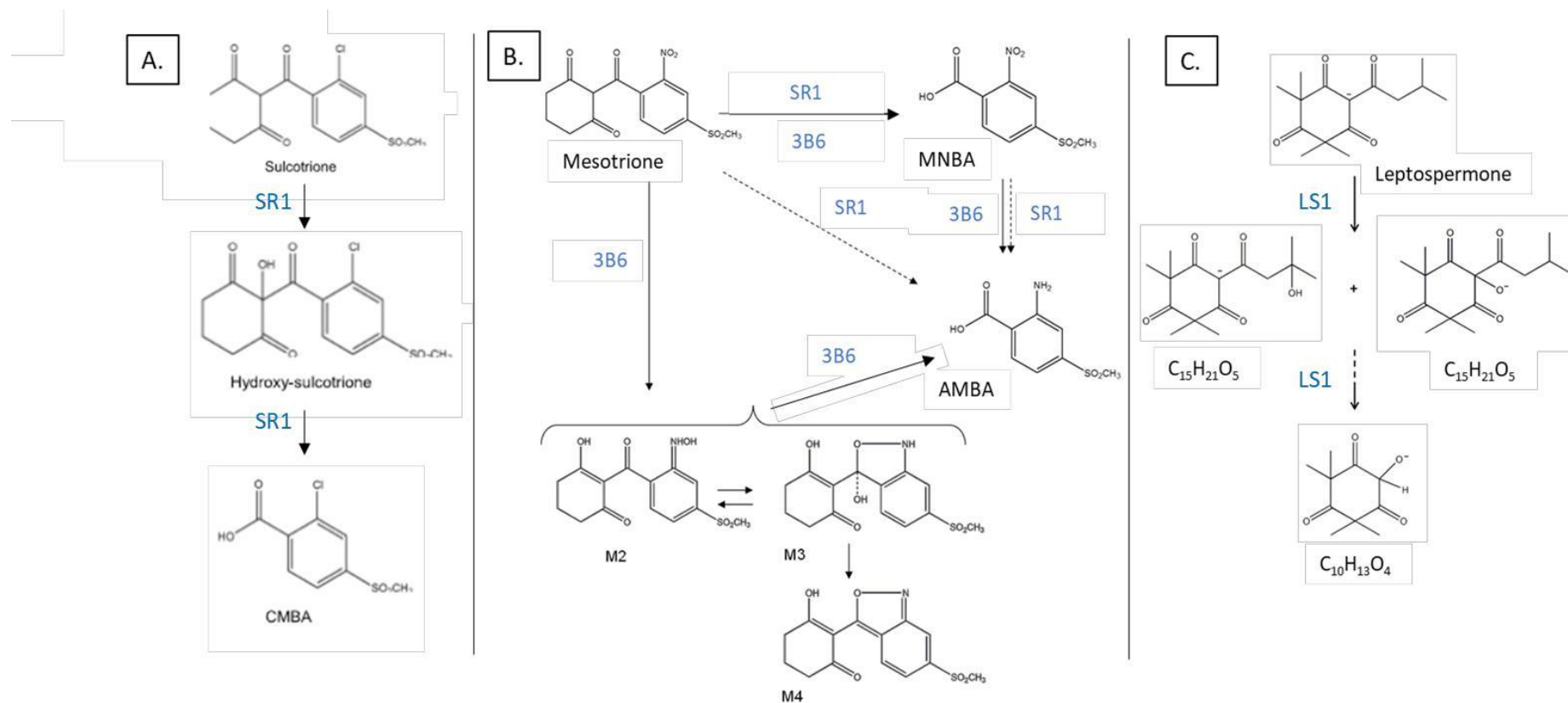


Figure I.19 : Voies de biodégradation des herbicides β -tricétones (d'après Romdhane *et al.*, 2016b; Romdhane *et al.*, 2017). La biodégradation de la sulcotrione par *Bradyrhizobium* SR1 est présentée en A. La biodégradation de la mésotrione est dégradée pr les souches SR1 et *Bacillus* sp. 3B6 est présentée en B. La biodégradation de la leptospermone par *Methylophilus* LS1 est présentée en C.

Par dégradation métabolique, *Pseudomonas putida* 10P, une bactérie isolée de microcosmes de sol traités à la sulcotrione, est capable d'utiliser la sulcotrione comme source de carbone et de le transformer partiellement pour produire du CMBA (Calvayrac *et al.*, 2012). Dans le même sol que celui utilisé par Calvayrac *et al.*, (2012), a été isolée *Methylophilus* LS1, une bactérie capable de dégrader la leptospermone (Romdhane *et al.*, 2017), ainsi que la souche *Bradyrhizobium* SR1. Cette dernière est capable de dégrader la sulcotrione mais également la mésotrione, avec une moindre efficacité cependant (10 jours de plus pour une dégradation complète à dose équivalente) (Romdhane *et al.*, 2016b). Quand une souche peut dégrader à la fois la sulcotrione et la mésotrione, une autre n'est capable de dégrader que l'un des deux composés malgré leurs structures chimiques relativement semblables. C'est le cas de *Bacillus megaterium* Mes11, une bactérie isolée d'un champ de maïs connue pour dégrader la mésotrione mais pas la sulcotrione (Durand *et al.*, 2006; Batisson *et al.*, 2009). Cependant, il a récemment été démontré la capacité de cette souche à dégrader, isolément ou en mixture, deux herbicides de familles différentes et dont les structures chimiques ne sont pas semblables : la mésotrione et le nicosulfuron (Carles *et al.*, 2018). Chez *Escherichia coli* DH5 α , un mécanisme de co-métabolisme est observé avec la glutathion-S-transférase, enzyme à large spectre impliquée dans les mécanismes de défense contre les stress oxydatifs qui joue un rôle dans la séquestration de la mésotrione, cette dernière étant reconnue comme un composé indésirable et géré, de ce fait, comme une espèce réactive de l'oxygène générant un stress oxydatif (Olchanheski *et al.*, 2014) (**figure I.20.A**).

En ce qui concerne leur écotoxicité sur les microorganismes du sol, des premières études en microcosmes ont été réalisées par Crouzet *et al.*, avec une exposition à la mésotrione et au Callisto®, sa formulation commerciale. Il a été démontré lors de ces études que, à des doses équivalant à 10 fois la dose agronomique recommandée, le Callisto® diminue significativement la biomasse des cyanobactéries. Le même effet est observé pour la mésotrione appliquée à 100 fois la dose agronomique recommandée (Crouzet *et al.*, 2013). Une exposition des bactéries aux doses précédemment décrites inhibe transitoirement le processus de nitrification soutenu par ces microorganismes et retarde la stimulation du processus de dénitrification (Crouzet *et al.*, 2016). Ce résultat est soutenu par une autre étude qui confirme, qu'à des doses agronomiques cette fois, la mésotrione a un effet sur l'abondance du gène *amoA*, qui code l'ammonium monooxygénase catalysant la nitrification, une étape clef du cycle de l'azote (Du *et al.*, 2018). Cette même étude a également montré, par des méthodes culture-dépendantes, une modification de l'abondance des communautés bactériennes et fongiques du sol à la suite d'une exposition à la mésotrione. Cette modification était transitoire et un phénomène de résilience a été observé après 20 jours d'expérience (Du *et al.*, 2018). Concernant la sulcotrione, il a été montré par séquençage d'amplicons de l'ARNr 16S,

qu'elle modifiait la diversité de la communauté bactérienne du sol dès la dose agronomique. Cette modification était transitoire et une résilience fut observée après 45 jours d'expérience (Romdhane *et al.*, 2019). Ce phénomène a également été montré sur des microcosmes de deux sols traités à la leptospermone. Sur la communauté bactérienne, il a été observé une modification de l'abondance et de la diversité puis, un retour à la normale lorsque l'herbicide n'était plus présent dans le sol, après 45 jours (Romdhane *et al.*, 2016c) (**figure I.20.B**). Concernant la communauté fongique, en fonction du sol testé et même lorsque l'herbicide était complètement dissipé, un phénomène de résilience était observé dans un sol mais pas dans le deuxième (Mallet *et al.*, 2019) (**figure I.20.C**). Là encore, ces résultats sont variables et dépendent en grande partie du sol considéré.

Finalement, ce cas d'étude montre que les herbicides β -tricétones, réputés faiblement persistants et à faible impact environnemental, peuvent avoir des effets transitoires ou à plus long terme sur la diversité des communautés bactériennes et fongiques du sol. C'est la communauté globale, par séquençage des marqueurs phylogénétiques (Mallet *et al.*, 2019; Romdhane *et al.*, 2019) ou la communauté nitrifiante (Du *et al.*, 2018) qui ont été ciblées dans ces études. A ma connaissance, aucune étude n'a encore testé l'hypothèse d'un phénomène de redondance fonctionnelle au sein des communautés microbiennes à la suite d'une exposition aux herbicides β -tricétones (**figure I.20.D**).

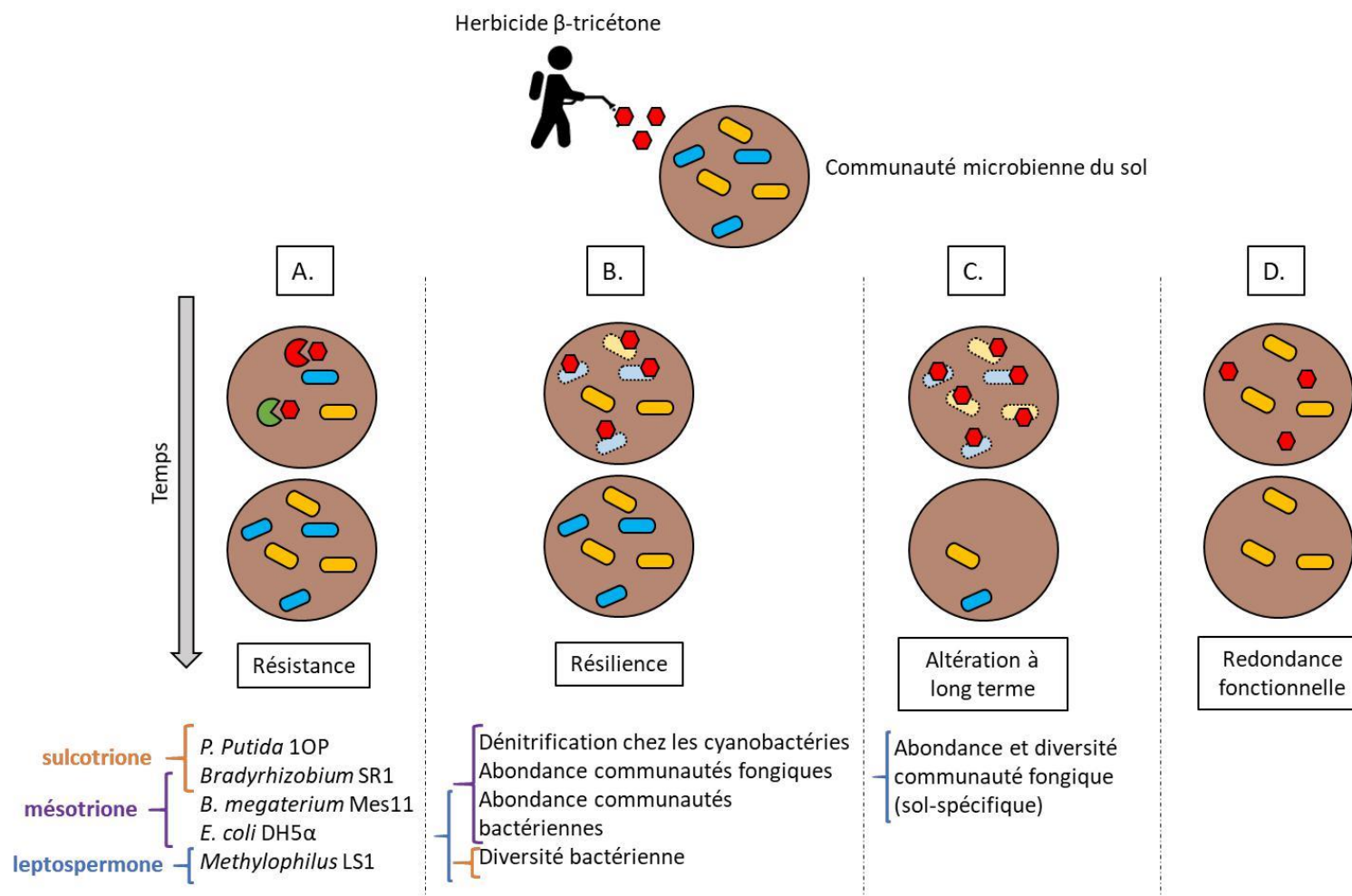


Figure I.20 : Etat des connaissances concernant l'impact écotoxicologique des herbicides β -tricétones sur les communautés microbiennes du sol. Les études réalisées avec la sulcotrione sont encadrées en orange, celles réalisées avec la mésotrione sont encadrées en violet et celles avec la leptospermone en bleu.

Présentation du sujet de thèse

Le devenir et le comportement dans l'environnement des herbicides β -tricétones synthétiques et naturels ont fait l'objet de l'ANR TRICETOX (AAP CESA 2013-2017). Cette collaboration internationale entre Perpignan, Dijon, Clermont-Ferrand et l'équipe du Pr F. Dayan aux USA a permis de mettre en évidence une biodégradation de la sulcotrione, de la mésotrione et de la leptospermone par différents genres bactériens. L'impact écotoxicologique de la sulcotrione et de la leptospermone sur la communauté microbienne du sol a également été estimé par des techniques de PCR quantitative et de pyroséquençage de marqueurs phylogénétiques des communautés bactériennes et fongiques.

Dans la continuité de ce travail et par une approche innovante, mon travail de thèse a consisté à utiliser directement la cible des herbicides β -tricétones et donc, la communauté bactérienne *hpd* du sol, comme marqueur de l'impact écotoxicologique de ces herbicides sur les sols.

Une étude bibliographique, qui fera l'objet du prochain chapitre, m'a permis d'identifier l'intérêt de l'utilisation des gènes bactériens codant les enzymes-cibles des herbicides comme biomarqueurs de l'exposition des sols à ces derniers. Plusieurs types de biomarqueurs, à différents niveaux d'organisation biologique, ont pu être identifiés et ont été intégrés à mon travail de thèse (figure I.21).

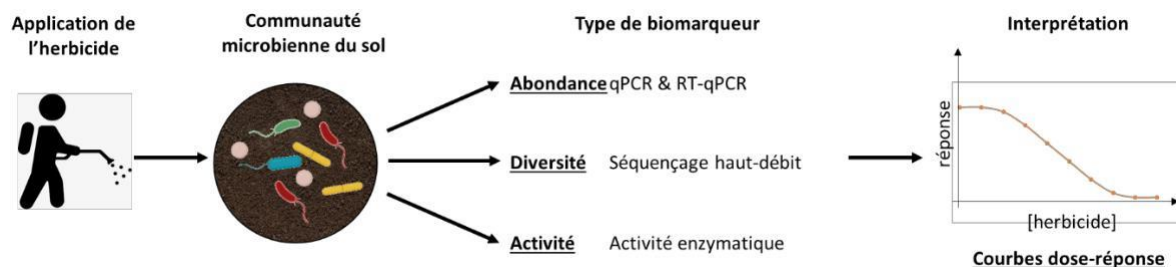


Figure I.21 : Evaluation de l'exposition des sols aux herbicides grâce à l'utilisation de marqueurs microbiens (tirée de Thiour-Mauprivez *et al.*, 2019). Les biomarqueurs peuvent être identifiés à différents niveaux d'organisation. L'abondance et la diversité peuvent être mesurées en prenant en compte la communauté dans son ensemble ou une communauté spécifique. L'activité de l'enzyme ciblée par les herbicides peut aussi être mesurée et constituer un biomarqueur. L'idée étant de déterminer la sensibilité de chaque biomarqueur grâce à l'identification d'une réponse dose-dépendante de ces biomarqueurs.

Afin de construire mon étude, je me suis appuyée sur le format expérimental en trois niveaux d'expositions proposé par Karpouzas *et al.*, 2016 (figure I.22) :

- Un premier niveau visait à déterminer *in vitro* la toxicité des herbicides β -tricétones sur des souches bactériennes pures. Ce travail fait l'objet du chapitre III et expose les différentes réponses de l'activité enzymatique HPPD de six souches bactériennes en réponse à l'exposition à des doses croissantes de sulcotrione, de mésotrione, de tembotrione et de Decano®, le produit formulé de la sulcotrione.
- Un deuxième niveau pour tester le « pire cas » a été mené en microcosmes de sol incubés au laboratoire en conditions contrôlées. Afin de tester l'effet des β -tricétones sur la communauté microbienne *hppd* et déterminer si elle pouvait constituer un bon biomarqueur d'exposition des sols à ces herbicides, nous avons, dans un premier temps, développé un outil moléculaire nous permettant d'avoir accès à l'abondance et à la diversité de cette communauté. Le développement de cet outil fait l'objet du chapitre IV.
- Un troisième niveau a été mené sur des échantillons prélevés aux champs en « conditions agronomiques ». Les deuxième et troisième niveaux sont regroupés au sein du chapitre V du manuscrit. Il s'agit là d'une approche « lab-to-field » avec : i) la simulation par une étude en microcosmes et la détermination *via* le suivi de la dissipation de la sulcotrione du pire scénario d'exposition; ii) un scénario d'exposition réaliste avec la validation de l'outil moléculaire développé sur des champs traités aux herbicides β -tricétones.

Ce travail a été réalisé à la fois au sein de l'équipe projet BAE (Biocapteurs, Analyses, Environnement) de l'Université de Perpignan Via Domitia rattachée à l'USR LBBM et de l'équipe EMFI (Ecologie Microbienne Fonctionnelle pour la gestion des Intrants) de l'UMR Agroécologie de l'INRAE de Dijon. J'ai ainsi pu bénéficier de l'expertise du personnel des deux instituts et me former à la fois en chimie de l'environnement, en biologie moléculaire, en bio-informatique et en microbiologie. Le projet a bénéficié d'un financement de la région Occitanie et d'une bourse FEDER.



Figure I.22 : Organisation des différents axes de la thèse dans ce manuscrit.

Chapitre II : Le gène *hpd* comme biomarqueur des herbicides β -tricétones dans les sols

Résumé de la publication



Figure II.1 Intégration du chapitre II dans l'étude.

Le comité d'action pour la prévention des résistances aux herbicides (HRAC) propose une classification des herbicides basée sur leur mode d'action (**figure II.2** ; <https://hracglobal.com>). Pour la plupart des herbicides, le mode d'action et l'enzyme ciblée sont bien définis. Certaines enzymes cibles ne sont pas uniquement présentes chez les plantes adventices mais sont également rencontrées dans d'autres organismes non-cibles comme les bactéries ou les mycètes. Partant de ce constat, nous avons listé ces cas où les herbicides ciblent une enzyme également présente chez les microorganismes (groupes en rouge sur la **figure II.2**). Un travail bibliographique a permis de mettre en évidence l'effet potentiel de ces herbicides sur des enzymes microbiennes, *a priori*, non cibles.

Pour une des enzymes listées, à savoir, la glutamine synthétase (GS), l'inhibition de ses trois différentes formes existantes chez les bactéries et ciblées par les herbicides du groupe H, comme le glufosinate, n'a, à notre connaissance, pas été testée.

Dans d'autres cas, comme pour l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase), cible des herbicides du groupe A, l'enzyme bactérienne possède un domaine de liaison au zinc que l'enzyme des plantes cibles ne possède pas et n'est, de ce fait, pas inhibée par les herbicides.

Pour une majorité des enzymes étudiées, la sensibilité à l'herbicide dépend de l'isoenzyme considérée. Ainsi, les acétolactate synthases (AHAS) bactériennes sont sensibles aux herbicides du groupe B si elles appartiennent aux types II et III tandis que celles de type I y sont tolérantes. Les 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthases) de classe I, retrouvées à la fois chez les

plantes et chez certaines bactéries, sont sensibles au glyphosate, contrairement à celles de classe II, résistantes et présentes uniquement chez les bactéries. Enfin, la forme HemY de la protoporphyrinogène oxydase (Protox) est commune aux plantes et aux firmicutes et sensible aux herbicides du groupe E, alors que les formes HemG et HemJ, présentes chez les bactéries Gram-négatives, sont résistantes à ces herbicides.

En ce qui concerne les herbicides ciblant des enzymes impliquées dans les mécanismes de photosynthèse (groupes C et D), ils ont un effet sur les photosystèmes I et II des cyanobactéries, dont la structure et le fonctionnement sont identiques à ceux des plantes.

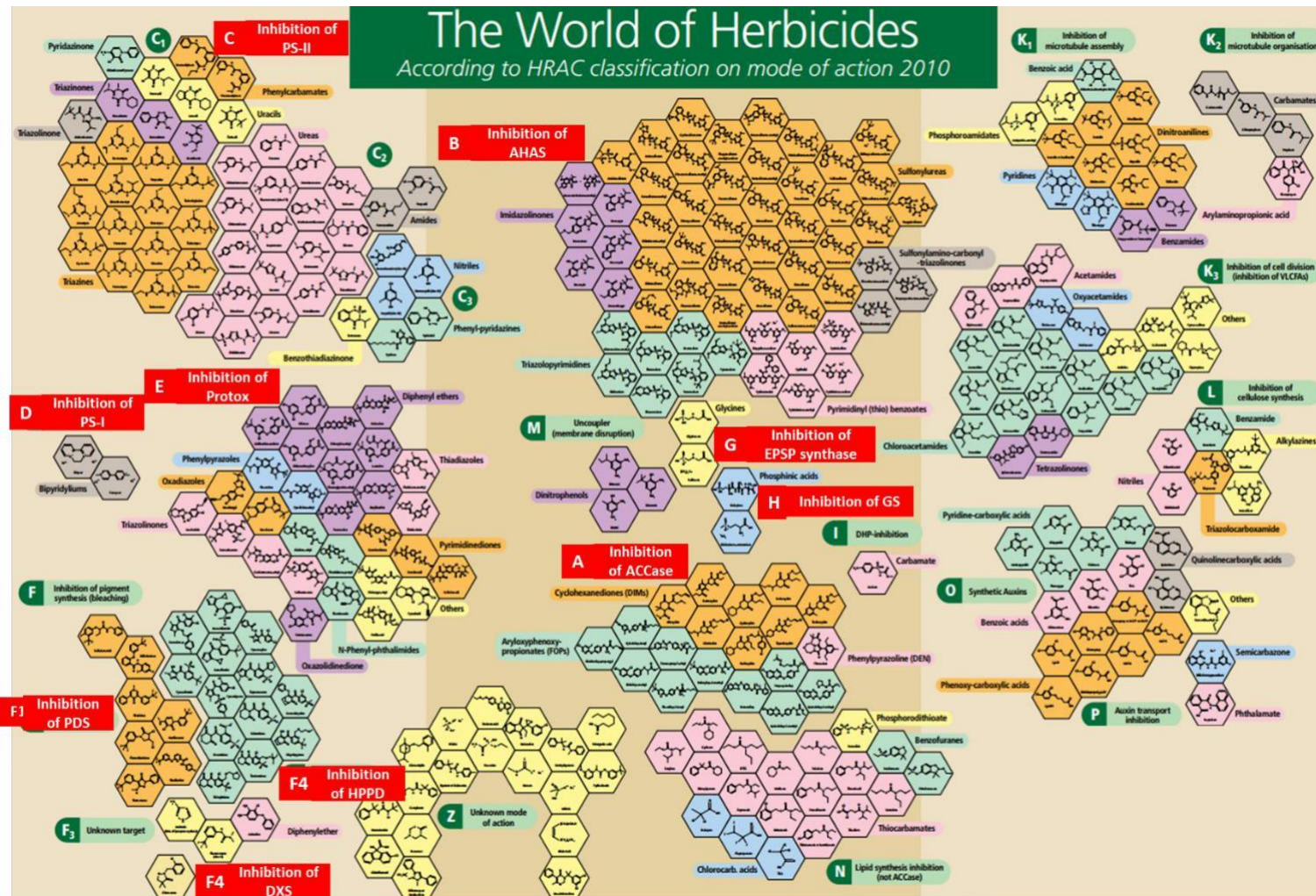


Figure II.2 : Le monde des herbicides selon la classification HRAC (<https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2020-map>). Les familles d'herbicides ayant été intégrées à la revue bibliographique sont surlignées en rouge. PS-II : Photosystème II ; PS-I : Photosystème I ; Protox : protoporphyrinogène oxydase ; PDS : phytoène deshydrogénase ; HPPD : 4-hydroxyphénylpyruvate dioxigénase ; DXS : DXP synthase ; AHAS : acétolactate synthase ; EPSP : 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate ; GS : glutamine synthase ; ACCase : acétyl-CoA carboxylase.

La 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD), cible des herbicides β -tricétones du groupe F2, est peu étudiée chez les microorganismes. Quelques études démontrent la capacité de ces herbicides à interagir avec le site catalytique des HPPDs bactériennes comme chez le modèle *Pseudomonas fluorescens* F113 et rapportent l'inhibition de l'HPPD causée par la sulcotrione chez *Shewanella oneidensis* MR-1 et *Acinetobacter baumannii*.

De même que pour les autres familles d'herbicides, nous avons présenté les études d'écotoxicologie microbienne menées sur les herbicides β -tricétones. Cela nous a finalement permis de soulever la question des mécanismes d'adaptation physiologique, biochimique et génétique mis en place par des microorganismes en réponse à l'exposition aux herbicides tricétones, dès le niveau moléculaire et jusqu'au niveau de la communauté et des interactions qui en découlent ; paragraphe plus exploratoire car peu documenté.

Enfin, nous concluons sur le fait que les microorganismes du sol, considérés comme organismes non-cibles, par la réglementation en cours, portent pourtant, pour la plupart, la cible de nombreux herbicides et pourraient donc être affectés par l'exposition récurrente à ces herbicides et à leurs produits de transformation. Cette étude propose également comme perspective de recherche d'utiliser directement la guildes microbienne portant le gène codant l'enzyme ciblée comme révélateur de l'impact écotoxicologique causé par l'exposition à ces molécules sur les communautés microbiennes du sol.

Cette étude a fait l'objet d'une revue publiée en mai 2019 dans le journal Science of the Total Environment (STOTEN) (doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.230).

Article 1

Science of the Total Environment 684 (2019) 314–325



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Review

Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers?



Clémence Thiour-Mauprivez ^{a,b,c}, Fabrice Martin-Laurent ^c, Christophe Calvayrac ^{a,b}, Lise Barthelmebs ^{a,b,*}

^a Univ. Perpignan Via Domitia, Biocapteurs-Analyses-Environnement, 66860 Perpignan, France

^b Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579 Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

^c AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21065 Dijon, France

HIGHLIGHTS

- Herbicide mode of action is depicted according to the HRAC classification.
- Numerous herbicides target an enzyme found in plants and in microorganisms.
- Possible effects of herbicides on soil microbial communities are described.
- Targeted microbial enzymes are suggested to be used as exposure biomarkers.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2019
Received in revised form 2 May 2019
Accepted 16 May 2019
Available online 20 May 2019

Editor: Yolanda Picó

Keywords:

Non-target microorganisms
Herbicides
Microbial ecotoxicology
Soil microbial communities
Microbial markers

ABSTRACT

Conventional agriculture still relies on the general use of agrochemicals (herbicides, fungicides and insecticides) to control various pests (weeds, fungal pathogens and insects), to ensure the yield of crop and to feed a constantly growing population. The generalized use of pesticides in agriculture leads to the contamination of soil and other connected environmental resources. The persistence of pesticide residues in soil is identified as a major threat for in-soil living organisms that are supporting an important number of ecosystem services. Although authorities released pesticides on the market only after their careful and thorough evaluation, the risk assessment for in-soil living organisms is unsatisfactory, particularly for microorganisms for which pesticide toxicity is solely considered by one global test measuring N mineralization. Recently, European Food Safety Authority (EFSA) underlined the lack of standardized methods to assess pesticide ecotoxicological effects on soil microorganisms. Within this context, there is an obvious need to develop innovative microbial markers sensitive to pesticide exposure. Biomarkers that reveal direct effects of pesticides on microorganisms are often viewed as the panacea. Such biomarkers can only be developed for pesticides having a mode of action inhibiting a specific enzyme not only found in the targeted organisms but also in microorganisms which are considered as “non-target organisms” by current regulations. This review explores possible ways of innovation to develop such biomarkers for herbicides. We scanned the herbicide classification by considering the mode of action, the targeted enzyme and the ecotoxicological effects of each class of active substance in order to identify those that can be tracked using sensitive microbial markers.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Univ. Perpignan Via Domitia, Biocapteurs-Analyses-Environnement, 66860 Perpignan, France.
E-mail address: barthelm@univ-perp.fr (L. Barthelmebs).

Contents

1.	Introduction	315
2.	Herbicide Resistance Action Committee classification: mode of action of herbicides and their potential effects on microorganisms	316
2.1.	Herbicides affecting cell metabolism	316
2.1.1.	Group A: herbicides inhibiting acetyl-CoA carboxylase (ACCase)	316
2.1.2.	Group B: herbicides inhibiting acetohydroxyacid synthase (AHAS)	317
2.1.3.	Group G: herbicides inhibiting 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP Synthase)	317
2.1.4.	Group H: herbicides inhibiting glutamine synthetase (GS)	318
2.2.	Herbicides inhibiting light processes	318
2.2.1.	Group C: herbicides inhibiting photosystem II (PS-II)	318
2.2.2.	Group D: Herbicides inhibiting photosystem I (PS-I)	318
2.2.3.	Group E: herbicides inhibiting Protoporphyrinogen oxidase (Protox)	318
2.2.4.	Group F1: herbicides inhibiting Phytoene dehydrogenase (PDS)	319
2.2.5.	Group F4: herbicides inhibiting DXP synthase (DXS)	319
3.	A well-reviewed case: β -triketone herbicides (group F2) inhibiting 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD)	319
4.	How do microorganisms face stresses caused by herbicides at different levels of organization: from molecular to trophic interactions?	321
5.	Conclusion and further perspectives	322
	Funding	323
	Appendix A. Supplementary data	323
	References	323

1. Introduction

Soil is known as a complex and dynamic biological system, hosting a wide diversity of living organisms, accomplishing various functions such as biogeochemical cycles (Smith et al., 2015) supporting numerous soil ecosystem services such as primary production and water purification (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). A single gram of soil shelters several tens of thousands different species of microorganisms and billions of bacteria (Rosselló-Mora and Amann, 2001). Microorganisms are not only numerous in soil, they are active where they develop keystone functions for the ecosystem such as N-cycling (Philippot and Hallin, 2005). Despite their tremendous importance not only for primary and livestock productions but also for regulatory services such as mitigation of greenhouse gas emission, arable soils are exposed to various anthropogenic pressures including the application of man-made chemicals on crops (Wall et al., 2015). Among chemicals often found in arable soils, pesticides present the originality to be intentionally released in the agroecosystem to ensure the primary production yield and quality. Although pesticides are released on the market only if unacceptable ecotoxicological effects of the active substance on the environment are excluded (EU, 2009), the application of pesticides in conventional agriculture has been identified as a major threat for soil biodiversity and functions (Van-Camp et al., n.d.). Since then, more and more studies report the ecotoxicological effects of pesticides on soil ecosystems showing inhibition of microbial functions, reduction of microbial group abundance, changes in the composition and diversity of soil microbial communities (for review see (Puglisi, 2012)). Despite increasing evidences for pesticide toxicity towards soil microorganisms, the environmental risk assessment (ERA) of pesticides demanded by EFSA (European Food Safety Authority) to the firms to obtain the authorization of commercialization of new active substances, is only including the *a priori* assessment of pesticide ecotoxicity to soil microorganisms via the estimation of the effect of the active substance on N mineralization (OECD 216, 2000). This global test is out-of-date and is not suitable to accurately estimate the ecotoxicity of pesticides on microbial abundance, diversity and activity (Martin-Laurent et al., 2013; Karpouzias et al., 2016). Within this context, EFSA recently underlined the importance to define new specific protection goals with the aim to better protect soil ecosystem services (EFSA, 2010). During this process, soil microorganisms, classified as non-target organisms from the regulatory point of view, have been identified as key-driver to be protected at the level of a functional group. More recently, EFSA has conducted a review addressing the state of the art of ecotoxicological assessment of

pesticides on soil living organisms, including microorganisms. Among them, arbuscular mycorrhiza fungi (AMF), forming an obligate symbiosis with most of the higher plants and being a microbial guild involved in N-cycle, were proposed as potential indicator of pesticide toxicity towards soil microorganisms (Ockleford et al., 2017). In a recent review making the inventory of existing standard methods for the assessment of structural and functional diversity of soil organisms, Römke et al. (2018) suggested that, even if the consideration of AMF and N-related microbial guild in the framework of pesticide ERA can be viewed as an important step further to better protect soil microorganisms, it might not be sufficient enough to reach the specific protection goals on soil ecosystem services. In particular, a specific question is raised on the process responsible of the ecotoxicological effects. Indeed, Karpouzias et al. (2014) showed that the AMF diversity was decreased in response to nicosulfuron exposure but they cannot conclude about the origin of the effect (direct (toxicity in AMF) or indirect (toxicity in the host plant) effect). Similar remark can be done for the microbial guild involved in N-cycle which is complex in nature, being made of different microorganisms (bacteria, fungi and archaea) working in a functional network. Within this context, the measurement of the direct effect on microorganisms could reflect their exposure to pesticide residues in soil. However, it must be kept in mind that extrinsic factors (types of soil and crops, soil pH, temperature, organic matter content as well as microbial activity) and/or intrinsic ones (water solubility, organic carbon-water partitioning coefficient K_{oc} and octanol-water partitioning coefficient K_{ow}) are known to influence the fate of herbicides in soils and that it could modulate their effects on microorganisms (for review see (Dumas et al., 2017)). Direct effect on soil microorganisms can only be monitored in those harboring the active ingredient targets which could constitute innovative exposure biomarkers suitable to detect and measure the effect of a given xenobiotic with its target within an organism (WHO, 1993). Recently, Romdhane et al. (2019) suggested that 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD), the enzyme targeted by β -triketone herbicides and found in all living reigns, could be a good biomarker of exposure to these herbicides.

Within this context, this review aims to scan herbicides applied to crops classified by considering their mode of action in the targeted weeds and their known effects on non-target soil microorganisms. To highlight the interest of developing such biomarkers, a specific focus is done on β -triketone herbicides which present the interest of being natural and/or synthetic origin and which target an enzyme found in all living organisms. The ultimate goal of this review is to identify classes of herbicides that can have an influence on soil microorganisms and

supported soil ecosystem services and to propose new insights to estimate the effects of herbicides towards soil microorganisms by developing innovative microbial markers.

2. Herbicide Resistance Action Committee classification: mode of action of herbicides and their potential effects on microorganisms

In the early 1990s the Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) was created with the support of agrochemical companies in order to predict resistant weed apparition. The HRAC proposes an herbicide classification based on their modes of action (<https://www.hracglobal.com/>). Three main groups of herbicides emerge from this classification: the first one contains herbicides affecting cell metabolism, the second contains those affecting light processes and the last one gathers those affecting growth and cell division (supplementary data, Table 1) and will not be presented in this review because of no known direct effects on microorganisms.

For most of these herbicides, their modes of action are well defined and the targeted enzyme in weeds is known. Biochemical

characteristics of the targeted enzyme, which is characterized by its EC number (BRENDA website, <http://brenda-enzymes.info/index.php>), will be introduced. Interestingly, some of these targets are also present in a range of non-target organisms (*i.e.* other organisms than weeds targeted by the herbicide), including soil microorganisms. In this case, relevant microbial pathways will be underlined and the potential impact of herbicides either on pure culture or on microbial communities will be reviewed, given rise to an ecotoxicological question: do herbicides have an ecotoxicological impact on soil microorganisms?

2.1. Herbicides affecting cell metabolism

Among the seven groups of herbicides identified as cell metabolism inhibitors (Table 1), only A, B, G and H groups, presented below, are known to inhibit bacterial and fungal enzymes.

2.1.1. Group A: herbicides inhibiting acetyl-CoA carboxylase (ACCase)

Acetyl-CoA carboxylase (ACCase; EC 6.4.1.2) catalyzes the first step of fatty acid biosynthesis by carboxylation of acetyl-CoA to produce

Table 1

Herbicides affecting cell metabolism and light processes.

Herbicide utilizations are described for the specific relevant commercialized herbicide mentioned. "Not-approved in EU" means that none of the active substance of the herbicide are authorized anymore.

HRAC group	Mode of action	Chemistry group of the herbicide		Relevant commercialized herbicide ^a (Active ingredient)	Target	Utilization		
A	Cell metabolism	Aryloxyphenoxypropionates (FOPs)		Fusilade Max (Fluazifop-p-butyl)	Acetyl-CoA carboxylase (ACCase; EC 6.4.1.2)	Post-emergence herbicide		
B	Cell metabolism	Cyclohexanediones (DIMs)		Milagro 240 (Nicosulfuron)	Acetohydroxyacid synthase (AHAS; EC 2.2.1.6)	Numerous cultures as citrus		
		Phenylpyrazoline (DENs)				fruits, sugar beet, flax, hop.		
		Imidazolinones				Post-emergence herbicide		
		Pyrimidinylthiobenzoates				Forage and grain maize		
C	Light processes	Sulfonylaminocarbonyltriazolinone		Emblem flo (Bromoxynil octanoate)	Photosystem II (PS-II; EC 1.10.3.9)	Post-emergence herbicide Flax, maize and sorghum		
		Sulfonylureas						
		Triazolopyrimidines						
		Amides	Phenyl-pyridazines					
							Benzothiadiazinones	Triazines
							Nitriles	Triazinones
D	Light processes	Phenyl-carbamates	Uracils	Reglone 2 (Diquat)	Photosystem I (PS-I; EC 1.97.1.12)	Post-emergence herbicide Poppy, potato, banana and grapevine		
		Pyridazinones	Substituted ureas					
		Bipyridylum						
E	Light processes	Diphenylether	Pyrimidindiones	Stratego L (Oxyfluorene, pendimethalin)	Protoporphyrinogen oxidase (Protox; EC 1.3.3.4)	Post-emergence herbicide		
F1	Light processes	N-phenylphthalimide	Thiadiazole	Carat (Flurtamone)	Phytoene dehydrogenase (PDS; EC 1.3.5.5)	Flower garden		
		Oxadiazole	Triazolinone					
F2	Light processes	Pyridiazinone		Callisto (Mesotrione)	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD; EC 1.13.11.27)	Pre- and post-emergence herbicide		
F3	Light processes	Pyridinone		Not-approved in EU ^a	Carotenoid synthesis	Wheat and barley		
F4	Light processes					Post-emergence herbicide		
G	Cell metabolism			Clomastar (Clomazone)	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS; EC 2.2.1.7)	Maize, sugar cane, poppy and flax		
H	Cell metabolism			Round-up (Glyphosate)	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP Synthase; EC 2.5.1.19)	Pre- and post-emergence herbicide		
I	Cell metabolism			Basta F1 (Glufosinate)	Glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2)	Numerous vegetable cultures		
M	Cell metabolism			Not-approved in EU ^a	Dihydropterolate synthase (DHP; EC 2.5.1.15)	Numerous cultures and garden maintenance		
N	Cell metabolism							
Z	Cell metabolism			Oblix 500 (Ethofumesate)	Lipid synthesis inhibition (not ACCase)	Pre-emergence herbicide		
				Flamprop-M-methyl/-isopropyl	Unknown	Sugar beet		

^a Information about approbation of each active ingredient can be found at <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>.

malonyl-CoA (Harwood, 1988) (supplementary data, Fig. 1). ACCase is targeted by cyclohexanedione (DIMs), aryloxyphenoxypropionates (FOPs) and phenylpyrazoline (DENs) herbicides (Rendina and Felts, 1988; Secor and Cséke, 1988; Hofer et al., 2006).

The enzyme is found in all living reigns. However, bacterial ACCase are different from eukaryote ACCase due to the addition of a zinc-binding domain (Bilder et al., 2006). Hence, DIMs, FOPs and DENs herbicides are only able to inhibit the eukaryote-type ACCase (Kukorelli et al., 2013). Darine et al. (2015) have noticed an effect of the herbicide fluzafop-*P*-butyl applied at 1 $\times$ the recommended field rate (FR) dose on soil microbial community richness, highlighting the fact that some potential pathogens were stimulated whereas some Plant Growth Promoting Bacteria were inhibited. Authors also noticed a decrease in the activity of phosphatase, urease and fluorescein-diacetate (FDA), three microbial key enzymes, consequently to the herbicide exposure.

It should be quoted that, these past few years, resistance phenomenon have largely been described and novel ACCase-inhibitors are now actively screened (Ye et al., 2018).

2.1.2. Group B: herbicides inhibiting acetohydroxyacid synthase (AHAS)

Herbicides belonging to sulfonylureas (SNs) and to some others families are known to inhibit acetohydroxyacid synthase (AHAS; EC 2.2.1.6.), also known as acetolactate synthase (ALS) (LaRossa and Schloss, 1984). This enzyme, which exists in plants, fungi, archaea, and bacteria, but not in animals, catalyzes the formation of 2-acetolactate and 2-aceto-2-hydroxybutyrate as the first step in the biosynthesis of the branched-chain amino acids valine, leucine and isoleucine (Lonhienne et al., 2018) (supplementary data, Fig. 2). Microbial AHAS has received considerable attention in the last two decades (Boldt and Jacobsen, 1998; Forlani et al., 1995; Liu et al., 2016). The X-ray crystal structure of AHAS enzymes has been resolved from *Klebsiella pneumoniae* and *Saccharomyces cerevisiae* in 2002 (Pang et al., 2002a; Pang et al., 2002b). Crystal structure of *S. cerevisiae* AHAS with SNs was also elucidated (Pang et al., 2003). Microbial AHAS is composed of two subunits: the catalytic one (around 60 kDa) and the regulatory one (9–35 kDa), that were both crystallized as dimer (Liu et al., 2016). Numbers of microbial *ilv* genes encoding AHAS have been cloned, recombinant enzyme activity have been characterized and inhibition by SN herbicides tested. Among the three isozymes characterized in bacteria, type I, only found in Enterobacteriaceae, is known to be resistant to SN herbicides (McCourt and Duggleby, 2006), whereas the two others (type II and type III) exhibit sensitivity to SNs (Nelson and Duxbury, 2008).

This sensitivity was confirmed by *in vitro* experiments, done with pure culture of several pathogenic bacteria using minimum culture media lacking branched-chain amino acids with various concentrations of SN herbicides. Kreisberg et al. (2013) have shown that chlorimuron ethyl and metsulfuron methyl were the most effective SNs tested, inducing a bacteriostatic effect on *Burkholderia pseudomallei* and *Pseudomonas aeruginosa* strains, with MIC₅₀ around 62.5 μ M on a panel of clinical isolates. The growth of *Acinetobacter baumannii* was only reduced in presence of the same SNs at higher concentration (20 mM). A set of second-generation, newly synthesized SNs, have also been tested on *Mycobacterium tuberculosis* (Wang et al., 2013) and on the pathogenic fungus *Candida albicans* (Lee et al., 2013), also showing inhibitory activity towards AHAS and microbial activity.

SN effects were also investigated on isolated soil microorganisms and revealed that type III AHAS is mainly represented in soil bacterial populations (Boldt and Jacobsen, 1998; Nelson and Duxbury, 2008). Some studies, based on cultural and biochemical approaches, have also investigated changes in soil microbial communities in contact with AHAS-inhibiting herbicides using either the active ingredient (Gigliotti and Allievi, 2001; El-Ghamry et al., 2002; Petric et al., 2016) or the formulated product (Arabet et al., 2014; Rachedi et al., 2018). Depending on the type of SNs and the doses of application that vary from 1 $\times$ to 1000 $\times$ the recommended FR dose, the microbial community

composition was shown to be modified at different extents. Nevertheless, herbicide dissipation rate was not systematically determined in these studies which make the interpretation of the results difficult since SN herbicides are known to be easily degraded (Carles et al., 2017; Carles et al., 2018). A microcosm study was conducted to assess the influence of triasulfuron at three doses (2, 10 and 50 mg.kg⁻¹) on a soil microbial community. Non-cultural methods, coupled to dissipation kinetics of triasulfuron, revealed that only the SN applied at the highest dose significantly decrease soil microbial biomass (Pose-Juan et al., 2017). Arabet et al. (2014) revealed that the application of a formulated mixture of SNs modified the balance between relative species abundances but did not significantly change the overall composition of the soil bacterial community. Similar observations were reported by Rachedi et al. (2018) who focused on Actinobacteria, well known for their aptitude to resist to a range of xenobiotics. These authors hypothesized that resistant bacteria could either possess a modified AHAS, making the SN inactive on cellular division, or were able to degrade the herbicide. Nelson and Duxbury (2008) first performed the study of *ilv* gene diversity in soil bacterial, using degenerated primers designed from 15 *ilv* gene sequences. These primers were also recently applied to screen for *ilv* sequences in SN-tolerant bacterial strains isolated from various soils exposed to nicosulfuron (Petric et al., 2016). Based on 16S rRNA sequence analyses, these SN-tolerant strains were mainly affiliated to the phyla of Firmicutes and Actinobacteria. AHAS amplicons were obtained only for 43.5% of these strains, showing the limitation of the primer pair used which did not provide a complete coverage of *ilv* gene sequence diversity in the selected SN-tolerant strains. Nevertheless, the whole results indicate that repeated exposure to nicosulfuron led to an increase in abundance and diversity of SN-tolerant bacteria.

2.1.3. Group G: herbicides inhibiting 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP Synthase)

EPSP Synthase (EC 2.5.1.19) is a key enzyme in the shikimate pathway in plants (supplementary data, Fig. 3) as well as in fungi and bacteria. This enzyme catalyzes the transfer of an enolpyruvyl moiety from phosphoenolpyruvate (PEP) to the 5-hydroxy position of shikimate 3-phosphate (S3P) leading to the biosynthesis of chorismate and then of aromatic amino acids (Wang et al., 2014).

Microbial EPSP Synthases, encoded by *aroA* genes, have been extensively studied these last three decades since they are potential target for glyphosate, a broad-spectrum herbicide providing a low cost weed control (Amrhein et al., 1980; Marques et al., 2007). EPSP Synthases from class II, which are present in many bacterial species, have a natural tolerance to glyphosate (Wang et al., 2014). This mechanism has been largely described and used for the development of genetically modified crops (Tian et al., 2013). On the contrary, EPSP Synthases from class I, which are found in plants and in some bacteria (e.g. *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*), are inhibited at low concentrations of herbicide, as shown for the EPSP Synthase from *E. coli*, which exhibits a high sensitivity to glyphosate (IC₅₀ 1.6 μ M) (Funke et al., 2009). This class I EPSP Synthase enzyme was characterized as a monomer of 46 kDa, whose 3D structure was obtained for the first time in *E. coli* by crystallographic techniques (Stallings et al., 1991).

Due to the widespread and repeated use of glyphosate, many works, mostly performed on soil microcosms, have looked into its effects on microbial communities. Biochemical, microbiological and molecular analytical methods performed on soil treated with the active ingredient (Sheng et al., 2012; Nivelle et al., 2017) or formulated products (Ratcliff et al., 2006; Mijangos et al., 2009) or with both for a comparison study (Allegrini et al., 2015) revealed that application at FR doses appears to have no or little effect on soil microorganisms while higher rates may stimulate soil microbial activity.

In order to increase the resolution of the changes in microbial community composition in response to glyphosate exposure, modern cultivation-independent methods such as next generation sequencing

(NGS) techniques are nowadays used. Commercial formulations of glyphosate were employed in almost all these recent works and mostly sprayed on plants at once or twice the recommended FR dose. Since soil microbial communities include glyphosate-tolerant, glyphosate-sensitive and glyphosate-degrading guilds, the discrepancies observed between these studies are not surprising. Indeed, while some works have reported negative effects on soil microorganisms (Newman et al., 2016a) such as a decrease in the abundance of the Acidobacteria phylum members (Newman et al., 2016b) or a perturbation of the bacterial association network (Guijarro et al., 2018), some others have shown minimal or no effects in response to glyphosate exposure (Lu et al., 2017; Lu et al., 2018; Schlatter et al., 2017; Dennis et al., 2018). Unfortunately, dissipation of glyphosate was not systematically measured in these studies making difficult to interpret the various responses of the soil microflora to glyphosate exposure.

2.1.4. Group H: herbicides inhibiting glutamine synthetase (GS)

Glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2) converts glutamate and ammonia to glutamine within nitrogen metabolism (supplementary data, Fig. 4). There are three different classes of GS (Kumada et al., 1993): GS-I is specific to bacteria; GS-II is found in eukaryotes and in bacteria belonging to the Rhizobiaceae, Frankiaceae and Streptomycetaceae families; and GS-III is only present in a few bacteria.

Glufosinate-based herbicides inhibit GS due to their structural analogy with glutamate (Hoerlein, 1994). These herbicides are derived from a natural tripeptide called L-phosphinothricin and produced by the bacterium *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987).

At the recommended FR dose, glufosinate was shown to have no effects on the alpha diversity of soil microbial communities (Dennis et al., 2018). However, the herbicide was shown to inhibit GS in the yeast *S. cerevisiae* during wine fermentation process at a concentration of 10 mg.L^{-1} (Vallejo et al., 2017). In the toxin-producer cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, glufosinate high doses (5 to 10 mg.L^{-1}) were shown to inhibit growth while low doses (0.5 to 1 mg.L^{-1}) were promoting cyanobacterial growth and toxin production and thus, may have deleterious effects on water quality and human health (Q. Zhang et al., 2017).

2.2. Herbicides inhibiting light processes

We can find in the group "Light processes", herbicides inhibiting PS-II, PS-I or others pigment synthesis systems (Table 1).

2.2.1. Group C: herbicides inhibiting photosystem II (PS-II)

The first protein complex involved in the photosynthetic light reactions is the photosystem II (PS-I; EC 1.10.3.9). This system, located in the thylakoid membrane of plants, algae and also cyanobacteria, uses light energy to drive the transfer of electrons from water to plastoquinone (PQ) resulting in the production of oxygen and in the release of plastoquinol (PQH_2) (supplementary data, Fig. 5).

Herbicides that target PS-II compete with plastoquinone for binding at the secondary quinone acceptor site (Q_B -site) in the protein D_1 subunit (EC 3.4.21.102) leading to the inhibition of plastoquinone reduction and generation of reactive oxygen species (Broser et al., 2011).

Several authors have studied the effects of these herbicides on cyanobacteria, microorganisms that play a major role in nitrogen and carbon cycles and which are the only group of prokaryotes able to carry out oxygenic photosynthesis. As they share many of the same physiological features with plants, many studies have largely demonstrated that these non-target microorganisms were quite sensitive to these herbicides. For instance, Broser et al. (2011) have demonstrated in *Thermosynechococcus elongatus*, an anoxygenic purple bacteria isolated from thermophilic environment, that terbutryn herbicide (1, 3, 5-Triazine-2, 4-diamine) binds *via*, at least, two hydrogen bonds to the Q_B -site. More recently, Singh et al. (2018) have reviewed the distribution of cyanobacteria and their interactions with pesticides in paddy

fields and revealed that some cyanobacterial forms were sensitive to different herbicides depending on the species studied and the concentration and nature of the herbicide used. These authors have also reported differential responses in the photosynthetic activity due to pigment synthesizing enzymes or due to different modes of action of herbicides that result in an alteration in photochemical activity. In addition, as previously mentioned by Stratton (1987), some studies revealed ecotoxicological differences between the active ingredient and its transformation products. For instance, atrazine (group C) was more toxic than its metabolites towards photosynthesis in *Anabaena inaequalis*, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena variabilis*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda* with EC_{50} values ranging from 0.1 to 0.5 ppm . Regarding effects of ureas on photosynthesis activity of cyanobacteria, Shen and Luo (2011) clearly demonstrated that application of diuron on *Anabaena azollae*, *Anabaena flos-aquae* and *Anabaena azotica*, with dose ranging to 0.001 to 10 ppm exerted an inhibition on photosynthesis mechanisms leading to a lower net photosynthetic rate and a decrease of the chlorophyll *a* fluorescence measurement parameter (Fv/Fm ratio). The same herbicide at 5 ppm was shown to inhibit oxygen production by 75% compared to the untreated control in a naturally occurring atrazine-resistant cyanobacterial isolate (Sajjaphan et al., 2002). A higher oxygen production inhibition of $80\text{--}87\%$ was obtained compared to the control for *A. variabilis* treated with 0.5 ppm of diuron (Sajjaphan et al., 2002; Singh et al., 2011). Nevertheless, effects of PS-II-inhibitors on cyanobacteria seem to be clearly strain-dependent as observed by Deblois et al. (2008) after the exposure of *Synechocystis* sp. and *M. aeruginosa* to diuron and oxadiazon. A decrease in the efficiency of PS-II photochemistry was induced by diuron for both strains, whereas only *Synechocystis* sp. was impacted by oxadiazon.

2.2.2. Group D: Herbicides inhibiting photosystem I (PS-I)

Photosystem I (PS-I; EC 1.97.1.12), the second photosystem in the light-dependent reactions of oxygenic photosynthesis of plants, algae and cyanobacteria, is a multisubunit protein located in the thylakoid membrane that catalyzes the light driven electron transfer from plastoquinin (PQ) to ferredoxin (supplementary data, Fig. 5).

Bipyridylium herbicides belonging to group D, such as hexazinone and diquat, are known to target PS-I by accepting electrons from plastoquinin and by forming a reduced herbicide radical that can then reduce molecular oxygen to form superoxide radicals and generates hydroxyl radicals (Tahmasebi et al., 2018).

Peterson et al. (1997) have studied the exposure of several classes of cyanobacterial isolates to diquat and hexazinone in continuous cultures in chemostats. Strains tested were *M. aeruginosa* PCC 7820 and *M. aeruginosa* UTEX 2063, two unicellular cyanobacteria, *Oscillatoria* sp. UTCC 129 and *Pseudanabaena* sp. F63 belonging to filamentous cyanobacteria and two N-fixing filamentous strain: *Aphanizomenon flos-aquae* F107 and *A. inaequalis* UTEX 381. Interestingly, tested organisms exhibited large differences in sensitivity to both herbicides and all the cyanobacteria tested were much more sensitive to diquat than to hexazinone. Toxicity studies of hexazinone and atrazine, a PS-II inhibitor, with two cyanobacterial strains isolated from freshwater have demonstrated that *Selenastrum capricornutum* was more susceptible to hexazinone than to atrazine while *A. flos-aquae* was more susceptible to atrazine (Abou-Waly et al., 1991). Again, cyanobacterial sensitivity to PS-I inhibitors appears to be strain-dependent.

2.2.3. Group E: herbicides inhibiting Protoporphyrinogen oxidase (Protox)

Protoporphyrinogen IX oxidase (Protox; EC 1.3.3.4) catalyzes the formation of protoporphyrin IX, the last common intermediate for the biosynthesis of heme and chlorophyll (see figure 1 in (Hao et al., 2013)). Three nonhomologous isofunctional Protox enzymes have been identified. Among them, the oxygen-dependent form named HemY, found in plant and also in prokaryotes has also been identified in many aerobic or facultative gram-positive bacteria such as Firmicutes

and in a few gram-negative ones. The second isoform is the oxygen-independent enzyme HemG that was reported in about 20% of gram-negative bacteria, mainly represented by γ -proteobacteria, such as *E. coli* and *Salmonella* and in some cyanobacteria. The third isoform HemJ was identified in several cyanobacteria and many other α - and β -proteobacteria (Kobayashi et al., 2014; Dailey et al., 2017). It is of interest to note that diphenyl-ether herbicides only act as competitive inhibitors of the HemY Protox, as illustrated by studies performed on *Myxococcus xanthus* and *Aquifex aeolicus* HemY activities that were both strongly inhibited by acifluorfen at 1 μ M (Dailey and Dailey, 1996; Wang et al., 2001).

A few ecological studies have been conducted with this class of herbicides. Zhang et al. (2014) have assessed the effects of fomesafen (from 0 to 500 μ g.kg⁻¹) on soil microbial populations by classical Pasteurian approaches relying on plate counting techniques, and also on soil bacterial community structure by DGGE experiments. The authors concluded that fomesafen had no significant toxic effects on soil microbial community structure and activities. To our knowledge, no ecotoxicological study was carried out with Omics methodologies.

2.2.4. Group F1: herbicides inhibiting Phytoene dehydrogenase (PDS)

Phytoene dehydrogenase (PDS) also named phytoene desaturase (EC 1.3.5.5) is the target of herbicides belonging to the F1 family (Sandmann et al., 1991; Sandmann and Kowalczyk, 1989). This is the first enzyme involved in the carotenoid biosynthesis pathway which is the most widespread group of pigments produced in plants as well as in several bacteria and fungi. In plants, PDS is included in a complex multi-component pathway that forms lycopene. PDS converts phytoene into carotene via the intermediate phytofluene, using FAD as co-factor for both steps. Cyanobacteria has the same PDS as plants, whereas a CRTI-type PDS able to catalyze the entire desaturation in a single enzymatic step is expressed in archaea, bacteria and fungi, also using FAD as co-factor (see figure 1 in (Brausemann et al., 1993)) (Sandmann, 2009).

The crystal structure of PDS from the plant *Oryza sativa* was obtained with the herbicide norflurazon, showing the binding between the keto group of the herbicide and the amino group of the conserved arginine residue in position 300 (Koschmieder et al., 2017) and explaining how mutations confer resistance to PDS enzymes, as observed for the cyanobacterial PDS from *Synechocystis* sp. (Martinezferez et al., 1994). Interestingly, despite that the PDS from *O. sativa* has only 22% amino acid sequence similarity and 11% identity with the bacterial CRTI from *Pantoea ananatis*, both enzymes show structural similarities (Brausemann et al., 1993; Schaub et al., 2012). Linden et al. (1991) have expressed 3 PDS bacterial genes from *Erwinia uredovora*, *Rhodobacter capsulatus*, and *Synechococcus* PCC 7942, in *E. coli* and tested the effects of flurtamone upon the desaturation catalyzed by these different enzymes. Whatever the origin of the expressed enzyme, an inhibition was observed in the presence of flurtamone with an average value of about 4 μ M (Linden et al., 1991).

2.2.5. Group F4: herbicides inhibiting DXP synthase (DXS)

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase (EC 2.2.1.7), named DXS and previously known as DOXP synthase, is the starting enzyme of the non-mevalonate DOXP pathways (supplementary data, Fig. 6). This enzyme, characterized in plants and in eubacteria, forms DXP by the condensation of D-glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate. In eubacteria, DXS lies just before the branch point for vitamin B1, B6 and isoprenoids synthesis (Hahn et al., 2001). Determination of DXS structure has been first resolved by crystallization from *E. coli* and also from *Deinococcus radiodurans* (Xiang et al., 2007).

In vitro studies consisting in exposing a DXS from spinach expressed in *E. coli* to the herbicide clomazone and its metabolite 5-keto clomazone, have demonstrated that only the metabolite inhibited the DXS enzyme activity (decrease of 47% at 20 μ M of 5-keto clomazone) (Ferhatoglu and Barrett, 2006). Similar results were obtained with the DXS from the bacteria *Haemophilus influenzae* also expressed in *E. coli*

(Matsue et al., 2010). Nevertheless, a recent study investigated the long term effects of an exposure to clomazone at 1 $\times$, 10 $\times$ and 100 $\times$ the FR dose on soil microbial communities using NGS (P. Du et al., 2018). Microbial diversity and abundance were influenced only in 100 $\times$ FR dose treated samples. Surprisingly, only the dissipation of clomazone was followed during the experimentation while it would have been useful to analyze metabolite formation, especially the one of 5-keto clomazone.

3. A well-reviewed case: β -triketone herbicides (group F2) inhibiting 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD)

β -Triketone herbicides (Table 2) are part of the HRAC F2 group and inhibit the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD; EC:1.13.11.27). These herbicides are based on a natural phytotoxin (*i.e.* leptospermane) produced by the Californian bottlebrush plant *Callistemon citrinus* (Mitchell et al., 2001) and also found in the essential oil of Manuka tree *Leptospermum scoparium* (Dayan et al., 2007). These protection products were qualified as “eco-friendly” by Sidhardhan et al. (2012) and Duke et al. (2010) because of their efficiency at low FR doses: 350 g.ha⁻¹ for sulcotrione and 150 g.ha⁻¹ for mesotrione as compared to 1 kg.ha⁻¹ for atrazine (group C). In Europe, farmers commonly use sulcotrione, mesotrione or tembotrione to control weeds on corn crops, rising them to the top five most used herbicides (EUROSTAT, 2007).

In plants, 4-HPPD is a 50 kDa dimer non-heme iron enzyme which converts 4-hydroxyphenylpyruvate (4-HPP) in homogentisate (HGA) due to oxidative decarboxylation, aromatic ring hydroxylation and carboxymethyl group rearrangement (Dayan et al., 2009). Once HGA is synthesized, tocopherols and prenylquinones biosynthesis is permitted. The latter acts as an essential cofactor for phytoene desaturase (Norris et al., 1995). Phytoene desaturase and prenylquinone allows plant to produce carotenoids, helpful to protect it from light and free radicals (Siehl et al., 2014). Thus, a plant lacking a functional 4-HPPD will bleach, become necrotic and die. By acting as competitive inhibitors of 4-HPPD, β -triketone herbicides ensure a rapid death of undesirable weeds. Although maize harbors a functional 4-HPPD, the latter was shown to exhibit a special conformation that makes it inaccessible to β -triketone herbicides (Fritze et al., 2004). Moreover, corn presents a slower uptake and an enhanced metabolism of mesotrione making it resistant to β -triketones (Mitchell et al., 2001).

In microorganisms, 4-HPPD is tetrameric and is part of the tyrosine degradation pathway, leading to fumarate and acetoacetate, two compounds of the central metabolism (Arias-Barrau et al., 2004) (Fig. 1). This pathway can also produce pyomelanin, a brown pigment resulting of the spontaneous oxidation and polymerisation of HGA. The first HPPD from the fungus reign was characterized by Wyckoff et al. (1995) in the frame of the *trcP* gene study of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. This gene codes for a T-cell reactive protein which elicits a proliferative response of T-cells. Surprisingly, according to the gene and protein sequences, researchers found about 50% amino acid sequence identity and 70% similarity to mammalian 4-HPPD. After being cloned in *E. coli*, the *trcP* gene allowed the bacteria to produce a brown pigment, characteristic of pyomelanin production. In this fungus, 4-HPPD is historically named TRCP due to its role as a T-cell reactive protein. Similarly, Keon and Hargreaves (1998) took an interest in isolating the *hppd* gene of the fungal leaf pathogen *Mycosphaera graminicola* and cloning it into *E. coli*. They also observed the brown pigment production, characteristic of a functional 4-HPPD (Keon and Hargreaves 1998). Working on another fungus, Schmalzer-Ripcke et al. (2009) have shown that, a 4-HPPD mutant in *Aspergillus fumigatus* is highly more sensitive to Reactive Oxygen Species (ROS) than a wild-type strain, raising the fact that pyomelanin acts as a protective agent against peroxides and thiol-oxidizing agents. Therefore, according to the authors, production of pyomelanin allows the airborne fungal pathogen to settle up in patient lungs and to begin the infectious process without being affected

Table 2 β -Triketone herbicides: active ingredients and their relevant commercial formulations.

Active ingredient	Leptospermone	Sulcotrione	Mesotrione	Tembotrione	NTBC
Relevant commercial formulation	Natural extract from <i>Leptospermum scoparium</i> and <i>Callistemon citrinus</i>	Decano®	Callisto®	Capreno®	Medication (tyrosinemia type I)
Utilization	Natural herbicide	Herbicide (maize and flax cultures)	Herbicide (maize, poppy, flax and sugar cane)	Herbicide (maize)	Medication (tyrosinemia type I)

by ROS. Nonetheless, a few years later, this theory was not confirmed in murine model: production of pyomelanin by *A. fumigatus* thanks to its 4-HPPD is dispensable for virulence. However, authors do not exclude a possible role of 4-HPPD in the virulence of *A. fumigatus* in other models such as human (Keller et al., 2011).

Regarding bacteria, the most studied bacterial 4-HPPD is the one of *Pseudomonas fluorescens*. Crystallized by Serre et al. (1999), the way the substrate 4-HPP binds to it is solved but the present study does not reveal how 4-HPPD-inhibitors binds to the enzyme. In *Streptomyces avermitilis*, the binding mode of [2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione (NTBC), a 4-HPPD-inhibitor, to the bacterial 4-HPPD, encoded by the *melA* gene, is described (Brownlee et al., 2004). Authors conclude that NTBC have a really high affinity with the bacterial enzyme, raising the fact that β -triketone herbicides are able to bind and inhibit bacterial 4-HPPD too. In *Burkholderia cenocepacia* C5424, a gram-negative opportunistic pathogen, pyomelanin was able to protect the bacteria from free radicals and to attenuate the host cell oxidative burst (Keith et al., 2007). Moreover, authors have also tested the growth of the bacterium in presence of paraquat, an herbicide from group K banned in EU since 2007, but no significant effect on bacterial growth was detected. We may hypothesize that a similar test in presence of 4-HPPD-inhibitors should have been more interesting. As demonstrated by Yoon et al. (2007) in a *P. aeruginosa* strain harboring a mutation in its *norCB* gene encoding a nitric oxide reductase (NOR), 4-HPPD allows the bacterium to survive in anaerobic conditions by binding Nitric Oxide (NO) avidly. It is to say that 4-HPPD is found in many bacteria, yeasts and fungi and its roles in these microorganisms are various and often important. Bacterial 4-HPPDs can be isolated from soil metagenome (Lee et al., 2008), suggesting that numerous soil-borne bacteria harbor a 4-HPPD, making them potential targets for β -triketone herbicides. Knowing that, it appears surprising that only a few studies take an interest in the possible effects of 4-HPPD-inhibitors on soil microorganisms.

It is known that β -triketone herbicides have antimicrobial effects *in vitro*. Twenty years ago, the measure of the minimal inhibitory concentration (MIC) of leptospermone, a natural β -triketone, has shown a deleterious effect on bacterial growth (especially on Gram-positive one) whereas no effect on fungi was demonstrated (Christoph et al.,

2000). More recently, NTBC was shown to have a negative effect on the growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Nunes et al., 2005). Moreover, inhibition of its 4-HPPD by NTBC avoids the fungus to differentiate itself in a pathogenic yeast-like phase. Responses of dimorphic fungi to a NTBC exposition are variable. For instance, in *C. immitis*, it has been shown that NTBC inhibits mycelial growth but has no effect on spherule growth (Viriyakosol et al., 2013). 4-HPPD inhibitors are able to inhibit fungi at different levels of their growth and so their effects on these latter are not predictable and could be deleterious. Regarding bacteria, sulcotrione was shown to inhibit pyomelanin production and, therefore, 4-HPPD activity, of *Shewanella oneidensis* MR-1 from 18 μ M (Turick et al., 2009). In *A. baumannii* this inhibition was shown to be effective from 2.5 μ M of sulcotrione (Coelho-Souza et al., 2014). More recently Jeong et al. (2018) proposed to use leptospermone as a natural food preservative due to its capacity to inhibit six different strains of foodborne bacteria from 88.6 μ M.

The ecotoxicity of β -triketones was evaluated on soil microbial communities. A first microcosm approach has been made with an exposure to mesotrione or Callisto®, the commercial formulation of the active ingredient. It has been demonstrated that, at high FR doses, both products significantly decrease cyanobacterial biomass (Crouzet et al., 2013). Although being applied at a higher dose than the recommended one, Callisto® appears to decrease cyanobacterial biomass more drastically than the active ingredient. It suggests that formulated pesticides, applied on crops, are more toxic than the active ingredient. This observation is supported by another study which showed that Callisto®, applied at 10 $\times$ the FR dose and mesotrione applied at 100 $\times$ the FR dose in soil microcosms, induced short-term inhibition of nitrification and a lasting stimulation of denitrification (Crouzet et al., 2016). In this study, an increase in soil ammonium content and a decrease in nitrate contents were observed, letting us think that nitrogen cycle in soils could possibly be impacted by the active ingredient as well as by the formulated compound. This negative effect of mesotrione at field rate was confirmed on *amoA* gene which encodes an enzyme implied in the nitrogen cycle (Z. Du et al., 2018). In addition, this study demonstrated by T-RFLP analysis a negative effect of mesotrione on the

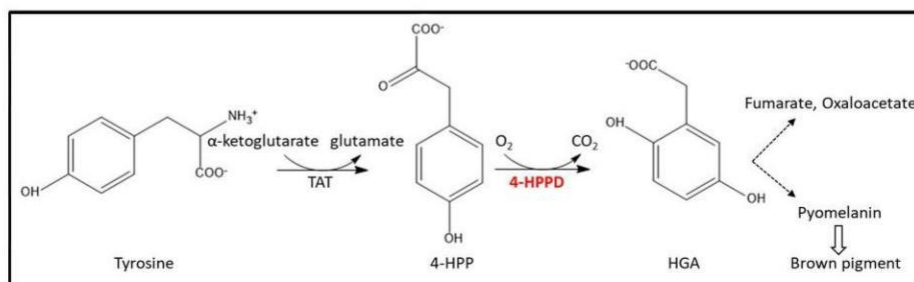


Fig. 1. Microbial fumarate, oxaloacetate and pyomelanin biosynthesis pathway. 4-hydroxyphenylpyruvate (4-HPP); 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD); homogentisate (HGA). The enzyme of interest is in red bold.

Rhizobium genus as well as a potential effect on soil nitrogen fixing capacity. On the contrary, *Acidobacteria* were favored in presence of mesotrione because of its acidifying properties. Authors also noticed a modification of soil microbial abundance following mesotrione exposure but this effect was only transient and a phenomenon of resilience was finally observed at the end of the experiment (Z. Du et al., 2018). Romdhane et al. (2016a) have used a sequencing 16S rRNA gene approach to assess the impact of leptospermone on bacterial communities of two arable soils exposed to 1× and 10× FR doses. The authors have concluded that soil bacterial diversity was modified and kept modified until the complete dissipation of leptospermone (Romdhane et al., 2016a). More recently, the effect of both leptospermone and sulcotrione on soil bacterial communities was assessed using 1× and 10× FR doses and led to the same conclusion: a transient modification of the bacterial diversity due to both herbicides was observed (Romdhane et al., 2019). However, Z. Du et al. (2018) underlined the fact that the ecotoxicological impact of β -triketone herbicides on soil bacterial communities highly depends on soil types and many factors need to be taken into account to conclude on it.

4. How do microorganisms face stresses caused by herbicides at different levels of organization: from molecular to trophic interactions?

Recently, Karpouzias et al. (2016) described the interactions between soil microorganisms and pesticides in light of the Yin Yang concept. On the Yin side, pesticides could be toxic for microorganisms while on the Yang side, they could be useful to them by being used as an energy source for their growth. On the Yang side, exposing repeatedly soil microorganisms to herbicides can lead to the selection and the emergence of bacterial populations able to degrade them in order to be more competitive among the microbial community they belong. A wide range of bacterial isolates are known to biodegrade herbicides sometimes leading to the decrease in herbicidal activity overtime (Fig. 2.A). This phenomenon was first mentioned by Audus in 1949 for the hormone herbicide 2,4-D (group O) (Audus, 1949). The definite proof of the

involvement of the microflora in the process of 2,4-D inactivation came two years later with the demonstration that soil sterilization led to the reactivation of 2,4-D activity and with the isolation of *Bacterium globiforme* able to degrade 2,4-D from a soil previously perfused with a solution of this herbicide (Audus, 1951). Later on, at the end of the 70's, the genetic support of 2,4-D degradation was identified in *Alcaligenes paradoxus* (Pemberton and Fisher, 1977) paving the way to the isolation and characterization of *tfd* genes coding for 2,4-D degrading enzymes (for review, see (van der Meer et al., 1992)). Microbial degradation of herbicide is also well known for s-triazines (group C), such as atrazine (for review, see (Udriković-Kolić et al., 2012)). By soil enrichment cultures from various soils regularly treated with recommended FR doses of atrazine, Devers et al. (2007) were able to isolate 17 atrazine-degrading isolates belonging to both Gram-negative and -positive bacteria. In total, not less than three different atrazine-degrading gene combinations were observed (*trzN-atzBC*, *atzABC-trzD* and *atzABCDEF*) on various plasmids and gene cassettes surrounded by IS (Insertion Sequences) suggesting that atrazine-degrading genes can be dispersed among the soil microflora by conjugation and transposition (Devers et al., 2007). This highlights the tremendous genetic plasticity of atrazine-degraders driven by herbicide exposure. Regarding sulcotrione, one of the synthetic β -triketones (group F2), so far only two bacterial degraders have been isolated from soil microcosms exposed to this herbicide: *Pseudomonas putida* 10P (Calvayrac et al., 2012) and *Bradyrhizobium* sp. SR1 (Romdhane et al., 2016b). Both were able to efficiently degrade the active ingredient and to use it as a sole source of carbon and energy for their growth. However, this capacity of microorganisms to degrade herbicides is shown to highly depend on a range of abiotic parameters including physicochemical properties of both herbicide and soil, pedoclimatic conditions and biotic factors including microbial diversity and hotspots such as rhizosphere, as shown for glyphosate (group G) (Aparicio et al., 2013; Laitinen et al., 2006).

In response to the Yin side of the interaction, microorganisms evolved by different means to resist to the toxic effects of herbicides. One of them is the transformation of the herbicide by the bacteria.

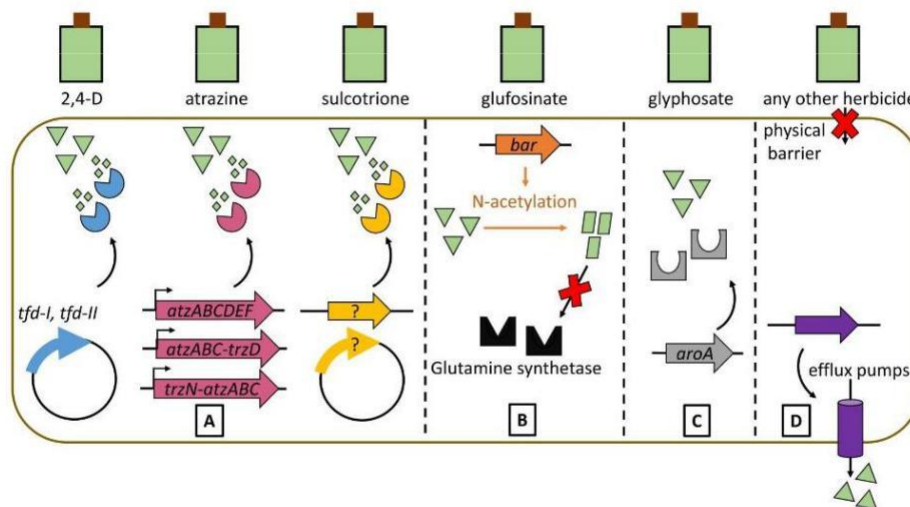


Fig. 2. Facing the stress caused by herbicides (modified from a figure initially proposed by R4P Network 2016). Repeated exposure to herbicides can lead to the selection and emergence of a bacterial guild able to degrade them (A). This was the case for the (i) 2,4-D that is degraded by *Cupriavidus necator* JMP134 harboring *tfd* degrading-genes (Don and Pemberton, 1985), (ii) atrazine degraded by a range of atrazine-degrading bacterial populations harboring various gene compositions (*atzABCDEF*, *atzABC-trzD*, *trzn-atzABC*) (Calvayrac et al., 2012) and (iii) sulcotrione degraded by two bacterial isolates but for which degrading-genes remain unknown (Romdhane et al., 2016b; Aparicio et al., 2013). Bacteria harboring an enzyme targeted by an herbicide can resist to it in many ways. The *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus* allows the bacteria to detoxify glufosinate by N-acetylation, protecting its own glutamine synthetase (Thompson et al., 1987) (B). Target modification following genetic mutation (C) can also explain resistance phenomenon as described in a *Salmonella typhimurium* which harbors a mutation in *aroA* gene making it resistant to glyphosate (Kurenbach et al., 2015). Other phenomena (D) such as efflux pumps throwing out the herbicide, a mutation in the transporter involved in the entry of the herbicide in the cell or a physical barrier can contribute to the resistance of the bacteria to the herbicide.

This phenomenon has been described in a number of bacteria that harbor the enzyme targeted by the herbicide. For instance, *Streptomyces hygroscopicus*, which is able to produce L-phosphinothricin, from which the herbicide glufosinate (group H) is derived, is also harboring the glutamine synthetase that is targeted by this herbicide. In order to avoid poisoning itself, this bacterium has developed a system to inactivate the glufosinate it produces. This system relies on an enzyme encoded by the *bar* gene that catalyzes the N-acetylation of glufosinate, causing its inactivation (Thompson et al., 1987) (Fig. 2.B.). Another way for bacteria to resist to the toxicity of herbicides is the target mutation. Indeed, in a *S. typhimurium* mutant strain, a single mutation in the *aroA* gene which encodes EPSP Synthase (the glyphosate target, group G), was found to lead to the modification of the enzyme structure and confers glyphosate resistance to this bacterium (Stalker et al., 1985; Comai et al., 1983) (Fig. 2.C.). Another option to resist to herbicides relies on detoxification processes such as the activity of efflux pumps throwing the herbicide out of the cell as described for antibiotics resistance (Kurenbach et al., 2015) or the mutation of the porine involved in the active transport of the herbicide, preventing its entry and its toxicity (Fig. 2.D.).

If these resistance mechanisms seem, at first sight, to be environmental friendly helping bacterial community and supported functions to resist to the stress caused by herbicide exposure, they can also be viewed as major threat for human and animal health because of possible co-resistance to other compounds such as antibiotics resistance phenomenon. Indeed, Kurenbach et al. (2017) showed that, in response to herbicide exposure (glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba), *E. coli* and *S. typhimurium* enhanced their resistance to chloramphenicol and kanamycin. In *E. coli*, this increase in antibiotic resistance was due to efflux pump activity (Kurenbach et al., 2017). Besides the fact that these two bacterial strains are known to develop Multi-Drug-Resistance phenotypes, this report underlines the existing risk for the selection of crossed-resistances to herbicide and antibiotics (for review, see (Rangasamy et al., 2018; Van Bruggen et al., 2018)). This remains an open question which has to be considered by the World Health Organization within the One Health initiative aiming to limit the dispersion of antibiotic microbial resistances (Frank, 2008).

Within this context and having in mind the crucial importance of microorganisms for all living organisms via their respective microbiomes, it seems important to not only assess the impact of herbicides on microbial communities but also on microbiomes and the consequences on holobionts they formed with plants and animals. For instance, rats with deficient gut microbiota were shown to be more sensitive to s-triazines, highlighting the fact that gut microbiota can mitigate pesticide toxicity to rats (Zhan et al., 2018). This is in line with the study of de Almeida et al. (2017) revealing that the gut microbiota of insecticide-resistant insects was a reservoir of various insecticide-degrading bacteria which, via their detoxification activity, may mitigate the effect of pesticides in insects. On the contrary, when the gut microbiota is not adapted to pesticide biodegradation, herbicides such as glyphosate were shown to disturb gut microbiota of diverse species including honey bees, a major pollinator which plays an important role in biodiversity maintenance (Motta et al., 2018). Similarly, Sessitsch and Mitter (2015) underlined that pesticide application may affect the plant microbiome composition and that there is a need to better assess the effect of pesticide treatments on desirable plant microbiome functions.

5. Conclusion and further perspectives

For the regulatory point of view, the effect of pesticides on soil microorganisms is solely estimated on the N mineralization activity (M. Zhang et al., 2017; Chen et al., 2003; Bhowmick et al., 2014). An important number of academic studies have been carried out with various cultivation-dependent and cultivation-independent methods to assess the effect of herbicides on the abundance, the diversity and the activity

of soil microorganisms (Imfeld and Vuilleumier, 2012). Most of these studies are searching either for negative effects of pesticides on microbial abundance, diversity and activity, or for positive effects leading to the adaptation of microorganisms to herbicides biodegradation. For microorganisms with biodegradation capacities, biological systems involved in the herbicide response are often highly specific and characterized by enzymatic reactions that closely depend on the chemical structure of the molecule. For instance, various strains of *Pseudomonas*, such as *Pseudomonas* sp. ADP, have developed a *de novo* catabolic pathway for the specific biodegradation of atrazine (Martinez et al., 2001). Regarding β -triketone herbicides, *Bradyrhizobium* SR1, a sulcotriene-degrading strain, was also able to biodegrade mesotrione at a lower rate and with a different pathway than the one observed in *Bacillus* sp. 3B6 and *Bacillus megaterium* Mes11 mesotrione-degrading strains (Romdhane et al., 2016b; Durand et al., 2006; Carles et al., 2016). It is noteworthy that these catabolic gene systems are often regulated and located on plasmids, allowing their dispersion in the soil bacterial community by horizontal gene transfer under favourable selection pressure exerted by repeated exposure to herbicide (Van Bruggen et al., 2018). In contrast, some microorganisms present non-specific responses to herbicides, often linked to the general adaptive response mechanisms. For instance, activity of efflux pumps allow to detoxify the microbial cell from herbicides but, as a non-substrate-specific system, this activity could also increase antibiotics resistance phenomenon (Rangasamy et al., 2018). Studies performed with SN herbicides have shown that point mutation in the gene sequence coding for the targeted enzyme, i.e. AHAS for herbicides from group B, can explain the apparition of SN tolerant strains (Petric et al., 2016; Rachedi et al., 2018). Altogether, these results demonstrate that monitoring the appearance of herbicide tolerant bacteria could be a valuable tool for assessing the soil microflora response to herbicides. Nevertheless, these studies were based on the selection of cultivable SN tolerant strains which are known to represent only 0.1 to 5% of the overall microbial community due to the limitation of classical Pasteurian approaches (Janssen et al., 2002).

We suggest that one can use the microbial enzyme specifically targeted by herbicides to develop molecular biomarkers to track their effects on soil microorganisms. This innovative approach differs from the classical one that consists in studying biomarkers in a well-defined vertebrate or invertebrate either aquatic or terrestrial organism, measuring for example acetylcholinesterase or glutathione S-transferase enzyme activities or expressions (Domingues et al., 2010). Thereafter, we present a non-exhaustive list of the microbial enzymes, encountered in many species within the soil microbial community, that could be potentially used as biomarkers. Hence, *ilv* and *aroA* genes of soil microorganisms could be used as biomarkers of SN herbicides and glyphosate respectively (Group B and G in HRAC classification). *hemY* gene of diverse bacterial strains may be suitable biomarkers of diphenyl-ether herbicides, while the *hppd* gene can be used as a biomarker of β -triketone herbicides (Group F2 in HRAC classification), as suggested by Romdhane et al. (2019). This approach has already been suggested by Petric et al. (2016), who reported, by using cultivation-dependent methods, that AHAS, the target of SNs in plant and which is also found soil microorganisms, can be a valuable biomarker to assess the exposure of soil microflora to SNs.

In the near future, cultivation-independent methods will allow us to select a set of responsive gene sequences which could be used for the development of specific exposure biomarkers (Fig. 3). Molecular approaches based on direct soil microbial community DNA or RNA extraction coupled with quantitative PCR (qPCR and RT-qPCR) and high throughput sequencing analyses will lead to the development of exposure biomarker showing an effect on the abundance and the diversity of this soil microbial community respectively. Another type of biomarker could be imagined by measuring the targeted enzyme activity or using metabolomics analyses. Whatever the type of biomarker chosen, its response needs to be proportional to the specific herbicide

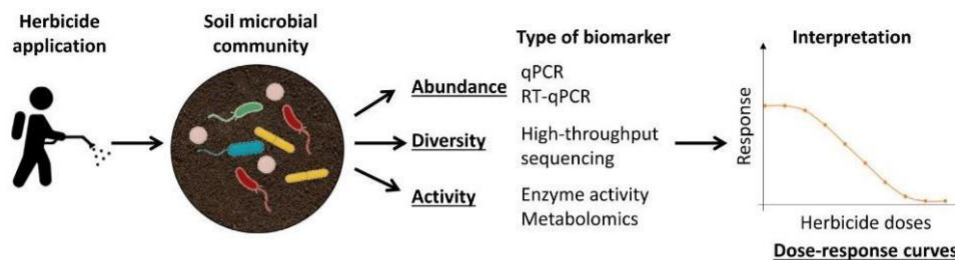


Fig. 3. Assessing herbicide exposure in soils via microbial biomarkers. Biomarkers can be identified at different biological levels. Abundance and diversity can be measured whether on the global microbial community or on a specific one. The activity of the enzyme targeted by the herbicide can also be monitored and used as a biomarker. Dose-response curves analyses have to be performed to determine the sensitivity of each biomarker to the herbicide of interest.

dose it reveals. One should keep in mind that the development of specific biomarkers to assess environmental exposure to a specific class of herbicides requires different approaches depending both on the type of biomarker that have to be developed and on the herbicide class considered.

Funding

This work was supported by the Région Occitanie and European Funds for Regional Development (FEDER). Authors also thank Perpignan University Via Domitia for their financial support (BQR 2018).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.230>.

References

- Abou-Waly, H., Abou-Setta, M.M., Nigg, H.N., Mallory, L.L., 1991. Growth response of freshwater algae, *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum* to atrazine and hexazinone herbicides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 223–229.
- Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E. del V., 2015. Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Sci. Total Environ.* 533, 60–68.
- de Almeida, L.G., de Moraes, L.A.B., Trigo, J.R., Omoto, C., Cónsoli, F.L., 2017. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. *PLoS One* 12, e0174754.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., Steinrück, H.C., 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiol.* 66, 830–834.
- Aparicio, V.C., et al., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–1873.
- Arabet, D., et al., 2014. Effects of a sulfonylurea herbicide on the soil bacterial community. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 5619–5627.
- Arias-Barrau, E., et al., 2004. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 186, 5062–5077.
- Audus, L.J., 1949. The biological detoxication of 2: 4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. *Plant Soil* 2, 31–36.
- Audus, L.J., 1951. The biological detoxication of hormone herbicides in soil. *Plant Soil* 3, 170–192.
- Bhowmick, S., Das, R., Das, A.C., 2014. Effect of thiobencarb and pretilachlor on microorganisms in relation to mineralization of C and N in the Gangetic alluvial soil of West Bengal. *Environ. Monit. Assess.* 186, 6849–6856.
- Bilder, P., et al., 2006. The structure of the carboxyltransferase component of acetyl-CoA carboxylase reveals a zinc-binding motif unique to the bacterial enzyme. *Biochemistry* 45, 1712–1722.
- Boldt, T.S., Jacobsen, C.S., 1998. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 29–35.
- Brausemann, A. et al. Structure of phytoene desaturase provides insights into herbicide binding and reaction mechanisms involved in carotene desaturation. *Struct. Lond. Engl.* 1993 25, 1222–1232.e3 (2017).
- Broser, M., et al., 2011. Structural basis of cyanobacterial photosystem II inhibition by the herbicide terbutryn. *J. Biol. Chem.* 286, 15964–15972.
- Brownlee, J.M., Johnson-Winters, K., Harrison, D.H.T., Moran, G.R., 2004. Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide. *NTBC. Biochemistry* 43, 6370–6377.

- Calvayrac, C., et al., 2012. Isolation and characterisation of a bacterial strain degrading the herbicide sulcotrione from an agricultural soil. *Pest Manag. Sci.* 68, 340–347.
- Carles, L., et al., 2016. Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione. *Biochem. J.* 473, 1443–1453.
- Carles, L., et al., 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.
- Carles, L., et al., 2018. Biodegradation and toxicity of a maize herbicide mixture: mesotrione, nicosulfuron and S-metolachlor. *J. Hazard. Mater.* 354, 42–53.
- Chen, G., Zhu, H., Zhang, Y., 2003. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res. Microbiol.* 154, 393–398.
- Christoph, F., Kaulfers, P.M., Stahl-Biskup, E., 2000. A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of beta-triketones. *Planta Med.* 66, 556–560.
- Coelho-Souza, T., et al., 2014. Pyomelanin production: a rare phenotype in *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiol.* 63, 152–154.
- Comai, L., Sen, L.C., Stalker, D.M., 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science* 221, 370–371.
- Crouzet, O., et al., 2013. Dose-dependent effects of the herbicide mesotrione on soil cyanobacterial communities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 23–31.
- Crouzet, O., et al., 2016. Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 4207–4217.
- Dailey, H.A., Dailey, T.A., 1996. Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*. Expression, purification, and characterization of the cloned enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 8714–8718.
- Dailey, H.A., et al., 2017. Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 81.
- Darine, T., Alaeddine, C., Fethi, B., Ridha, M., 2015. Fluazifop-P-butyl (herbicide) affects richness and structure of soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.* 81, 89–97.
- Dayan, F.E., et al., 2007. p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for beta-triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* 68, 2004–2014.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4022–4034.
- Deblois, C.P., Qiu, B., & Juneau, P. Effect of herbicides (diuron and oxadiazon) on photosynthetic energy dissipation processes of different species of cyanobacteria and two green algae. *Photosynthesis. Energy from the Sun* (Eds. Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H. & Osmond, B.) 1435–1438 (Springer Netherlands, 2008).
- Dennis, P.G., Kukules, T., Forstner, C., Orton, T.G., Pattison, A.B., 2018. The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. *Sci. Rep.* 8 (2119).
- Devers, M., El Azhari, N., Kolic, N.-U., Martin-Laurent, F., 2007. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 78–86.
- Domingues, I., Agra, A.R., Monaghan, K., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 5–18.
- Don, R.H., Pemberton, J.M., 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 161, 466–468.
- Du, P., et al., 2018a. Clomazone influence soil microbial community and soil nitrogen cycling. *Sci. Total Environ.* 644, 475–485.
- Du, Z., et al., 2018b. Effects of the herbicide mesotrione on soil enzyme activity and microbial communities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164, 571–578.
- Duke, S.O., et al., 2010. Natural toxins for use in pest management. *Toxins* 2, 1943–1962.
- Dumas, E., et al., 2017. Fate and ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: an overview to assess the environmental risks. *J. Hazard. Mater.* 325, 136–156.
- Durand, S., et al., 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, 2603–2616.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on the development of specific protection goal options for environmental risk assessment of pesticides, in particular in relation to the revision of the Guidance Documents on Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology (SANCO/3268/2001 and SANCO/10329/2002). *EFSA J.* 8, 1821.

- El-Ghamry, A.M., Xu, J.M., Huang, C.Y., Gan, J., 2002. Microbial response to bensulfuron-methyl treatment in soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 136–139.
- EU, 2009. No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives (EC) No. 79/117 and (EC) No. 91/414. Off. J. Eur. Union 309.
- EUROSTAT, 2007. The use of plant protection products in the European Union, data 1992–2003. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Ferhatoglu, Y., Barrett, M., 2006. Studies of clomazone mode of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* 85, 7–14.
- Forlani, G., Mantelli, M., Branzoni, M., Nielsen, E., Favilli, F., 1995. Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant Soil* 176, 243–253.
- Frank, D., 2008. One world, one health. one medicine. *Can. Vet. J.* 49, 1063–1065.
- Fritze, I.M., et al., 2004. The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* 134, 1388–1400.
- Funke, T., et al., 2009. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 $\rightarrow$ Ile and Pro101 $\rightarrow$ Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284, 9854–9860.
- Gigliotti, C., Allievi, L., 2001. Differential effects of the herbicides bensulfuron and cinosulfuron on soil microorganisms. *J. Environ. Sci. Health B* 36, 775–782.
- Guijarro, K.H., et al., 2018. Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history. *Sci. Total Environ.* 634, 974–982.
- Hahn, F.M., et al., 2001. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 183, 1–11.
- Hao, G.-F., et al., 2013. Computational and experimental insights into the mechanism of substrate recognition and feedback inhibition of protoporphyrinogen oxidase. *PLoS One* 8, e69198.
- Harwood, J.L., 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 101–138.
- Hoerlein, G., 1994. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 138, 73–145.
- Hofer, U., Muehlebach, M., Hole, S., Zoschke, A., 2006. Pinoxaden - for broad spectrum grass weed management in cereal. crops. 113.
- Imfeld, G., Vuilleumier, S., 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. *Eur. J. Soil Biol.* 49, 22–30.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2391–2396.
- Jeong, E.-Y., Lee, M.-J., Lee, H.-S., 2018. Antimicrobial activities of leptospermon isolated from *Leptospermum scoparium* seeds and structure-activity relationships of its derivatives against foodborne bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* 27, 1541–1547.
- Karpouzias, D.G., et al., 2014. 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.
- Karpouzias, D.G., et al., 2016. LOVE TO HATE? pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 18947–18951.
- Keith, K.E., Killip, L., He, P., Moran, G.R., Valvano, M.A., 2007. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *J. Bacteriol.* 189, 9057–9065.
- Keller, S., et al., 2011. Pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus* requires HmgX and the transcriptional activator HmgR but is dispensable for virulence. *PLoS One* 6, e26604.
- Keon, J., Hargreaves, J., 1998. Isolation and heterologous expression of a gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the wheat leaf-spot pathogen, *Mycosphaerella graminicola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 337–343.
- Kobayashi, K., Masuda, T., Tajima, N., Wada, H., Sato, N., 2014. Molecular phylogeny and intricate evolutionary history of the three isofunctional enzymes involved in the oxidation of protoporphyrinogen IX. *Genome Biol. Evol.* 6, 2141–2155.
- Koschmieder, J., et al., 2017. Plant-type phytoene desaturase: functional evaluation of structural implications. *PLoS One* 12, e0187628.
- Kreisberg, J.F., et al., 2013. Growth inhibition of pathogenic bacteria by sulfonylurea herbicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1513–1517.
- Kukorelli, G., Reisinger, P., Pinke, G., 2013. ACCase inhibitor herbicides – selectivity, weed resistance and fitness cost: a review. *Int. J. Pest Manag.* 59, 165–173.
- Kumada, Y., et al., 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3009–3013.
- Kurenbach, B., et al., 2015. Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio* 6.
- Kurenbach, B., et al., 2017. Herbicide ingredients change *Salmonella enterica* sv. Typhimurium and *Escherichia coli* antibiotic responses. *Microbiol. Read. Engl.*
- Laitinen, P., et al., 2006. Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Manag. Sci.* 62, 473–491.
- LaRossa, R.A., Schloss, J.V., 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 259, 8753–8757.
- Lee, C.-M., et al., 2008. Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 322–326.
- Lee, Y.-T., et al., 2013. Sulfonylureas have antifungal activity and are potent inhibitors of *Candida albicans* acetohydroxyacid synthase. *J. Med. Chem.* 56, 210–219.
- Linden, H., et al., 1991. Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenoids. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* 46, 1045–1051.
- Liu, Y., Li, Y., Wang, X., 2016. Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 8633–8649.
- Lonhienne, T., et al., 2018. Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E1945–E1954.
- Lu, G.-H., et al., 2017. Impact of a glyphosate-tolerant soybean line on the rhizobacteria, revealed by Illumina MiSeq. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 561–572.
- Lu, G.-H., et al., 2018. Impact of glyphosate on the rhizosphere microbial communities of an EPSPS-transgenic soybean line ZUTS31 by metagenome sequencing. *Curr. Genomics* 19, 36–49.
- Marques, M.R., et al., 2007. The inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase as a model for development of novel antimicrobials. *Curr. Drug Targets* 8, 445–457.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R., Sadowsky, M.J., 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* 183, 5684–5697.
- Martinezferez, I., Vioque, A., Sandmann, G., 1994. Mutagenesis of an amino acid responsible in phytoene desaturase from *Synechocystis* for binding of the bleaching herbicide norflurazon. *Pestic. Biochem. Physiol.* 48, 185–190.
- Martin-Laurent, F., Kandler, E., Petric, I., Djuric, S., Karpouzias, D.G., 2013. ECOFUN-MICROBIODIV: an FP7 European project for developing and evaluating innovative tools for assessing the impact of pesticides on soil functional microbial diversity—towards new pesticide registration regulation? *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 1203–1205.
- Matsue, Y., et al., 2010. The herbicide ketoclorazone inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against *Haemophilus influenzae*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 63, 583–588.
- McCourt, J.A., Duggleby, R.G., 2006. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31, 173–210.
- van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S., Zehnder, A.J., 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56, 677–694.
- Mijangos, I., Becerril, J.M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C., 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biol. Amp Biochem.* 41, 505–513.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis. Island Press, Washington, DC.
- Mitchell, G., et al., 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57, 120–128.
- Motta, E.V.S., Raymann, K., Moran, N.A., 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 10305–10310.
- Nelson, D.R., Duxbury, T., 2008. The distribution of acetohydroxyacid synthase in soil bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 123–132.
- Newman, M.M., et al., 2016a. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.* 553, 32–41.
- Newman, M.M., et al., 2016b. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci. Total Environ.* 543, 155–160.
- Nivelle, E., et al., 2017. Does nitrogen fertilization history affects short-term microbial responses and chemical properties of soils submitted to different glyphosate concentrations? *PLoS One* 12, e0178342.
- Norris, S.R., Barrette, T.R., DellaPenna, D., 1995. Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastiquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7, 2139–2149.
- Nunes, L.R., et al., 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell* 4, 2115–2128.
- Ockelford, C., et al., 2017. Scientific opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. *EFSA J.* 15, e04690.
- OECD 216, 2000. Soil microorganisms: nitrogen transformation test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 10.
- Pang, S.S., Guddat, L.W., Duggleby, R.G., 2002a. Crystallization of the FAD-independent acetolactate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1237–1239.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G., Guddat, L.W., 2002b. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.* 317, 249–262.
- Pang, S.S., Guddat, L.W., Duggleby, R.G., 2003. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 7639–7644.
- Pemberton, J.M., Fisher, P.R., 1977. 2,4-D plasmids and persistence. *Nature* 268, 732–733.
- Peterson, H.G., Boutin, C., Freemark, K.E., Martin, P.A., 1997. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquat. Toxicol.* 39, 111–134.
- Petric, I., 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. Int.* 23, 4320–4333.
- Philippot, L., Hallin, S., 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 234–239.
- Pose-Juan, E., Igual, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2017. Influence of herbicide triasulfuron on soil microbial community in an unamended soil and a soil amended with organic residues. *Front. Microbiol.* 8.

- Puglisi, E., 2012. Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides. EFSA Support. Publ. 9, 359E.
- Rachedi, K., et al., 2018. Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil Actinobacteria growth and characterization of resistant strains. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 49, 79–86.
- Rangasamy, K., et al., 2018. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. *Microb. Pathog.* 114, 304–310.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34, 114–124.
- Rendina, A.R., Felts, J.M., 1988. Cyclohexanedione herbicides are selective and potent inhibitors of acetyl-CoA carboxylase from grasses. *Plant Physiol.* 86, 983–986.
- Römbke, J., Bernard, J., Martin-Laurent, F., 2018. Standard methods for the assessment of structural and functional diversity of soil organisms: a review. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 14, 463–479.
- Romdhane, S., et al., 2016a. Ecotoxicological impact of the bioherbicide *Leptospermone* on the microbial community of two arable soils. *Front. Microbiol.* 7.
- Romdhane, S., et al., 2016b. Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two β -triketone herbicides. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 4138–4148.
- Romdhane, S., et al., 2019. Assessment of the ecotoxicological impact of natural and synthetic β -triketone herbicides on the diversity and activity of the soil bacterial community using omic approaches. *Sci. Total Environ.* 651, 241–249.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39–67.
- Sajjaphan, K., Shapir, N., Judd, A.K., Wackett, L.P., Sadowsky, M.J., 2002. Novel *psbA1* gene from a naturally occurring atrazine-resistant cyanobacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1358–1366.
- Sandmann, G., 2009. Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 169–174.
- Sandmann, G., Kowalczyk, S., 1989. *In vitro* carotenogenesis and characterization of the phytoene desaturase reaction in *Anacystis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 916–921.
- Sandmann, G., Schmidt, A., Linden, H., Böger, P., 1991. Phytoene desaturase, the essential target for bleaching herbicides. *Weed Sci.* 39, 474–479.
- Schaub, P., et al., 2012. On the structure and function of the phytoene desaturase CRTI from *Pantoea ananatis*, a membrane-peripheral and FAD-dependent oxidase/isomerase. *PLoS One* 7, e39550.
- Schlatter, D.C., Yin, C., Hulbert, S., Burke, I., Paulitz, T., 2017. Impacts of repeated glyphosate use on wheat-associated bacteria are small and depend on glyphosate use history. *Appl. Environ. Microbiol.* 83.
- Schmalzer-Ripcke, J., et al., 2009. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 493–503.
- Secor, J., Cséke, C., 1988. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase activity by Haloxypfop and Tralkoxydim. *Plant Physiol.* 86, 10–12.
- Serre, L., et al., 1999. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. *Struct. Lond. Engl.* 1993 (7), 977–988.
- Sessitsch, A., Mitter, B., 2015. 21st century agriculture: integration of plant microbiomes for improved crop production and food security. *Microb. Biotechnol.* 8, 32–33.
- Shen, J., Luo, W., 2011. Effects of monosulfuron on growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of three nitrogen-fixing cyanobacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 34–43.
- Sheng, M., Hamel, C., Fernandez, M.R., 2012. Cropping practices modulate the impact of glyphosate on arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria in agroecosystems of the semiarid prairie. *Can. J. Microbiol.* 58, 990–1001.
- Sidhardhan, N., P. S.V., Dubey, S., Jain, D., 2012. Synthesis and characterization of an eco-friendly herbicides against weeds. *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 305–307.
- Siehl, D.L., et al., 2014. Broad 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide tolerance in soybean with an optimized enzyme and expression cassette. *Plant Physiol.* 166, 1162–1176.
- Singh, S., Datta, P., Tirkey, A., 2011. Response of multiple herbicide resistant strain of diazotrophic cyanobacterium, *Anabaena variabilis*, exposed to atrazine and DCMU. *Indian J. Exp. Biol.* 49, 298–303.
- Singh, A.K., et al., 2018. Distribution of cyanobacteria and their interactions with pesticides in paddy field: a comprehensive review. *J. Environ. Manag.* 224, 361–375.
- Smith, P., et al., 2015. Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. *SOIL* 1, 665–685.
- Stalker, D.M., Hiatt, W.R., Comai, L., 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* 260, 4724–4728.
- Stallings, W.C., et al., 1991. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5046–5050.
- Stratton, G.W., 1987. Toxic effects of organic solvents on the growth of blue-green algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 1012–1019.
- K.B. Tahmasebi, et al. Multiple resistance evolution in bipyrilidyl-resistant *Epilobium ciliatum* after recurrent selection. *Front. Plant Sci.* 9, (2018).
- Thompson, C.J., et al., 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6, 2519–2523.
- Tian, Y.-S., et al., 2013. Complementary screening, identification and application of a novel class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Bacillus cereus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 549–557.
- Turick, C.E., et al., 2009. The role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in enhancement of solid-phase electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 223–225.
- Udikić-Kolić, N., Scott, C., Martin-Laurent, F., 2012. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1175–1189.
- Vallejo, B., Picazo, C., Orozco, H., Matallana, E., Aranda, A., 2017. Herbicide glufosinate inhibits yeast growth and extends longevity during wine fermentation. *Sci. Rep.* 7, 12414.
- Van Bruggen, A.H.C., et al., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616–617, 255–268.
- Van Camp, L. et al. Reports of the Technical Working Groups. 79.
- Viriyakosol, S., et al., 2013. Gene expression in human fungal pathogen *Coccidioides immitis* changes as arthroconidia differentiate into spherules and mature. *BMC Microbiol.* 13, 121.
- Wall, D.H., Nielsen, U.N., Six, J., 2015. Soil biodiversity and human health. *Nature* 528, 69–76.
- Wang, K.F., Dailey, T.A., Dailey, H.A., 2001. Expression and characterization of the terminal heme synthetic enzymes from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 115–119.
- Wang, D., et al., 2013. Discovery of novel acetohydroxyacid synthase inhibitors as active agents against *Mycobacterium tuberculosis* by virtual screening and bioassay. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 343–353.
- Wang, L., et al., 2014. Characterization of a class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate from *Sinorhizobium fredii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2967–2973.
- WHO, 1993. Task group on biomarkers and risk assessment: concepts and principles et al. *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. World Health Organization.
- Wyckoff, E.E., Pishko, E.J., Kirkland, T.N., Cole, G.T., 1995. Cloning and expression of a gene encoding a T-cell reactive protein from *Coccidioides immitis*: homology to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and the mammalian F antigen. *Gene* 161, 107–111.
- Xiang, S., Usunow, G., Lange, G., Busch, M., Tong, L., 2007. Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 282, 2676–2682.
- Ye, F., et al., 2018. Herbicidal activity and molecular docking study of novel ACCase inhibitors. *Front. Plant Sci.* 9 (1850).
- Yoon, S.S., et al., 2007. Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *EMBO J.* 26, 3662–3672.
- Zhan, J., et al., 2018. Antibiotics may increase triazine herbicide exposure risk via disturbing gut microbiota. *Microbiome* 6 (224).
- Zhang, Q., et al., 2014. Effects of fomesafen on soil enzyme activity, microbial population, and bacterial community composition. *Environ. Monit. Assess.* 186, 2801–2812.
- Zhang, Q., et al., 2017a. Effects of glufosinate on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa* at environmentally relevant concentrations. *Sci. Total Environ.* 575, 513–518.
- Zhang, M., Wang, W., Wang, J., Teng, Y., Xu, Z., 2017b. Dynamics of biochemical properties associated with soil nitrogen mineralization following nitrification inhibitor and fungicide applications. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 11340–11348.

Chapitre III : Effets des herbicides β -tricétones sur des HPPDs bactériennes modèles

Introduction

La première partie de mon travail visait à étudier l'effet des herbicides β -tricétones sur l'activité HPPD de souches bactériennes pures afin d'en préciser la nature et de caractériser la gamme de réponses possibles (**figure III.1**). Ce travail visait également à développer un bioessai pour évaluer *in vitro* la toxicité des tricétones vis-à-vis des microorganismes.

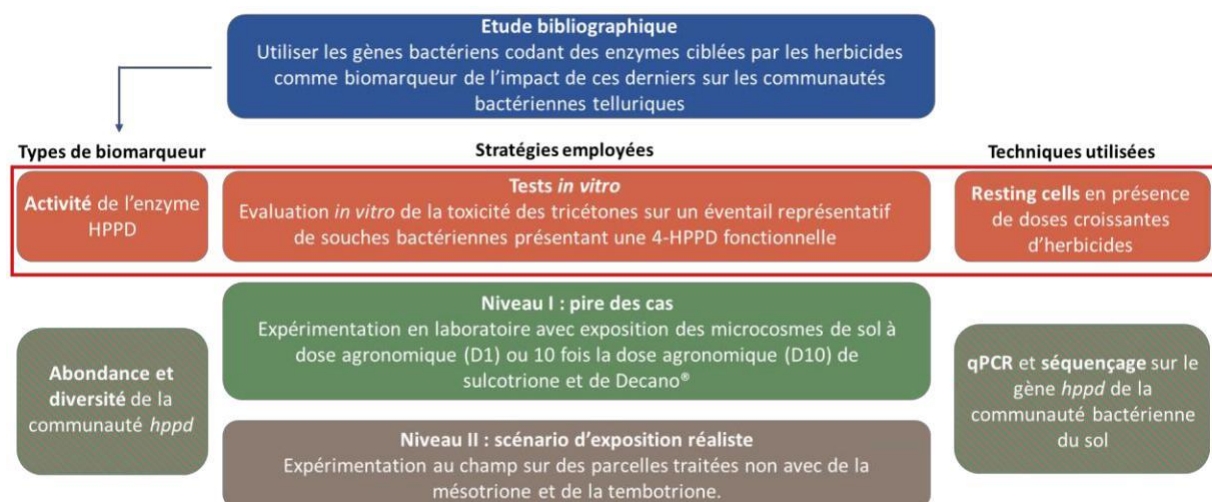


Figure III.1 : Intégration du chapitre III dans l'étude. L'étude menée dans le cadre de l'article 2 porte sur l'évaluation de l'effet des tricétones sur l'activité de l'enzyme HPPD microbienne.

Au début de ma thèse, j'ai constitué un souchier d'isolats bactériens possédant une HPPD fonctionnelle. Ce souchier contient vingt isolats de différents genres bactériens. Une première expérience a été menée afin de mesurer un possible effet des β -tricétones sur la croissance des bactéries. Les bactéries du souchier ont été cultivées en milieu riche dilué au 1/10^{ème} en présence ou non de sulcotrione (à 1, 10 ou 100 fois la dose agronomique). Leur croissance a ensuite été suivie en mesurant leur densité optique à 600nm pendant 5 jours à l'aide d'un lecteur de plaque Bioscreen C. Les résultats de cette expérience étaient souche-dépendants et n'ont montré aucun effet de la sulcotrione sur la croissance des souches testées. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des β -tricétones sur l'activité enzymatique de l'HPPD directement. La vitesse et le mode de croissance des bactéries du souchier ont été testés afin de savoir si les souches pouvaient être de bonnes candidates à la préparation en « resting cells ». Parallèlement, la capacité à produire de la pyomélanine dans nos conditions d'étude a également été testée (**tableau III.1**).

Tableau III.1 : Isolats bactériens décrits comme possédant une HPPD et intégrés au souchier.

Nom de l'isolat	Croissance en adéquation avec la préparation en « resting cells »	Production de pyomelanine dans les conditions expérimentales testées
<i>Rhizobium leguminosarum</i> T117	Croissance lente	Oui
<i>Rhizobium leguminosarum</i> P221	Croissance lente	Non
<i>Rhizobium leguminosarum</i> H132	Flocule dans le PBS	Non déterminée
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	Oui	Oui
<i>Rhizobium etli</i> GD164	Croissance lente	Oui
<i>Rhizobium tropici</i> CESTAS414	Oui	Non
<i>Rhizobium gallicium</i> R602sp ^T	Oui	Non
<i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T	Oui	Non
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF30399	Oui	Variable
<i>Ensifer fredii</i> HH103	Oui	Variable
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA110	Croissance lente	Oui
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	Oui	Oui
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CTR1015	Oui	Oui
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NEM419	Oui	Oui
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12	Oui	Non
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	Oui	Oui
<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	Production d'exopolysaccharides	Non déterminée
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Sporule	Non déterminée
<i>Psychrobacter</i> sp. P11F6	Oui mais à température ambiante	Non
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Oui	Oui
<i>Paraburkholderia phymatum</i> STM815	Oui	Non
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Sporule	Non déterminée
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	Sporule	Non déterminée

Les isolats choisis pour conduire l'étude en raison de leur facilité de culture et de leur capacité à produire de la pyomelanine sont surlignés en vert.

Parmi les isolats collectés, six ont été intégrés à l'étude : la bactérie Gram-positive *Bacillus cereus* ATCC15479 ; et les Gram-négatives *S. oneidensis* MR-1, précédemment décrites comme étant affectées par la sulcotrione ; *Rhizobium etli* CFN 42, bactérie symbiotique modèle ; et trois souches potentiellement PGPR, appartenant au genre *Pseudomonas*, bien étudiées à l'UMR Agroécologie : *P. fluorescens* F113, souche bactérienne modèle pour l'étude de l'HPPD, *P. fluorescens* CTR1015 et *P. fluorescens* NEM419.

Dans un premier temps, les interactions moléculaires développées entre l'HPPD et la molécule active β -tricétone ont été étudiées *in silico* grâce à une collaboration avec Franck E. Dayan, de l'Université du Colorado. Pour cela, des études de docking moléculaire ont été réalisées afin de déceler de possibles différences dans l'interaction des HPPDs bactériennes avec les β -tricétones. Ces études ont révélé un potentiel de liaison des HPPDs de *B. cereus* ATCC15479 et *S. oneidensis* MR-1 équivalent pour les trois molécules testées : sulcotrione, mésotrione et tembotrione. L'HPPD de *P. fluorescens* F113 a montré une moins bonne liaison aux 3 herbicides testés. Nous nous sommes donc demandé si ces différences étaient quantifiables au niveau cellulaire.

L'activité HPPD des six isolats a été mesurée en « resting cell » en présence de doses croissantes de sulcotrione. Le principe de la mesure de l'activité HPPD repose sur la transformation de la tyrosine en pyomélanine, un pigment coloré qui peut être détecté à 430nm. Parmi les six isolats, deux présentaient une forte inhibition de l'activité HPPD, même en présence de faibles doses de sulcotrione. Des tests complémentaires ont donc été réalisés avec la mésotrione et la tembotrione, deux autres molécules actives appartenant à la famille des β -tricétones. La souche *P. fluorescens* F113, qui présentait une activité HPPD inchangée en présence de sulcotrione jusqu'à 10 fois la dose agronomique recommandée, a également été soumise à des doses croissantes de mésotrione et de tembotrione. Les principaux résultats sont résumés dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2 : Récapitulatif des résultats obtenus suite à l'exposition des isolats à différentes concentrations de molécules actives β -tricétones.

Molécule active	Sulcotrione		Mésotrione		Tembotrione	
	D1	D10	D1	D5	D1	D5
<i>B. cereus</i> ATCC14579	↘	↘↘	→	→	↘	↘↘
<i>S. oneidensis</i> MR-1	↘	↘↘	↘↘	↘↘	↘	↘↘
<i>R. etli</i> CFN42	→	↘↘				
<i>P. fluorescens</i> F113	→	→	→	→	↘	↘
<i>P. fluorescens</i> CTR1015	↘	↘↘				
<i>P. fluorescens</i> NEM419	→	↘				

→ : moins de 25% de baisse de l'activité enzymatique (conformément au dossier d'homologation des substances actives qui tolère des effets n'excédant pas 25% au-delà de 100 jours suite à l'application du produit); ↘ : 25 à 50% de baisse de l'activité enzymatique ; ↘↘ : plus de 50% de baisse de l'activité enzymatique. Pour les cases grisées les mesures n'ont pas été réalisées.

Nous avons pu calculer une CE50 (Concentration Efficace à 50%), c'est-à-dire la concentration à laquelle la molécule active testée diminue de 50% l'activité de l'HPPD, pour les souches de *B. cereus* ATCC14579 et *S. oneidensis* MR-1. Pour ces deux isolats, c'est la tembotrione qui a la CE50 la plus basse et donc le potentiel d'inhibition de l'enzyme le plus élevé, suivie de la mésotrione et enfin de la sulcotrione. Les résultats obtenus sont isolats- et molécule active-dépendants.

Ce travail sera soumis prochainement pour publication dans le journal Applied Microbiology and Biotechnology (AMB).

Article 2 (à soumettre)

Assessing the effects of β -triketone herbicides on bacterial HPPD: from a molecular study to an enzymatic assay

Thiour-Mauprivez C.^{1,2}, Dayan F. E.³, Devers-Lamrani M.², Calvayrac C.¹, Martin-Laurent F.², Barthelmebs L.¹

¹Univ. Perpignan Via Domitia, Biocapteurs-Analyses-Environnement, 66860 Perpignan, France; Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579 Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France.

²AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21065 Dijon,

France ³Agricultural Biology Department, Colorado State University, Fort Collins CO, USA

*Corresponding author: barthelm@univ-perp.fr

Abstract: β -triketone herbicides target hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) in plants. HPPD is also present in a wide range of soil bacteria that may also be sensitive to β -triketone herbicides. Docking studies revealed that the binding potentials of sulcotrione, mesotrione and tembotrione differed across bacterial HPPD investigated. Further studies tested whether these differences were also observed at a cellular level. A new HPPD bioassay based on measuring the enzymatic activity of pure bacterial strains was developed. The HPPD activity of six bacterial strains was tested with $1 \times$ or $10 \times$ recommended field doses of sulcotrione. Response to this herbicide was strain-dependent. HPPD activities of three of the six selected strains were tested with $1 \times$ to $10 \times$ the recommended field dose of mesotrione and tembotrione. While *Pseudomonas fluorescens* F113 HPPD activity was not inhibited by any of the herbicides tested, all the molecules inhibited HPPD in *Bacillus cereus* ATCC14579 and *Shewanella oneidensis* MR-1. Tembotrione had the strongest inhibitory effect. A comparable bioassay could be developed to directly test the inhibitory potential of soil extracts on the HPPD of soil bacteria.

Key points:

- Triketone herbicides bind with different forces to bacterial HPPD.
- HPPD activity of *B. cereus* ATCC14579 is sensitive to all triketone herbicides.
- Tembotrione has the highest inhibitory activity on bacterial HPPD.
- Pyomelanin production in *P. fluorescens* F113 is not inhibited by β -triketone herbicides.

Keywords: enzymatic bioassay; molecular docking; 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; bacterial strains; β -triketone herbicides.

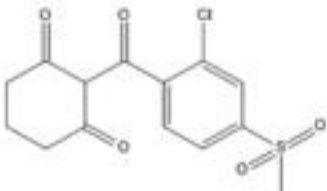
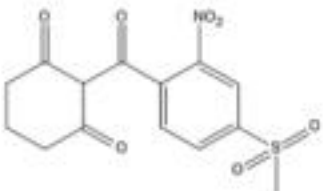
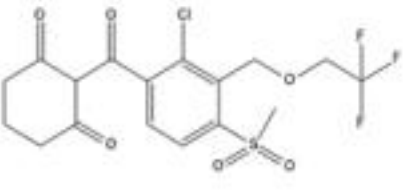
1) Introduction

4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD, EC 1.13.11.27) is a non-heme iron enzyme involved in the second reaction of the tyrosine catabolism pathway by converting 4-hydroxyphenylpyruvate (HPP) in homogentisate (HGA) *via* oxidative decarboxylation, aromatic ring hydroxylation and carboxymethyl group rearrangement (Moran 2005). HPPD is ubiquitous in all living organisms (Santucci et al. 2017).

In plants, HPPD is a 40 to 50 kDa dimer enzyme, synthesized and localized within the plastids (Tsegaye et al. 2002; Collakova and DellaPenna 2003; Dayan et al. 2007) and involved in the biosynthesis of tocochromanols and plastoquinone. This latter molecule acts as an essential cofactor for phytoene desaturase, allowing plant to produce carotenoids required to protect it from light and free radical (Norris et al. 1995). In non-photosynthetic organisms, including humans, HGA is involved in the synthesis pathway of fumarate, one of the intermediates of the Krebs cycle, and acetoacetate (Dixon and Edwards 2006).

NTBC ([2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione) was the first HPPD inhibitor developed to treat tyrosinemia type I, a fatal human disease resulting from a defect in the tyrosine catabolism pathway (Neidig *et al.* 2005). Zeneca Agrochemicals was first to discover the possible use of HPPD inhibitors as herbicides. Many new molecules were synthesized based on the structure of leptospermone, a natural phytotoxin produced by the Californian bottlebrush plant (*Callistemon citrinus*) (Beaudegnies et al. 2009). Sulcotrione (2-(2-chloro-4-methylsulfonylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione) was the first HPPD-inhibiting herbicide commercialized (Schulz *et al.* 1993). Mesotrione (2-[4-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzoyl]cyclohexane-1,3-dione) and tembotrione (2-[2-chloro-4-methylsulfonyl-3-(2,2,2-trifluoroethoxymethyl)benzoyl]cyclohexane-1,3-dione) were subsequently commercialized (Mitchell *et al.* 2001) (**supplementary file 1**). These herbicides have successfully replaced atrazine that was banned from the European market in 2004, and are now widely used maize growers.

Supplementary file 1. β -triketone molecules used as herbicides.

Molecule	Sulcotrione	Mesotrione	Tembotrione
Chemical structure			
IUPAC name	2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl)cyclohexane-1,3-dione	2-(4-methyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione	2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl)-3-((2,2,2-trifluoroethoxy)methyl)benzoyl)cyclohexane-1,3-dione
MW (g.mol ⁻¹)	324.8	339.3	440.8
pKa	3.13	3.12	3.18
Solubility in water at pH 7 (g.L ⁻¹)	0.17	15	28.3
Octanol-water partition coefficient (log P)	0.55	-0.17	1.8
Main degradation product	CMBA	MNBA	TCMBA

As the use of HPPD inhibitors on crops continues to expand, it is important to assess their effect on soil non-target organisms, and especially on the HPPD activity of the microbiota. In microorganisms, HPPD is also implicated in tyrosine degradation, leading to acetoacetate and fumarate synthesis, and to pyomelanin production, a pigment accumulating following oxidation and polymerization of HGA. This brown pigment is easily observable on culture media supplemented with L-tyrosine. Pyomelanin production is described in various microbial species such as fungi and yeasts (Schmaler-Ripcke et al. 2009; Vasanthakumar et al. 2015; Almeida-Paes et al. 2018; Perez-Cuesta et al. 2020) and in numerous bacterial genera such as *Legionella*, *Shewanella*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Alteromonas* or *Vibrio* (Steinert et al. 2001; Turick et al. 2002; Brownlee et al. 2004; Keith et al. 2007; Han et al. 2015; Zhu et al. 2015; Batallones et al. 2019). Most of these studies report a protective role of pyomelanin against reactive oxygen species, highlighting the importance of deciphering the function of HPPD in microbes and especially in pathogenic species. The structure of HPPD and the binding mode of inhibitors are well described in *Pseudomonas fluorescens* F113 and *Streptomyces avermitilis* (Serre et al. 1999; Brownlee et al. 2004). However, only a few studies take an interest in deciphering the potential inhibition of soil microbial HPPD by β -triketone herbicides. Most often, these studies are either focused on plant or bacterial HPPDs cloned in *Escherichia coli* strains (Rocaboy-Faquet et al. 2014; Neuckermans et al. 2019; Liu et al. 2020). The effect of agronomical doses of these herbicides on the enzymatic activity of native soil bacteria remains to be studied.

Here, we selected six pure bacterial strains of different genera known to have active HPPDs and produce pyomelanin: three *P. fluorescens* strains (Serre et al. 1999), *Shewanella oneidensis* MR-1 (Turick et al. 2009), one nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium etli* CFN42 and one Gram-positive bacteria *Bacillus cereus* ATCC14579. We carried out *in silico* docking studies to document the binding mode of β -triketones with HPPD. Then, in order to measure the effect of these herbicides, we exposed the six bacterial strains to increasing doses of sulcotrione and measured their HPPD enzymatic activity reflected by pyomelanin production. *S. oneidensis* MR-1 and *P. fluorescens* F113 were selected for further experiments because their HPPD are well described in the literature and, according to our first assay, these two strains exhibit a different enzymatic response following the exposure to herbicide. The only Gram-positive bacteria, *B. cereus* ATCC14579 was also selected because of its promising first inhibition results observed with sulcotrione. Similar measurements were then done on these three strains exposed to increasing doses of mesotrione and tembotrione.

2) Material and methods

a) Bacterial strains and culture conditions

B. cereus ATCC14579, *P. fluorescens* F113, *P. fluorescens* CTR1015 and *P. fluorescens* NEM419 were cultured in a Lysogenic Broth (LB: 10 g.L⁻¹ tryptone; 5 g.L⁻¹ yeast extract; 10 g.L⁻¹ NaCl). *S. oneidensis* MR-1 was grown in a Tryptic Soy Broth (TSB: 17 g.L⁻¹ tryptone; 3 g.L⁻¹ soy; 5 g.L⁻¹ NaCl; 2.5 .L⁻¹ K₂HPO₄; 2.5 g.L⁻¹ glucose) and *R. etli* CFN42 in Tryptone Yeast extract media supplemented with CaCl₂ (TY+CaCl₂: 5 g.L⁻¹ tryptone; 3 g.L⁻¹ yeast extract; 0.9 g.L⁻¹ CaCl₂ × 2H₂O). Each bacterial strain was grown overnight at 28°C and 110 rpm in its appropriate culture medium.

b) Resting cells preparation

Each overnight culture was diluted and incubated in a new fresh appropriate medium during three to eight-hour according to its growth capacity, to reach the exponential phase of growth. Then, cells were harvested by centrifugation for 5 min at 5,000 rpm, washed in 20 mM Phosphate Buffer (PB), and then resuspended in a volume of PB calculated to have an OD₆₀₀ of 3. In this way, biomass was similar in all the resting strains cells. Resting cells can be stored for 24 h at -4°C until use.

c) In silico analysis

Protein sequences were retrieved from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with WP_000810922.1 corresponding to the accession number of *B. cereus* ATCC14579 HPPD sequence and WP_011072057.1, WP_011425038.1 and WP_014347821.1 corresponding to the HPPD sequences of *S. oneidensis* MR-1, *R. etli* CFN42 and *P. fluorescens* F113 respectfully. The protein sequences of both *P. fluorescens* CTR1015 and *P. fluorescens* NEM419 are not available yet. Sequences were aligned using ClustalW (Thompson *et al.* 2002).

Homology modeling

Homology models of each of the HPPDs were obtained using the multiple alignment function of Modeller version 9.22 (Webb and Sali 2016; Webb and Sali 2017), including the crystal structures of HPPD from *Streptomyces avermitilis* and from *Arabidopsis thaliana* (1t47 and 5yy6, respectively) (Brownlee *et al.* 2004; Yang *et al.* 2004). The crystal structure of *A. thaliana* was included because it incorporates the conformational change known to occur upon binding of the inhibitors. Preliminary models with the lowest DOPE scores were selected for further refinement using GROMACS (version 2018.3) (Hess *et al.* 2008; Abraham *et al.* 2015). The structures were relaxed to correct for steric clashes or inappropriate geometries prior to molecular dynamics simulation. The final topology of the homology models were evaluated using MolProbity (Davis *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010).

Docking of herbicides

The structures of mesotrione and tembotrione were downloaded as sdf files from PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), edited with Spartan18 (Wavefunction Inc., Irvine CA 92612) to include delocalized -1 charges over two of the three keto groups, and saved as saved as pdb files. The structures were converted to Autodock compatible pdbqt format using AutoDockTools (version 1.5.6). These herbicides were docked to the catalytic domain of HPPD using Autodock 4 and Autodock 4 (Morris et al. 2009; Forli et al. 2016), using the iron metal dication (with a +0.6 partial charge) as an anchor (Chen et al. 2010) and the following conserved residues (T164, S202, P215, N217, Q240, L295, F312, F321, L341, F333, N337, F338). The binding energy of the herbicides on the bacterial HPPD models were obtained from the dock.dlg file. Proteins and ligand interactions were visualized using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) (DeLano 2002).

d) Colorimetric method for HPPD activity monitoring using free cell assay

96-well-microplates were all filled with 50 μ L of resting cells, and completed with 125 μ L of L-Tyrosine 1.8 g/L (pH 9), and with 75 μ L of herbicide solutions diluted in PB for the assays or with 75 μ L of PB for the positive control (PC). For the negative control (NC), only 200 μ L of PB were added to the resting cells. All controls and assays were performed in triplicate. Herbicide concentrations ranged from 0.05 to 15 times of the recommended field dose (RfD) for each molecule tested; corresponding to: 0.23 to 67.5 μ M for sulcotrione; 0.22 to 66 μ M for mesotrione and 0.17 to 52.5 μ M for tembotrione. Microplates were covered with a Breathseal sealer (Greiner Bio-One™, Germany) and incubated at 28°C and 110 rpm. After 48 hours of incubation, OD₄₃₀ and OD₆₀₀ were measured using an Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (Greiner Bio-One™, Germany). Microplates were then centrifuged at 6000 rpm for 6 minutes and OD₄₃₀ of the supernatant was measured.

e) Dose-response curves

For each triplicate, normalized OD₄₃₀ (OD_{430N}) was calculated according to:

$$OD_{430N} = OD_{430PC} - OD_{430NC}$$

where OD_{430PC} is the mean OD₄₃₀ measured at 0 μ M of herbicide (i.e. PC) and OD_{430NC} is the mean OD₄₃₀ measured for the NC.

The enzymatic activity percentage, Act. %, was calculated according to the equation

$$Act. \% = (OD_{430} / OD_{430PC}) * 100$$

For each herbicide tested, EC50 (half-maximum Effective Concentration, concentration required to obtain a 50% effect) was calculated using the “drc” package in R (Ritz et al. 2015).

3) Results

a) *In silico* sequences analysis

HPPD protein sequences of *B. cereus* ATCC14579, *S. oneidensis* MR-1, *P. fluorescens* F113 and *R. etli* CFN42 were aligned (**supplementary file 2**). These four sequences have a similarity ranging from 34 to 50%. Even though these four sequences have relatively low similarity, they retain some highly conserved regions common across HPPD from different phyla and kingdoms.

<i>B. cereus</i> ATCC14579	MKQKSMDT--LAAQMEDFFPVRDVDHLEFYVGNKQSSYYLARAFGFKIVAYSGLETGNR	58
<i>S. oneidensis</i> MR-1	-----MASELNPLGLLGIEFTEFASSDTDF-MHKVFIDFGFSLL-----KKAK-	42
<i>P. fluorescens</i> F113	-----MADLYENPMGLMGFEFIEFASPTPNT-LEPIFEIMGFTKV-----ATHR-	43
<i>R. etli</i> CFN42	MGPFPDAPPSEITADNPAGTDGFFVEFAHPEPEK-LSELFTRMGYVAV-----ARHK-	53
	: *	
<i>B. cereus</i> ATCC14579	EKVSYYLVQKNMRFVVSAGLSSENRIAEFVKTHGDGVKDVALLVDDVDKAYSEAVKRGAV	118
<i>S. oneidensis</i> MR-1	NKDILYYKQNDINFLNK--QREGFSAKFAKSHGPAICSMGWRVEDASFAHRVAVERGAK	100
<i>P. fluorescens</i> F113	SKNVHLRYQGAINLILNN--EPHSVASYFAAEHGSPVCGMAFRVKDSQQAYKRAELGAQ	101
<i>R. etli</i> CFN42	TKDITIWRQGDINYVLNA--EPGSHAARFVAKHGPCAPSMARVVDARHAFNHAVSKGAV	111
	* * : * . ** . . * * * . * . *	
<i>B. cereus</i> ATCC14579	AIAPPQELTDEDGTLKKAVIGTYGDTIHTLVERKNYKGA-FMPGFQKV-EFNIPFEESGL	176
<i>S. oneidensis</i> MR-1	AAD-----DSAKDLPYPAIYGIGDSLIFIDTFGANNNIYATDFEDLSEPVIT-QEKGF	153
<i>P. fluorescens</i> F113	PIHI-----ETGPMELNLPKIGGAPLYLIDRFEGGSSIIDFVFLGVDRNPVGAGL	157
<i>R. etli</i> CFN42	PYE-----GNDKVLDPVPAIVGIGGSLLYFVETYGAKGSAYEAEFDWLGEPNPKPLGIGF	165
	* . * * . . : : . . : * :	
<i>B. cereus</i> ATCC14579	IAVDHVMGNVE--KMEEWVSYYENVMGFKQMIHFDDDDISTEYSALMSKVMTN-GSRIKF	233
<i>S. oneidensis</i> MR-1	IEVDHLTNVYKGTMEHWANFYKNIFGFTEVRYFD---ISGVQTAIVSYALRSPDGSFCI	210
<i>P. fluorescens</i> F113	KIIDHLTHNVYRGRMAYWAGFYKLFNFREIRYFD---IKGEYTGTLTKAMTAPDGMIRI	214
<i>R. etli</i> CFN42	YYLDHLTHNVFRGNMDKWDFYRNLNFNFQIHFDD---IDGRITGLVSRITSPCGKIRI	222
	: * : . * * * * . : * : : * * * . : * : : . : :	
<i>B. cereus</i> ATCC14579	PINEPADGKRKSQIQEYLEFYNGAGVCHLALLTSDIVKTVEALRANGVEFLDT-PDTYYD	292
<i>S. oneidensis</i> MR-1	PINEG-KGNDKNQIDEYLKEYNGPGVCHLAFRSRDIVKSLDAMEGSSIQCLDIPE-YYD	268
<i>P. fluorescens</i> F113	PINEE-SSKGAGQIEEFMLQFNQEGICVAFLTDDLTKTWDHLKGIGRMFTAPPDTYYE	273
<i>R. etli</i> CFN42	PINES-K-DDTSQIEEYLKKYRGEIGCHIAVGTEDIYEATDRLADNGLRFMPGPPETYYD	280
	* : * * . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>B. cereus</i> ATCC14579	ELTARVGKIDEEIDKLKELKILVDRDD-----EGYLLQIFTKPIVDRPTLFIETIQRK	346
<i>S. oneidensis</i> MR-1	TIFDKVPQVTENRDRIKHHQILVDGDE-----SGYLLQIFTKNLF--PIFETIQRKN	320
<i>P. fluorescens</i> F113	MLEGRLPNHGEPVDELQSRGILLDGAS--EQGDKRLLQLFSETLMG--PVFETIQRK	329
<i>R. etli</i> CFN42	MSYERVHGHDEPIDRMKKHGLIDGEGVVNGGMTKILLQIFSKTVIG--PIFETIQRK	338
	: : * * : : * : * * : : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>B. cereus</i> ATCC14579	SRQFGECNFKALFESIEREQERRGNL-----	372
<i>S. oneidensis</i> MR-1	NLCFGECNFTALFQSIERDQMRRGVL-----	346
<i>P. fluorescens</i> F113	DDCFGECNFKALFESIERDQVRRGVLA--	358
<i>R. etli</i> CFN42	DECFGECNFRALFESIEADQIKRGVIGTAAE	369
	. * :	

Supplementary file 2. HPPD protein alignments. *B. cereus* ATCC14579, *S. oneidensis* MR-1, *P. fluorescens* F113 and *R. etli* CFN42 protein sequences were retrieved from Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and aligned with ClustalW (Thompson *et al.* 2002). The amino acids corresponding to the active site of the enzyme are framed in pink. Those involved in the substrate-binding domain are framed in green.

For example, the catalytic domain, located in the C-Terminus involves a highly conserved triad consisting a glutamate and two histidine residues in bacteria, plant and mammalian forms of HPPD (Serre et al. 1999; Fritze et al. 2004). These three amino acids are highly conserved because they coordinate the binding of a metal dication (either Fe or Co) involved in the catalytic function of HPPD (**Figure 1A**), thus playing an essential role in enzyme function.

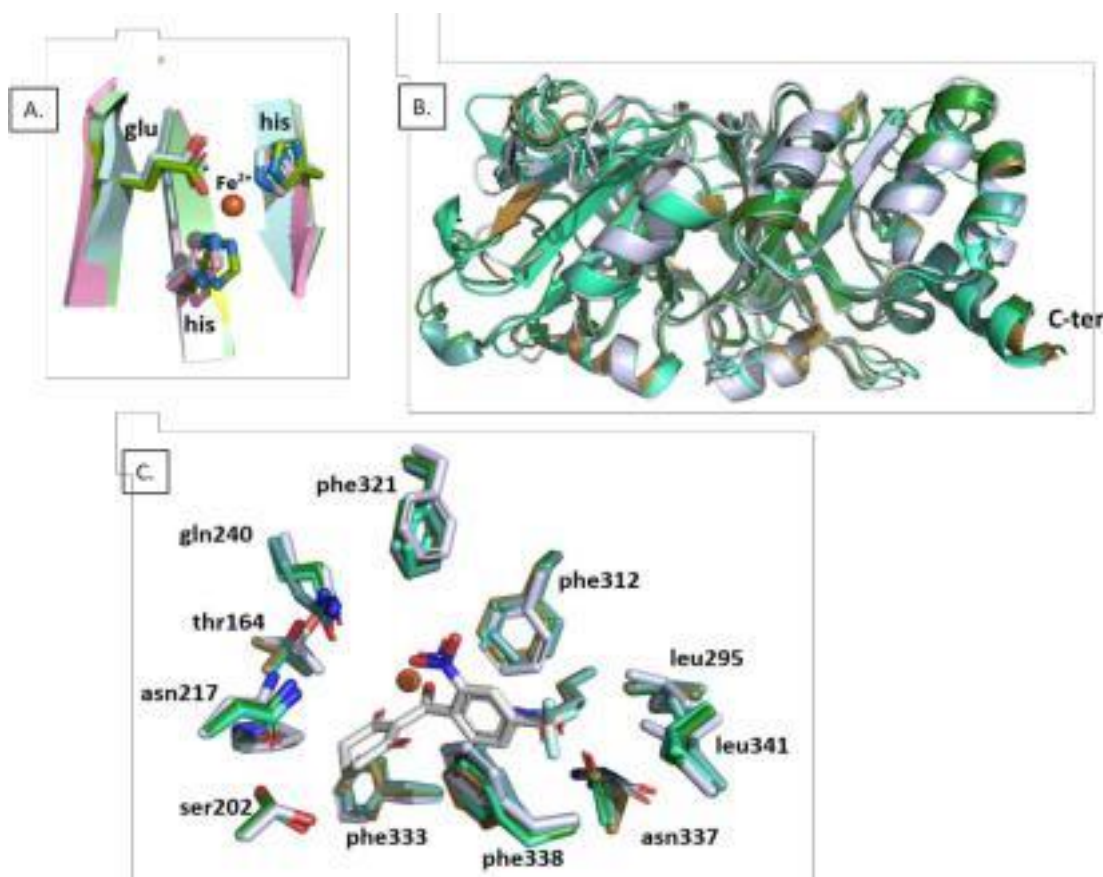
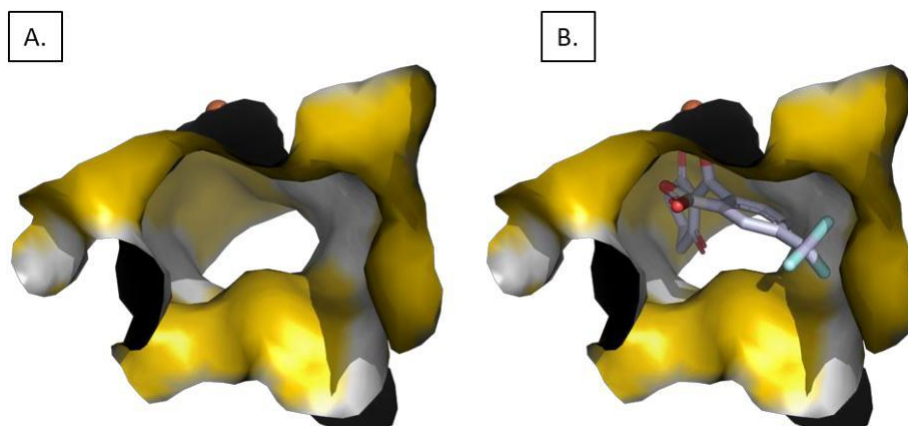


Figure 1. A) Residues involved in stabilizing the metal dication (Fe^{2+}) within the HPPD catalytic domain of *P. fluorescens* in pink (1cxj), *A. thaliana* in green (6isd) and *H. sapiens* in blue (3isq). B) Alignment of the 4 bacterial models derived from the HPPD sequences of *P. fluorescens* F113, *B. cereus* ATCC14579, *S. oneidensis* MR-1 and *R. etli* CFN42 and C) Amino acid residues lining the substrate binding pocket of HPPD are highly conserved of the 4 bacterial homology models. Numbering is based on sequence of *P. fluorescens* HPPD.

Additionally, the binding domain of the substrate HPP is a highly conserved area formed by mostly hydrophobic residues (T164, S202, P215, N217, Q240, L295, F312, F321, F333, N337, F338, L341 based on sequence of *P. fluorescens* HPPD) (Fig. 1 C and **Supplementary file 3**).

This domain plays an important role in positioning HPP in the proper position for the region specific hydroxylation reaction catalyzed by HPPD (Moran 2014).

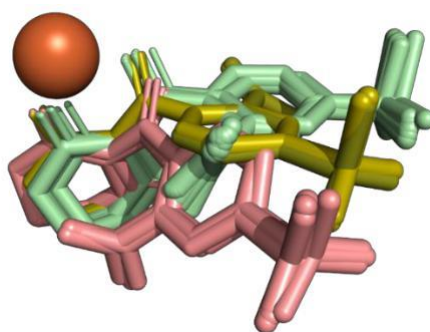
β -triketone herbicides are known to interact at this interphase by forming a stable complex between two of their keto groups towards a bidentate association with the active-site metal ion by coordinate as well as this hydrophobic domain (Brownlee et al. 2004).



Supplementary file 3. Lipophilic properties of the substrate HPP binding domain (yellow) of HPPD from *Streptomyces avermitilis*. A) Open substrate binding domain and B) binding domain occupied by NTBC, an HPPD inhibitor. Lipophilic domain was coloured using the YRB script (Hagemans et al. 2015).

b) Docking of sucotrione, mesotrione and tembotrione to microbial HPPD :

The binding energy for each docking experiments were the average of the energy of the correct orientations. For example, the docking results obtained with mesotrione coordinated on the metal dication on homology model of *P. fluorescens* F113 generated 25 different poses. On these 25 poses, 18 were in an orientation most similar to that observed with inhibitors co-crystalized with HPPD, 3 were in the less favourable pose and 4 in the least desirable pose (**supplementary file 4**). Regardless of the poses, all docking resulted in proper interaction with the iron metal dication. They are summarized in **table 1**.



Supplementary file 4. Example of docking results obtained with mesotrione coordinated on the metal dication on homology model of *P. fluorescens* F113. Of the 25 different poses generated by the docking algorithm, 18 were in an orientation most similar to that observed with inhibitors co-crystalized with HPPD (green), 3 were in the less favourable pose (gold) and 4 in the least desirable pose (pink). Regardless of the poses, all docking resulted in proper interaction with the iron metal dication.

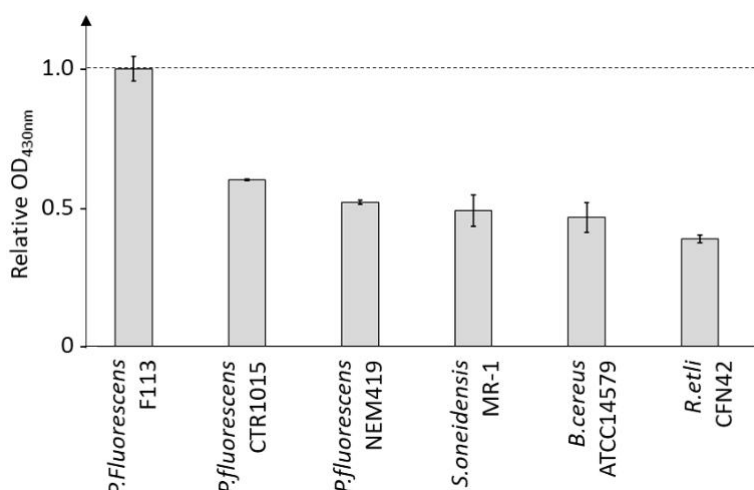
Table 1. Binding energies and number of poses in optimal orientations for sulcotrione, mesotrione and tembotrione in the homology models.

	Sulcotrione		Mesotrione		Tembotrione	
	Binding energy (kcal/mol)	Poses #	Binding energy (kcal/mol)	Poses #	Binding energy (kcal/mol)	Poses #
<i>P. fluorescens</i> F113	-2.16	20	-1.41	18	-2.55	17
<i>S. oneidensis</i> MR-1	-3.26	24	-2.52	25	-3.29	13
<i>B. cereus</i> ATCC14579	-3.03	23	-2.39	25	-3.16	15

As we can observed, the binding force of the three tested molecules to the HPPD of *P. fluorescens* F113 was lower than that of the two other strains. Tembotrione and sulcotrione binds more tightly to all the bacterial HPPDs tested than mesotrione. Regarding the number of docking achieving the preferred binding pose (similar to green pose in **supplementary file 4**), both sulcotrione and mesotrione docked correctly and more frequently than tembotrione.

c) Enzymatic activity

OD_{430nm}, reflecting the HPPD activity (Rocaboy-Faquet et al. 2016; Singh et al. 2018), was measured in the resting cells prepared from the six selected bacterial strains. *P. fluorescens* F113 HPPD expressed the highest production of pyomelanin pigment with an OD_{430nm} of 1.43 ± 0.11 , followed by *P. fluorescens* CTR1015 and NEM419 with OD_{430nm} of 0.86 ± 0.01 and 0.74 ± 0.02 respectively. *S. oneidensis* MR-1, *B. cereus* ATCC14579 and *R. etli* CFN42 harbour a pigment production with OD_{430nm} of 0.70 ± 0.12 ; 0.66 ± 0.07 and 0.55 ± 0.03 respectively (**supplementary file 5**).



Supplementary file 5. Comparison of OD_{430nm} of five bacterial strains (*P. fluorescens* CTR1015 and NEM419, *S. oneidensis* MR-1, *B. cereus* ATCC14579 and *R. etli* CFN42) with the one of *P. fluorescens* F113. Each value is obtained by subtracting the mean OD_{430nm} obtained in positive controls by the mean OD_{430nm} obtained in negative controls. The obtained difference is compared to the one of *P. fluorescens* F113 which has an arbitrary value of 1 and is depicted on this figure as “relative OD_{430nm}”.

Then, enzymatic activity measurement assays were performed using two models strains: *P. fluorescens* F113 and *S. oneidensis* MR-1. Strains were exposed to increasing doses of sulcotrione (0 to $10^{\times}$ RfD). *P. fluorescens* F113 OD_{430nm} appeared constant even with $10^{\times}$ RfD of sulcotrione (**Figure 2.A**) whereas the one of *S. oneidensis* MR-1 was drastically decreasing proportionally to the RfD of sulcotrione (**Figure 2.B**). This first assay informed us about the existence of tolerant HPPD activities such as the one of *P. fluorescens* F113 and sensitive one such as the one of *S. oneidensis* MR-1. However, inherent background signal was measured, probably due to the interference of the cell biomass. We then decided to add a centrifugation step before the measurement in order to eliminate interfering signals.

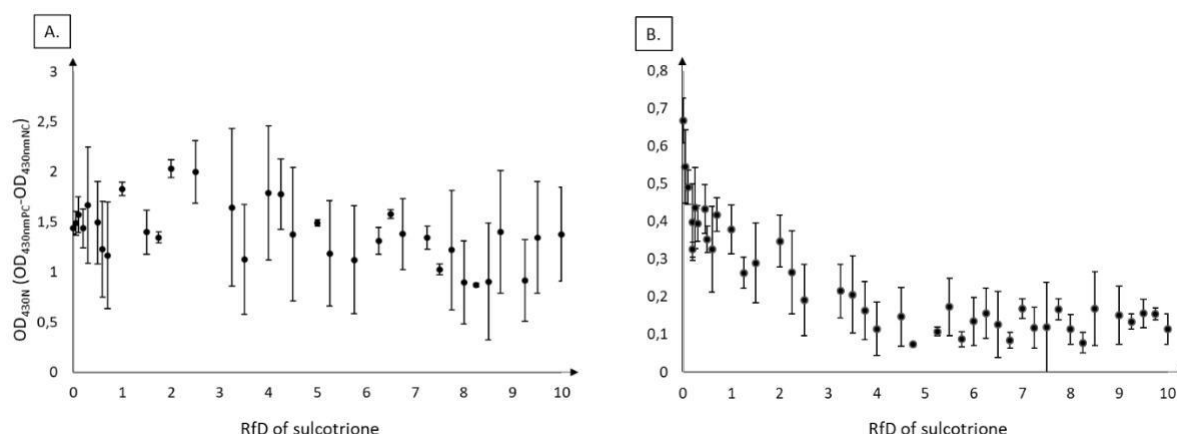


Figure 2. OD_{430nm} in *P. fluorescens* F113 (A) and *S. oneidensis* MR-1 (B) in regard to increasing RfD of sulcotrione. : Each value is obtained by subtracting the mean OD_{430nm} obtained in positive controls by the mean OD_{430nm} obtained in negative controls.

Adding the centrifugation step, the resting cells of the six bacterial strains of our study were exposed or not to $1^{\times}$ RfD or $10^{\times}$ RfD of sulcotrione. The enzymatic activity percentage (Act. %) was calculated for each strain and is depicted in **figure 3**. In *B. cereus* ATCC14579, *S. oneidensis* MR-1 and *P. fluorescens* CTR1015, 4-HPPD activity clearly decreased with increasing doses of sulcotrione, with a decrease of at least 31 % with $1^{\times}$ RfD, and of at least 74 % with $10^{\times}$ RfD. In *R. etli* CFN42 and *Pseudomonas* NEM 419 enzymatic activity remained unchanged with $1^{\times}$ RfD but decreased at $10^{\times}$ RfD. On the contrary, *P. fluorescens* F113 presented a similar HPPD activity whatever the sulcotrione dose, confirming data previously obtained. This screening assay allowed us to select three of the six bacterial strains (*B. cereus* ATCC14579, *S. oneidensis* MR-1 and *P. fluorescens* F113) for further analysis.

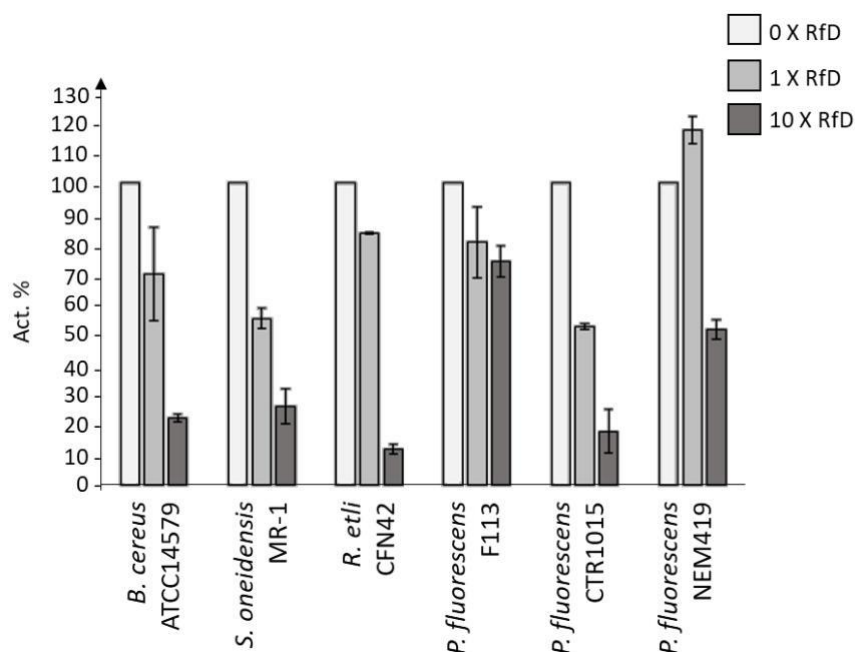


Figure 3. HPPD relative activity measured in the six different strains (*P. fluorescens* F113, CTR1015 and NEM419, *S. oneidensis* MR-1, *B. cereus* ATCC14579 and *R. etli* CFN42) exposed to 0, 1 or 10 $\times$ RfD of sulcotrione. 0 $\times$ RfD represents the positive control of our experiment.

d) Dose-response curves

S. oneidensis MR-1, *B. cereus* ATCC14579 and *P. fluorescens* F113 were exposed to increasing doses of sulcotrione, mesotrione and tembotrione (0 to 5 $\times$ RfD). The HPPD activity of *P. fluorescens* F113 is not inhibited by any of the β -triketones tested (**Figure 4.A**) even at high doses, up to 15 $\times$ RfD (data not shown). A clear dose-dependent response was observed in *B. cereus* ATCC14579 (**Figure 4.B**) and *S. oneidensis* MR-1 (**Figure 4.C**) which allowed us to calculate EC_{50} . Tembotrione appears to have the most harmful effects on the enzyme activity with an EC_{50} of $0.07 \pm 0.8 \mu\text{M}$ in *S. oneidensis* MR-1 (**Figure 4.E**). Its EC_{50} in *B. cereus* ATCC14579 is not even calculable due to a too rapid decrease of $OD_{430\text{N}}$ values (**Figure 4.D**). Whereas sulcotrione has the lowest effect with an EC_{50} of $3.96 \pm 0.3 \mu\text{M}$ in *B. cereus* ATCC14579 and $7.25 \pm 1.7 \mu\text{M}$ in *S. oneidensis* MR-1.

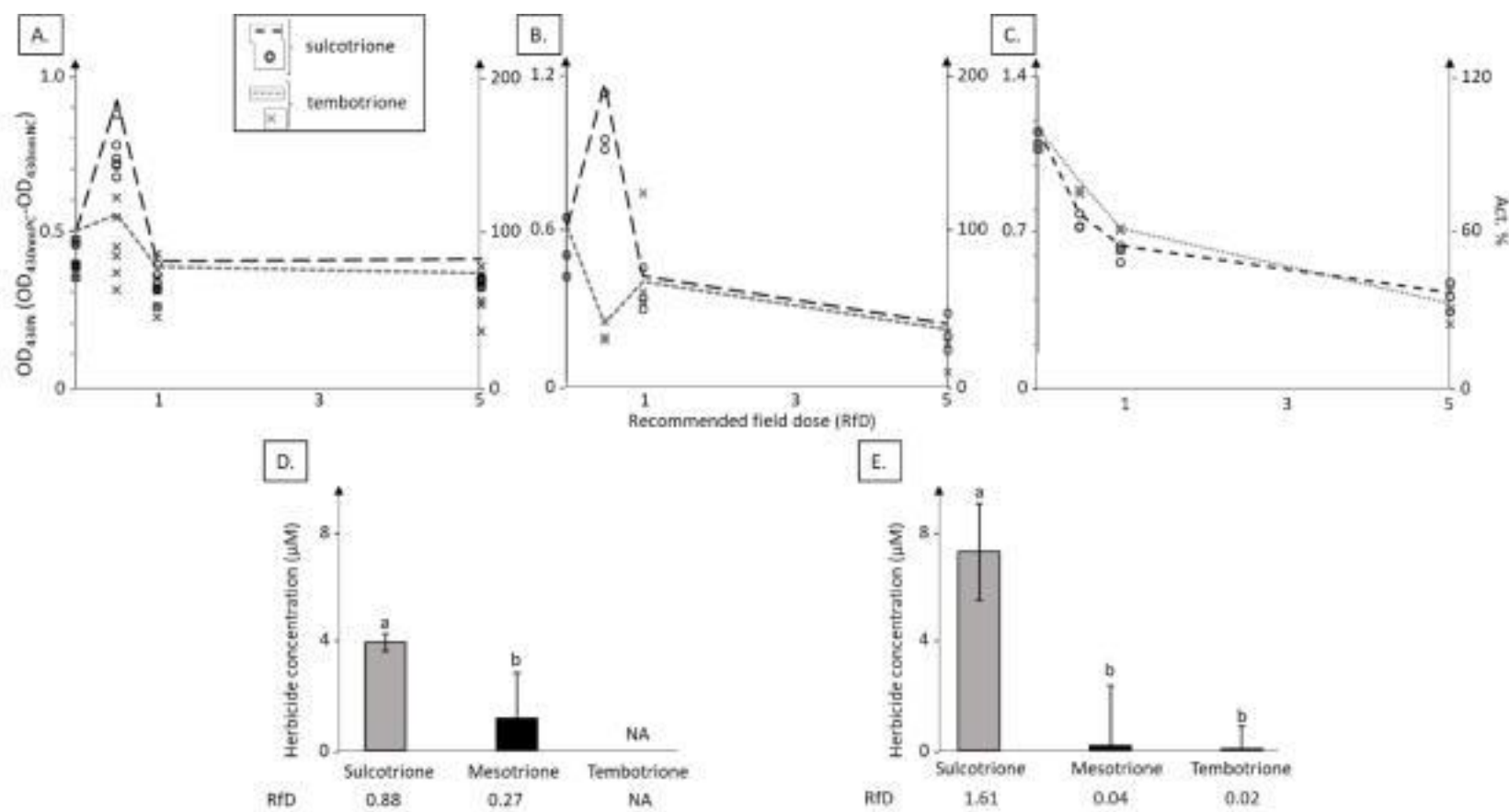


Figure 4. OD_{430N}, HPPD relative activity and EC₅₀ measurements in *B. cereus* ATCC14579 (B and D), *S. oneidensis* MR-1 (C and E) and *P. fluorescens* F113 (A).

OD_{430N} and Act.% were measured in presence of increasing doses of sulcotrione and tembotrione in *P. fluorescens* F113 (A), *B. cereus* ATCC14579 (B) and *S. oneidensis* MR-1 (C). EC₅₀ in *B. cereus* ATCC14579 (D) and *S. oneidensis* MR-1 (E) were calculated using the 'drc' package in R (Ritz *et al.* 2015). Their values are showed in μM on the left axis and the corresponding RfD is indicated under the molecule name.

4) Discussion

Among the four sequences (*B. cereus* ATCC14579, *S. oneidensis* MR-1, *P. fluorescens* F113 and *R. etli* CFN42) aligned in this study, a minimum of 34% similarity was measured and the active site of the enzyme appeared to be conserved in a large range of phyla and kingdoms. This observation is also verified when working on a higher number of bacterial HPPD protein sequences : the HIA and FFE motifs, typical from the active site of the enzyme, are conserved among 2506 protein sequences (Thiour-Mauprivez *et al.* 2020). Docking studies revealed that sulcotrione, mesotrione and tembotrione are able to bind with HPPD of *B. cereus* ATCC 14579, *S. oneidensis* MR-1 and *P. fluorescens* F113. However, the binding force of β -triketones with the HPPD *P. fluorescens* F113 is lower than the one of the two others. This suggests that β -triketones would have a lower effect on this bacterial strain. It is noteworthy that docking predictions are in agreement with the measurement done with our bioassay. Indeed, when exposing *P. fluorescens* F113 to whether 67.5 μ M of sulcotrione, 66 μ M of mesotrione or 51 μ M of tembotrione corresponding to $15 \times$ RfD in a resting cell assay, any inhibition of the HPPD enzymatic activity was measured. On the contrary, even at low doses of sulcotrione, mesotrione and tembotrione, HPPD enzymatic activities of *B. cereus* ATCC 14579 and *S. oneidensis* MR-1 were inhibited. For both strains, β -triketones were ranked as follows from the biggest to the lowest inhibitory effect: tembotrione, mesotrione and sulcotrione. Hence, inhibition of bacterial HPPD activity in response to β -triketones was strain- and molecule-dependent.

P. fluorescens F113, described as a Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Shanahan *et al.* 1992), was insensitive to tested β -triketones despite the fact that docking predicted that these active compound can interact with active site of the HPPD. Therefore, its insensitivity cannot only be explained by this poor interaction of triketone molecules with its HPPD enzyme. One may hypothesize possible detoxification phenomena supporting resistance to β -triketones specific to this bacterial strain. Among possible mechanisms, detoxification can be achieved by the transformation of the active compound. Although *Pseudomonas putida* 10P is known to degrade sulcotrione and used it as a source of carbon (Calvayrac *et al.* 2012), the transformation of β -triketones by *P. fluorescens* F113 is not yet described. Detoxification can also be achieved by efflux pumps that are pumping herbicides out of the cell. As an example, a putative major facilitator superfamily (MFS) transporter encoded by the *yhhS* gene was showed to confer resistance in an *E. coli* strain to glyphosate (Staub *et al.* 2012). Efflux pumps are commonly described in Gram-negative bacteria and especially in *Pseudomonas aeruginosa* where they are known to confer resistance to antibiotics. (Li *et al.* 2015; Rampioni *et al.* 2017). Other studies have tested the HPPD activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains in presence of NTBC and inhibitory effects are observed at high doses of the inhibitor. For the DKN343 and 1111 isolates, NTBC up to 900 μ M showed no inhibitory effects on HPPD activity and in the PAO1 mutant, *P. aeruginosa* hmgA::tn,

300 μM of NTBC are required to inhibit the enzyme activity (Ketelboeter and Bardy 2015). The same authors showed that the expression of the MexAB-OprM efflux pump is required for resistance to NTBC in DKN343 (Ketelboeter and Bardy 2017). This efflux pump is known to extrude a broad range of antibiotics, detergents or organic solvents (Chen et al. 2016). We can then hypothesize that a similar efflux pump can allow sulcotrione, mesotrione and tembotrione to be extruded by *P. fluorescens* F113.

The HPPD inhibition also depends on the molecule tested. Even if there was no differences in the binding force measured between the three β -triketones, tembotrione appears to have the lowest EC_{50} in both *B. cereus* ATCC14579 and *S. oneidensis* MR-1. Tembotrione was shown to be more toxic on the earthworm *Dendrobaena veneta* than glyphosate and nicosulfuron (Hackenberger et al. 2018). Even though the cited study did not compare tembotrione to other β -triketones, it gives us an information about its potential toxicity. When cloned in *E. coli*, the topramezone-resistant HPPD of the bacterium *Sphingobium* sp. TPM-19 exhibits a higher resistance to mesotrione (EC_{50} of 4.2 μM) compared to tembotrione (EC_{50} of 2.5 μM) (Liu et al. 2020) suggesting that, as observed in our study, tembotrione is more toxic than mesotrione on HPPD activity even for resistant HPPDs. This higher toxicity might be due to the fluorinated tail ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CF}_3$) which increase its lipophilicity and favors the passage of hydrophilic and lipophilic barriers (Dumas et al. 2017). However, tembotrione physicochemical property does not explain why it has no or a little effect on the HPPD enzymatic activity of *P. fluorescens* F113. One can notice that the MexAB-OprM efflux pump previously cited is not yet described neither in *B. cereus* ATCC 14579 nor in *S. oneidensis* MR-1, suggesting that these bacteria cannot extrude tembotrione once it has entered the cell. Regarding a possible biodegradation mechanism of tembotrione, the trifluoromethyl group added to this compound make it uneasy to degrade by bacteria (personal data). Taken together, these hypotheses can explain the fact that tembotrione harbor a higher effect on the HPPD activities of certain bacteria than sulcotrione does.

To our best knowledge, this is the first study that assess the affinity of three β -triketones for the HPPD of soil borne bacterial strains and measure the effect of agronomical doses of active compounds on the HPPD enzymatic activities of native soil bacteria under controlled conditions. This easy and cheap bioassay was found to be suitable to assess the effect of sulcotrione, mesotrione and tembotrione on pure bacterial strains. It could then be useful for a *a priori* risk assessment of β -triketones effects towards soil microorganisms as encouraged by the European Food Safety Authority (EFSA) that recommends to establish new specific protection goals to protect soil microorganisms (Martin-Laurent et al. 2013; Karpouzias et al. 2016). This bioassay might also be suitable for a *a posteriori* risk assessment to evaluate the effect of formulated plant protection products (PPPs). For example, the effects of β -triketone-based PPPs such as Decano[®] (made of sulcotrione), Calisto[®] (made of mesotrione) and Laudis[®] (made of tembotrione) could also be tested with our bioassay. In the future,

exposing this bioassay to extracts obtained from soils treated with β -triketones could also constitute a way for *a posteriori* risk assessment of formulated PPPs.

Acknowledgements: The authors kindly thank Marie Frendo and Tiffany Ferrer for their experimental work. The authors kindly thank Aleixei Sokorine for providing the *B. cereus* ATCC14579 strain, Charles Turick for the *S. oneidensis* MR-1 strain, Maria Esperanza Martinez Romero for *R. etli* CFN42, Fergual O'gara for *P. fluorescens* F113 and Sylvie Mazurier for both *P. fluorescens* CTR1015 and NEM419. This work was supported by the Région Occitanie and European Funds for Regional Development (FEDER). Authors also thank Perpignan University Via Domitia for their financial support (BQR 2018).

Author contributions: CTM, LB, FML and CC conceived and designed research. FD conducted *in silico* analysis and the docking experiments. CTM conducted the resting cells experiments. All authors read and approved the manuscript.

References

- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25 . <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Almeida-Paes R, Almeida-Silva F, Pinto GCM, Almeida M de A, Muniz M de M, Pizzini CV, Gerfen GJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM (2018) L-tyrosine induces the production of a pyomelanin-like pigment by the parasitic yeast-form of *Histoplasma capsulatum*. *Med Mycol* 56:506–509 . <https://doi.org/10.1093/mmy/myx068>
- Batallones V, Fernandez J, Farthing B, Shoemaker J, Qian KL, Phan K, Fung E, Rivera A, Van K, de la Cruz F, Ferreri AJ, Burinski K, Zhang J, Lizarraga V, Doan K, Rocha K, Traglia G, Ramirez MS, Tolmasky ME (2019) Disruption of *hmgA* by DNA duplication is responsible for hyperpigmentation in a *Vibrio anguillarum* strain. *Sci Rep* 9:14589 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51126-8>
- Beaudegnies R, Edmunds AJF, Fraser TEM, Hall RG, Hawkes TR, Mitchell G, Schaetzer J, Wendeborn S, 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 . <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.015>
- Brownlee JM, Johnson-Winters K, Harrison DHT, Moran GR (2004) Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. *Biochemistry* 43:6370–6377 . <https://doi.org/10.1021/bi049317s>
- Calvayrac C, Martin-Laurent F, Faveaux A, Picault N, Panaud O, Coste C-M, Chaabane H, Cooper J-F (2012) Isolation and characterisation of a bacterial strain degrading the herbicide sulcotrione from an agricultural soil. *Pest Manag Sci* 68:340–347 . <https://doi.org/10.1002/ps.2263>
- Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:12–21 . <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Chen W, Wang D, Zhou W, Sang H, Liu X, Ge Z, Zhang J, Lan L, Yang C-G, Chen H (2016) Novobiocin binding to *NalD* induces the expression of the *MexAB-OprM* pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 100:749–758 . <https://doi.org/10.1111/mmi.13346>
- Collakova E, DellaPenna D (2003) The Role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol* 133:930–940 . <https://doi.org/10.1104/pp.103.026138>
- Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*

- 35:W375-383 .
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm216>
- Dayan FE, Duke SO, Sauldubois A, Singh N, McCurdy C, Cantrell C (2007) p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for beta-triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* 68:2004–2014 .
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.026>
- DeLano WL PyMOL. DeLano Sceintifics, San Carlos, CA, 700
- Dixon DP, Edwards R (2006) Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol* 171:360–366 .
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.04.008>
- Dumas E, Giraudo M, Goujon E, Halma M, Khili E, Stauffert M, Batisson I, Besse-Hoggan P, Bohatier J, Bouchard P, Celle-Jeanton H, Costa Gomes M, Delbac F, Forano C, Goupil P, Guix N, Husson P, Ledoigt G, Mallet C, Mousty C, Prévot V, Richard C, Sarraute S (2017) Fate and ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: An overview to assess the environmental risks. *J Hazard Mater* 325:136–156 .
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.059>
- Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ (2016) Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* 11:905–919 .
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Fritze IM, Linden L, Freigang J, Auerbach G, Huber R, Steinbacher S (2004) The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol* 134:1388–1400 .
<https://doi.org/10.1104/pp.103.034082>
- Hackenberger DK, Stjepanović N, Lončarić Ž, Hackenberger BK (2018) Acute and subchronic effects of three herbicides on biomarkers and reproduction in earthworm *Dendrobaena veneta*. *Chemosphere* 208:722–730 .
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.047>
- Hagemans D, van Belzen IAEM, Morán Luengo T, Rüdiger SGD (2015) A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. *Front Mol Biosci* 2: .
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00056>
- Han H, Iakovenko L, Wilson AC (2015) Loss of homogentisate 1,2-dioxygenase activity in *Bacillus anthracis* results in accumulation of protective pigment. *PLOS ONE* 10:e0128967 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128967>
- Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 4:435–447 .
<https://doi.org/10.1021/ct700301q>
- Karpouzas DG, Tsiamis G, Trevisan M, Ferrari F, Malandain C, Sibourg O, Martin-Laurent F (2016) “LOVE TO HATE” pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:18947–18951 .
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Keith KE, Killip L, He P, Moran GR, Valvano MA (2007) *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *J Bacteriol* 189:9057–9065 .
<https://doi.org/10.1128/JB.00436-07>
- Ketelboeter LM, Bardy SL (2017) Characterization of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione resistance in pyomelanogenic *Pseudomonas aeruginosa* DKN343. *PloS One* 12:e0178084 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178084>
- Ketelboeter LM, Bardy SL (2015) Methods to inhibit bacterial pyomelanin production and determine the corresponding increase in sensitivity to oxidative stress. *J Vis Exp JoVE* e53105 .
<https://doi.org/10.3791/53105>
- Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28:337–418 .
<https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Liu B, Peng Q, Sheng M, Ni H, Xiao X, Tao Q, He Q, He J (2020) Isolation and characterization of a topramezone-resistant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Sphingobium* sp. TPM-19. *J Agric Food Chem* 68:1022–1029 .
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06871>
- Martin-Laurent F, Kandeler E, Petric I, Djuric S, Karpouzas DG (2013) ECOFUN-MICROBIODIV: an FP7 European project for developing and evaluating innovative tools for assessing the impact of pesticides on soil functional microbial diversity-- towards new pesticide registration regulation? *Environ Sci Pollut Res Int* 20:1203–1205 .
<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1368-0>
- Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TE, Hawkes TR, Holt DC, Townson JK, Wichert RA (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag Sci* 57:120–128 .

- [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E)
- Moran GR (2005) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Arch Biochem Biophys 433:117–128 . <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.015>
- Moran GR (2014) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and hydroxymandelate synthase: Exemplars of the α -keto acid dependent oxygenases. Arch Biochem Biophys 544:58–68 . <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.022>
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 30:2785–2791 . <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Neidig ML, Decker A, Kavana M, Moran GR, Solomon EI (2005) Spectroscopic and computational studies of NTBC bound to the non-heme iron enzyme (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase: active site contributions to drug inhibition. Biochem Biophys Res Commun 338:206–214 . <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.242>
- Neuckermans J, Mertens A, De Win D, Schwaneberg U, De Kock J (2019) A robust bacterial assay for high-throughput screening of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. Sci Rep 9:14145 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50533-1>
- Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. Plant Cell 7:2139–2149 . <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>
- Perez-Cuesta U, Aparicio-Fernandez L, Guruceaga X, Martin-Souto L, Abad-Diaz-de-Cerio A, Antoran A, Buldain I, Hernando FL, Ramirez-Garcia A, Rementeria A (2020) Melanin and pyomelanin in *Aspergillus fumigatus*: from its genetics to host interaction. Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol 23:55–63 . <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00078-0>
- Rampioni G, Pillai CR, Longo F, Bondi R, Baldelli V, Messina M, Imperi F, Visca P, Leoni L (2017) Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence. Sci Rep 7: . <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11892-9>
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015) Dose-response analysis using R. PloS One 10:e0146021 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rocaboy-Faquet E, Barthelmebs L, Calas-Blanchard C, Noguer T (2016) A novel amperometric biosensor for β -triketone herbicides based on hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibition: A case study for sulcotrione. Talanta 146:510–516 . <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.030>
- Rocaboy-Faquet E, Noguer T, Romdhane S, Bertrand C, Dayan FE, Barthelmebs L (2014) Novel bacterial bioassay for a high-throughput screening of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. Appl Microbiol Biotechnol 98:7243–7252 . <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5793-5>
- Santucci A, Bernardini G, Braconi D, Petricci E, Manetti F (2017) 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and its inhibition in plants and animals: small molecules as herbicides and agents for the treatment of human inherited diseases. J Med Chem 60:4101–4125 . <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01395>
- Schmaler-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T, Brakhage AA (2009) Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol 75:493–503 . <https://doi.org/10.1128/AEM.02077-08>
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. FEBS Lett 318:162–166 . [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80013-k](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80013-k)
- Serre L, Sailland A, Sy D, Boudec P, Rolland A, Pebay-Peyroula E, Cohen-Addad C (1999) Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. Struct Lond Engl 1993 7:977–988
- Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. Appl Environ Microbiol 58:353–358
- Singh D, Kumar J, Kumar A (2018) Isolation of pyomelanin from bacteria and evidences showing its synthesis by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme encoded by *hpdD* gene. Int J Biol Macromol 119:864–873 . <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.003>
- Staub JM, Brand L, Tran M, Kong Y, Rogers SG (2012) Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. J Ind Microbiol Biotechnol 39:641–647 . <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1057-x>

Steinert M, Flügel M, Schuppler M, Helbig JH, Supriyono A, Proksch P, Lück PC (2001) The Lly protein is essential for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in *Legionella pneumophila*.

FEMS Microbiol Lett 203:41–47 .
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10818.x>

Thiour-Mauprivez C, Devers-Lamrani M, Mounier A, Beguet J, Spor A, Calvayrac C, Barthelmebs L, Martin-Laurent F (2020) Design of a degenerate primer pair to target a bacterial functional community: The *hppd* bacterial gene coding for the enzyme targeted by herbicides, a study case. J Microbiol Methods 170:105839 .
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105839>

Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Curr Protoc Bioinforma Chapter 2:Unit 2.3 .
<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>

Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D (2002) Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. Plant Physiol Biochem 40:913–920 .
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01461-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01461-4)

Turick CE, Beliaev AS, Zakrajsek BA, Reardon CL, Lowy DA, Poppy TE, Maloney A, Ekechukwu AA (2009) The role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in enhancement of solid-phase electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. FEMS Microbiol Ecol 68:223–225 .
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00670.x>

Turick CE, Tisa LS, Frank Caccavo J (2002) Melanin production and use as a soluble electron shuttle for

Fe(III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY. Appl Environ Microbiol 68:2436–2444 .
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2436-2444.2002>

Vasanthakumar A, DeAraujo A, Mazurek J, Schilling M, Mitchell R (2015) Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by L-tyrosine. Microbiol Read Engl 161:1211–1218 .
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000030>

Webb B, Sali A (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. Curr Protoc Bioinforma 54:5.6.1-5.6.37 .
<https://doi.org/10.1002/cpbi.3>

Webb B, Sali A (2017) Protein structure modeling with MODELLER. In: Kaufmann M, Klinger C, Savelsbergh A (eds) Functional Genomics: Methods and Protocols. Springer, New York, NY, pp 39–54

Yang C, Pflugrath JW, Camper DL, Foster ML, Pernich DJ, Walsh TA (2004) Structural basis for herbicidal inhibitor selectivity revealed by comparison of crystal structures of plant and mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenases. Biochemistry 43:10414–10423 .
<https://doi.org/10.1021/bi049323o>

Zhu S, Lu Y, Xu X, Chen J, Yang J, Ma X (2015) Isolation and identification of a gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the red-brown pigment-producing bacterium *Alteromonas stellipolaris* LMG 21856. Folia Microbiol (Praha) 60:309–316 .
<https://doi.org/10.1007/s12223-015-0386-y>

Résultats complémentaires

L'activité HPPD de *B. cereus* ATCC14579, inhibée différemment par les trois molécules actives, pourrait être utilisée en analyse de routine pour détecter la présence de résidus d'herbicides β -tricétones dans les sols. Le principe de ce bioessai repose sur : (i) l'extraction des herbicides β -tricétones à partir d'échantillons de sols agricoles, (ii) la mise en contact des cellules de *B. cereus* ATCC14579 en « resting cells » avec l'extrait et (iii) la mesure de l'activité HPPD. Un tel protocole n'a pas été testé par manque de temps et la principale difficulté dans sa mise en place est que les rendements d'extraction des résidus de β -tricétones sont influencés par les propriétés physicochimiques des sols et des molécules actives considérés.

Les herbicides appliqués aux champs étant sous forme formulée, il se peut que les effets de la molécule active sur l'activité HPPD des cellules microbiennes soient modifiés en raison d'un effet synergique, antagoniste, ou non. Pour tester l'effet de la formulation des β -tricétones, nous avons exposé les isolats bactériens en « resting cells » à des doses croissantes de Decano®, le produit formulé de la sulcotrione. Comme pour la sulcotrione, la réponse apparaît isolat-dépendante (**figure III.2**).

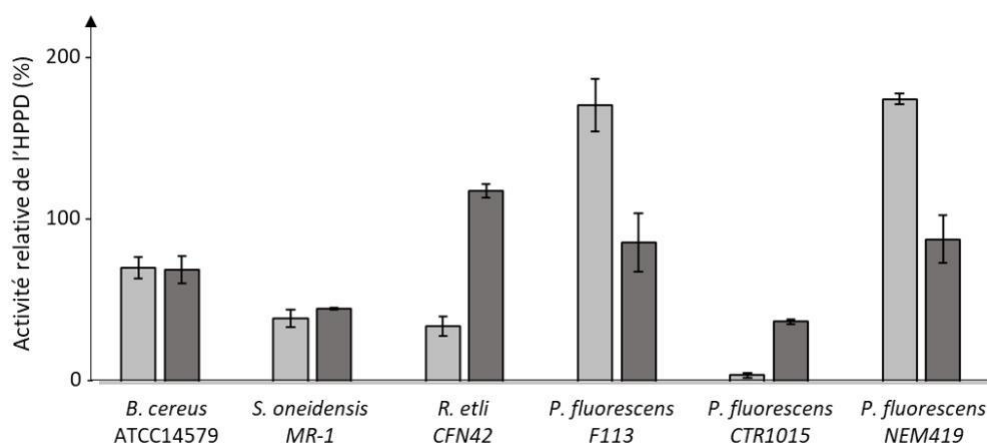


Figure III.2 : Effet du Decano® sur l'activité de l'HPPD des six souches modèles. En gris clair et en gris foncé sont représentés l'effet de l'exposition à 1 fois et 10 fois la dose agronomique de Decano®, respectivement.

Les CE_{50} chez *S. oneidensis* MR-1 (**figure III.3A**) et *B. cereus* ATCC14579 (**figure III.3B**) ont ensuite été calculées (**figure III.3**).

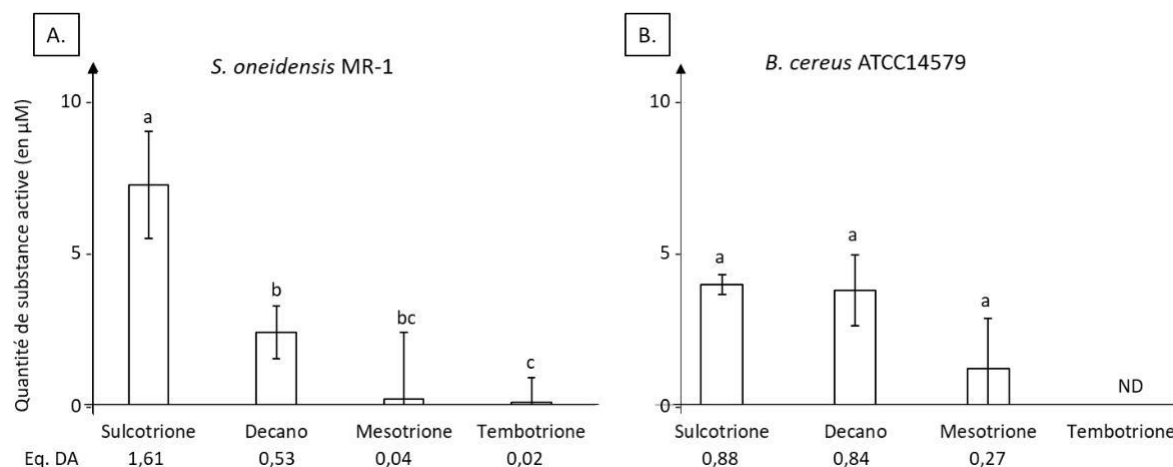


Figure III.3 : CE_{50} de *S. oneidensis* MR-1 (A) et *B. cereus* ATCC14579 (B) exposées à différents β -tricétones. Sur l'axe de gauche, les CE_{50} sont exprimées en μ M de substance active, le Decano® contenant 300g/L de sulcotrione. L'équivalence en nombre de fois la dose agronomique recommandée y est indiquée en dessous du nom de chaque molécule testée (Eq. DA). Ces CE_{50} ont été calculées à partir de la moyenne de 3 échantillons avec le package « drc » sous R (<http://bioassay.dk/>).

Nous remarquons que le Decano® semble avoir un plus fort potentiel inhibiteur que la substance active chez *S. oneidensis* MR-1 mais pas chez *B. cereus* ATCC14579. Bien que forts intéressants, ces résultats n'ont pas été intégrés à l'article en raison de leur trop grande variabilité. Il est à noter que cette variabilité n'était pas observée en réponse à l'exposition à la molécule active : la sulcotrione. Nous supposons ainsi que la molécule active du produit formulé ne pénètre pas de la même façon chez les différents isolats rendant la comparaison des résultats difficile. Une approche semblable sera conduite sur les produits formulés préparés avec la mésotrione et la tembotrione qui n'étaient pas en notre possession au moment où les tests furent effectués.

Le Decano® a également été intégré aux études en microcosmes et nous pourrions donc évaluer son effet sur l'abondance et la diversité de la communauté *hppd* et le comparer aux résultats obtenus pour la sulcotrione.

**Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire pour
l'étude de l'abondance et de la diversité de la communauté
bactérienne *hppd* des sols**

Introduction

Au-delà de l'activité enzymatique, l'abondance, la structure et la diversité de la communauté bactérienne *hppd* peuvent également servir de biomarqueur aux herbicides β -tricétones dans les sols. Ces paramètres sont mesurables par des approches de biologie moléculaire reposant sur l'extraction directe des acides nucléiques du sol et leur analyse par des essais de PCR quantitatives et de séquençage haut-débit d'amplicons *hppd* générés par PCR. Ces essais qPCR et PCR ont nécessité le développement d'une paire d'amorces oligonucléotidiques dégénérées ciblant spécifiquement une large variété de gènes *hppd* (figure IV.1).



Figure IV.1 : Intégration du chapitre IV dans l'étude.

En préambule du développement de l'outil moléculaire permettant de quantifier l'abondance et la diversité de la guildes bactérienne *hppd*, nous avons effectué une étude *in silico* afin de faire un état des lieux des séquences protéiques d'HPPD bactériennes séquencées et disponibles dans la banque de données Pfam (<https://pfam.xfam.org/family/PF14696>). Au total, au moment où nous avons réalisé l'analyse, il existait 2869 séquences décrites chez 1855 espèces bactériennes différentes (figure IV.2). Ces séquences ont été récupérées et constituent notre banque de référence de séquences HPPD.

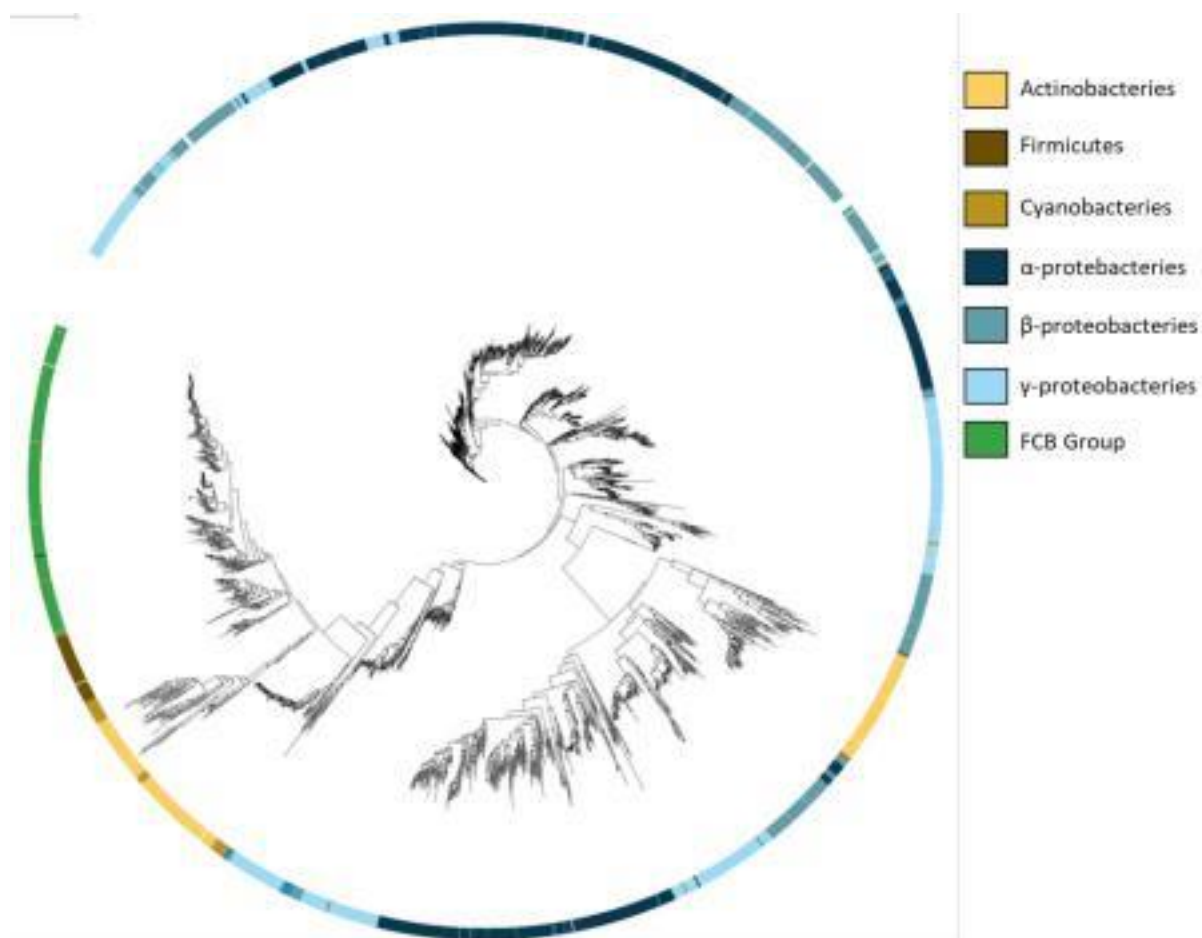


Figure IV.2 : Arbre phylogénétique des séquences protéiques d'HPPD bactériennes disponibles dans Pfam. Les séquences protéiques ont été récupérées sur Pfam (<https://pfam.xfam.org/family/PF14696>). L'arbre a été construit avec FastTree par la méthode du « Neighbour-Joining » et a été mis en forme sur iTol. Le cercle coloré représente les différents groupes bactériens auxquels sont affiliées les séquences.

L'arbre phylogénétique présenté en **figure IV.2** montre que tous les groupes bactériens sont représentés, avec une majorité de protéobactéries. Le gène *hppd* est donc communément retrouvé chez l'ensemble des bactéries.

Partant de ce postulat, nous avons voulu développer une paire d'amorces oligonucléotidiques ciblant le plus grand nombre de séquences HPPD de notre banque de référence. L'alignement des séquences protéiques a révélé une faible similarité entre les séquences, mais aussi, deux motifs répétés, HIA et FFE, sur lesquels nous avons basé le dessin de notre paire d'amorces dégénérées, qui, selon notre analyse *in silico*, ciblait 2506 des 2869 séquences de notre banque de référence (**cf figure 1 de la publication**).

Une première analyse de l'abondance et de la diversité du sol de Perpignan utilisant la paire d'amorces construite a été réalisée par qPCR et par séquençage Illumina MiSeq des amplicons *hppd*.

Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire pour l'étude de l'abondance et de la diversité de la communauté bactérienne *hppd* des sols

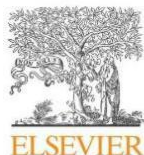
Les résultats obtenus ont ainsi validé l'outil moléculaire construit. L'analyse des données de séquençage obtenues avec nos amorces *hppd* a nécessité la création d'un pipeline spécifique.

La méthodologie que nous avons employée pour construire les amorces oligonucléotidiques permettant de quantifier l'abondance et la diversité de la guildes microbienne *hppd* pourrait être utilisée pour d'autres guildes fonctionnelles.

Ces résultats ont été publiés en janvier 2020 dans le journal Journal of Microbial Methods (JMM) (doi: 10.1016/j.mimet.2020.105839).

Article 3

Journal of Microbiological Methods 170 (2020) 105839



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth



Note

Design of a degenerate primer pair to target a bacterial functional community: The *hppd* bacterial gene coding for the enzyme targeted by herbicides, a study case

C. Thiour-Mauprivez^{a,b,c}, M. Devers-Lamrani^b, A. Mounier^b, J. Beguet^b, A. Spor^b, C. Calvayrac^{a,c}, L. Barthelmebs^{a,c}, F. Martin-Laurent^{b,*}

^a Univ. Perpignan Via Domitia, Biocapteurs-Analyses-Environnement, 66860 Perpignan, France

^b AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Agroécologie, F-21065 Dijon, France

^c Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579 Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Hppd
Degenerate primers
Soil bacterial community

ABSTRACT

The present work aimed to design a degenerate primer pair to target a large part of the *hppd* soil bacterial community, possibly affected by herbicides. We validated these primers by qPCR and high-throughput sequencing analysis of soil samples.

In recent scientific opinions, the European Food Safety Authority proposed to include soil ecosystemic services as a specific protection goal for risk assessment of pesticides and to protect soil microorganisms at the level of functional groups (EFSA, 2010). Another scientific opinion underlines the lack of standardized methods to measure the effects of pesticides on structural and functional endpoints of the microbial community (EFSA, 2017). To fill this knowledge gap, microbial genes encoding enzymes inhibited by substances with herbicidal activity could be ideal biomarkers of the direct effects of these molecules on soil microorganisms (Thiour-Mauprivez et al., 2019).

Screening of these active substances according to their mode of action led to the identification of those that affect the cell metabolism. A list of targeted enzymes was drawn up by the HRAC (<https://hracglobal.com/tools/world-of-herbicides-map>). Among them, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD; EC 1.13.11.27) appeared as a possible biomarker sensitive to the herbicides of the HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) F2 group (list of 13 active substances with herbicidal activity, supplementary file 1). This enzyme transforms tyrosine into fumarate and acetoacetate. These two compounds enter the central metabolism and lead to the formation of pyromelanin, a brown pigment that has antioxidant properties and protects fungi and bacteria from reactive oxygen species (ROS) (Langfelder et al., 2003; Turick et al., 2009). To our best knowledge, 2869 HPPD protein sequences from various bacterial species are available in the Pfam database ([http://pfam.xfam.org/family/](http://pfam.xfam.org/family/PF14696)

PF14696) (Fig. 1). One could hypothesize that among the numerous populations harbouring 4-HPPD within the bacterial community, several of them might be sensitive to HRAC F2 herbicides. From this point of view, both *a priori* and *a posteriori* risk assessment of HRAC F2 herbicides on soil microorganisms might be assessed by monitoring parameters of the *hppd* bacterial community.

In this context, the aim of this study was to develop a molecular tool to monitor the abundance and diversity of this community in the soil. In order to target as many bacterial *hppd* sequences as possible, we developed a pipeline (supplementary file 2) to design a degenerate primer pair targeting a broad spectrum of bacterial 4-HPPD genes. This was challenging since the known bacterial 4-HPPD proteins available on Pfam presented both length and sequence polymorphisms. Sequence lengths varied from 237 to 491 amino acids (95% of the 4-HPPD sequences were 325 to 360 amino acids in length), and the most distant protein sequences showed only 22% similarity (79/354 identical amino acids). The corresponding nucleic acid sequences were retrieved from GenBank, aligned with Muscle (Edgar, 2004), and too long, too short or too different sequences were removed manually. The 2506 remaining sequences were converted into protein sequences using Mega7 (Kumar et al., 2016), resulting in a clean bacterial 4-HPPD database (see taxonomic affiliation of these sequences in Table 1). The latter was submitted to j-CODEHOP (Boyce et al., 2009) to identify conserved motifs candidate for primer design. Two motifs were identified: HIA (harboured by 1957 out of 2506 sequences) and FFE (found in 2361

* Corresponding author.

E-mail address: fabrice.martin@inrae.fr (F. Martin-Laurent).

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105839>

Received 18 October 2019; Received in revised form 8 January 2020; Accepted 8 January 2020

Available online 09 January 2020

0167-7012/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

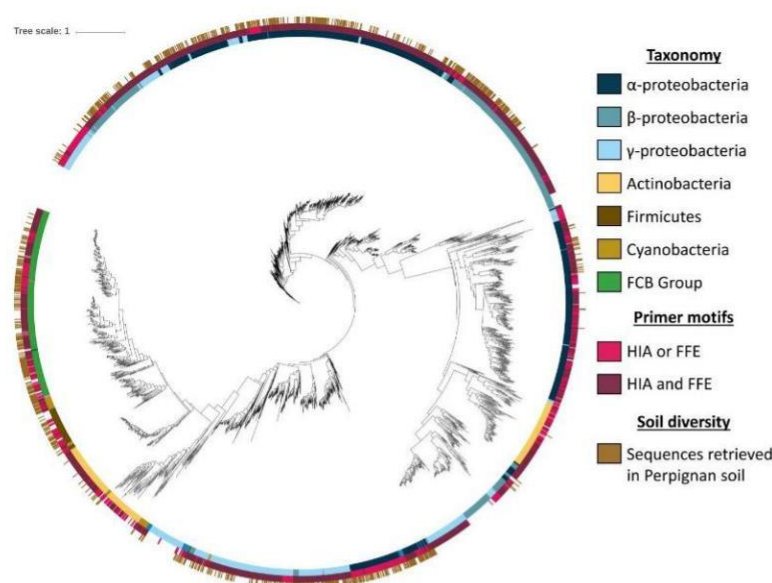


Fig. 1. Phylogenetic tree of the 4-HPPD database derived from Pfam, constructed with FastTree (Price et al., 2009) (Neighbour-Joining) and visualized with iTol (Letunic and Bork, 2019). The inner circle represents the affiliation of the 4-HPPD sequences to the main microbial groups indicated by different colours. The middle circle depicts the presence of the HIA and/or FFE motifs in the HPPD sequences, indicated by different colours. The outer circle shows the affiliation of the OTUs found in Perpignan soil samples to known HPPD sequences.

Table 1
Taxonomic affiliation of our *hpd* sequence database.

Phylum	Class	Number of sequences
Proteobacteria	α-proteobacteria	822
	γ-proteobacteria	529
	β-proteobacteria	484
Terrabacteria group	Actinobacteria	265
	Firmicutes	67
	Cyanobacteria	37
FCB group	Bacteroidetes	298
	Gemmatimonadetes	3
	Acidobacteria	1

sequences) (in pink and violet in Fig. 1). Twenty-base degenerate primers were then designed so that the nine bases in 3'-terminal position perfectly annealed the HIA or FFE motifs shared by 1812 of the 2506 analysed sequences (Fig. 2).

To validate our primer pair, three soil samples were collected from the surface layer (0–20 cm) of an arable field (University of Perpignan, France) (see properties in supplementary file 3). Soil samples were prepared as previously described (Romdhane et al., 2016). Nucleic acids were extracted with an RNeasy PowerSoil DNA Elution Kit (Qiagen) and the *hpd* gene was successfully amplified by PCR from these DNA extracts as described in supplementary file 4. The affiliation of the amplicons to the *hpd* gene sequence was checked by cloning and sequencing. Ninety-two percent of the 24 sequenced amplicons were related to *hpd* sequences (sequences submitted and released upon manuscript acceptance). The *hpd* community relative abundance was assessed by qPCR as described before (Romdhane et al., 2016) except for the HIA-F/FFE-R primer pair which was used at 10 μM in our final reaction mixture with an annealing temperature of 54 °C. A calibration curve was generated in triplicate using serial dilutions of the standard ranging from 10² to 10⁷ copies per reaction. Three no-template controls were included for each qPCR assay. The calibration curve showed an acceptable efficiency of 79% (R² = 0.99). The detection limit was around 10² copies of *hpd* copies per reaction (data not shown). Relative abundance was 421 ± 43 *hpd* sequences per 1000 sequences of 16S rDNA. *In silico* observations confirmed that *hpd* gene sequences were quite abundant among the soil bacterial community.

hpd sequence diversity of the amplicons obtained with a two-step PCR was assessed by Illumina 2*250 base pair MiSeq sequencing run (BioEnvironnement, University of Perpignan, France). The first PCR involved 27 cycles of amplification. It was performed in duplicate for each of the three soil DNA samples, and one no-template control using the NGS_HIA_F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGN-NNNARGGBATYACAGCAYATYGCN-3') and NGS_FFE_R (5'-GTCTCGTGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNCGYTGDATRAWYTCRA-ARAA-3') primer pair with a specific tail added to match the second PCR primer pair. Six microliters of the pooled first PCR products were used as a template for the second PCR that involved eight cycles of amplification with barcoded primers in duplicate. After pooling and amplicon size verification by electrophoresis, *hpd* amplicons were normalized using a SequalPrep™ Normalization Plate Kit (Invitrogen). Ten microliters of each sample were used for Illumina MiSeq sequencing. After assembly using PEAR (Zhang et al., 2014) and quality check using the QIIME pipeline (Caporaso et al., 2010), a total of 744,084 *hpd* nucleic sequences were obtained. These sequences were corrected and converted into proteins using framebot (Wang et al., 2013), then clustered using cd-hit (Li and Godzik, 2006) (threshold: 100%). The resulting 62,409 clusters were compared to the 4-HPPD database using blast, and affiliated to the closest relative sequence (minimum similarity: 57%). The designed primers allowed us to retrieve *hpd* sequences affiliated to most phylogenetic groups from our database, as shown in Fig. 1. However, only a few sequences related to Actinobacteria were obtained. This might be due not only to primer efficiency regarding this group but also to various biases such as DNA extraction and/or low abundance of Gram-positive bacteria in this soil. A small number of *hpd* sequences that contained only one (5.6%) or no motif (2.7%) were also amplified, suggesting that they may correspond to sequences not yet described.

This primer pair appears to be suitable for measuring the abundance of the *hpd* bacterial community and estimating its diversity in an arable soil. Further studies will aim to monitor the evolution of the *hpd* bacterial community exposed to herbicides of the HRAC F2 group. It is noteworthy that this primer design method could also be applied to amplify other functional genes, paving the way for the analysis of other bacterial subcommunities.

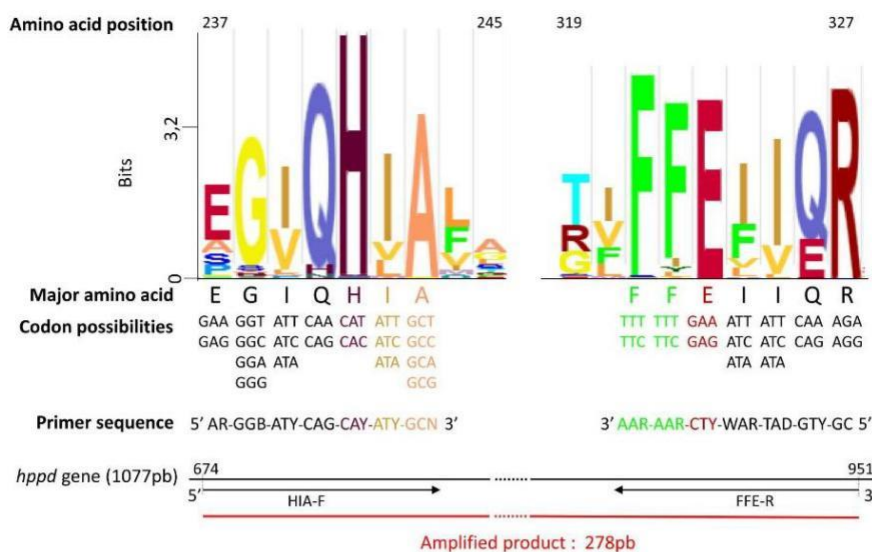


Fig. 2. HMM logos constructed with Skylign (Wheeler et al., 2014) showing the occurrence of the amino acids which composed our primer pair. R, A or G; B, C or G or T; Y, C or T; N, any base; D, A or G or T; W, A or T. The amino acid position and the amplified product length were determined in the *hppd* sequence of *Pseudomonas fluorescens* F113 (NC_016830.1).

Author statement

CTM was involved in the investigation process by conducting the experiments, analyzing the results and preparing a first draft of the manuscript. This was done under the guidance of LB and FML, the two PIs who supervised the PhD work of CTM who conceptualized the approach and accompanied CTM in the development of the methodology described in the paper. They contribute to the writing, reviewing and editing of the manuscript. To accomplish this work CTM had also the support of JB for conducting qPCR assays, of AM and AS for the NGS analysis and bioinformatics, MD for the design, validation of the primer pair as well as for the NGS analysis and bioinformatics and of CC for analytical chemistry to assess the fate of pesticide residues in soil. All authors edited the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The research project was done within the framework of the PhD studies of Miss Clémence Thiour-Mauprivez under the co-supervision of Pr Lise Barthelmebs and of myself. The PhD is funded by public funds of the Région Occitanie, European Funds for Regional Development (FEDER) and of the Perpignan University Via Domitia (France).

All authors are aware of and accept responsibility for the manuscript and declare no competing financial interest.

Acknowledgements

The authors thank the Région Occitanie, European Funds for Regional Development (FEDER) and Perpignan University Via Domitia (BQR 2018) for their financial support. The authors also thank Miss Annie Buchwalter for reading the manuscript and providing suggestions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105839>.

References

- Boyce, R., Chilana, P., Rose, T.M., 2009. iCODEHOP: a new interactive program for designing Consensus-DEgenerate hybrid oligonucleotide primers from multiply aligned protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 37, W222–W228. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp379>.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.L., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1303>.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- EFSA, 2010. EFSA J. 8, 1821. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1821>.
- EFSA, 2017. EFSA J. 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4982>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A.A., 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38, 143–158.
- Letunic, I., Bork, P., 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinform. Oxf. Engl.* 22, 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641–1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>.
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Barthelmebs, L., Calvayrac, C., Bertrand, C., Cooper, J.-F., Dayan, F.E., Martin-Laurent, F., 2016. Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptonterpene on the microbial community of two arable soils. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00775>.
- Thiour-Mauprivez, C., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., Barthelmebs, L., 2019. Effects of herbicide on non-target microorganisms: towards a new class of biomarkers? *Sci. Total Environ.* 684, 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.230>.
- Turick, C.E., Beliaev, A.S., Zakrajsek, B.A., Reardon, C.L., Lowy, D.A., Poppy, T.E., Maloney, A., Ekechukwu, A.A., 2009. The role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in enhancement of solid-phase electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00670.x>.
- Wang, Q., Quensen, J.F., Fish, J.A., Lee, T.K., Sun, Y., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2013. Ecological patterns of nifH genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a New Informatics Tool. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00592-13>.
- Wheeler, T.J., Clements, J., Finn, R.D., 2014. Skylign: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models. *BMC Bioinform.* 15, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-7>.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2014. PEAR: a fast and accurate illumina paired-end read merger. *Bioinform. Oxf. Engl.* 30, 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.

Chapitre V : Validation de l'outil moléculaire développé par une approche des microcosmes aux champs (lab-to-field)

Introduction

Une dernière partie de mon travail visait à tester l'outil moléculaire développé en conditions de laboratoire, par une étude en microcosmes, ainsi qu'en conditions réelles, par une étude aux champs. Les résultats de cette étude nous permettront de conclure sur la faisabilité d'utiliser l'abondance et la diversité de la communauté bactérienne *hppd* des sols comme biomarqueur d'exposition aux herbicides β -tricétones (**figure V.1**).

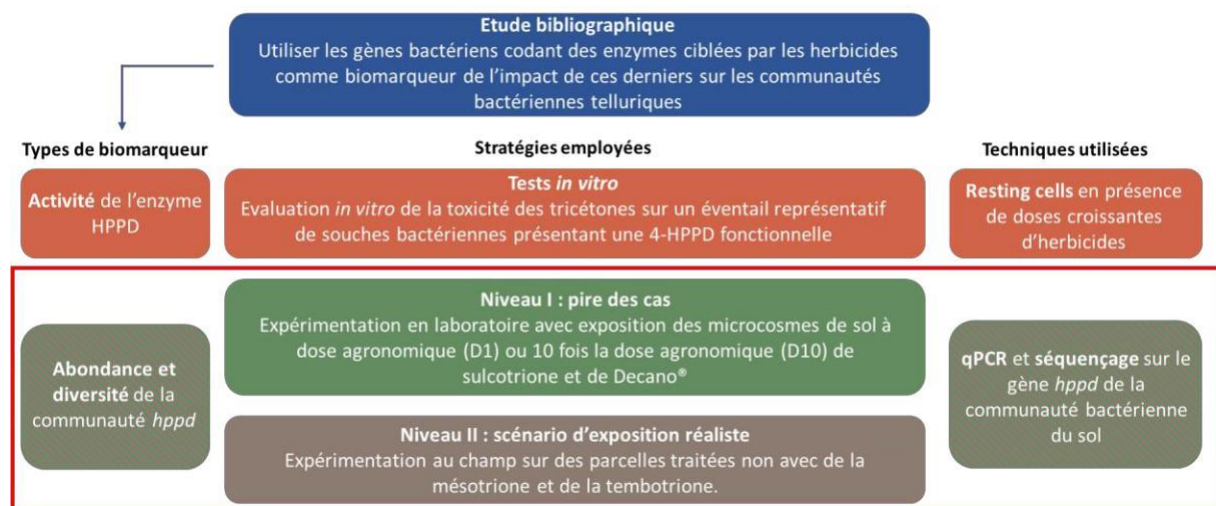


Figure V.1 : Intégration du chapitre V dans l'étude.

Nous avons, pour ce faire, construit cette étude en deux niveaux. Le premier niveau consistait à exposer des microcosmes de sol à 1 fois ou 10 fois la dose agronomique de sulcotrione et de son produit formulé, le Decano®. A notre connaissance, c'est d'ailleurs la première fois que le Decano® est utilisé dans une étude d'impact écotoxicologique. Afin de déterminer le scénario d'exposition de la communauté bactérienne aux herbicides, nous les avons extraits du sol et dosés par HPLC. Un protocole pour l'extraction de la sulcotrione à partir du sol de Perpignan était déjà disponible au laboratoire. Il a cependant fallu adapter ce protocole pour l'extraction de la molécule contenue dans le Decano®. Parallèlement à cela, les acides nucléiques ont été extraits aux différents temps de prélèvement (30 minutes, 7, 14 et 42 jours post-traitement) et l'abondance et la diversité de la communauté bactérienne *hppd* ont été mesurées par qPCR et par séquençage haut-débit grâce au couple d'amorces *hppd* précédemment présenté. Ni la sulcotrione ni le Decano® n'ont eu d'effets sur les paramètres mesurés dans cette communauté, quelle que soit la dose initiale appliquée. Les mêmes conclusions sont observées concernant l'effet de ces deux produits sur la communauté bactérienne totale du sol, résultats obtenus en quantifiant et en séquençant le gène codant l'ARNr 16S.

Un scénario d'exposition réaliste avec une étude sur des champs traités aux herbicides β -tricétones a fait l'objet du second niveau d'exposition. L'accès à ces champs a été rendu possible grâce à un partenariat avec Lionel Alletto de la chambre régionale d'agriculture Occitanie. Trois sols exposés ou non à des β -tricétones ont été prélevés à différentes périodes de l'année (**figure V.2**).

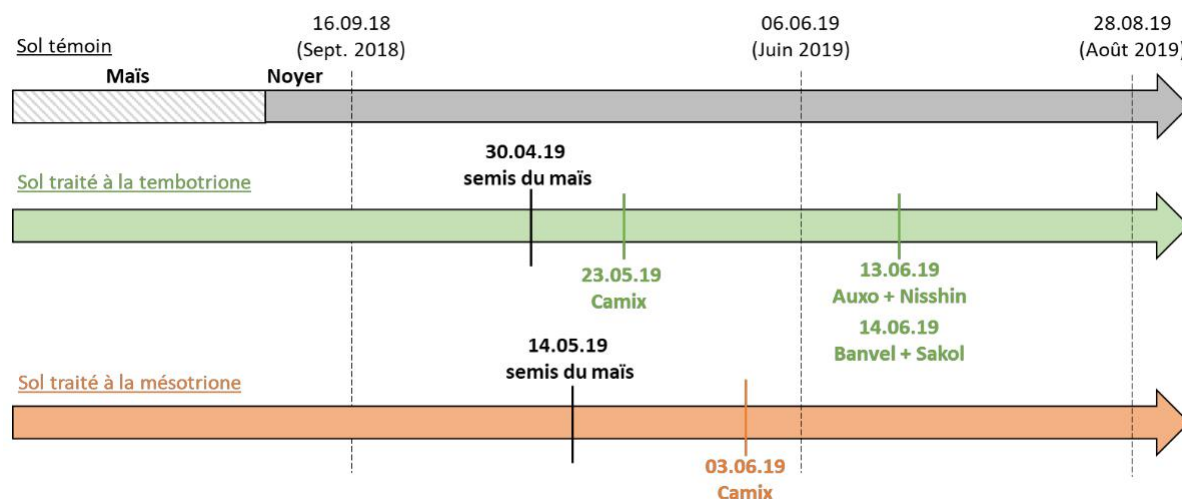


Figure V.2 : Pratiques culturales et traitements appliqués aux sols agricoles de l'étude. Le Camix® contient de la mésotrione à 40 g/L et a été appliqué à raison de 2,5 L/ha sur le sol représenté en vert et 2,7 L/ha sur celui représenté en orange. L'Auxo® contient 50 g/L de tembotrione et a été appliqué à raison de 0,6 L/ha sur le sol représenté en vert. Les autres traitements herbicides appliqués ne contiennent pas de β -tricétones.

L'abondance et la diversité des communautés bactériennes totales et *hppd*, aux trois temps et sur les trois sols ont été mesurées. Seul le sol représenté en vert sur la **figure V.2** présente une baisse du nombre relatif de copies du gène *hppd* en juin 2019. Ce nombre est ensuite, en août 2019, non significativement différent de celui mesuré en septembre 2018, premier temps de prélèvement. Il est à noter que ce sol présente également une diversité différente des deux autres sols.

Les conclusions de cette étude nous amènent à penser que l'abondance et la diversité des bactériennes totales et *hppd* ne sont pas modifiées suite à l'application d'herbicides β -tricétones dans les conditions testées.

L'article qui suit a été publié dans la session spéciale « Ecotoxicomic » du journal *Frontiers in Microbiology* en janvier 2021 (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610298>).

Article 4



ORIGINAL RESEARCH
published: 11 January 2021
doi: 10.3389/fmicb.2020.610298



Assessing the Effects of β -Triketone Herbicides on the Soil Bacterial and *hpd* Communities: A Lab-to-Field Experiment

Clémence Thiour-Mauprivez^{1,2,3}, Marion Devers-Lamrani³, David Bru³, Jérémie Béguet³, Aymé Spor³, Arnaud Mounier³, Lionel Alletto⁴, Christophe Calvayrac^{1,2}, Lise Barthelmebs^{1,2} and Fabrice Martin-Laurent^{3*}

¹ Biocapteurs-Analyses-Environnement, Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, France, ² Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579 Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France, ³ Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, ⁴ Université de Toulouse, INRAE, UMR AGIR, Castanet-Tolosan, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Christopher Bagwell,
Pacific Northwest National Laboratory
(DOE), United States

Reviewed by:

Giorgia Pertile,
Institute of Agrophysics (PAN), Poland
Malgorzata Baćmaga,
University of Warmia and Mazury
in Olsztyn, Poland

*Correspondence:

Fabrice Martin-Laurent
fabrice.martin@inrae.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbiotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 25 September 2020

Accepted: 07 December 2020

Published: 11 January 2021

Citation:

Thiour-Mauprivez C,
Devers-Lamrani M, Bru D, Béguet J,
Spor A, Mounier A, Alletto L,
Calvayrac C, Barthelmebs L and
Martin-Laurent F (2021) Assessing
the Effects of β -Triketone Herbicides
on the Soil Bacterial and *hpd*
Communities: A Lab-to-Field
Experiment.
Front. Microbiol. 11:610298.
doi: 10.3389/fmicb.2020.610298

Maize cultivators often use β -triketone herbicides to prevent the growth of weeds in their fields. These herbicides target the 4-HPPD enzyme of dicotyledons. This enzyme, encoded by the *hpd* gene, is widespread among all living organisms including soil bacteria, which are considered as “non-target organisms” by the legislation. Within the framework of the pesticide registration process, the ecotoxicological impact of herbicides on soil microorganisms is solely based on carbon and nitrogen mineralization tests. In this study, we used more extensive approaches to assess with a lab-to-field experiment the risk of β -triketone on the abundance and the diversity of both total and *hpd* soil bacterial communities. Soil microcosms were exposed, under lab conditions, to 1× or 10× the recommended dose of sulcotrione or its commercial product, Decano[®]. Whatever the treatment applied, sulcotrione was fully dissipated from soil after 42 days post-treatment. The abundance and the diversity of both the total and the *hpd* bacterial communities were not affected by the herbicide treatments all along the experiment. Same measurements were led in real agronomical conditions, on three different fields located in the same area cropped with maize: one not exposed to any plant protection products, another one exposed to a series of plant protection products (PPPs) comprising mesotrione, and a last one exposed to different PPPs including mesotrione and tembotrione, two β -triketones. In this latter, the abundance of the *hpd* community varied over time. The diversity of the total and the *hpd* communities evolved over time independently from the treatment received. Only slight but significant transient effects on the abundance of the *hpd* community in one of the tested soil were observed. Our results showed that tested β -triketones have no visible impact toward both total and *hpd* soil bacteria communities.

Keywords: soil, microorganisms, β -triketone, herbicide, *hpd* gene, lab-to-field, non-target organisms

INTRODUCTION

Soils are known as complex and dynamic habitats where a wide diversity of species lives. Soils could potentially shelter about a quarter of the world biodiversity (Decaëns et al., 2006). Among their inhabitants, microorganisms constitute a huge part of this biodiversity with several billions of bacterial species and more than a hundred thousand fungi species living in one gram of soil (Schloss and Handelsman, 2006). These microorganisms contribute to a series of complex processes and support key soil ecosystem functions associated to food supply, climate regulation or biochemical cycles among others (Wall et al., 2013; Graham et al., 2016). It then appears important to preserve and protect soil microorganisms and their habitats. In 2010, the European Commission officially recognized the need to protect soils and raised them as a non-renewable resource, as this was already the case for water (European Commission, 2010). The European soil biodiversity expert group identified the main pressures on soil organisms and human intensive exploitation appeared as a major threat (Gardi et al., 2013). This intensive exploitation is irretrievably linked to the use of plant protection products (PPPs), applied in conventional agriculture to protect crops from various pests. Among them, herbicides are still widely used to control weeds which enter in competition with crops. Some of them, developed during these last two decades are inspired by the biomimeticism. They mimicked active natural products and are consequently considered as “eco-friendly” (Cantrell et al., 2012).

This is the case for β -triketone herbicides, for which the chemical structure derived from a natural phytotoxin obtained from the Californian bottlebrush plant, *Callistemon citrinus* (Mitchell et al., 2001). Three β -triketone active substances are mainly used as herbicides on maize cultures: sulcotrione, mesotrione, and tembotrione (Schulz et al., 1993; Mitchell et al., 2001; Lee et al., 2008). These molecules inhibit the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) and lead to bleaching and death of weeds (Dayan et al., 2007; Rocaboy-Faquet et al., 2014). This enzyme is not only found in plants but in almost all living organisms, including microorganisms where it takes part to the tyrosine degradation pathway (Moran, 2005). The *hppd* gene, coding the targeted enzyme, is described in about 2000 bacterial species (Thiour-Mauprivez et al., 2020). Thus, soil bacteria, classified as “non-target organisms” by current EU regulation for pesticide authorization, might be impacted by β -triketones, with a possible domino effect on microbial functions supporting soil ecosystem services (Thiour-Mauprivez et al., 2019). In this context, studies assessing the ecotoxicological impact of β -triketone herbicides on soil total bacteria have recently been led (Romdhane et al., 2016a, 2019). In order to get a closer look to the direct effect of β -triketone, we report here the assessment of its ecotoxicological effect on the abundance and the diversity of the total bacterial community and the bacterial community harboring the *hppd* gene. These parameters were measured in a lab-to-field experiment in which lab conditions were led with the active substance at higher doses than the recommended ones, to test the “worst-case scenario” and field experiments were led with recommended field doses (RfDs), in frame with a “realistic scenario of exposure,” as recommended

by the European Food Safety Authority (Ockleford et al., 2017). Our lab-to-field experiment complies the two-tiered approach to assess the possible toxicity of β -triketones on the *hppd* bacterial community which harbors the gene encoding the enzyme targeted by these herbicides.

Under lab conditions, soil microcosms were treated with $1\times$ or $10\times$ the RfD of sulcotrione using the active ingredient or the formulated product (Decano®) or not treated (control). Under these conditions, dissipation studies of the active substance or the formulated PPP in soil microcosms were carried out in order to estimate the scenario of exposure of soil microorganisms. Under field conditions, samples were collected in maize crops exposed to PPP treatments comprising several β -triketones or not treated at all (control). For both lab and field experiments, the abundance and the diversity of both the total and the *hppd* bacterial communities were estimated by quantitative PCR (qPCR) and high throughput sequencing, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Laboratory Experiment

Reagents

Standard of sulcotrione [(S) 98.8% purity], a weak acidic herbicide with pKa value of 2.87 and MW = 328.7 g.mol⁻¹ was purchased from Sigma-Aldrich, France. Formulated sulcotrione [Decano® (D)] was purchased from (SAPEC Agro, France). Methanol and acetonitrile (HPLC quality) were purchased from Carlo Erba, dichloromethane for pesticide analysis from Riedel-de-Haën GmbH, trifluoroacetic acid (99.0% purity) and hydrochloric acid (38.0%) from Aldrich and water was Milli-Q quality.

Soil Sampling and Microcosm Set-up Under Lab Conditions

Soil samples were collected from the surface layer (0–20 cm) of an arable field located in Perpignan, France. According to the World Reference Base of Soil Resources, it is a sandy loam clay-rich soil composed of 16.2% clay, 29.1% silt, and 54.7% sand. Granulometry was measured according to the particle size 5 fractions with no decarbonization method (NF X 31-107). Soil contains 27.5 g/kg of organic matter, 15.99 g/kg of organic carbon, and 1.25 g/kg of nitrogen. These contents were measured by dry combustion according to the standard methods NF ISO 10694 and NF ISO 13878. Soil physicochemical characteristics are 99 meq/kg Cation Exchange Capacity (CEC), 260.3% Ca2/CEC and water pH 8.04. CEC was measured according to the Metson method (NF X 31-130) and water pH was determined using a glass electrode (NF ISO 10390). Soil samples were sieved to 2 mm and soil moisture was of 3%. Soil samples were divided in microcosm of 20 g of soil each and treated or not with active ingredient {2-[2-chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione} (S) or formulated compound [Decano® (D)]. For each treatment (sulcotrione or Decano®), twelve microcosms were treated at $1\times$ RfD (1.5 μ g/g), twelve were treated at $10\times$ RfD (15 μ g/g) and twelve remained untreated (control). These doses were chosen to fulfill the two-tier scenario

of exposure. Soil moisture was adjusted at 22% relative humidity. Soil microcosm were incubated at $21 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark. Every 2 days, microcosms were ventilated and soil moisture was adjusted if needed under sterile conditions. Soil samples were collected after 30 min of treatment (day 0), 7, 14, and 42 days of incubation and immediately stored at -20°C for further analyses. Three replicates were prepared for each treatment (S control, S $1 \times$ RfD, S $10 \times$ RfD, D control, D $1 \times$ RfD, and D $10 \times$ RfD).

Herbicide Quantification

Extraction step

This analytical method was an adaptation of the procedure previously published by Chaabane et al., 2008. In order to follow active substance or formulated PPP dissipation in soil, 10 g of soil (triplicates) for each condition were extracted twice with 30 mL of acetonitrile/0.1 M hydrochloric acid (90/10; V/V) under agitation at 100 rpm orbital shaking for 50 min and then filtered on a Whatman filter GF/A 47 mm. The organic filtrate was evaporated at 30°C and the acidic aqueous solution was then extracted twice with 6.0 mL of dichloromethane. The organic phase was evaporated to dryness and then solubilized with 3.0 mL of methanol. The final extract was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Chromatographic analysis

Soil extracts treated with sulcotrione were analyzed using a VWR Hitachi LaChrom apparatus consisted of auto-sampler L-2200 and HTA L-2130 pump modules equipped with a Kinetex C18 column (5 μm , 150 mm $\times$ 3 mm) and a DAD L-2450 UV/Vis detector set at 285 nm. For sulcotrione, the mobile phase consisted of a mixture of water acidified with 0.1% acetic acid (AW) and acetonitrile (ACN) delivered at a flow-rate of 0.5 mL/min with an isocratic mode 70/30 (AW/ACN) for 15 min. For soil extracts treated with Decano[®], the mobile phase was the same as the one used for sulcotrione but was delivered at a flow-rate of 1 mL/min with an isocratic mode 80/20 (AW/ACN) for 8 min.

Analytical performance

Recovered analytics were evaluated by spiking soil samples replicates ($n = 5$) with increasing doses (0.1–75 $\mu\text{g/g}$) of analytical standards of sulcotrione or formulated sulcotrione (Decano[®]) prior to extraction. The mean recovery rates were estimated as 85 ± 10 and $52 \pm 4\%$, for sulcotrione and Decano[®], respectively. The limit of quantification, defined as the sample concentration required to give a signal-to-noise ratio of 5:1 was evaluated to 0.1 $\mu\text{g/g}$ for both sulcotrione and Decano[®].

Field Experiment

Soil samples were collected from the surface layer (0–20 cm) of three arable fields located near Tarbes, France. These fields were not part of an experimental parcel, they were exploited by farmers and, thus, were treated at RfDs of PPPs with a crop protection program which we did not choose. Field 1 has not received any PPPs for 3 years and was historically cultivated with maize but is now cultivated with walnut tree and will constitute the control field. Field 2 was sown with maize on the 30th April 2019 and

was treated with Camix[®] (containing 40 g/L mesotrione, applied at 2.5 L/ha) on the 23th May 2019 and with Auxo[®] (containing 50 g/L tembotrione, applied at 0.6 L/ha), Nisshin (nicosulfuron-based, 0.6 L/ha), Banvel (dicamba-based, 0.2 L/ha), and Sakol (alkylpolyglucoside-based, 0.1 L/ha) on the 3rd June 2019. Three samplings were made over one crop cycle on these three fields with three replicates made of seven composite-samples each done using an auger. The first sampling time was before seedling and treatments on the 16th September 2018 (September 2018). The second was made after treatment for field 3 whereas in the field 2, it was made between the first and the second treatment on the 6th June 2019 (June 2019). For all the fields, the last sampling campaign was led on the 28th August 2019 (August 2019). Soil properties and chemical characteristics are described in the **Supplementary Table 1**. Soil samples were stored at -20°C until use.

Ecotoxicological Impact of β -Triketone on Soil Bacterial Communities

Soil DNA Extraction

At each sampling time of the experiment, nucleic acids were extracted with RNeasy PowerSoil DNA Elution Kit (Qiagen). DNA quality was checked and concentrations quantified by Quant-iTTM PicoGreenTM (Thermo Fischer Scientific, France). A mean of 0.19 ± 0.18 and 0.38 ± 0.29 $\mu\text{g/g}$ of soil were extracted from laboratory and field samples, respectively. DNA extracts were stored at -20°C until use.

Abundance of Total and *hppd* Bacterial Communities

Prior to quantification, inhibition tests were performed as previously described in Petric et al. (2011), in order to detect the presence of DNA co-extracts possibly inhibiting the qPCR assays. Samples were then diluted at 1 ng/ μL . Amplification of both *hppd* and 16S rRNA genes were carried out using a ViiATM 7 (Thermo Fisher Scientific, France) in a final reaction mixture of 15 μL . The mixture contained SYBR Green PCR Master Mix (TakyonTM Low ROX SYBR[®] 2 $\times$ Mastermix Blue, Eurogentec, Belgium), 250 ng of T4 gp32 (Qbiogene, MP Biomedicals, France), 10 μM of each *hppd* primer (HIAF and FFER, Thiour-Mauprivez et al., 2020), or 1 μM of each 16S rRNA primer (341F and 534R, Muyzer et al., 1996) and 1 ng of soil DNA template. qPCR runs were as follow for the amplification of the *hppd* gene: *Taq* polymerase enzyme activation step for 3 min at 95°C , then 40 cycles of 10 s of denaturation at 95°C , 30 s of annealing at 54°C , elongation for 30 s at 72°C , and a melting curve stage with 15 s at 95°C , 1 min at 68°C , and 15 s at 95°C (data were collected at this step). Run parameters used for the amplification of 16S rRNA gene were previously described by Romdhane et al. (2016a). Standard curves were generated using serial dilutions of linearized plasmid pGEM-T easy vector system containing each standard gene sequence (ranging from 10^2 to 10^7 copies per qPCR reaction). For each condition tested, two qPCR assays were conducted. In each assay, qPCR calibration was performed in triplicate and three no-template controls (NTC) were also included.

Diversity of Total and *hpd* Bacterial Communities

Total and *hpd* bacterial diversities were monitored using a high throughput sequencing of 16S rRNA and *hpd* amplicons, respectively (Illumina MiSeq, Microsynth). A two-step PCR procedure was used to amplify the *hpd* gene from obtained DNA extracts. In the first step, 27 cycles of amplification were performed in duplicate using the NGS_FFER-NGS_HIAF primer pair (Thiour-Mauprivez et al., 2020). Duplicates were then pooled and a second step of PCR was conducted, in duplicate, using 1 μ L of the previous PCR as template to carry out eight cycles of amplification with barcoded primers. To amplify the 16S rRNA gene from obtained DNA extracts, 20 cycles of amplification were performed in duplicate using the U341F-805R primer pair (Takahashi et al., 2014). Duplicates were then pooled and a second step of PCR was conducted, in duplicate, using 1 μ L of the previous PCR as template to carry out 15 cycles of amplification with barcoded primers. After pooling, amplicon size was checked by electrophoresis on a 2% agarose gel. 25 μ L of PCR products were normalized using SequalPrep™ Normalization Plate Kit (Invitrogen) and 10 μ L of each sample were sent to Microsynth for sequencing. 16S rRNA amplicon data analysis were conducted as described in Romdhane et al. (2016a). For the *hpd* amplicon data analysis, reads were quality-controlled and assembled using PEAR (Zhang et al., 2014). Unassembled reads and once-assembled reads outside the expected range were discarded. Sequences were corrected and converted into protein sequences using framebot (Wang et al., 2013), then clustered into OTUs using cd-hit (Li and Godzik, 2006). Representative *hpd* sequences for each OTU were aligned using Muscle (Edgar, 2004) and the maximum likelihood phylogeny was calculated using FastTree 2 algorithm (Price et al., 2009). Several α -diversity indices (PD whole tree, Simpson reciprocal, and Shannon indices) were then calculated using rarefied OTU tables at the depth of 6000 sequences per sample in the microcosms treated with sulcotrione, 15,000 sequences per sample in those treated with Decano® and 20,000 sequences per sample in the soils sampled directly from fields considering the 16S rRNA amplicons. Same indices were calculated using rarefied OTU tables of 2300 sequences per sample in the microcosms treated with sulcotrione, 2000 sequences per sample in those treated with Decano® and 4200 sequences per sample in the soils sampled directly from fields considering the *hpd* amplicons. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots were generated in QIIME based on weighted UniFrac distance matrix and coordinates were used to draw 3D figures.

Statistical Analysis

Statistical analysis were conducted using R software and a significance threshold was set at a p -value of 0.05 (R Development Core Team, 2005). For qPCR results, data were log-transformed. Data normality was verified by a Shapiro-Wilk test. The homogeneity of variances of the residues was verified by a Levene test. Data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey test was performed for each treatment and each time point. Not all data showed a normal distribution. Consequently, non-parametric test (Kruskal-Wallis test) was carried out on

non-normal distributed data. Weighted or unweighted UniFrac distance matrices were subjected to a PERMANOVA analysis using the ADONIS function from R package “vegan” (Oksanen et al., 2020). Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLS-DA) was performed to select discriminant OTUs between different treatments using the function “splsda” from R package mixOmics (Rohart et al., 2017). A homemade R script was used to identify the discriminant OTUs by performing an ANOVA on each of these OTUs.

RESULTS

Fate of Sulcotrione and Decano® in Soil Microcosms

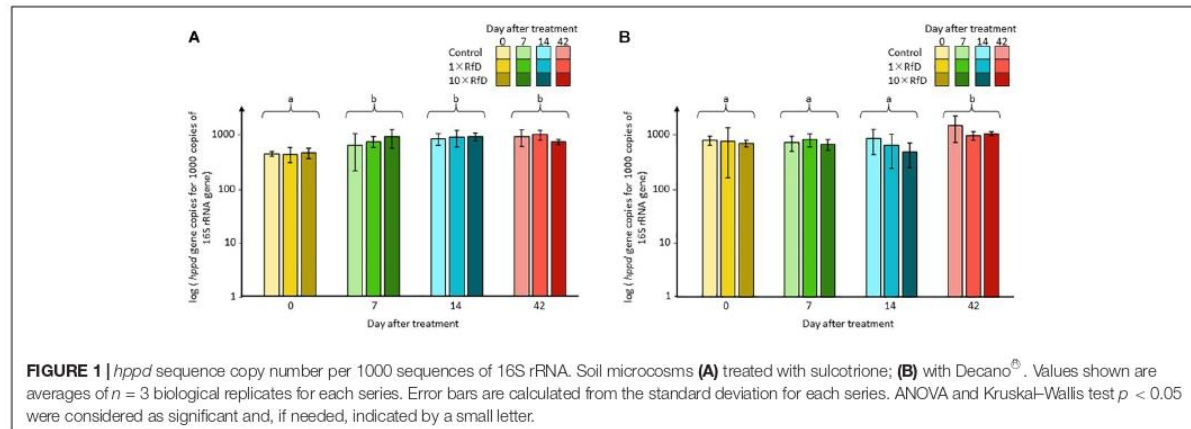
In order to decipher the exposure scenario of bacteria in soil microcosms, kinetics of dissipation of sulcotrione and Decano® in soils were measured at each time point (Table 1). Sulcotrione and Decano® dissipation kinetics could be reasonably described by a first-order kinetics ($C = C_0.e^{-kt}$) for the application at 1 $\times$ RfD. Half-life time of sulcotrione in Perpignan soil was estimated at *ca* 4 days for 1 $\times$ RfD. Regarding Decano®, half-life time in Perpignan soil was evaluated at *ca* 1.5 days for the 1 $\times$ RfD condition. For the application at 10 $\times$ RfD, we were only able to estimate graphically the half-life time of sulcotrione at *ca* 14 days and of Decano® at *ca* 18 days (Supplementary Figure 1). Anyhow, sulcotrione and Decano® both reached an unquantifiable concentration after 42 days of exposure in Perpignan soil, whatever the starting concentration of RfD applied.

Impact of Sulcotrione and Decano® on the Abundance of the Total and the *hpd* Bacterial Community

The impact of sulcotrione and Decano® on the abundance of the total and the *hpd* bacterial community in the soil microcosms was monitored by qPCR. Sequence copy numbers ranged from 8.99×10^3 to 3.82×10^5 sequences of 16S rRNA per nanogram of DNA and from 4.81×10^3 to 2.75×10^5 sequences of *hpd* per nanogram of DNA. The abundances of both the total and the *hpd* bacterial communities were not affected by the β -triketone treatments applied. Similarly, the relative abundance of *hpd* sequences per 1000 sequences of 16S rRNA (Figure 1) was not affected by any of the β -triketone treatments applied. In both cases, only a time effect was observable with relative abundance measured at day 0 different from the other sampling days

TABLE 1 | Main environmental parameters of sulcotrione and Decano® estimated by modeling their kinetics of dissipation in Perpignan soil.

Treatment	Sulcotrione		Decano®	
RfD	1	10	1	10
k (day)	0.36 $\pm$ 0.02	n.d.	0.43 $\pm$ 0.03	n.d.
DT ₅₀ (day)	1.94 $\pm$ 0.08	n.d.	1.63 $\pm$ 0.11	n.d.
R ²	0.81 $\pm$ 0.10	n.d.	0.99 $\pm$ 0.01	n.d.



(ANOVA, $p = 0.001$) for microcosms treated with sulcotrione and relative abundance measured at day 42 different from those measured at 0, 7, or 14 days (Kruskal-Wallis test, $p = 0.002$) for microcosms treated with Decano®.

community was not modified over time or according to the RfD applied. Same conclusions were made on the measurements of the total bacterial diversity, monitored by 16S rRNA Illumina sequencing (Supplementary Figure 2).

Impact of Sulcotrione and Decano® on the Diversity of the *hpd* Bacterial Community

To further investigate the possible ecotoxicological impact of sulcotrione and Decano® on the diversity of total and *hpd* bacterial communities, the 16S rRNA and the *hpd* amplicons were amplified from soil DNA extracts and sequenced. These sequences were grouped into 2849 OTUs and 1688 OTUs at 80% amino-acid sequence identity threshold for sulcotrione and Decano® treatment respectively. α -Diversity was estimated for each treatment by a range of indices depicted in Table 2. No significant differences neither overtime nor in response to the RfD applied was shown for all tested treatments. Same measurements were made on the total bacterial α -diversity by sequencing the 16S rRNA gene. Sequences were grouped in 4099 OTUs in the soil treated with sulcotrione and in 4767 OTUs in the soil treated with Decano® at 94% nucleotide sequence identity threshold. A time effect was highlighted but no significant differences due to the treatment applied were shown (Supplementary Table 2). Together, these results indicate that the α -diversity of both the total and the *hpd* communities are not affected by sulcotrione or Decano® in our experimental conditions.

The ecotoxicological impact of sulcotrione and Decano® on the *hpd* bacterial β -diversity of soil microcosms was evaluated. For each treatment, the analysis of the PCoA, representing the weighted UniFrac distances, showed no significant difference in the *hpd* bacterial community composition between RfD applied (Control, 1x RfD, or 10x RfD) and sampling time (0, 7, 14, 42 days after treatment) (Figure 2).

Altogether, the results obtained for α - and β -diversity measurements indicate that the diversity of the *hpd* bacterial

TABLE 2 | Richness and diversity indices of the *hpd* bacterial community calculated for soil microcosms exposed for 0, 7, 14, and 42 days to sulcotrione (S, in brown) or Decano® (D, in blue) applied at different concentrations (control, 1x RfD, and 10x RfD).

Day after treatment	Treatment	Observed species	PD whole tree	Simpson reciprocal
0	S control	211 ± 24	62 ± 5	18 ± 6
	S 1x RfD	188 ± 26	55 ± 7	16 ± 2
	S 10x RfD	184 ± 49	54 ± 13	15 ± 8
	D control	196 ± 17	52 ± 4	16 ± 2
	D 1x RfD	216 ± 38	59 ± 8	26 ± 17
	D 10x RfD	200 ± 15	54 ± 2	17 ± 1
7	S control	165 ± 21	49 ± 6	9 ± 2
	S 1x RfD	192 ± 28	56 ± 6	16 ± 6
	S 10x RfD	167 ± 11	49 ± 3	11 ± 1
	D control	206 ± 24	55 ± 6	21 ± 7
	D 1x RfD	208 ± 17	57 ± 4	26 ± 14
	D 10x RfD	233 ± 12	63 ± 1	26 ± 1
14	S control	177 ± 28	50 ± 7	11 ± 1
	S 1x RfD	168 ± 18	48 ± 5	9 ± 1
	S 10x RfD	180 ± 35	52 ± 7	10 ± 2
	D control	204 ± 3	55 ± 2	18 ± 1
	D 1x RfD	230 ± 24	61 ± 5	26 ± 11
	D 10x RfD	225 ± 17	59 ± 5	25 ± 5
42	S control	176 ± 21.2	51 ± 5	11 ± 2
	S 1x RfD	167 ± 25	50 ± 6	12 ± 2
	S 10x RfD	199 ± 31	57 ± 8	14 ± 4
	D control	211 ± 1	57 ± 0	19 ± 1
	D 1x RfD	213 ± 7	57 ± 1	19 ± 2
	D 10x RfD	204 ± 11	57 ± 3	16 ± 2

Mean values ± confidence intervals are shown. No significant difference for each treatment and each time point was shown (Kruskal-Wallis test $p < 0.05$ were considered as significant and, if needed, indicated by a small letter).

Abundance and Diversity of the Total and the *hpd* Bacterial Community in Agricultural Soils Exposed to β -Triketone Herbicides

The ecotoxicological impact of PPP treatments on the abundance, the diversity and the composition of the total and the *hpd* bacterial communities was also assessed under real agronomical conditions.

Sequence copy numbers ranged from 1.21×10^5 to 4.63×10^5 sequences of 16S rRNA per nanograms of DNA and from

7.90×10^4 to 2.62×10^5 sequences of *hpd* per ng of DNA. The relative abundance of *hpd* gene copies per 1000 sequences of 16S rRNA is shown in Figure 3A. An ANOVA test suggest that whatever the treatment applied, values recorded in the samples collected in September 2018 were significantly higher than that of the two others (June 2019 and August 2019) ($p < 0.01$). Considering the relative abundance of *hpd* found in each treated soil, only values observed in field 2 were statistically different from those measured in the others: values recorded in June 2019 (ANOVA, $p < 0.01$) were significantly lower than those of September 2018. This was no longer observed on samples of

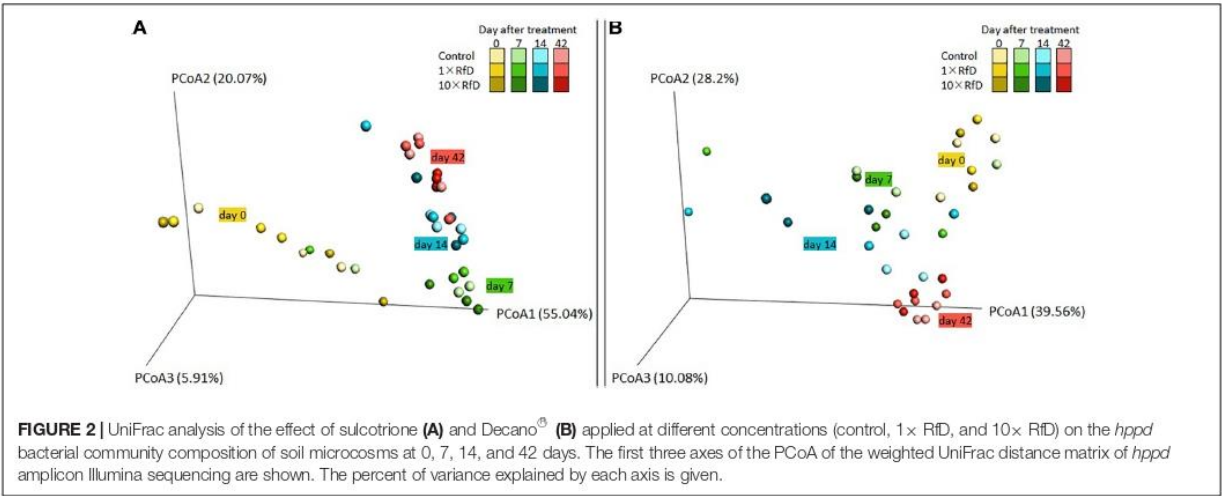


FIGURE 2 | UniFrac analysis of the effect of sulcotrione (A) and Decano[®] (B) applied at different concentrations (control, 1x RfD, and 10x RfD) on the *hpd* bacterial community composition of soil microcosms at 0, 7, 14, and 42 days. The first three axes of the PCoA of the weighted UniFrac distance matrix of *hpd* amplicon Illumina sequencing are shown. The percent of variance explained by each axis is given.

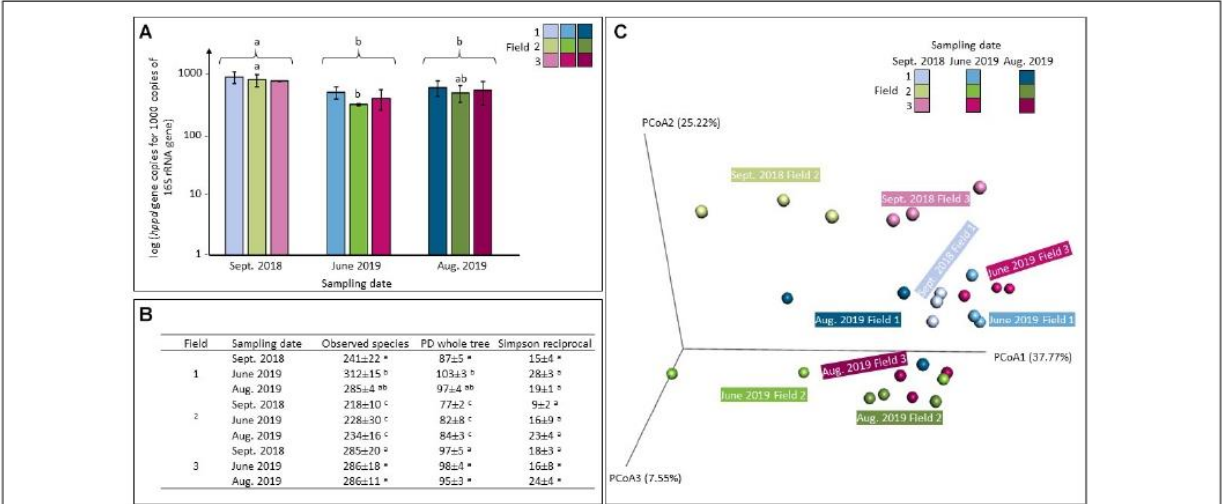


FIGURE 3 | Analysis of the abundance (A), the α -diversity (B), and the β -diversity (C) of the *hpd* bacterial community in soils of agricultural exposed to PPPs (fields 2 and 3) or not (field 1) collected at different sampling times over a 1-year crop cycle (September 2018, June 2019, August 2019). (A) *hpd* sequence copy number per 1000 sequences of 16S rRNA gene. Values shown are averages of $n = 3$ biological replicates for each series. Error bars are calculated from the standard deviation for each series. ANOVA $p < 0.05$ was considered as significant and, if needed, indicated by a small letter. (B) Richness and diversity indices of the *hpd* bacterial community (mean values $\pm$ confidence intervals). ANOVA tests were conducted and $p < 0.05$ was considered as significant and indicated by a different letter. (C) UniFrac analysis on the *hpd* bacterial community composition.

August 2019, which were not statistically different from those obtained in September 2018 (ANOVA, $p = 0.09$) or in June 2019 (ANOVA, $p = 0.17$).

The *hppd* sequences were grouped into 1562 OTUs at 80% amino-acid sequence identity threshold. α -Diversity was estimated for each condition by a range of indices depicted in **Figure 3B**. The observed species and the Phylogenetic Diversity (PD) indices calculated in field 2 were significantly lower than those of field 1 and field 3, no matter what the sampling date (ANOVA, $p < 0.01$). Same measurements were made on the total bacterial α -diversity and they led to the similar conclusions: the three indices calculated in the case of field 2 were significantly lower from those calculated for fields 1 and 3, respectively (ANOVA, $p < 0.05$, **Supplementary Figure 3**). The total and the *hppd* bacterial α -diversities are different in field 2 than in the other two fields. On June 2019, the observed species and the PD whole tree indices calculated on the *hppd* bacterial α -diversities within field 1 were significantly different from those calculated on September 2018 (ANOVA, $p < 0.01$) but not from those measured in August 2019 (ANOVA, $p_{\text{observed_species}} = 0.66$ and $p_{\text{PD_whole_tree}} = 0.88$). It has to be noticed that the α -diversity of the total bacterial community was also modified over time (ANOVA, $p < 0.05$, **Supplementary Figure 3**).

The *hppd* bacterial β -diversity is illustrated on **Figure 3C** by a PCoA representing the weighted UniFrac distances. In addition, an sPLS-DA was performed in parallel to an ANOVA test performed on each *hppd* OTU taken separately. All of these tests showed no statistical differences between soils: the β -diversity of *hppd* bacterial community remained unchanged among time and between the different studied soils. Same tests were performed on the total bacterial β -diversity obtained by sequencing the 16S rRNA gene with sequences grouped in 5739 OTUs at 94% nucleotide sequence identity threshold. Whatever the soil considered, no significant differences were found (data not shown).

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate, in a lab-to-field experimental design, the ecotoxicological impact of β -triketone herbicides on the abundance, the composition and the diversity of total and *hppd* bacterial communities. Under lab conditions, the worst-case scenario (up to 10 times the agronomical dose) as well as the effect of the formulation (sulcotrione vs Decano[®]) were tested. Under field conditions, agronomical scenario exposure including the application of several PPP treatments over a 1-year cropping cycle was tested.

Estimation of the Fate and Ecotoxicological Impact of Sulcotrione and Decano[®] on the Total and *hppd* Bacterial Communities Under Lab Conditions

Under lab conditions, soil microcosms were exposed for 42 days to 1× or 10× RfD of sulcotrione or Decano[®]. Kinetics of

dissipation of the active substance were established. Although the dissipation of sulcotrione in the Perpignan soil has already been monitored in several studies (Chaabane et al., 2008; Romdhane et al., 2019), this is the first time that the kinetic of dissipation of the active substance of Decano[®] was measured in this soil. Even if the recovery rate of sulcotrione from microcosms treated with Decano[®] was not optimal (52%), one could observe that, 42 days after application, sulcotrione was fully dissipated from both batches of microcosms. Our results are consistent with previous studies where similar concentrations were applied, showing a complete dissipation of sulcotrione within 45 days in Perpignan soil (Calvayrac et al., 2012; Romdhane et al., 2016b, 2019). Observed DT₅₀ at 1× RfD were in the range of those measured in other studies (4–7 days in dark) confirming that sulcotrione is rapidly dissipated from soils (Barchanska et al., 2016). Concomitantly to sulcotrione dissipation and, as previously observed by Romdhane et al. (2016b), CMBA, the principal transformation product of sulcotrione, is accumulated in Perpignan soil in both microcosm batches. As expected, for both Decano[®] and sulcotrione, at a higher dose rate of application, dissipation lasted longer than at lower rate of application.

The effect of sulcotrione and of Decano[®] on the abundance and the diversity of both the total and *hppd* soil bacterial communities was measured by qPCR and amplicon Illumina sequencing, respectively. Both treatments had no effect on the abundance of the total soil bacterial community. This observation is in accordance with that of Romdhane et al. (2016a) showing that natural triketone (i.e., leptospermone) has either no effect or very short-lasting effect on the abundance of the total bacterial community. It has to be noticed that mesotrione, another β -triketone, was shown to transiently modify the abundance and the diversity of both soil bacterial and fungal communities (Du et al., 2018). It suggests that β -triketone ecotoxicological effect on microorganisms depends on the active compound, on the soil type and on their interactions. Similarly, the two treatments, at both doses, had no effect on the composition and structure of the total bacterial community. This is in agreement with Romdhane et al. (2019) who reported no change of α - and β -diversities of the total bacterial community in the soil of Perpignan exposed to either 1× or 10× RfD of sulcotrione. Interestingly, one can observe that different studies carried out on the same soil at different times with different sequencing technologies (454 pyrosequencing vs Illumina sequencing) under similar conditions led to similar conclusions showing the reliability of such approaches, as already suggested (Luo et al., 2012) and consolidating our observations.

Soil bacterial *hppd* abundance and diversity have already been monitored in Perpignan soil (Thiour-Mauprivez et al., 2020) but, to our best knowledge, this was the first time they were monitored in response to a sulcotrione and Decano[®] exposure. As observed for the total bacterial community, both treatments applied at both doses have no effect on the abundance and diversity of the *hppd* bacterial community. Therefore, one can conclude that, under our experimental conditions, the *hppd* bacterial community harboring the gene target of β -triketone herbicides is insensitive to formulated sulcotrione or to the active substance. The low

persistence of sulcotrione in Perpignan soil indicates that soil bacterial community is only shortly exposed to β -triketone and such a short exposure is not enough to modify the abundance or the diversity of the soil bacterial community. In addition, detoxification mechanisms such as efflux transporters, known as unspecific drivers of resistance of bacteria to antibiotics, could work as a detoxification mechanism against β -triketones and even could stop them entering the cell. Such mechanisms have already been observed in an *Escherichia coli* strain exposed to glyphosate (Staub et al., 2012). However, another β -triketone formulated product called Callisto® (mesotrione) is shown to transiently inhibit the nitrification process in bacteria when applied at $10\times$ RfD, probably because of a direct effect (Crouzet et al., 2016). This further reinforces the assumption that like for other herbicidal active substances, the β -triketone ecotoxicological effect on microorganisms depends on the properties of active compound, of soil type and of their interactions.

Estimation of the Ecotoxicological Effect of β -Triketone on the Abundance, Composition, and Diversity of Both Total- and *hppd*-Bacterial Communities Under Field Conditions

The lab-to-field assessment of the ecotoxicological impact of active substances on soil microorganisms has been proposed as a gold standard to conduct environmental risk assessment of pesticides (Karpouzias et al., 2016). Consequently, in parallel to lab-experiments, the impact of β -triketone PPPs, including mesotrione- and/or tembotrione-based PPPs was measured on the abundance, the composition and the diversity of both the total and the *hppd* bacterial communities in field samples collected over 1 year cropping cycle.

The main result of this field study concerns one of the tested fields (field 2), in which the *hppd* bacterial community abundance decreased after the first treatment with mesotrione-based herbicide (Camix®) to finally increase after the second treatment with tembotrione-, dicamba-, nicosulfuron-, and alkylpolyglucoside-based herbicides but without reaching the level of abundance measured initially. This suggests a partial resilience of the *hppd* community in this field. This observed time effect might be due to different factors such as climatic conditions or the phenology of the crop. It could also be explained by the PPP treatments applied to this field. However, we are not able to conclude whether the abundance decrease is due to mesotrione because: (i) Camix® is composed, in addition to mesotrione, of S-metolachlor (400 g/L) and benoxacor (20 g/L); (ii) the α -diversity of this field is significantly lower than those measured in fields 1 and 3, making a comparison uneasy. Regarding the β -diversity measured in this field, it remained unchanged and identical to the other fields all along the cropping cycle.

This field experiment reveals the difficulty to define reliable references when working on formulated product composed of several active compounds with different action modes and of several other compounds entering in their formulation that are usually bound by confidentiality by the agrochemical firms.

Considering this, it becomes evident that the conclusions of a *a priori* risk assessment carried out under control conditions for a single active compound cannot be expanded for a formulated PPP applied in combination with others in the field all along the cropping cycle. This study also highlights the difficulty to define reliable controls when working on real agronomical situations encountered on farms. Indeed, in our experimental design, we chose a control field not exposed to β -triketones located closely to the other two sampled fields cropped with maize and exposed to herbicides. Even if the soils of chosen fields are subjected to the same pedoclimatic conditions and harbor similar physicochemical properties, differences in the bacterial composition were readily observed at the first sampling date. This raises the question of the reference to interpret the changes in response to the PPP treatments applied. Consequently, there is a need to define a normal operating range (NOR) for each studied indicator as it has been evaluated on diverse indicators (soil microbial biomass and bacterial diversity) in a 13 km² parcel on 278 soils all spaced from 215 meters (Constancias et al., 2015). The fully randomized block design that is usually applied in agronomical assay has been shown in the past to be of interest to estimate the impact of several active substances applied one by one on soil microorganisms (Papadopoulou et al., 2016; Storck et al., 2018), but it seems not appropriate to evaluate the risk encountered in-farm at a systemic level which is far more complex with a combination of PPPs applied simultaneously or one after the other all along the cropping cycle.

CONCLUSION

Our study provides a comprehensive lab-to-field assessment of the ecotoxicity of β -triketone herbicides (active compound and formulated one) on both the total and *hppd* bacterial communities. Our lab-experiment confirmed the low persistence of the active substance in both sulcotrione and Decano® treated soil microcosms. Under our experimental conditions, both treatments at agronomical doses have no effect on the abundance, the composition and the diversity of both total and *hppd* bacterial communities. Our field-experiment led to similar conclusions thereby comforting the eco-friendly reputation of β -triketone herbicides.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: NCBI, accession number: PRJNA666084 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA666084>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CT-M, LB, FM-L, MD-L, and CC conceived and designed the research. CT-M and CC conducted the chemical analysis. CT-M, MD-L, AS, and AM conducted the bioinformatics analysis.

JB and DB conducted the PCR experiments. LA conducted the field sampling. CT-M, FM-L, and LB wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Région Occitanie and European Funds for Regional Development (FEDER). Authors also

thank Perpignan University Via Domitia for their financial support (BQR, 2018).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.610298/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Barchanska, H., Kluz, 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. doi: 10.1007/s11368-015-1188-1
- Calvayrac, C., Martin-Laurent, F., Faveaux, A., Picault, N., Panaud, O., Coste, C.-M., et al. (2012). Isolation and characterisation of a bacterial strain degrading the herbicide sulcotrione from an agricultural soil. *Pest. Manag. Sci.* 68, 340–347. doi: 10.1002/ps.2263
- Cantrell, C. L., Dayan, F. E., and Duke, S. O. (2012). Natural products as sources for new pesticides. *J. Nat. Prod.* 75, 1231–1242. doi: 10.1021/np300024u
- 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. doi: 10.1002/ps.1456
- Constancias, F., Terrat, S., Saby, N. P. A., Horrigue, W., Villerd, J., Guillemain, J.-P., et al. (2015). Mapping and determinism of soil microbial community distribution across an agricultural landscape. *Microbiol. Open* 4, 505–517. doi: 10.1002/mbo3.255
- Crouzet, O., Poly, F., Bonnemoy, F., Bru, D., Batisson, I., Bohatier, J., et al. (2016). Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 4207–4217. doi: 10.1007/s11356-015-4797-8
- 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. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.01.026
- Decaens, T., Jiménez, J. J., Gioia, C., Measey, G. J., and Lavelle, P. (2006). The values of soil animals for conservation biology. *Eur. J. Soil Biol.* 42, S23–S38. doi: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.001
- Du, Z., Zhu, Y., Zhu, L., Zhang, J., Li, B., Wang, J., et al. (2018). Effects of the herbicide mesotrione on soil enzyme activity and microbial communities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164, 571–578. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.075
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- European Commission (2010). *Soil Biodiversity: Functions, Threats and Tools for Policy Makers*. Brussels: European Commission.
- Gardi, C., Jeffery, S., and Saltelli, A. (2013). An estimate of potential threats levels to soil biodiversity in EU. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1538–1548. doi: 10.1111/gcb.12159
- Graham, E. B., Knelman, J. E., Schindlbacher, A., Siciliano, S., Breulmann, M., Yannarell, A., et al. (2016). Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Front. Microbiol.* 7:214. doi: 10.3389/fmicb.2016.00214
- Karpouzias, D. G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O., et al. (2016). “LOVE TO HATE” pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 18947–18951. doi: 10.1007/s11356-016-7319-4
- Lee, C.-M., Yeo, Y.-S., Lee, J.-H., Kim, S.-J., Kim, J.-B., Han, N. S., et al. (2008). Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 322–326. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.102
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158
- Luo, C., Tsementzi, D., Kyripides, N., Read, T., and Konstantinidis, K. T. (2012). Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One* 7:e30087. doi: 10.1371/journal.pone.0030087
- Mitchell, G., Bartlett, D. W., Fraser, T. E., Hawkes, T. R., Holt, D. C., Townson, J. K., et al. (2001). Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest. Manag. Sci.* 57, 120–128. doi: 10.1002/1526-4998(200102)57:2<120::AID-PS254<3.0.CO;2-E
- Moran, G. R. (2005). 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 117–128. doi: 10.1016/j.ab.2004.08.015
- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., and Waver, C. (1996). “Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities,” in *Molecular Microbial Ecology Manual*, eds A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (Dordrecht: Kluwer Academic Publishing), 3.4.4.1–3.4.4.22.
- Ockleford, C., Adriaanse, P., Bemy, P., Brock, T., Duquesne, S., Grilli, S., et al. (2017). Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. *EFSA J.* 15:e04690. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4690
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). *Vegan: Community Ecology Package. Version 2.5-7*. Available online at: <http://vegan.r-forge.r-project.org/>
- Papadopoulou, E. S., Karas, P. A., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., Trevisan, M., et al. (2016). Dissipation and adsorption of Isoproturon, Tebuconazole, Chlorpyrifos and their main transformation products under laboratory and field conditions. *Sci. Total Environ.* 569–570, 86–96. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.133
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., et al. (2011). Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 Soil quality — method to directly extract DNA from soil samples. *J. Microbiol. Methods* 84, 454–460. doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.016
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641–1650. doi: 10.1093/molbev/msp077
- R Development Core Team (2005). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rocaboy-Faquet, E., Noguer, T., Romdhane, S., Bertrand, C., Dayan, F. E., and Barthelmebs, L. (2014). Novel bacterial bioassay for a high-throughput screening of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7243–7252. doi: 10.1007/s00253-014-5793-5
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Cao, K.-A. L. (2017). mixOmics: an R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Barthelmebs, L., Calvayrac, C., Bertrand, C., Cooper, J.-F., et al. (2016a). Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptospermone on the microbial community of two arable soils. *Front. Microbiol.* 7:775. doi: 10.3389/fmicb.2016.00775
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., Rocaboy-Faquet, E., Riboul, D., et al. (2016b). Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two β -triketone herbicides. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 4138–4148. doi: 10.1007/s11356-015-4544-1

- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Beguet, J., Bertrand, C., Calvayrac, C., Salvia, M.-V., et al. (2019). Assessment of the ecotoxicological impact of natural and synthetic β -triketone herbicides on the diversity and activity of the soil bacterial community using omic approaches. *Sci. Total Environ.* 651, 241–249. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.159
- Schloss, P. D., and Handelsman, J. (2006). Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput. Biol.* 2:e020092. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020092
- Schulz, A., Ort, O., Beyer, P., and Kleinig, H. (1993). SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.* 318, 162–166. doi: 10.1016/0014-5793(93)80013-k
- Staub, J. M., Brand, L., Tran, M., Kong, Y., and Rogers, S. G. (2012). Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 641–647. doi: 10.1007/s10295-011-1057-x
- Storck, V., Nikolaki, S., Perruchon, C., Chabanis, C., Sacchi, A., Pertile, G., et al. (2018). Lab to field assessment of the ecotoxicological impact of Chlorpyrifos, Isoproturon, or Tebuconazole on the diversity and composition of the soil bacterial community. *Front. Microbiol.* 9:1412. doi: 10.3389/fmicb.2018.01412
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., and Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using Next-generation sequencing. *PLoS One* 9:e105592. doi: 10.1371/journal.pone.0105592
- Thiour-Mauprivez, C., Devers-Lamrani, M., Mounier, A., Beguet, J., Spor, A., Calvayrac, C., et al. (2020). Design of a degenerate primer pair to target a bacterial functional community: the *hppd* bacterial gene coding for the enzyme targeted by herbicides, a study case. *J. Microbiol. Methods* 170:105839. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105839
- Thiour-Mauprivez, C., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., and Barthelmebs, L. (2019). Effects of herbicide on non-target microorganisms: towards a new class of biomarkers? *Sci. Total Environ.* 684, 314–325. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.230
- Wall, D. H., Bardgett, R. D., Behan-Pelletier, V., Herrick, J. E., Jones, T. H., and Strong, D. R. (2013). *Soil Ecology and Ecosystem Services*. Oxford: Oxford University Press.
- Wang, Q., Quensen, J. F., Fish, J. A., Lee, T. K., Sun, Y., Tiedje, J. M., et al. (2013). Ecological Patterns of *nifH* genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a new informatics tool. *mBio* 4:e00592-13. doi: 10.1128/mBio.00592-13
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30, 614–620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Thiour-Mauprivez, Devers-Lamrani, Bru, Béguet, Spor, Mounier, Alletto, Calvayrac, Barthelmebs and Martin-Laurent. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résultats complémentaires

Concernant les cinétiques de dissipation de la sulcotrione et du produit formulé (Decano®) obtenues dans les microcosmes de sol traités, nous avons vérifié l'adéquation au modèle du premier ordre du type $C=C_0e^{-kt}$ par test du khi-deux (χ^2) en utilisant les valeurs C mesurées expérimentalement et les valeurs C calculées par le modèle. Avec une valeur critique du χ^2 égale à 5,99 (paramètres du modèle : k et C_0 ; $n=2$ degrés de liberté) et pour un niveau de confiance de 95%, seules les valeurs mesurées dans les microcosmes traités à une 1 fois la dose agronomique suivent un modèle du premier ordre avec une valeur du χ^2 voisine de 0,33 pour le traitement à la sulcotrione et de 0,14 pour le traitement au Decano® et des pourcentages d'erreur du modèle acceptables de 7% et 13% respectivement. En revanche, pour les microcosmes traités à 10 fois la dose agronomique (sulcotrione et Decano®), les valeurs mesurées ne s'ajustant pas au modèle du premier ordre (valeur du $\chi^2 > 5,99$), nous avons fait le choix de déterminer graphiquement leurs DT_{50} .

Dans les microcosmes traités à la sulcotrione, nous avons, conjointement à l'ADN, extrait l'ARN des échantillons de sols. Nous avons pour objectif de mesurer l'activité de la communauté bactérienne *hppd* par RT-qPCR. Cependant, pour la majorité des échantillons, nous n'avons pas réussi à dépasser le seuil de détection de l'appareil, rendant les données obtenues ininterprétables (**tableau V.1**). En effet, seuls dix échantillons sur les 36 testés dépassent au moins une fois le seuil de détection de l'appareil.

Tableau V.1 : Echantillons dépassant au moins une fois le seuil de détection en RT-qPCR.

Echantillon (Jour_traitement_réplica)	Nombre de détection/nombre de RT-qPCR réalisées
J7_D0_2	2/3
J7_D1_1	1/3
J7_D1_3	1/3
J7_D10_3	1/3
J14_D1_1	2/3
J14_D1_2	2/3
J14_D1_3	2/3
J14_D10_1	1/3
J14_D10_3	2/3
J42_D10_3	1/3

Concernant les résultats de séquençage du gène *hppd* obtenus sur les microcosmes de sol traités au Decano®, nous avons réussi à mettre en évidence une OTU variant en fonction de la date et de la dose (ANOVA, $p < 0.05$). Selon l'outil Protein Blast® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), la séquence sortante correspond à une

HPPD de la bactérie *Novosphingobium* sp. NDB2Meth1 avec un score de 90% d'identité et une e-value de 1×10^{-44} . Cependant, comme illustré sur la **figure V.3**, cette OTU n'est que faiblement représentée parmi nos échantillons et son occurrence au jour 0 de l'expérience varie fortement en fonction des doses testées. Nous ne l'avons donc pas considérée dans la suite de notre étude.

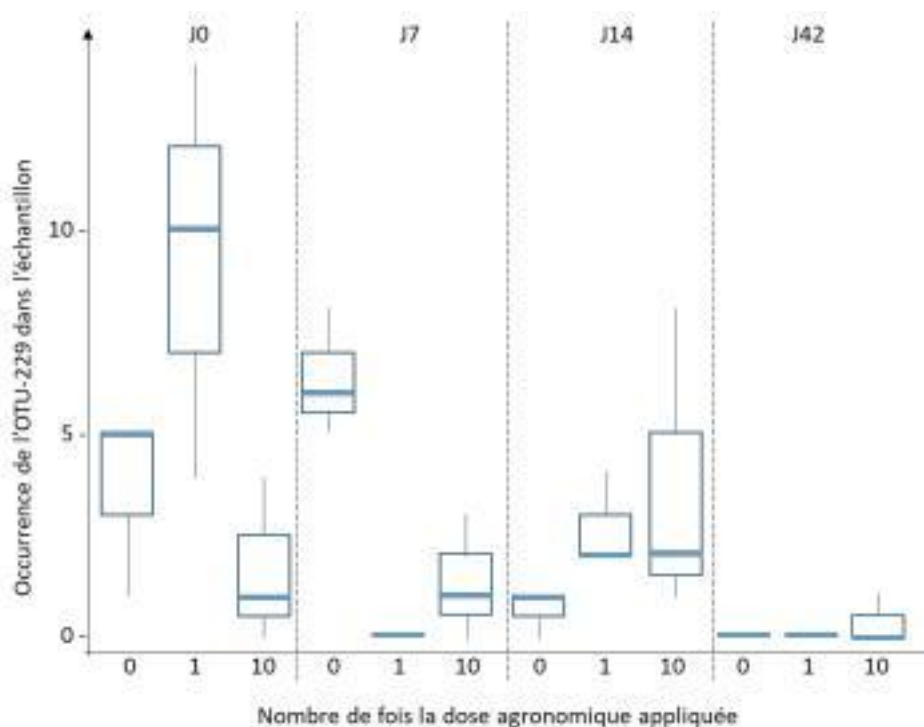


Figure V.3 : Occurrence de l'OTU-229 dans les microcosmes de sols traités au Decano®. Les boxplots représentent la moyenne de n=3 échantillons par condition.

Chapitre VI : Discussion, conclusion et perspectives

Résumé des principaux résultats obtenus

L'objectif de ce travail était de vérifier l'hypothèse suivante : des organismes dits « non-cibles » mais porteurs de la cible moléculaire d'une molécule herbicide donnée peuvent-ils être directement impactés par ce composé ? Si oui, peuvent-ils constituer un marqueur d'exposition ou d'effet ? Ces questions s'inscrivent dans une démarche de recherche de nouveaux indicateurs de la qualité des sols, plébiscitée, entre autres, par l'EFSA qui encourage l'utilisation de marqueurs d'origine microbienne pour l'évaluation du risque *a priori* et *a posteriori* (EFSA 2010). La mise au point de ce marqueur requiert l'étude de l'effet de la molécule herbicide à différents niveaux biologiques et l'emploi de stratégies adéquates (**figure VI.1**).

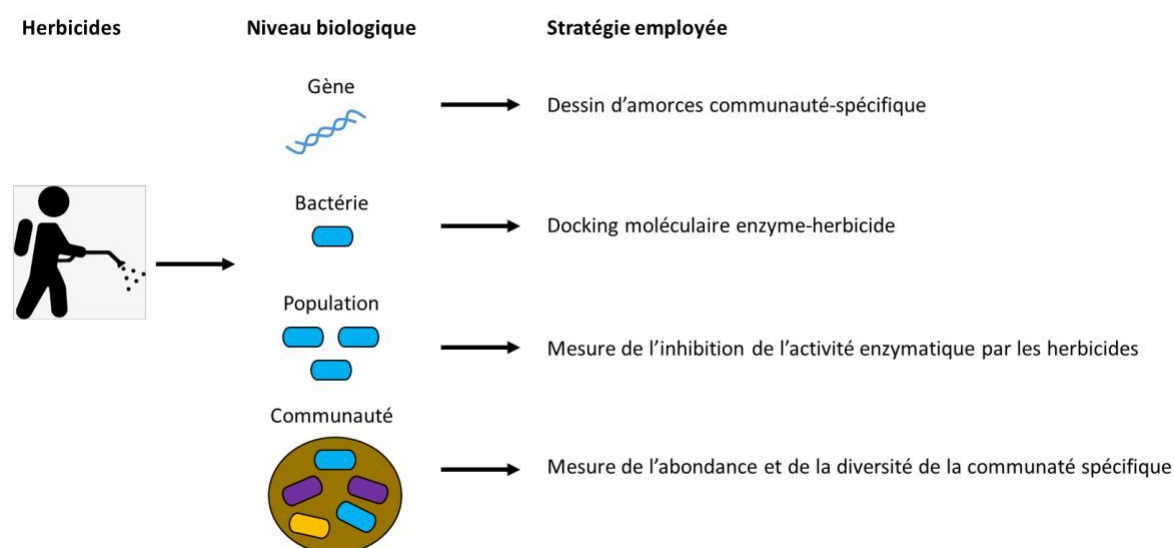


Figure VI.1 : Développement d'un marqueur d'exposition ou d'effet des herbicides dans les sols.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux herbicides β -tricétones, historiquement étudiés par les équipes d'accueil (Chaabane *et al.*, 2008; Calvayrac *et al.*, 2012; Rocaboy-Faquet *et al.*, 2014; Romdhane *et al.*, 2019). Leur cible, l'enzyme HPPD codée par le gène du même nom, fait « preuve de concept » de l'utilisation d'une enzyme ou d'un gène d'un organisme non-cible comme marqueur d'exposition à la substance dont il porte la cible. Cette réflexion a donné lieu à une étude bibliographique de faisabilité, présentée dans le **chapitre II** de ce manuscrit. Puis, après avoir identifié les différents niveaux d'organisation biologique auxquels pouvaient être développé le biomarqueur, nous avons construit cette étude en quatre niveaux : i) construction d'amorces *in silico* spécifiques au gène *hppd* (**chapitre IV**) ; ii) mesure *in silico* des interactions entre l'enzyme bactérienne HPPD et les inhibiteurs β -tricétones (**chapitre III**) ; iii) mesure de l'inhibition de l'activité enzymatique sur des populations bactériennes HPPD⁺, qui expriment l'enzyme HPPD (**chapitre III**) ; iv) mesure de l'abondance et de la diversité de la communauté bactérienne *hppd* du laboratoire aux champs, couplée

à la détermination du devenir des β -tricétones dans les sols par analyses en chromatographie liquide pour qualifier le scénario d'exposition des microorganismes à ces molécules actives (**chapitre IV**). Nous avons ainsi mis en place une approche pluridisciplinaire allant de l'ordinateur en passant par l'erlenmeyer, par des microcosmes de sol incubés au laboratoire et des échantillons de sols prélevés dans des champs cultivés, en testant à la fois les substances actives mais également les produits de protection des plantes formulés, à des doses agronomiques pertinentes, en employant à la fois des méthodes culture-indépendantes et culture-dépendantes et en s'attachant à rester au plus proche des conditions réelles. La **figure VI.2** reprend les principaux résultats obtenus lors de l'étude.

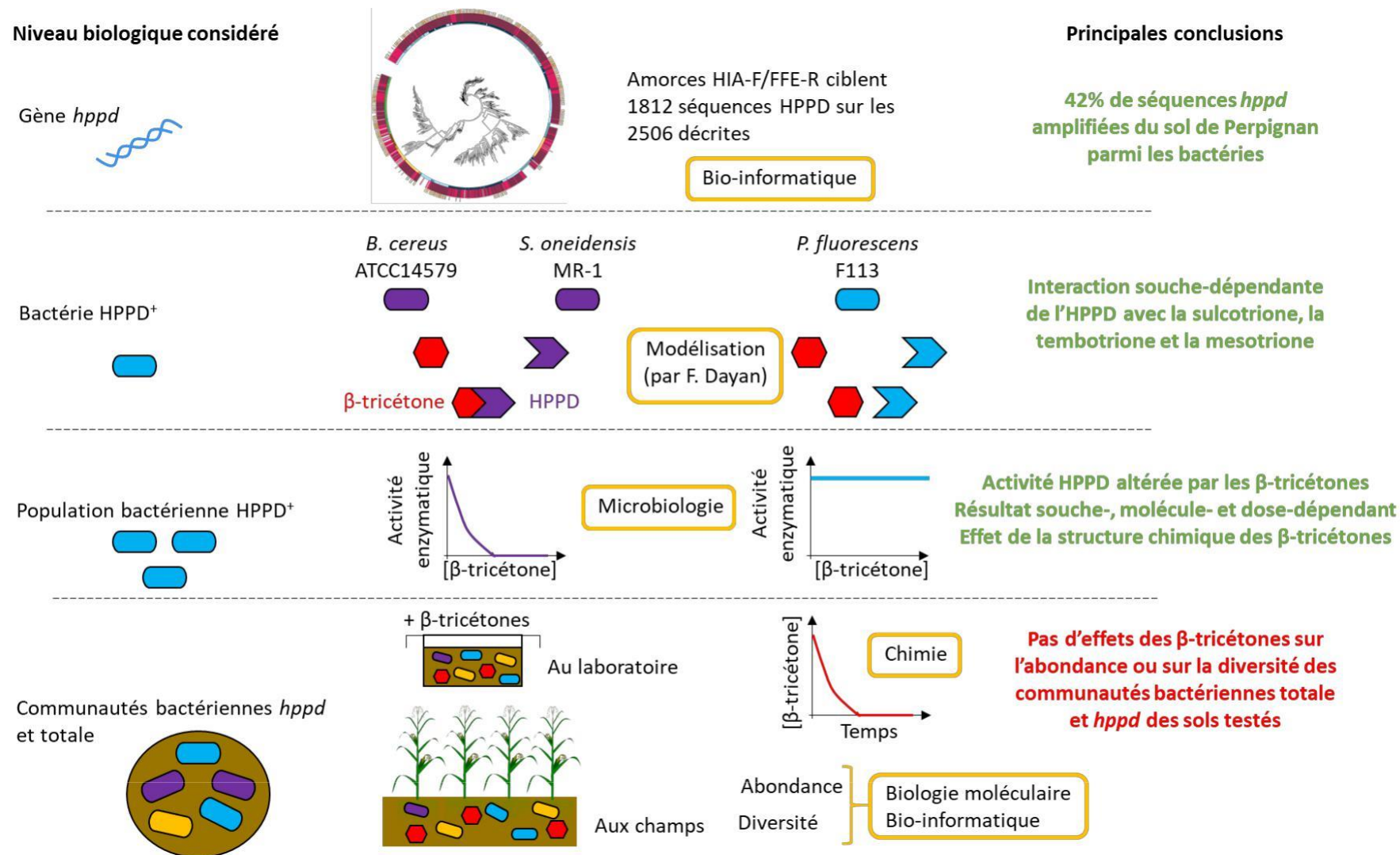


Figure VI.2 : Schématisation des principaux résultats de l'étude. Les disciplines auxquelles ont été fait appel pour obtenir ces résultats sont encadrées en jaune.

Les premières analyses *in silico* ont montré que le gène *hppd* est présent chez de nombreux isolats appartenant à de nombreux genres bactériens. Ce grand nombre de séquences décrites nous a permis de dessiner des amorces dégénérées spécifiques du gène *hppd* d'un grand nombre de bactéries. Grâce à ce travail, nous avons pu mettre en place des essais de qPCR pour mesurer l'abondance de la communauté bactérienne *hppd*. Des amplicons *hppd* ont été générés par PCR et leur séquençage a permis de décrire la composition et la diversité de la communauté bactérienne *hppd* des sols, grâce à un pipeline spécifique aux amplicons *hppd*, développé en collaboration avec Marion Devers, Aymé Spor et Arnaud Mounier de l'INRAE de Dijon.

A l'échelle de l'enzyme, les modélisations *in silico* menées par Franck Dayan ont montré que la sulcotrione, la mésotrione et la tembotrione se liaient avec une plus grande force aux HPPD de *B. cereus* ATCC14579 et *S. oneidensis* MR-1 qu'à celle de *P. fluorescens* F113. Cette caractéristique moléculaire a été retrouvée également au niveau cellulaire avec peu ou pas d'effet des β -tricétones testés sur l'activité enzymatique HPPD de populations de *P. fluorescens* F113 alors que, chez *B. cereus* ATCC14579 et *S. oneidensis* MR-1, l'effet sur l'activité HPPD est marqué en présence de faibles doses d'herbicides et observable pour toutes les molécules testées. Cet effet apparaît dose-dépendant pour toutes les molécules testées et cette propriété nous a permis de calculer des CE₅₀ pour chaque « couple » population-molécule testé. De plus, pour *B. cereus* ATCC14579 et *S. oneidensis* MR-1, l'inhibition de l'activité HPPD apparaît également molécule-dépendante avec un effet plus marqué de la tembotrione et de la mésotrione que de la sulcotrione. Nous émettons l'hypothèse que la tembotrione, en raison de la présence d'une queue fluorée -O-CH₂-CF₃ et, de ce fait, d'un encombrement stérique plus conséquent, serait plus difficilement expulsée des cellules et donc possiblement plus toxique pour les populations bactériennes testées en raison de l'absence de détoxification.

Finalement, les études au niveau de la communauté bactérienne *hppd* réalisées sur des échantillons de sols collectés dans des microcosmes de sols incubés aux laboratoires, dans des conditions contrôlées, et aux champs, dans des conditions agronomiques, n'ont pas mis en évidence d'effet notable de la sulcotrione ou de sa formulation commerciale sur l'abondance, la composition ou la diversité de cette communauté. La mesure des demi-vies de la sulcotrione pure ou en formulation dans le sol de Perpignan a montré une rapide dissipation de l'herbicide. Les molécules β -tricétones testées dans divers sols sont globalement connues pour montrer une affinité modérée pour les sols, mais suffisante pour diminuer leur persistance et leur biodisponibilité, d'autant que ces produits sont appliqués à de relativement faibles doses agronomiques (Chaabane *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2019). Il est donc possible que la sulcotrione, appliquée à des doses agronomiques ne soit pas biodisponible suffisamment longtemps pour altérer la communauté *hppd* et que, si un effet existe, il soit présent

dans des temps courts et transitoires, de telle sorte qu'il ait pu nous échapper compte tenu de notre plan expérimental. De plus, comme nous avons pu le constater à l'échelle d'une population, il existe de nombreux mécanismes de régulation biologique qui pourraient expliquer les différences observées entre deux populations bactériennes d'espèces différentes. Au sein d'une communauté, et donc, d'un ensemble complexe de populations hétérogènes, ces régulations sont d'autant plus nombreuses et complexes, qu'elles pourraient contribuer à masquer le signal qui pourrait être causé par l'exposition aux β -tricétones.

Discussion

Notre hypothèse de travail a donc été vérifiée au niveau moléculaire ainsi qu'au niveau cellulaire : l'activité enzymatique de l'HPPD de certaines souches bactériennes peut servir de biomarqueur grâce à une réponse dose-dépendante. De récentes études se sont également intéressées à mesurer l'inhibition par des β -tricétones de l'activité enzymatique HPPD chez des populations bactériennes. Certaines avec pour but final de construire des plantes génétiquement modifiées résistantes aux herbicides β -tricétones grâce au clonage d'un gène *hppd* bactérien naturellement résistant à ces composés (Liu *et al.*, 2020), d'autres dans le but de produire de la mélanine à l'échelle industrielle (Tan *et al.*, 2019). La production de mélanine et, par conséquent, l'HPPD, sont de plus en plus étudiées en raison du rôle protecteur de la mélanine face aux stress oxydatifs et des applications liées à la santé humaine qui pourraient en découler (Neuckermans *et al.*, 2019; Pavan *et al.*, 2020). A notre connaissance, c'est cependant la première fois qu'est étudiée l'inhibition de l'activité enzymatique sur des populations bactériennes environnementales non transformées et qu'il est proposé d'utiliser cette activité comme marqueur de l'impact écotoxicologique *a priori* des herbicides β -tricétones.

L'abondance et la diversité mesurées à l'échelle de la communauté bactérienne *hppd*, ne nous ont pas permis de valider notre hypothèse et ne semblent donc pas, dans les conditions testées, être de bon marqueurs des β -tricétones dans les sols. Cependant, cette étude a été menée sur un seul type de sol concernant l'expérience en microcosmes, et quatre autres sols collectés dans la même région agricole pour l'expérience pleins champs. Le sol étant un milieu complexe et variable aussi bien à l'échelle microscopique (« hot-spots ») qu'à l'échelle macroscopique (pédoclimat), les essais conduits dans cette étude sur le sol de Perpignan et les sols agricoles de la région toulousaine mériteraient d'être menés sur un panel de sols représentatifs des sols agricoles français pour généraliser nos conclusions. Par ailleurs, ces essais pourraient aussi être menés sur des « hot-spots » d'activité microbienne pour voir si les conclusions seraient identiques aux nôtres. Concernant l'expérience sur

les sols agricoles, la temporalité de l'échantillonnage peut être questionnée au regard du scénario d'exposition des communautés microbiennes aux herbicides β -tricétones dans les sols. En effet, des campagnes d'échantillonnages plus fréquentes, au moins pendant la première semaine suivant le traitement, auraient pu être souhaitables. Toutefois étant donné qu'aucune modification n'a pas pu être observée aussi bien sur l'abondance, la composition ou la diversité de la communauté bactérienne aux temps d'échantillonnages réalisés, on peut se demander de l'intérêt de mettre en évidence un impact éventuel transitoire à des temps courts d'exposition de ces herbicides sur la communauté bactérienne des sols. Aussi, grâce aux résultats obtenus *in silico* à l'échelle moléculaire et à l'échelle de la population, une autre stratégie expérimentale ciblant les communautés *hppd* les plus sensibles aux β -tricétones grâce à des amorces plus spécifiques pourrait être mise en place. Le même plan expérimental pourrait également être appliqué à d'autres microorganismes tels que les moisissures ou les cyanobactéries, peut-être plus réactives aux herbicides β -tricétones (Crouzet *et al.*, 2016; Mallet *et al.*, 2019). De plus, au-delà des limites liées à notre plan expérimental, les interactions au sein de la communauté et facteurs extrinsèques entrant en jeu sont plus complexes qu'à l'échelle d'une simple souche ou même d'une population.

Parmi ceux-ci, peuvent être cités des facteurs liés directement aux propriétés des molécules herbicides étudiées et à leur dissipation rapide dans les sols qui font qu'elles n'auront peu ou pas d'effets sur les communautés microbiennes telluriques. De plus, les produits issus de la dégradation des β -tricétones sont, comme les molécules mères, décrits comme ayant un faible taux de persistance dans le sol. Le CMBA, produit de dégradation de la sulcotrione, a, en fonction du sol considéré, une DT_{50} de 9,4 à 38,2 jours (EFSA 2008). De plus, ce métabolite n'est pas connu pour inhiber les HPPDs bactériennes (Chaabane *et al.*, 2007). Les bactéries du sol ne sont donc exposées aux herbicides β -tricétones et à leurs métabolites que de façon transitoire, expliquant possiblement le fait que nous n'observons pas d'effets « dose » dans le sol. La biodisponibilité de ces molécules peut également s'avérer être un facteur limitant à notre étude. Cette biodisponibilité est intimement liée aux propriétés physico-chimiques du sol et notamment à sa teneur en eau (Sims 2014). Une étude menée sur des sols traités avec deux substances actives différentes, le metsulfuron ou le sulfentrazone, a montré que, plus l'amendement ajouté au sol était concentré et donc, plus l'humidité relative du sol augmentait, moins les herbicides étaient biodisponibles (Szmigielski *et al.*, 2018). Ainsi, selon le sol et même, la niche écologique considérée, la drilosphère étant par exemple décrite comme ayant plus d'eau disponible que la rhizosphère (Carminati *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2018), la biodisponibilité des herbicides peut varier. Un herbicide plus biodisponible sera, d'une part, plus susceptible d'impacter les microorganismes sensibles et sera, d'autre part, plus susceptible d'être utilisé comme substrat par des bactéries capables de le dégrader. Les microorganismes dégradants, de par leur activité,

contribuent à éliminer l'herbicide du milieu diminuant ainsi sa persistance, l'exposition et, par conséquent, son impact écotoxicologique sur les microorganismes du sol. De plus, les microorganismes à la fois dégradants et HPPD⁺, peuvent se développer aux dépens des β -tricétones. Ces mécanismes contribuent à faire varier l'abondance et la diversité de la communauté *hppd* suite à une exposition aux herbicides β -tricétones

Le fait que l'effet des herbicides β -tricétones puisse être masqué à l'échelle de la communauté peut aussi s'expliquer par un mécanisme compensatoire de cette dernière. A l'instar de l'hypothèse de la redondance fonctionnelle qui considère que, puisque plusieurs espèces remplissent les mêmes fonctions, une perturbation de l'écosystème aura un effet seulement à long-terme sur le fonctionnement de celui-ci (Walker 1992), nous pourrions émettre la même hypothèse en ce qui concerne les résultats de cette étude. La perturbation de l'écosystème sol par l'apport d'herbicides β -tricétones sur ce dernier n'aurait pas d'effet visible sur la communauté bactérienne du sol pendant notre temps d'observation car ce dernier est trop court ou d'autres fonctions prennent le relais et permettent à la communauté de trouver son équilibre malgré la perturbation fugace engendrée.

Pour rappel, l'HPPD convertit l'HPP en HGA qui entrera ensuite : i) chez les plantes, dans la voie de synthèse des plastoquinones ; ii) dans la voie de synthèse de l'acétoacétate et du fumarate ; iii) dans la voie de synthèse de la mélanine (cf. **figure I.15**). Au sein de la communauté bactérienne du sol, seules les deux dernières voies sont rencontrées.

Le fumarate synthétisé entrera dans le cycle de Krebs, mécanisme sous-jacent de la respiration aérobie (Kelly and Hughes 2001). Dans le sol, le cycle de Krebs est l'un des mécanismes permettant de produire du dioxyde de carbone qui entrera directement dans le cycle du carbone, processus essentiel au maintien de l'équilibre de l'écosystème sol et d'un des services écosystémiques de soutien rendus par les sols (Xu and Shang 2016). Afin de permettre le fonctionnement du cycle de Krebs en toutes circonstances, plusieurs voies aboutissant à la synthèse de ses substrats sont possibles. La dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) par les bactéries du sol représente, par exemple, l'une des voies principales d'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs (Erwin *et al.*, 2019). Le fumarate, lui, pourra être obtenu à partir du métabolisme de la tyrosine, en faisant intervenir l'HPPD mais également à partir du cycle de l'urée, intervenant dans le métabolisme de l'arginine, un autre acide aminé (**figure VI.3**) ou, simplement, à partir du succinate dans le cycle de Krebs.

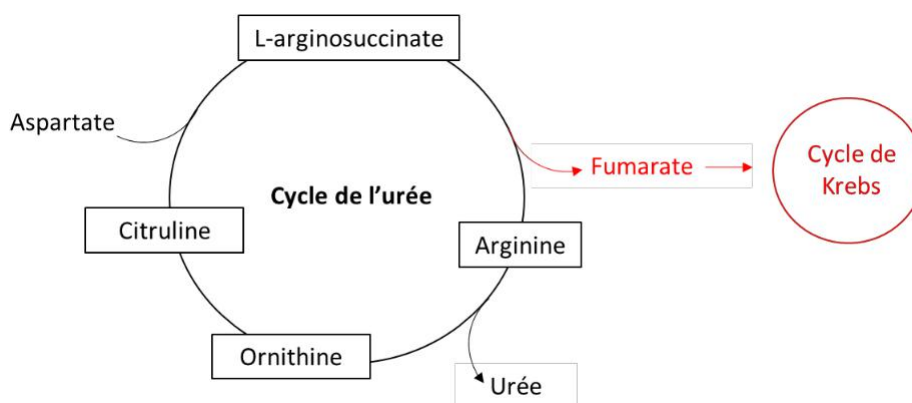


Figure VI.3 : Production de fumarate à partir du cycle de l'urée (d'après Mendz and Hazell 1996).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la voie du métabolisme de la tyrosine n'est probablement pas la voie préférentiellement utilisée dans le sol pour la production de fumarate. Cela expliquerait le fait que l'HPPD soit peu ou pas exprimée dans nos conditions d'études et que nous sommes incapables de mesurer ladite expression par RT-qPCR et qu'en conséquence, les herbicides β -tricétones ont peu d'effet à l'échelle de la communauté bactérienne.

Concernant la production de mélanine, une revue a récemment mis en évidence les multiples systèmes de régulation retrouvés chez les bactéries (Pavan *et al.*, 2020), situant l'HPPD au centre d'un véritable carrefour métabolique et sous-entendant les possibles compensations métaboliques qui en découlent. Chez certaines bactéries, la production de mélanine est en fait régulée par la concentration de certains acides aminés dans le milieu. Ainsi, la présence de phénylalanine ou de tyrosine peut activer un régulateur transcriptionnel qui activera à son tour le pool de gènes nécessaire à la synthèse de la mélanine, dont fait partie le gène *hppd* (Yang *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2010). D'autres facteurs peuvent également entrer en jeu dans la régulation de la production de mélanine : la présence de glycérol inhibe la transcription de l'*hppd* chez *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34mel^T (Pavan *et al.*, 2019). Ces mécanismes de régulation sont également étudiés chez les bactéries et moisissures pathogènes des plantes et de l'Homme, respectivement *Ralstonia solanacearum* et *Aeromonas media*. Par l'étude de souches mutées, les auteurs réussissent à mettre en évidence des phénomènes de régulation transcriptionnelle de l'*hppd* dont l'enzyme confère, chez ces deux microorganismes, une résistance au stress oxydatif et leur permet une invasion efficace de l'hôte (Wang *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2016).

Des conditions particulières sont donc nécessaires à l'expression de l'*hppd*, qui mettent en évidence l'importance de l'environnement. Lors de nos expériences en « resting cells », nous nous sommes placés dans des conditions favorables pour mesurer l'activité l'HPPD et que la mélanine soit produite. Cependant, dans le sol, nous ne contrôlons pas tous ces paramètres et il se peut que nos conditions ne soient pas optimales pour l'expression du gène codant cette enzyme. Cette hypothèse

est en effet soutenue par le fait que nous n'avions pas réussi à quantifier l'expression du gène *hppd* dans les sols alors que nous avons pu extraire des ARN amplifiables en RT-qPCR. Il aurait par exemple fallu apporter à notre sol de la tyrosine ou de la phénylalanine ou encore, lui ajouter un stress oxydatif pour que les conditions soient réunies pour que le gène *hppd* puisse s'exprimer. Bien que les approches multi-stress soient de plus en plus communes dans de nombreux écosystèmes (Gunderson *et al.*, 2016; Rocca *et al.*, 2018), nous n'avions pas envisagé d'appliquer un stress autre que l'exposition aux herbicides lors de cette étude, notre plan expérimental étant construit de telle sorte à avoir un contrôle et deux conditions de traitement à deux doses agronomiques différentes uniquement.

Outre les verrous technologiques propres à notre étude et à l'HPPD, nous nous sommes aussi heurtés à des problématiques plus globales. Certaines m'ont amenée à me questionner sur le bien-fondé de la législation concernant la mise sur le marché des PPs. D'une part, concernant l'évaluation du risque *a priori*, avant la mise sur le marché des PPs, la réglementation actuelle propose un de ces deux tests pour les études d'écotoxicité sur les microorganismes : soit la mesure du potentiel de nitrification, soit la mesure du taux de minéralisation du carbone (OCDE 2000a ; OCDE 2000b). Depuis l'avènement des méthodes culture-indépendantes et du séquençage haut-débit, le métagénome du sol est de plus en plus documenté (Nesme *et al.*, 2016). Les deux tests réglementaires semblent donc dérisoires et complètement dépassés. En effet, le couplage des analyses de séquençage haut-débit à d'autres méthodes comme la mesure du taux d'acides gras phospholipidiques (PLFA), qui est connue pour être un bon bioindicateur de la diversité microbienne des sols, ou encore, l'arrivée du séquençage de troisième génération, vont rendre les analyses des communautés microbiennes du sol encore plus précises (Nkongolo and Narendrula-Kotha 2020). Ces nouvelles technologies permettront d'établir plus facilement le lien entre dynamique des communautés microbiennes et fonctions qu'elles assurent dans l'écosystème sol. Selon moi, ces nouvelles technologies pourraient contribuer à une meilleure évaluation du risque *a priori* des molécules actives sur les microorganismes car reproductibles et applicables à tous les sols. D'autre part, il n'existe pas, dans la réglementation actuelle, un protocole d'évaluation du risque *a posteriori*, une fois le produit formulé mis au point, commercialisé et utilisé. Or, je me suis aperçue qu'il était difficile de travailler avec le Decano®, produit formulé de la sulcotrione dont la formulation reste inconnue en raison du secret industriel, d'une part, en raison de son faible taux d'extraction du sol et d'autre part, de sa mauvaise solubilité qui peut en partie expliquer des résultats variables obtenus sur les essais en « resting cells ». Ainsi, se pose la question de la pertinence de considérer uniquement la substance active lors des tests de mise sur le marché des PPs, ses propriétés pouvant se révéler être différentes de celles du produit final mis en formulation. Cela soulève également le besoin de mettre au point une évaluation du risque *a posteriori*, afin de tester l'impact environnemental et écotoxicologique du produit formulé.

Conclusion et perspectives

A ma connaissance, c'est la première fois qu'une étude d'écotoxicologie microbienne propose d'utiliser le gène codant l'enzyme ciblée par une molécule active comme biomarqueur d'exposition dans un organisme non-cible. L'analyse des séquences disponibles dans GenBank nous a permis de montrer que le gène ciblé était présent dans de nombreux genres bactériens. Bien qu'*in silico*, nous avons pu mettre en évidence l'interaction moléculaire des β -tricétones avec le site actif de l'HPPD et montrer que certaines populations microbiennes présentaient des HPPDs sensibles aux β -tricétones, l'abondance, la composition et la diversité de la communauté *hppd* ne sont pas affectés par l'exposition à ces molécules. Cette discordance entre les aspects théoriques et biologiques peut s'expliquer par différents phénomènes abiotiques (adsorption des β -tricétones, structure chimique des différentes molécules) et biotiques (régulation de l'expression, compensation, redondance fonctionnelle). Notre étude indique qu'il faudrait plutôt cibler quelques taxons bactériens sensibles aux β -tricétones plutôt que la communauté dans son ensemble et suivre l'évolution de leur expression du gène *hppd* et de leur activité enzymatique HPPD. Toutefois, même si cette stratégie s'avérait fructueuse on peut s'interroger sur l'importance biologique de l'effet qui pourrait être observé car, par ailleurs, à l'échelle de la communauté bactérienne globale, rien ne transparait. Dans ce cas, il pourrait être judicieux de cibler une communauté reliée à une fonction importante pour la santé des plantes telle que les bactéries PGPR dont fait partie *P. fluorescens* F113 ou les bactéries fixatrices d'azote comme *R. etli* CFN42 qui sont importantes dans le contexte de la transition agroécologique. Egalement, la mesure l'activité enzymatique HPPD de certaines populations bactériennes pourrait être instrumentée pour en faire un marqueur d'exposition capable de détecter des résidus de β -tricétones biodisponibles dans différentes matrices. Ce travail précurseur fait lieu de preuve de concept étant donné que bon nombre d'herbicides ciblent une enzyme présente également chez les microorganismes non-cibles (Thiour-Mauprivez *et al.*, 2019). A l'avenir, certaines enzymes ciblées par des molécules actives et décrites comme essentielles chez certains microorganismes, ainsi que les gènes qui les codent, pourraient également être testées comme biomarqueurs des herbicides qui les ciblent. On peut, par ailleurs, d'une manière plus générale, s'interroger sur la nécessité de développer une approche similaire sur d'autres microorganismes telles que les moisissures ou les algues, et même, parmi les autres règnes du vivant avec des végétaux et des animaux considérés non-cibles mais ayant la cible de molécule active entrant dans la composition de certains PP afin d'évaluer l'effet de ces composés sur la santé de l'environnement, des animaux et de l'Homme.

Références

- Ahmad S, Lee SY, Kong HG, Jo EJ, Choi HK, Khan R, Lee S-W (2016) Genetic determinants for pyomelanin production and its protective effect against oxidative stress in *Ralstonia solanacearum*. PLoS One 11: . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160845>
- Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernández C, Galán B, García JL, Díaz E, Miñambres B (2004) The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 186:5062–5077 . <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.5062-5077.2004>
- Azhari NE, Chabaud S, Percept A, Bru D, Martin-Laurent F (2007) *pcaH*, a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in the soil environment. Pest Management Science 63:459–467 . <https://doi.org/10.1002/ps.1357>
- Barchanska H, Kluza A, Krajczewska K, Maj J (2016) Degradation study of mesotrione and other triketone herbicides on soils and sediments. J Soils Sediments 16:125–133 . <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1188-1>
- Barton LL, Northup DE (2011) Microbial Ecology. Wiley
- Batisson I, 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 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.009>
- Beaudegnies R, Edmunds AJF, Fraser TEM, Hall RG, Hawkes TR, Mitchell G, Schaetzer J, Wendeborn S, Wibley J (2009) Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors—A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17:4134–4152 . <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.015>
- Bérard A, Capowicz L, Mombo S, Schreck E, Dumat C, Deola F, Capowicz Y (2016) Soil microbial respiration and PICT responses to an industrial and historic lead pollution: a field study. Environ Sci Pollut Res Int 23:4271–4281 . <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5089-z>
- Billet L, Devers M, Rouard N, Martin-Laurent F, Spor A (2019) Labour sharing promotes coexistence in atrazine degrading bacterial communities. Sci Rep 9:18363 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54978-2>
- Borisova-Mubarakshina MM, Vetoshkina DV, Ivanov BN (2019) Antioxidant and signaling functions of the plastoquinone pool in higher plants. Physiol Plant 166:181–198 . <https://doi.org/10.1111/ppl.12936>
- Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. Appl Environ Microbiol 66:2096–2104 . <https://doi.org/10.1128/aem.66.5.2096-2104.2000>
- Brownlee JM, Johnson-Winters K, Harrison DHT, Moran GR (2004) Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. Biochemistry 43:6370–6377 . <https://doi.org/10.1021/bi049317s>
- Calvayrac C, Bontemps N, Nougé-Bissoué A, Romdhane S, Coste C-M, Cooper J-F (2013) Photolysis of tembotrione and its main by-products under extreme artificial conditions: comparison with another β -triketone herbicide. Sci Total Environ 452–453:227–232 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.067>
- Calvayrac C, Martin-Laurent F, Faveaux A, Picault N, Panaud O, Coste C-M, Chaabane H, Cooper J-F (2012) Isolation and characterisation of a bacterial strain degrading the herbicide sulcotrione from an agricultural soil. Pest Manag Sci 68:340–347 . <https://doi.org/10.1002/ps.2263>
- Calvet R (1989) Adsorption of organic chemicals in soils. Environ Health Perspect 83:145–177 . <https://doi.org/10.1289/ehp.8983145>
- Carles L, Joly M, Bonnemoy F, Leremboure M, Donnadiou F, Batisson I, Besse-Hoggan P (2018) Biodegradation and toxicity of a maize herbicide mixture: mesotrione, nicosulfuron and S-metolachlor. J Hazard Mater 354:42–53 . <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.045>
- Carminati A, Moradi AB, Vetterlein D, Vontobel P, Lehmann E, Weller U, Vogel H-J, Oswald SE (2010) Dynamics of soil water content in the rhizosphere. Plant Soil 332:163–176 . <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0283-8>

- Cébron A, Norini M-P, Beguiristain T, Leyval C (2008) Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods* 73:148–159 . <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- CGDD (2015) Sols et environnement Chiffres clés. Commissariat général au développement durable Édition novembre 2015.
- CGDD (2017) Pesticides : évolution des ventes, des usages et de la présence dans les cours d'eau depuis 2009, Commissariat général au développement durable, Datalab mars 2017.
- CGDD (2018) Environnement & agriculture. Commissariat général au développement durable Les chiffres clés Édition juin 2018.
- Chaabane H, Cooper J-F, Azouzi L, Coste C-M (2005) Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. *J Agric Food Chem* 53:4091–4095 . <https://doi.org/10.1021/jf040443c>
- Chaabane H, Vulliet E, Calvayrac C, Coste C-M, Cooper J-F (2008) Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Manag Sci* 64:86–93 . <https://doi.org/10.1002/ps.1456>
- Chaabane H, Vulliet E, Joux F, Lantoine F, Conan P, Cooper J-F, Coste C-M (2007) Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms. *Water Res* 41:1781–1789 . <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.009>
- Corlett RT (2015) The Anthropocene concept in ecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 30:36–41 . <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.007>
- Corvalán C, Hales S, McMichael AJ, Millennium Ecosystem Assessment (Program), World Health Organization (eds) (2005) Ecosystems and human well-being: health synthesis. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Coscollà C, López A, Yahyaoui A, Colin P, Robin C, Poinson Q, Yusà V (2017) Human exposure and risk assessment to airborne pesticides in a rural French community. *Science of The Total Environment* 584–585:856–868 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.132>
- Crouzet O, Poly F, Bonnemoy F, Bru D, Batisson I, Bohatier J, Philippot L, Mallet C (2016) Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:4207–4217 . <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4797-8>
- Crouzet O, Wiszniowski J, Donnadiou F, Bonnemoy F, Bohatier J, Mallet C (2013) Dose-dependent effects of the herbicide mesotrione on soil cyanobacterial communities. *Arch Environ Contam Toxicol* 64:23–31 . <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9809-9>
- CSTEE (2000) Opinion on the available scientific approaches to assess the potential effects and risk of chemicals on terrestrial ecosystems. Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment.
- Daily GC (2012) Nature's services: societal dependence on natural ecosystems. Island Press
- Dayan FE, Duke SO, Sauldubois A, Singh N, McCurdy C, Cantrell C (2007) p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for beta-triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* 68:2004–2014 . <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.026>
- Dayan FE, Singh N, McCurdy CR, Godfrey CA, Larsen L, Weavers RT, Van Klink JW, Perry NB (2009) Beta-triketone inhibitors of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: modeling and comparative molecular field analysis of their interactions. *J Agric Food Chem* 57:5194–5200 . <https://doi.org/10.1021/jf9005593>
- Decaëns T, Jiménez JJ, Gioia C, Measey GJ, Lavelle P (2006) The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology* 42:S23–S38 . <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.07.001>
- Devers M, El Azhari N, Kolic N-U, Martin-Laurent F (2007) Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiol Lett* 273:78–86 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00792.x>

- Devers M, Henry S, Hartmann A, Martin-Laurent F (2005) Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (atz) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. *Pest Manag Sci* 61:870–880 . <https://doi.org/10.1002/ps.1098>
- Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques
- Dolan T, Howsam P, Parsons DJ, Whelan MJ (2013) Is the EU drinking water directive standard for pesticides in drinking water consistent with the precautionary principle? *Environ Sci Technol* 47:4999–5006 . <https://doi.org/10.1021/es304955g>
- Doublet J, Mamy L, Barriuso E (2009) Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* 77:582–589 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.044>
- Du Z, Zhu Y, Zhu L, Zhang J, Li B, Wang J, Wang J, Zhang C, Cheng C (2018) Effects of the herbicide mesotrione on soil enzyme activity and microbial communities. *Ecotoxicol Environ Saf* 164:571–578 . <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.075>
- Dumas E, Giraudo M, Goujon E, Halma M, Khilil E, Stauffert M, Batisson I, Besse-Hoggan P, Bohatier J, Bouchard P, Celle-Jeanton H, Costa Gomes M, Delbac F, Forano C, Goupil P, Guix N, Husson P, Ledoigt G, Mallet C, Mousty C, Prévot V, Richard C, Sarraute S (2017) Fate and ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: an overview to assess the environmental risks. *J Hazard Mater* 325:136–156 . <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.059>
- Durand S, Legeret B, Martin A-S, Sancelme M, Delort AM, 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 Communications in Mass Spectrometry* 20:2603–2616 . <https://doi.org/10.1002/rcm.2627>
- Dyson JS, Beulke S, Brown CD, Lane MCG (2002) Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *J Environ Qual* 31:613–618
- EFSE (2016) Rapport intermédiaire. L'évaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques.
- EFSA (2008) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance sulcotrione. *EFSA Journal* 6:150r . <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.150r>
- EFSA (2010) Scientific opinion on the development of specific protection goal options for environmental risk assessment of pesticides, in particular in relation to the revision of the Guidance Documents on Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology (SANCO/3268/ 2001 and SANCO/10329/2002). *EFSA J.* 8 1821.
- Ehrlich P and E (1981) Extinction: The causes and consequences of the disappearance of species. In: *eweb*:35542. <https://repository.library.georgetown.edu/handle/10822/788604>. Accessed 27 Apr 2020
- El Azhari N, Devers-Lamrani M, Chatagnier G, Rouard N, Martin-Laurent F (2010) Molecular analysis of the catechol-degrading bacterial community in a coal wasteland heavily contaminated with PAHs. *J Hazard Mater* 177:593–601 . <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.074>
- Erwin KL, Johnson WH, Meichan AJ, Whitman CP (2019) Preparation of dihydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons and activities of two dioxygenases in the phenanthrene degradative pathway. *Arch Biochem Biophys* 673:108081 . <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108081>
- Escalas A, Hale L, Voordeckers JW, Yang Y, Firestone MK, Alvarez-Cohen L, Zhou J (2019) Microbial functional diversity: from concepts to applications. *Ecology and Evolution* 9:12000–12016 . <https://doi.org/10.1002/ece3.5670>
- European Commission (1998) Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, L330/32.
- European Commission (2006a) Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Thematic Strategy for Soil Protection [SEC(2006)620] [SEC(2006)1165] COM(2006) 231 final

- European Commission (2006b) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH), establishing a European chemicals agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Off. J. Eur. Union 396.
- European Commission (2009) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives (EC) No. 79/117 and (EC) No. 91/414. Off. J. Eur. Union 309.
- European commission (2010) No. 1235/2010 of the European Parliament and of the Council of 15 December 2010 amending, as regards pharmacovigilance of medicinal products for human use, Regulation (EC) No 726/2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency, and Regulation (EC) No 1394/2007 on advanced therapy medicinal products. Off. J. Eur. Union 348.
- Eurostat (2007) The use of plant protection products in the European Union, data 1992-2003. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Faria AT, Fialho CA, Souza MF, Freitas NM, Silva AA, Faria AT, Fialho CA, Souza MF, Freitas NM, Silva AA (2019) Sorption and desorption of tembotrione and its metabolite AE 1417268 in soils with different attributes. *Planta Daninha* 37: . <https://doi.org/10.1590/s0100-83582019370100096>
- Frampton GK, Jansch S, Scott-Fordsmand JJ, Römbke J, Van den Brink PJ (2006) Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. *Environ Toxicol Chem* 25:2480–2489 . <https://doi.org/10.1897/05-438r.1>
- Friedrich MW (2011) Microbial communities, structure, and function. In: Reitner J, Thiel V (eds) *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 592–595
- Fritze IM, Linden L, Freigang J, Auerbach G, Huber R, Steinbacher S (2004) The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol* 134:1388–1400 . <https://doi.org/10.1104/pp.103.034082>
- Ghiglione J-F, Martin-Laurent F, Pesce S (2016) Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environ Sci Pollut Res* 23:3981–3983 . <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5763-1>
- Graham EB, Knelman JE, Schindlbacher A, Siciliano S, Breulmann M, Yannarell A, Beman JM, Abell G, Philippot L, Prosser J, Foulquier A, Yuste JC, Glanville HC, Jones DL, Angel R, Salminen J, Newton RJ, Bürgmann H, Ingram LJ, Hamer U, Siljanen HMP, Peltoniemi K, Potthast K, Bañeras L, Hartmann M, Banerjee S, Yu R-Q, Nogaro G, Richter A, Koranda M, Castle SC, Goberna M, Song B, Chatterjee A, Nunes OC, Lopes AR, Cao Y, Kaisermann A, Hallin S, Strickland MS, Garcia-Pausas J, Barba J, Kang H, Isobe K, Papaspyrou S, Pastorelli R, Lagomarsino A, Lindström ES, Basiliko N, Nemergut DR (2016) Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Front Microbiol* 7: . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00214>
- Gray RA, Tseng CK, Rusay RJ (1980) United States Patent: 4227919 - 1-Hydroxy-2-(alkylketo)-4,4,6,6-tetramethyl cyclohexen-3,5-dione herbicides
- Griffiths BS, Philippot L (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* 37:112–129 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>
- Guichard L, Dedieu F, Jeuffroy M-H, Meynard J-M, Reau R, Savini I (2017) Le plan Ecophyto de réduction d'usage des pesticides en France : décryptage d'un échec et raisons d'espérer. *Cah Agric* 26:14002 . <https://doi.org/10.1051/cagri/2017004>
- Guillon A, Videloup C, Leroux C, Bertin H, Philibert M, Baudin I, Bruchet A, Esperanza M (2019) Occurrence and fate of 27 triazines and metabolites within French drinking water treatment plants. *Water Supply* 19:463–471 . <https://doi.org/10.2166/ws.2018.091>

- Gunderson AR, Armstrong EJ, Stillman JH (2016) Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Ann Rev Mar Sci* 8:357–378 . <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033953>
- Gunnarsdottir MJ, Gardarsson SM, Figueras MJ, Puigdomènech C, Juárez R, Saucedo G, Arnedo MJ, Santos R, Monteiro S, Avery L, Pagaling E, Allan R, Abel C, Eglitis J, Hambsch B, Hügler M, Rajkovic A, Smigic N, Udovicki B, Albrechtsen H-J, López-Avilés A, Hunter P (2020) Water safety plan enhancements with improved drinking water quality detection techniques. *Science of The Total Environment* 698:134185 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134185>
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312:7–14 . <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hassani MA, Durán P, Hacquard S (2018) Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6:58 . <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Imfeld G, Vuilleumier S (2012) Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. *European Journal of Soil Biology* 49:22–30 . <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>
- Inceoglu Ö, van Overbeek LS, Falcão Salles J, van Elsas JD (2013) Normal operating range of bacterial communities in soil used for potato cropping. *Appl Environ Microbiol* 79:1160–1170 . <https://doi.org/10.1128/AEM.02811-12>
- IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- Kaiser K, Kalbitz K (2012) Cycling downwards – dissolved organic matter in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 52:29–32 . <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.04.002>
- Kandeler E, Deiglmayr K, Tscherko D, Bru D, Philippot L (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* 72:5957–5962 . <https://doi.org/10.1128/AEM.00439-06>
- Karpouzias DG, Tsiamis G, Trevisan M, Ferrari F, Malandain C, Sibourg O, Martin-Laurent F (2016) “LOVE TO HATE” pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:18947–18951 . <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Kelly DJ, Hughes NJ (2001) The citric acid cycle and fatty acid biosynthesis. In: Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL (eds) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press, Washington (DC)
- Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:303–313 . <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kroll D (2009) Chapter 15 - Monitoring for terrorist-related contamination. In: Ahuja S (ed) *Handbook of water purity and quality*. Academic Press, Amsterdam, pp 343–377
- Kurenbach B, Marjoshi D, Amábile-Cuevas CF, Ferguson GC, Godsoe W, Gibson P, Heinemann JA (2015) Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio* 6: . <https://doi.org/10.1128/mBio.00009-15>
- Kuzyakov Y, Blagodatskaya E (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83:184–199 . <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Larras F, Rimet F, Gregorio V, Bérard A, Leboulanger C, Montuelle B, Bouchez A (2016) Pollution-induced community tolerance (PICT) as a tool for monitoring Lake Geneva long-term *in situ* ecotoxic restoration from herbicide contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:4301–4311 . <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5302-0>

- Lee C-M, Yeo Y-S, Lee J-H, Kim S-J, Kim J-B, Han NS, Koo B-S, Yoon S-H (2008) Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. *Biochem Biophys Res Commun* 370:322–326 . <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.102>
- Liu D, Lian B, Wu C, Guo P (2018) A comparative study of gut microbiota profiles of earthworms fed in three different substrates. *Symbiosis* 74:21–29 . <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0491-6>
- Liu B, Peng Q, Sheng M, Ni H, Xiao X, Tao Q, He Q, He J (2020) Isolation and characterization of a topramezone-resistant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Sphingobium* sp. TPM-19. *J Agric Food Chem* 68:1022–1029 . <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06871>
- Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, Balsaa P, Gans O, Weiss S, Blaha L, Bolchi M, Gawlik BM (2010) Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res* 44:4115–4126 . <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032>
- Louca S, Polz MF, Mazel F, Albright MBN, Huber JA, O'Connor MI, Ackermann M, Hahn AS, Srivastava DS, Crowe SA, Doebeli M, Parfrey LW (2018) Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution* 2:936–943 . <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>
- Mallet C, Romdhane S, Loiseau C, Béguet J, Martin-Laurent F, Calvayrac C, Barthelmebs L (2019) Impact of Leptospermone, a natural β -triketone herbicide, on the fungal composition and diversity of two arable soils. *Front Microbiol* 10:1024 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01024>
- Mamy L, Patureau D, Barriuso E, Bedos C, Bessac F, Louchart X, Martin-Laurent F, Miegé C, Benoit P (2015) Prediction of the fate of organic compounds in the environment from their molecular properties: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45:1277–1377 . <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955627>
- Martinez B, Tomkins J, Wackett LP, Wing R, Sadowsky MJ (2001) Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Journal of Bacteriology* 183:5684–5697 . <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5684-5697.2001>
- Martin-Laurent F, Kandeler E, Petric I, Djuric S, Karpouzas DG (2013) ECOFUN-MICROBIODIV: an FP7 European project for developing and evaluating innovative tools for assessing the impact of pesticides on soil functional microbial diversity--towards new pesticide registration regulation? *Environ Sci Pollut Res Int* 20:1203–1205 . <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1368-0>
- Masson-Boivin C, Sachs JL (2018) Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Curr Opin Plant Biol* 44:7–15 . <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Mendz GL, Hazell SL (1996) The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 142:2959–2967 . <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2959>
- Migliani R, Bisht SS (2019) World of earthworms with pesticides and insecticides. *Interdiscip Toxicol* 12:71–82 . <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0008>
- Mills LS, Soulé ME, Doak DF (1993) The keystone-species concept in ecology and conservation management and policy must explicitly consider the complexity of interactions in natural systems. *BioScience* 43:219–224 . <https://doi.org/10.2307/1312122>
- Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TE, Hawkes TR, Holt DC, Townson JK, Wichert RA (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag Sci* 57:120–128 . [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E)
- Miyamoto M, Tanaka H, Katagi T (2011) Ecotoxicological risk assessment of pesticides in terrestrial ecosystems. Sumitomo Kagaku (English Edition) 2011-1, Report 5.
- Moran GR (2005) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 433:117–128 . <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.015>
- Nagy I, Compernelle F, Ghys K, Vanderleyden J, De Mot R (1995) A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Appl Environ Microbiol* 61:2056–2060
- Neergaard A de, Magid J (2015) Detritusphere effects on P availability and C mineralization in soil. *European Journal of Soil Science* 66:155–165 . <https://doi.org/10.1111/ejss.12179>

- Nesme J, Achouak W, Agathos SN, Bailey M, Baldrian P, Brunel D, Frostegård Å, Heulin T, Jansson JK, Jurkevitch E, Kruus KL, Kowalchuk GA, Lagares A, Lappin-Scott HM, Lemanceau P, Le Paslier D, Mandic-Mulec I, Murrell JC, Myrold DD, Nalin R, Nannipieri P, Neufeld JD, O’Gara F, Parnell JJ, Pühler A, Pylro V, Ramos JL, Roesch LFW, Schlöter M, Schleper C, Sczyrba A, Sessitsch A, Sjöling S, Sørensen J, Sørensen SJ, Tebbe CC, Topp E, Tsiamis G, van Elsas JD, van Keulen G, Widmer F, Wagner M, Zhang T, Zhang X, Zhao L, Zhu Y-G, Vogel TM, Simonet P (2016) Back to the future of soil metagenomics. *Front Microbiol* 7:73 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00073>
- Neuckermans J, Mertens A, De Win D, Schwaneberg U, De Kock J (2019) A robust bacterial assay for high-throughput screening of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. *Sci Rep* 9:14145 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50533-1>
- Nkongolo KK, Narendrula-Kotha R (2020) Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function. *J Appl Genetics* 61:249–263 . <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00549-5>
- OCDE (2000a), Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070226-en>.
- OCDE (2000b), Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070240-en>.
- Olchanheski LR, Dourado MN, Beltrame FL, Zielinski AAF, Demiate IM, Pileggi SAV, Azevedo RA, Sadowsky MJ, Pileggi M (2014) Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5-α. *PLOS ONE* 9:e99960 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099960>
- Orwin KH, Wardle DA (2004) New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1907–1912 . <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.036>
- Pajares S, Bohannan BJM (2016) Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Front Microbiol* 7:1045 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01045>
- Palmer GC, Palmer KL, Jorth PA, Whiteley M (2010) Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* transcriptional response to phenylalanine and tyrosine. *J Bacteriol* 192:2722–2728 . <https://doi.org/10.1128/JB.00112-10>
- Pascale A, Proietti S, Pantelides IS, Stringlis IA (2020) Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion. *Front Plant Sci* 10: . <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01741>
- Pavan ME, López NI, Pettinari MJ (2020) Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:1357–1370 . <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10245-y>
- Pavan ME, Venero ES, Egoburo DE, Pavan EE, López NI, Julia Pettinari M (2019) Glycerol inhibition of melanin biosynthesis in the environmental *Aeromonas salmonicida* 34melT. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:1865–1876 . <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9545-9>
- Pelosi C, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Mamy L, Mougin C (2017) Fate and impact of pesticides: new directions to explore. *Environ Sci Pollut Res Int* 24:6841–6843 . <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8383-0>
- Pesce S, Ghiglione J-F, Topp E, Martin-Laurent F (2020) Editorial: microbial ecotoxicology. *Front Microbiol* 11: . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01342>
- Pesce S, Lissalde S, Lavieille D, Margoum C, Mazzella N, Roubex V, Montuelle B (2010) Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquat Toxicol* 99:492–499 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.006>
- Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, Sarr A, Maron P-A (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J* 7:1609–1619 . <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.34>
- Polechová J, Storch D (2019) Ecological Niche. In: Fath B (ed) *Encyclopedia of Ecology* (Second Edition). Elsevier, Oxford, pp 72–80

- Rocaboy-Faquet E, Noguer T, Romdhane S, Bertrand C, Dayan FE, Barthelmebs L (2014) Novel bacterial bioassay for a high-throughput screening of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7243–7252 . <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5793-5>
- Rocca JD, Simonin M, Blaszcak JR, Ernakovich JG, Gibbons SM, Midani FS, Washburne AD (2018) The microbiome stress project: toward a global meta-analysis of environmental stressors and their effects on microbial communities. *Front Microbiol* 9:3272 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03272>
- Romdhane S (2016a) Les herbicides β -tricétones : devenir et impact écotoxicologique dans des sols agricoles et caractérisation de souches bactériennes dégradantes. Thèse de doctorat, Perpignan
- Romdhane S, Devers-Lamrani M, Barthelmebs L, Calvayrac C, Bertrand C, Cooper J-F, Dayan FE, Martin-Laurent F (2016c) Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptospermone on the microbial community of two arable soils. *Front Microbiol* 7: . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00775>
- Romdhane S, Devers-Lamrani M, Beguet J, Bertrand C, Calvayrac C, Salvia M-V, Jrad AB, Dayan FE, Spor A, Barthelmebs L, Martin-Laurent F (2019) Assessment of the ecotoxicological impact of natural and synthetic β -triketone herbicides on the diversity and activity of the soil bacterial community using omic approaches. *Sci Total Environ* 651:241–249 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.159>
- Romdhane S, Devers-Lamrani M, Martin-Laurent F, Calvayrac C, Rocaboy-Faquet E, Riboul D, Cooper J-F, Barthelmebs L (2016b) Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two β -triketone herbicides. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:4138–4148 . <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4544-1>
- Romdhane S, Devers-Lamrani M, Martin-Laurent F, Jrad AB, Raviglione D, Salvia M-V, Besse-Hoggan P, Dayan FE, Bertrand C, Barthelmebs L (2017) Evidence for photolytic and microbial degradation processes in the dissipation of leptospermone, a natural β -triketone herbicide. *Environ Sci Pollut Res* 1–12 . <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9728-4>
- Schlatter DC, Reardon CL, Johnson-Maynard J, Brooks E, Kahl K, Norby J, Huggins D, Paulitz TC (2019) Mining the drilosphere: bacterial communities and denitrifier abundance in a no-till wheat cropping system. *Front Microbiol* 10: . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01339>
- Schloss PD, Handelsman J (2006) Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol* 2: . <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092>
- Schmalzer-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T, Brakhage AA (2009) Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 75:493–503 . <https://doi.org/10.1128/AEM.02077-08>
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett* 318:162–166 . [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80013-k](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80013-k)
- Schulze E-D, Mooney HA (eds) (1994) Biodiversity and ecosystem function. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Science AA for the A of (2013) Infographic: pesticide planet. *Science* 341:730–731 . <https://doi.org/10.1126/science.341.6147.730>
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho D, Berga M, Buergermann H, Huber DH, Langenheder S, Lennon JT, Martiny JB, Matulich KL, Schmidt TM, Handelsman J (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* 3: . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Sharma IP, Chandra D, Kanta C (2018) Drilosphere a valuable source for soil microbial nbsp activities. *MOJ Biology and Medicine* 3:
- Silva V, Mol HGJ, Zomer P, Tienstra M, Ritsema CJ, Geissen V (2019) Pesticide residues in European agricultural soils - A hidden reality unfolded. *Sci Total Environ* 653:1532–1545 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Sims GK (2014) Bioavailability in biodegradation and function of herbicides. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 5:1–3 . <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000e144>

- Sjerps RMA, Kooij PJF, van Loon A, Van Wezel AP (2019) Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources. *Chemosphere* 235:510–518 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.207>
- Smith D, Alvey S, Crowley DE (2005) Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiol Ecol* 53:265–273 . <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.12.011>
- Steele JH (1991) Marine functional diversity. *BioScience* 41:470–474 . <https://doi.org/10.2307/1311804>
- Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487–506 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
- Storck V, Nikolaki S, Perruchon C, Chabanis C, Sacchi A, Pertile G, Baguelin C, Karas PA, Spor A, Devers-Lamrani M, Papadopoulou ES, Sibourg O, Malandain C, Trevisan M, Ferrari F, Karpouzas DG, Tsiamis G, Martin-Laurent F (2018) Lab to field assessment of the ecotoxicological impact of chlorpyrifos, isoproturon, or tebuconazole on the diversity and composition of the soil bacterial community. *Front Microbiol* 9:1412 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01412>
- Sui Y, Yang H (2013) Bioaccumulation and degradation of atrazine in several Chinese ryegrass genotypes. *Environ Sci Process Impacts* 15:2338–2344 . <https://doi.org/10.1039/c3em00375b>
- Szmigielski AM, Hangs RD, Schoenau JJ (2018) Bioavailability of metsulfuron and sulfentrazone herbicides in soil as affected by amendment with two contrasting willow biochars. *Bull Environ Contam Toxicol* 100:298–302 . <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2212-5>
- Tallis H, Kareiva P (2005) Ecosystem services. *Curr Biol* 15:R746–748 . <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.007>
- Tan T, Zhang X, Miao Z, Yu Y, Du S, Hou X, Cai J (2019) A single point mutation in *hmgA* leads to melanin accumulation in *Bacillus thuringiensis* BMB181. *Enzyme and Microbial Technology* 120:91–97 . <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.10.007>
- Terrat S, Horrigue W, Dequiedt S, Saby NPA, Lelièvre M, Nowak V, Tripied J, Régnier T, Jolivet C, Arrouays D, Wincker P, Cruaud C, Karimi B, Bispo A, Maron PA, Chemidlin Prévost-Bouré N, Ranjard L (2017) Mapping and predictive variations of soil bacterial richness across France. *PLoS ONE* 12:e0186766 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186766>
- Thiour-Mauprivez C, Martin-Laurent F, Calvayrac C, Barthelmebs L (2019) Effects of herbicide on non-target microorganisms: towards a new class of biomarkers? *Sci Total Environ* 684:314–325 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.230>
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6:2519–2523
- Turick CE, Beliaev AS, Zakrajsek BA, Reardon CL, Lowy DA, Poppy TE, Maloney A, Ekechukwu AA (2009) The role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in enhancement of solid-phase electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol Ecol* 68:223–225 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00670.x>
- Udiković-Kolić N, Scott C, Martin-Laurent F (2012) Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:1175–1189 . <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4495-0>
- Valavanidis A, Vlachogianni T (2017) Ecotoxicity test methods and ecological risk assessment. 29 van Rhijn P, Vanderleyden J (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59:124–142
- Villarroel MJ, Sancho E, Ferrando MD, Andreu E (2003) Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53:857–864 . [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00546-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00546-0)
- Völker J, Borchardt D (2019) Drinking water quality at risk: a european perspective. In: Schröter M, Bonn A, Klotz S, Seppelt R, Baessler C (eds) *Atlas of Ecosystem Services: Drivers, Risks, and Societal Responses*. Springer International Publishing, Cham, pp 205–210

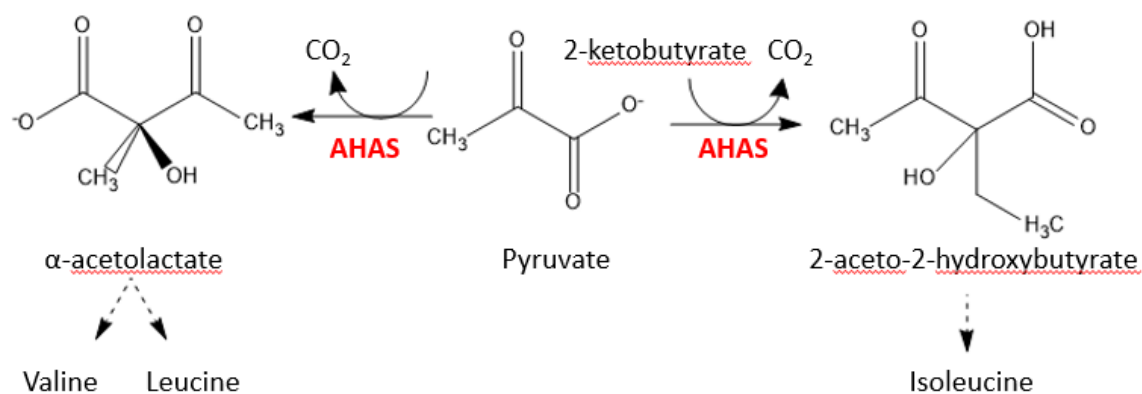
- Walker BH (1992) Biodiversity and ecological redundancy. *Conservation Biology* 6:18–23 .
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x>
- Wall DH, Bardgett RD, Behan-Pelletier V, Herrick JE, Jones TH, Strong DR (2013) Soil ecology and ecosystem services. OUP Oxford
- Wang H, Qiao Y, Chai B, Qiu C, Chen X (2015) Identification and molecular characterization of the homogentisate pathway responsible for pyomelanin production, the major melanin constituents in *Aeromonas media* WS. *PLoS ONE* 10:e0120923 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120923>
- Wogram J, Liess M (2001) Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol* 67:0360–0367 .
<https://doi.org/10.1007/s001280133>
- Xu M, Shang H (2016) Contribution of soil respiration to the global carbon equation. *Journal of Plant Physiology* 203:16–28 . <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.08.007>
- Yang X, Lwanga EH, Bemani A, Gertsen H, Salanki T, Guo X, Fu H, Xue S, Ritsema C, Geissen V (2019) Biogenic transport of glyphosate in the presence of LDPE microplastics: a mesocosm experiment. *Environ Pollut* 245:829–835 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.044>
- Yang H, Wang L, Xie Z, Tian Y, Liu G, Tan H (2007) The tyrosine degradation gene *hpdD* is transcriptionally activated by *HpdA* and repressed by *HpdR* in *Streptomyces coelicolor*, while *hpdA* is negatively autoregulated and repressed by *HpdR*. *Molecular Microbiology* 65:1064–1077 .
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05848.x>

Annexes

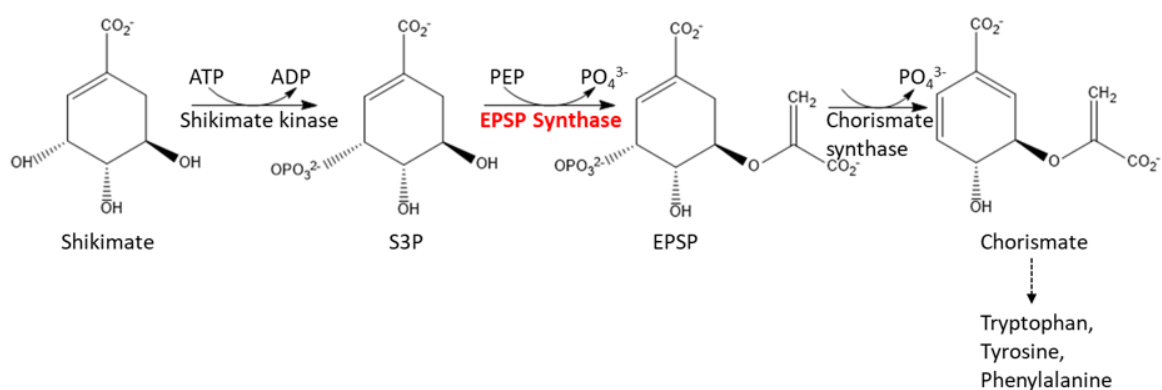
Documents supplémentaires article 1:



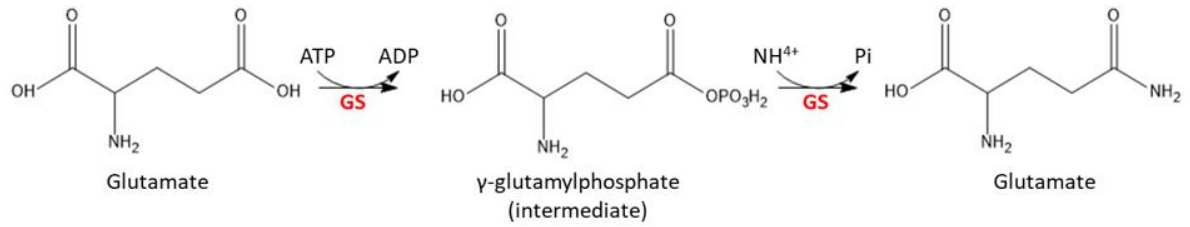
Sup data Figure 1. Fatty acid biosynthesis.



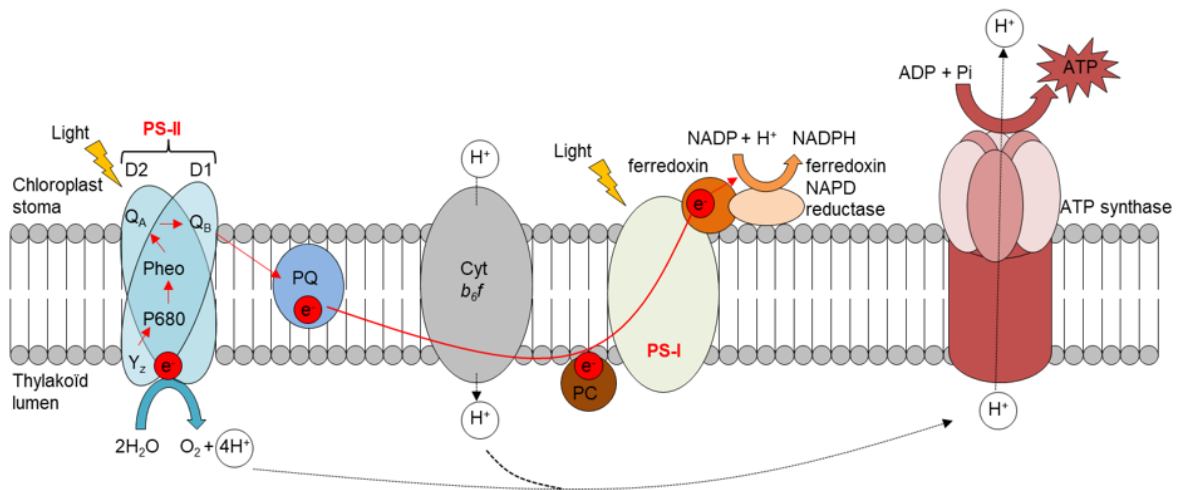
Sup Data Figure 2 . Valine, leucine and isoleucine biosynthesis.



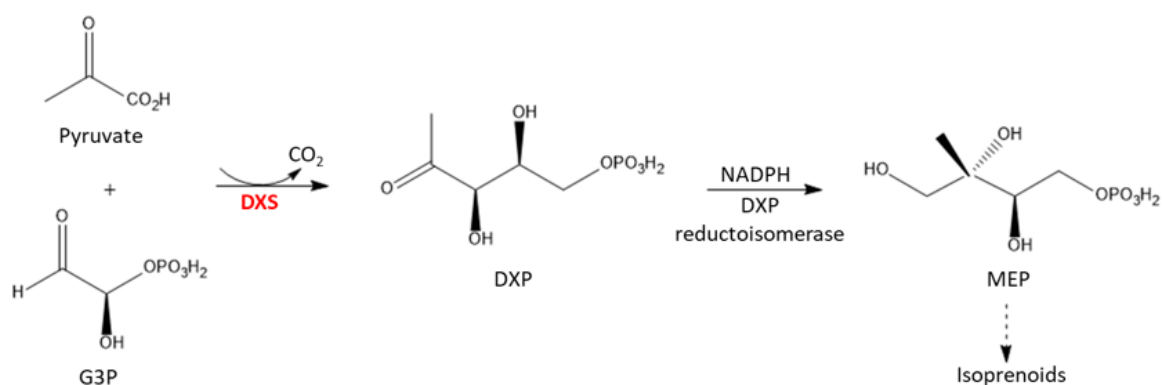
Sup Data Figure 3. The shikimate pathway.



Sup data Figure 4. Glutamine biosynthesis pathway.



Sup data Figure 5. Role of PS-I and PS-II in the electron transport chain.



Sup data Figure 6. Isoprenoids biosynthesis pathway.

SUP Data Table 1. Herbicides affecting growth and cell division.

HRAC group	Chemistry group of the herbicide	Relevant commercialized herbicide (active ingredient)	Target
K	Benzamide Benzoic acid Dinitroaniline Pyridine	Ros-clean (isoxaben, oryzalin)	Microtubule assembly
K2	Carbamates	Non-approved in EU	Microtubule organisation
K3	Acetamides Chloroacetamides Oxyacetamides	S-metalostar (s-metachlore)	Very-long-chain fatty acids synthase (VLCFA-synthase)
L	Alkylazine Benzamide Nitrile	Ros-clean (isoxaben, oryzalin)	Cellulose synthesis
O	Benzoic acids Phenoxycarboxylic acids Pyridine carboxylic acids Quinoline carboxylic acids	Dicash (dicamba)	Synthetic auxins
P	Semi-carbazones	Non-approved in EU	Auxin transport

Documents supplémentaires article 3:

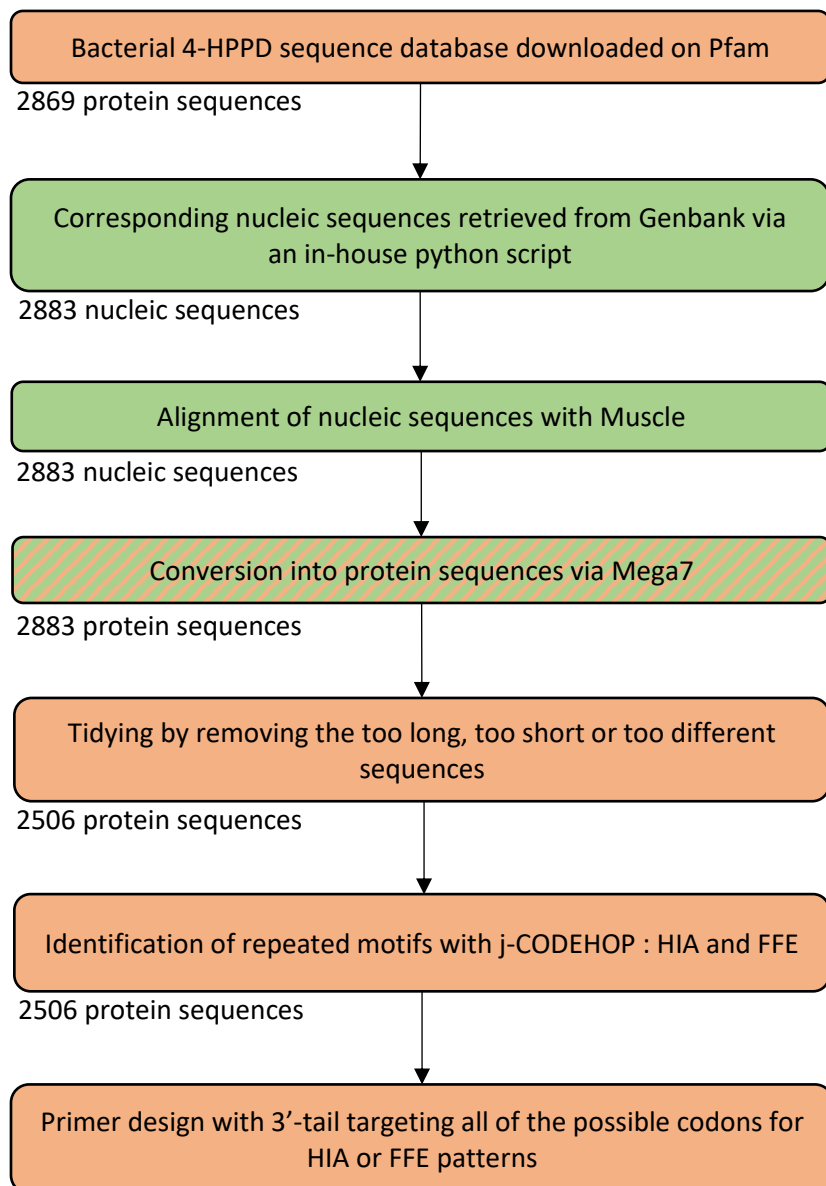
Supplementary data

Supplementary file 1. Active substances with herbicidal activity belonging to the HRAC F2 group

Chemical family	Active substance
Oxazole	Isoxachlortole
	Isoxaflutole
Pyrazole	Benzofenap
	Pyrasulfotole
	Pyrazolynate
	Pyrazoxyfen
	Topramezone
Benzoylcyclohexanedione	Mesotrione
	Sulcotrione
	Tembotrione
	Tefuryltrione
Unclassified	Benzobicyclon
	Bicyclopyrone

Supplementary file 2. A novel pipeline to design a degenerate primer pair to target bacterial *hppd* genes.

The different steps are depicted in orange when working on protein sequences and in green when working on nucleic sequences.



Supplementary file 3. Physicochemical properties of the soil of Perpignan (France).

Perpignan soil properties	
Clay (%)	16.2
Silt (%)	29.1
Sand (%)	54.7
Organic matter (g.kg ⁻¹)	27.5
Organic carbon (g.kg ⁻¹)	15.9
Nitrogen (g.kg ⁻¹)	1.2
CEC (meq.kg ⁻¹)	99.0
Ca ²⁺ /CEC (%)	260.3
Water pH (a.u.)	8.0

Supplementary file 4. PCR conditions for the amplification of the *hppd* gene from soil DNA extracts.

PCR reactions were conducted in a final volume of 25µL using 0.5ng of DNA template, 1X standard buffer with MgCl₂ (MP Biomedicals, France), 0.2mM of dNTPs (MP Biomedicals, France), 10µM of each specific primer (HIA-F/FFE-R), 250ng of T4 gp32 (MP Biomedicals, France) and 1.25U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals, France). DNA amplifications were carried out in a PTC 200 gradient cycler (MJ Research, Waltham, MA) as follows: 2min at 95°C, 35 cycles of 30s at 95°C, 45s at 51.5°C for primer annealing, and 45s at 72°C, plus an additional 15min run at 72°C. PCR products were then separated by electrophoresis on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (100mg.L⁻¹) and photographed with a CCD camera.

Documents supplémentaires article 4:

Table S1. Soil properties of samples collected in three agricultural fields located in the same area. Granulometry was measured according to the particle size 5 fractions with no decarbonisation method (NF X 31-107) and revealed sandy clay loam soils. Organic carbon, matter and nitrogen contents were measured by dry combustion according to the standard methods NF ISO 10694 and NF ISO 13878. CEC was measured according to the Metson method (NF X 31-130). n.d=not determined.

Field	Sampling date	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	Water pH	Organic carbon (g/kg)	Organic matter (g/kg)	Nitrogen (g/kg)	CEC (meq/kg)
1	Sept. 2018	23.4	55	18.3	6.2	n.d	n.d	n.d	n.d
	June 2019	14.1	52	33.8	6.1	47.5	82.3	3.21	186
	Aug. 2019	18.5	48	33.5	5.8	50.7	87.7	3.38	185
2	Sept. 2018	26.2	44.7	26.4	6.7	n.d	n.d	n.d	n.d
	June 2019	20.9	47.9	31.3	5.2	29.2	50.5	2.45	119
	Aug. 2019	20	50.4	29.7	5.4	31.7	54.8	2.46	124
3	Sept. 2018	16.1	33.4	48.5	6.3	n.d	n.d	n.d	n.d
	June 2019	13.3	48.7	38	5.7	42.8	74.1	2.89	141
	Aug. 2019	17	52.2	30.8	5.7	51.7	89.4	3.39	164

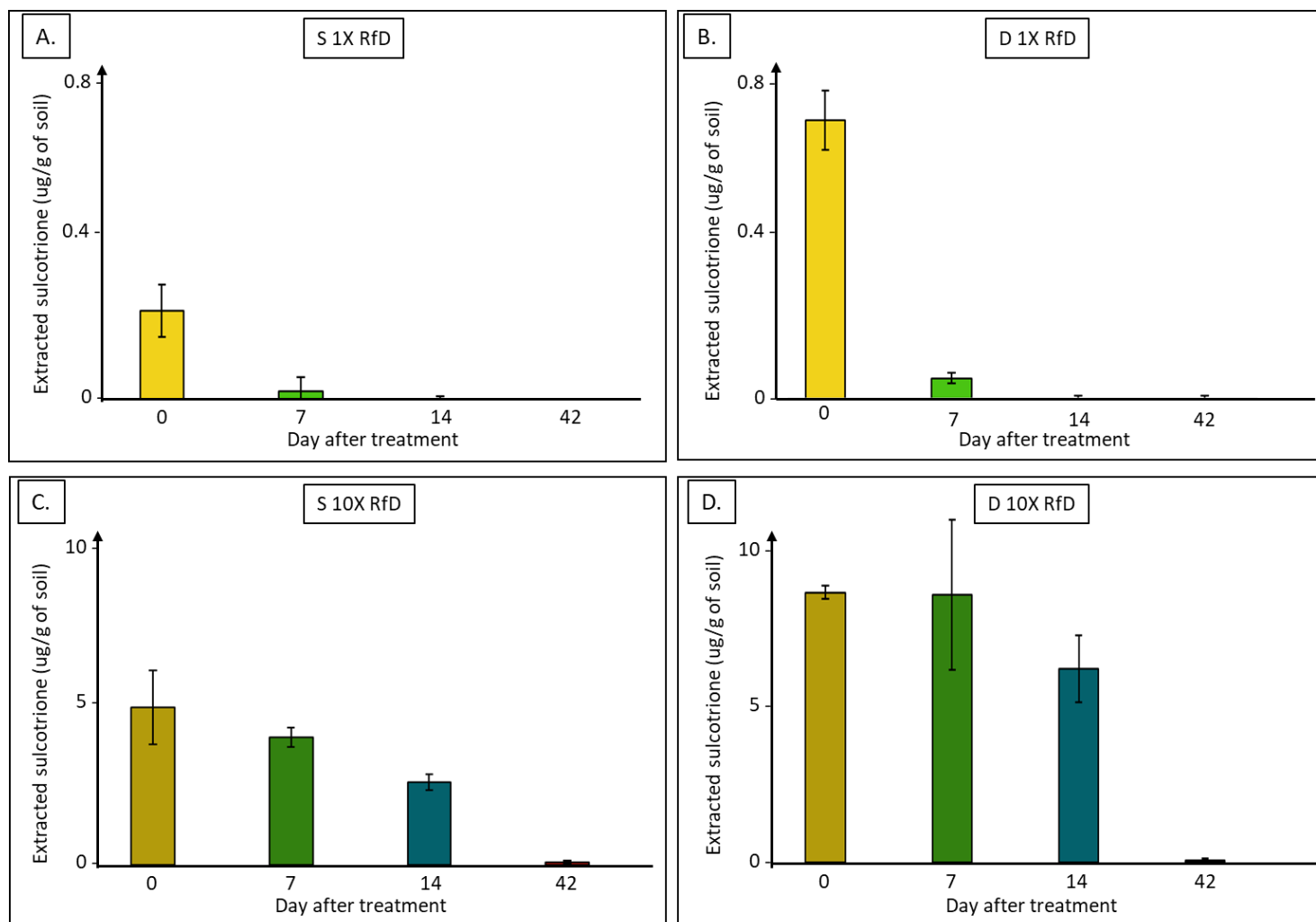


Figure S1. Dissipation kinetics of 1X RfD of sulcotrione **(A)** and Decano® **(B)** and 10X RfD of sulcotrione **(C)** and Decano® **(D)** in Perpignan soil microcosms. Standard deviations are indicated (n=3).

Table S2. Richness and diversity indices of the total bacterial community calculated for soil microcosms exposed to sulcotrione (S) and Decano[®] (D) applied at different concentrations (Control, 1X RfD, and 10X RfD) at 0, 7, 14 and 42 days. Mean values $\pm$ confidence intervals are shown. Statistical analysis were led for each sampling day by comparing the different treatments to the control. Differences are indicated, if needed, by small letters (Kruskal–Wallis test $P < 0.05$).

Day after treatment	Treatment	Observed species	PD whole tree	Simpson reciprocal
0	S Control	1367 $\pm$ 61 ^b	503 $\pm$ 22 ^b	206 $\pm$ 25
	S 1X RfD	1508 $\pm$ 16 ^a	544 $\pm$ 9 ^a	280 $\pm$ 59
	S 10X RfD	1520 $\pm$ 35 ^a	558 $\pm$ 11 ^a	282 $\pm$ 48
	D Control	2421 $\pm$ 72	810 $\pm$ 22	249 $\pm$ 3
	D 1X RfD	2237 $\pm$ 187	760 $\pm$ 44	208 $\pm$ 76
	D 10X RfD	2416 $\pm$ 134	804 $\pm$ 29	320 $\pm$ 56
7	S Control	1270 $\pm$ 46	482 $\pm$ 12	91 $\pm$ 27
	S 1X RfD	1333 $\pm$ 56	497 $\pm$ 19	118 $\pm$ 40
	S 10X RfD	1326 $\pm$ 88	499 $\pm$ 12	115 $\pm$ 30
	D Control	2370 $\pm$ 82	793 $\pm$ 9	223 $\pm$ 73
	D 1X RfD	2283 $\pm$ 300	768 $\pm$ 74	270 $\pm$ 109
	D 10X RfD	2484 $\pm$ 104	822 $\pm$ 24	344 $\pm$ 66
14	S Control	1485 $\pm$ 31	558 $\pm$ 11	174 $\pm$ 3
	S 1X RfD	1443 $\pm$ 62	541 $\pm$ 9	149 $\pm$ 14
	S 10X RfD	1474 $\pm$ 51	520 $\pm$ 19	165 $\pm$ 57
	D Control	2577 $\pm$ 63	810 $\pm$ 22	281 $\pm$ 67
	D 1X RfD	2447 $\pm$ 66	760 $\pm$ 44	205 $\pm$ 105
	D 10X RfD	2232 $\pm$ 335	804 $\pm$ 29	151 $\pm$ 133
42	S Control	1540 $\pm$ 16	536 $\pm$ 9	241 $\pm$ 75
	S 1X RfD	1512 $\pm$ 9	552 $\pm$ 4	202 $\pm$ 23
	S 10X RfD	1548 $\pm$ 24	543 $\pm$ 6	218 $\pm$ 41
	D Control	2539 $\pm$ 84	841 $\pm$ 26	334 $\pm$ 21
	D 1X RfD	2596 $\pm$ 41	848 $\pm$ 17	353 $\pm$ 18
	D 10X RfD	2624 $\pm$ 38	857 $\pm$ 10	328 $\pm$ 41

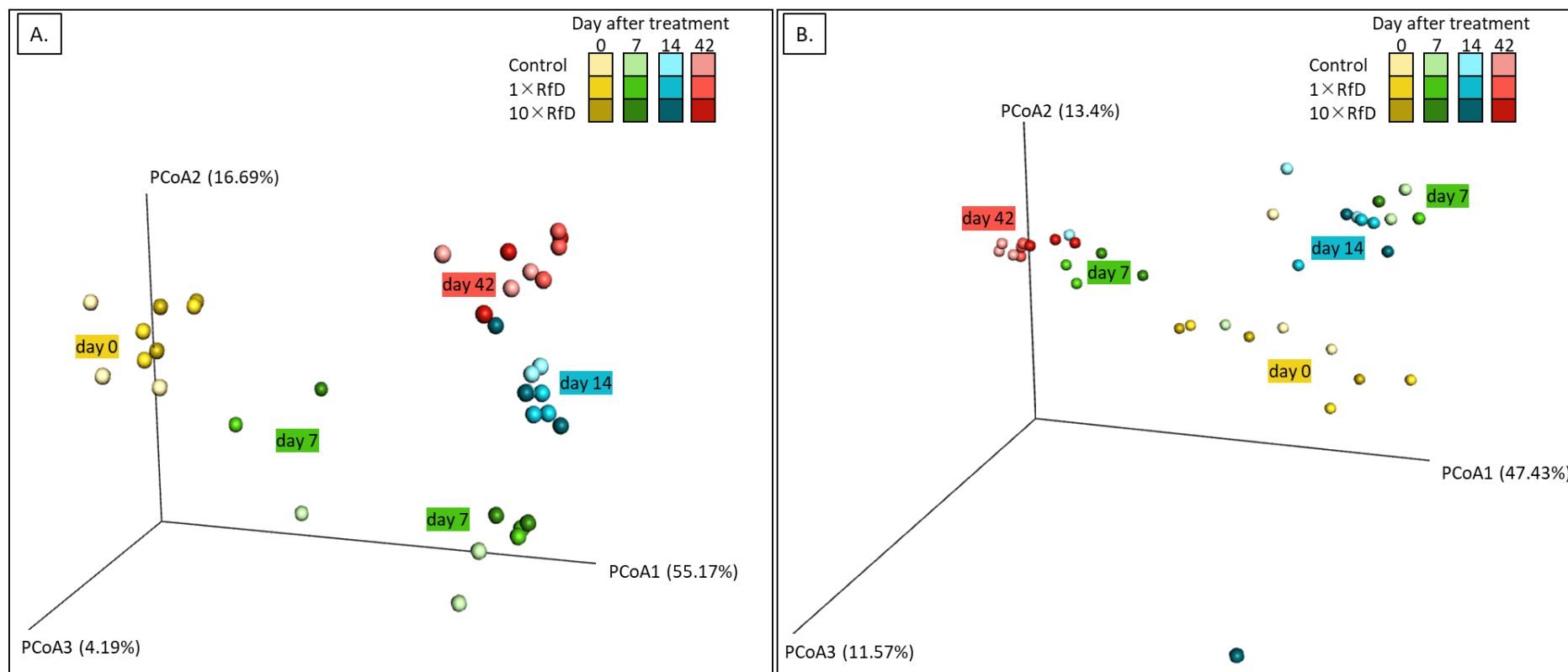


Figure S2. UniFrac analysis of the effect of sulcotrione **(A)** and Decano® **(B)** applied at different concentrations (Control, 1X RfD, and 10X RfD) on the total bacterial community composition of soil microcosms after 0, 7, 14 and 42 days of exposure. The first three axes of the PCoA of the weighted UniFrac distance matrix of 16S rRNA amplicon Illumina sequencing are shown. The percent of variance explained by each axis is given.

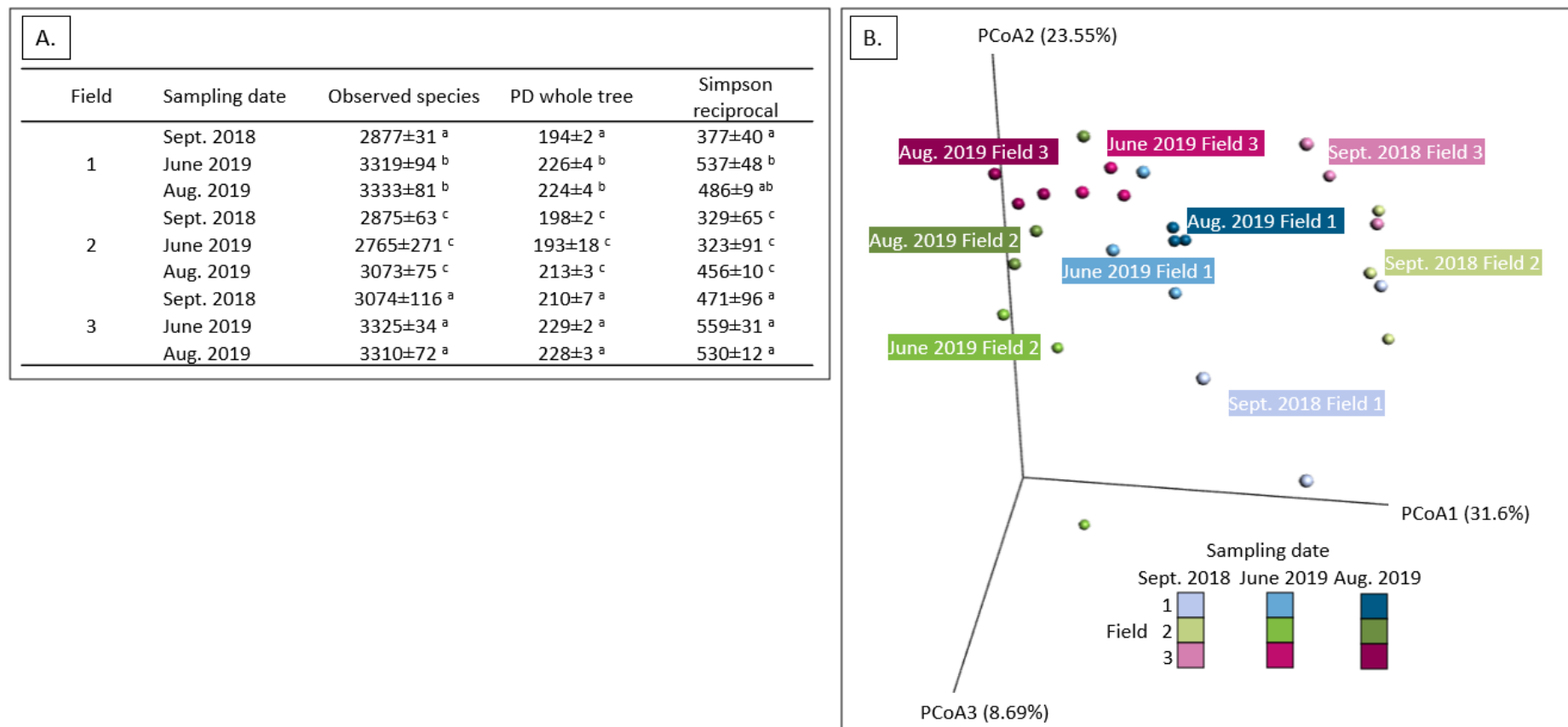


Figure S3. Analysis of the α -diversity **(A)** and the β -diversity **(B)** of the total bacterial community in soils of agricultural fields treated with PPPs (fields 2 and 3) or not (field 1) at different sampling times over a crop cycle (Sept. 2018, June 2019, Aug. 2019). **(A)** Richness and diversity indices of the total bacterial community (mean values $\pm$ confidence intervals). ANOVA tests were conducted and $p < 0.05$ was considered as significant and indicated by a small letter. **(B)** UniFrac analysis on the total bacterial community composition. The first three axes of the PCoA of the weighted UniFrac distance matrix of *hppd* amplicon Illumina sequencing are shown. The percent of variance explained by each axis is given.

DIAGSOL : Développement d'un nouveau marqueur fonctionnel d'exposition aux herbicides β -tricétones dans les sols agricoles.

Résumé : De nombreux herbicides ciblent une enzyme végétale aussi retrouvée chez des organismes dits « non-cibles » tels que les microorganismes. Ce travail de thèse vise à établir la preuve de concept que les gènes microbiens codant l'enzyme ciblée ou l'activité de l'enzyme elle-même peuvent servir de marqueur d'impact écotoxicologique des herbicides dans les sols. L'enzyme HPPD (4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase) et le gène du même nom, cible des herbicides β -tricétones, sont sujets d'étude.

Des études *in silico* montrent que le gène *hppd* est présent dans de nombreux genres bactériens et un couple d'amorces ciblant une majorité des séquences décrites a été dessiné. Ce dernier a servi à mesurer l'abondance, la composition et la diversité de la communauté bactérienne *hppd* de microcosmes de sols exposés à la sulcotrione ou à sa formulation commerciale, le Decano®. Les mêmes mesures sont réalisées sur des champs agricoles traités avec des β -tricétones pendant une année. A l'échelle de la communauté, aucun effet des herbicides n'est décelable, renforçant leur réputation « eco-friendly ».

Au niveau enzymatique, des études de docking moléculaire montrent que les herbicides se lient plus fortement à l'HPPD de certaines souches. Le bioessai développé soutient cette observation : les β -tricétones ont un effet variable sur l'activité HPPD en fonction de la souche considérée. La tembotrione inhibe plus fortement l'activité HPPD de *Bacillus cereus* ATCC14579 et *Shewanella oneidensis* MR-1 que la sulcotrione et la mésotrione. A l'avenir, ce bioessai pourrait être utilisé comme marqueur d'exposition des sols aux herbicides β -tricétones dans une optique d'évaluation du risque par les autorités.

Mots-clefs : herbicides β -tricétones ; enzyme HPPD ; gène *hppd* microbien ; microorganismes ; communautés microbiennes ; écotoxicologie microbienne ; biomarqueur ; bioessai ; organismes non-cibles.

DIAGSOL: Development of a new functional marker for β -triketone herbicide exposure in agricultural soils.

Abstract: Numerous herbicides target an enzyme found not only in weeds but also in « non-target organisms » such as microorganisms. This proof-of-concept study aims to use microbial gene encoding the targeted enzyme or the targeted enzyme itself as a marker for herbicide exposure in soils. The *hppd* gene and the encoded enzyme (HPPD; 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase), targeted by β -triketone herbicides, are the subject of this study.

In silico analyses reveal that the *hppd* gene is spread out in all bacterial phyla. Primers specific to this gene were designed. This primer pair is used to measure the abundance, the composition and the diversity of the *hppd* bacterial community in soil microcosms exposed to sulcotrione or its commercial formulation, Decano®. Similar measurements are made, over a cropping cycle, on agricultural fields treated with various herbicides, including β -triketones. No significant effect of β -triketone herbicides were observed at the bacterial community scale, strengthening their “eco-friendly” reputation.

At the enzymatic scale, molecular docking studies reveal that β -triketones bind more closely to certain bacterial HPPD than others. The developed bioassay reinforces this observation: regarding the bacterial strain, β -triketones have a variable inhibitory effect on the HPPD enzymatic activity. Tembotrione has a greater inhibitory effect on the HPPD activity of *Bacillus cereus* ATCC14579 and *Shewanella oneidensis* MR-1 than sulcotrione and mesotrione. This bioassay could be used as a marker of exposure for β -triketones risk assessment studies requested by authorities in charge of pesticide regulation.

Key-words: β -triketone herbicides ; HPPD enzyme ; microbial *hppd* gene ; microorganisms ; microbial communities ; microbial ecotoxicology ; biomarker ; bioassay ; non-target organisms.