

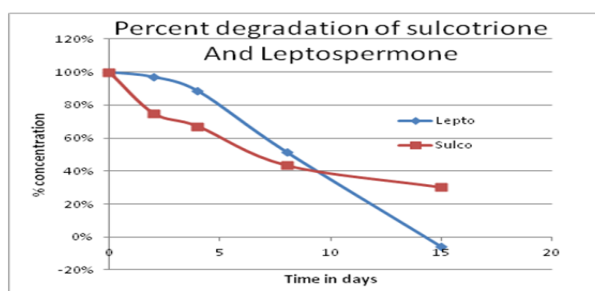
Etude par métabolomique environnementale de l'impact de pesticides et de produits de biocontrôle en microcosmes de sols.

Mots clés : Chimie de l'environnement, métabolomiques, nouveaux polluants, biocontrôle, impact environnemental.

Résumé :

L'utilisation croissante de produits d'origine naturelle, souvent complexes, ou de micro-organismes, dans les pratiques agricoles ou en démoustication conduit à des interrogations quant à leur impact sur l'environnement. Afin d'évaluer cet impact une approche possible consiste à définir la rémanence de ces polluants et de leurs produits de dégradation dans l'environnement. Nous souhaitons développer une nouvelle approche basée sur un protocole permettant, par profilage métabolomique, d'évaluer l'impact de ces préparations sur le métabolome du milieu tout en suivant le devenir du bioproduit utilisé et ses produits de dégradation. Il s'agit ici de considérer un sol ou un sédiment comme un système vivant capable de transformer les polluants mais aussi de produire son propre métabolome. L'outil développé devrait permettre de révéler des marqueurs de la pollution et de d'évaluer, outre la demi-vie des polluants, le temps de résilience des systèmes étudiés. Pour développer l'outil, nous avons choisi, dans ce projet, de comparer le devenir et l'impact sur le métabolome d'un sol contaminé par deux herbicides (un naturel et un de synthèse) *versus* un sol témoin.

Actuellement le suivi des pesticides dans l'environnement est réalisé selon des protocoles OCDE qui ne sont pas appropriés au suivi des préparations naturelles ou extraits naturels complexes. Par ailleurs, les résidus étudiés (pesticides ou produits de dégradation) ne permettent de définir l'impact des pesticides sur les sols. La détermination de la demi-vie, par exemple ne permet pas d'estimer la rémanence d'un composé dans l'environnement comme le met en évidence la figure 1. L'utilisation d'une approche métabolomique pourra donc apporter de nombreuses informations essentielles quant à l'impact environnemental de ces bioproduits.



Sulcotrione:
First-order kinetics
 $t_{1/2} \approx 8$ days

Leptospermone:
First-order kinetics
 $t_{1/2} \approx 8$ days

Figure 1 : Détermination de la 1/2 vie de deux herbicides sur un sol limono-argileux (Sol de Perpignan), malgré une demi-vie identique la sulcotrione, dans les conditions de l'étude, paraît plus persistante que la leptospermone.

Etude préliminaire déjà effectuée au CRIOBE :

Protocole préliminaire :

Sur sol non contaminé, l'impact de deux β -tricétones a été évalué : la sulcotrione (substance active commerciale) et la leptospermone (composé de synthèse analogue au naturel). Pour chaque modalité de temps et de traitement, cinq échantillons de sol (10,0 g chacun) ont été traités avec une solution méthanolique de sulcotrione ou de leptospermone correspondant à la dose d'application recommandée au champ. Les microcosmes ont été maintenus pendant 90 jours et des échantillons ont été prélevés à différents temps pour la réalisation d'extraits organiques. Un outil de métabolomique a été développé, intégrant l'acquisition de profils métaboliques en LC/MS, la génération de matrices et des analyses multivariées (PCA, PLSDA, MANOVA). Cet outil a été appliqué aux extraits de sol des microcosmes étudiés. L'ensemble du protocole développé est représenté dans la figure 2.

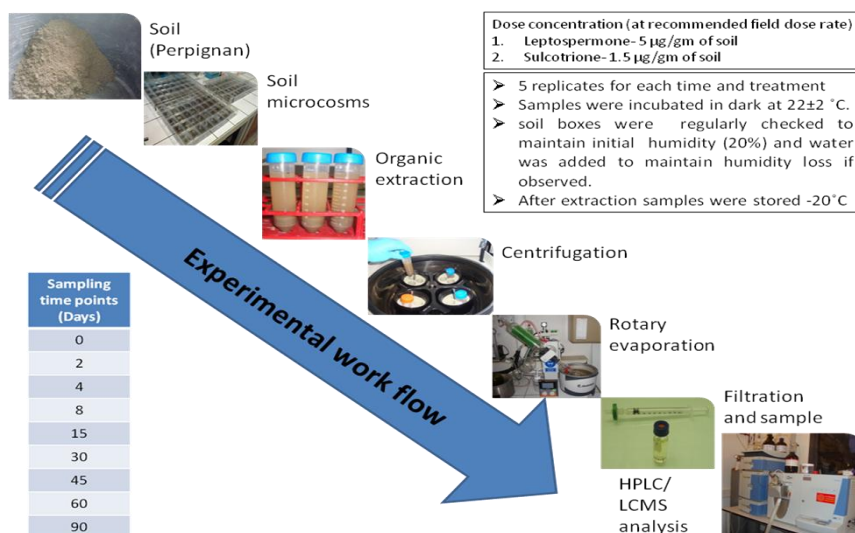


Figure 2 : Protocole expérimental pour le suivi de l'impact des pesticides sur microcosmes de sols par métabolomique.

Résultats préliminaires :

Tout d'abord, les analyses en ACP et MANOVA de cette première expérience ont permis de mettre en évidence les effets des traitements par les herbicides ainsi qu'un effet temps sur le métabolome du sol (Figure 3). En effet, nous pouvons observer au sein de chaque traitement un "décrochage" des groupes à partir du temps 45 jours; cette différence de la fraction du métabolome étudié est également observable chez le contrôle.

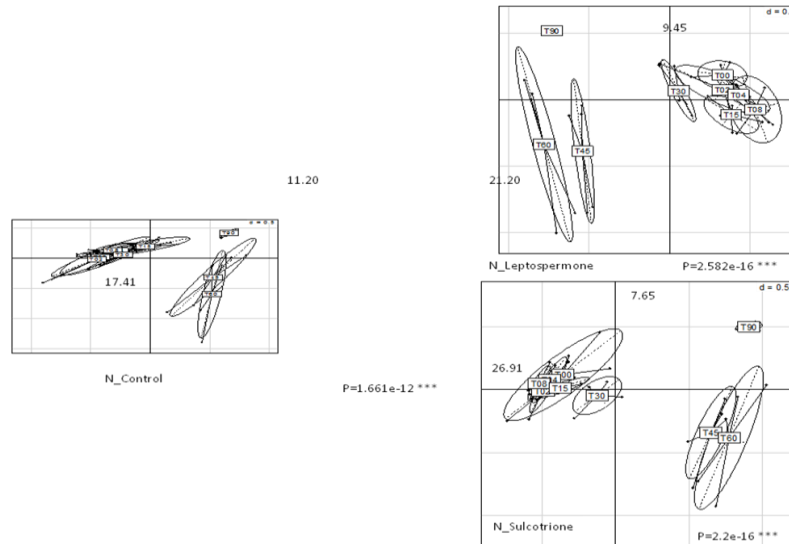
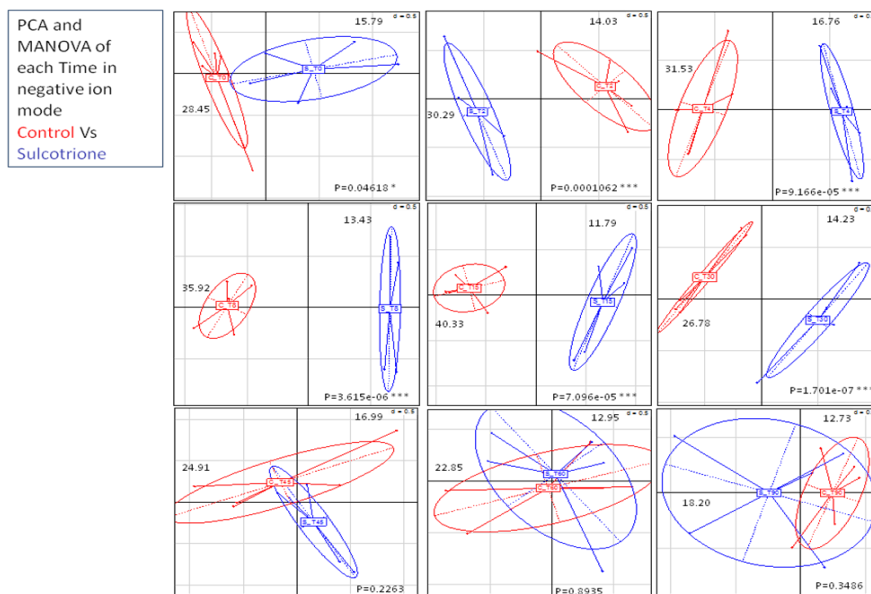


Figure 3 : ACP groupes temps de prélèvements réalisés sur les données de profilage en LC/ESI-MS, des différents traitements (contrôle, sulcotrione et leptospermone)

Dans un deuxième temps, si nous observons les différences du métabolome du sol entre les contrôles et les traitements pour chaque temps de prélèvements, nous pouvons définir le temps nécessaire à la résilience du sol, c'est dire le temps nécessaire pour que, statistiquement, aucune différence significative ne soit observable entre les sols traités et les contrôles.

Dans les conditions de l'étude, une résilience précoce du métabolome du sol a été observée 15 jours après traitement par la leptospermone *versus* 45 jours pour la sulcotrione, ceci malgré une dose 5 fois plus élevée pour la leptospermone (Figure 4).



Parameter	Time point	P value		Parameter	Time point	P value	
		Scan mode				Scan mode	
		Positive	Negative			Positive	Negative
Control Vs LEPTOSPERMONE	T0	0.04381 *	0.1438	Control Vs Sulcotrione	T0	0.01292 *	0.04618 *
	T2	0.4834	0.009939 **		T2	0.8114	0.0001062 ***
	T4	0.1273	0.004848 **		T4	0.02452 *	9.166e-05 ***
	T8	0.08464	0.001787 **		T8	0.000106 ***	3.615e-06 ***
	T15	0.1529	0.003932 **		T15	0.1892	7.096e-05 ***
	T30	0.5169	0.5825		T30	0.3163	1.701e-07 ***
	T45	0.4908	0.2742		T45	0.3532	0.2263
	T60	0.673	0.2742		T60	0.2893	0.8935
	T90	0.1519	0.2227		T90	0.5621	0.3486

Figure 4 : ACP groupes en fonction du temps réalisés sur les données de profilage en LC/ESI-MS, (contrôle vs sulcotrione) et valeur des MANOVA réalisé sur les coordonnées des 2 premiers axes de l'ACP.

PROPOSITION DE STAGE DE MASTER 2 (2016)

Cadre du projet :

L'objectif de ce stage est donc de développer une approche métabolomique pour évaluer l'impact d'herbicides sur le sol. Le but de ce projet étant de mettre en évidence la présence par profilage métabolique des biomarqueurs environnementaux caractéristiques d'une pollution aux herbicides et d'estimer le temps nécessaire à la résilience du milieu étudié après traitement.

Objectifs :

- La première étude présentée préalablement nous servira de base pour optimiser les pas de prélèvement, et **définir un protocole global** permettant de mieux évaluer la résilience des sols, ainsi que l'impact des pesticides ou polluants sur le milieu.
- Par ailleurs, les **composés qui participent significativement à la discrimination des échantillons devront être caractérisés (marqueurs)**. Ces composés ont deux origines possibles, ce sont soit des produits de dégradation des herbicides, soit des métabolites endogènes du sol.

Les résultats encourageants de cette étude préliminaire, effectuée sur des composés purs, nous incitent à tester cette approche en métabolomique non ciblée. Ainsi, nous avons choisi, dans ce projet, de comparer le devenir et l'impact sur le métabolome d'un sol contaminé par 3 herbicides (2 naturels et un de synthèse) *versus* un sol témoin.



Compétences :

Compétences à l'interface chimie/environnement, connaissance de la chromatographie (LC-MS). Des compétences dans l'utilisation d'outils chimiométriques (PCA, PLSDA, MANOVA) seraient appréciables.

Contexte :

Ce projet de recherche est mené dans l'équipe "chimie" du CRIOBE au sein de l'université de Perpignan (UPVD). Les analyses chimiques seront réalisées sur la plateforme Bio2mar.

Contact :

Les étudiants intéressés par cette proposition de stage pourront nous contacter par mail, et nous fixerons un rendez-vous pour discuter du sujet et vous présenter le laboratoire ainsi que les moyens techniques mis à disposition pour la réalisation de ce stage.

- Cédric Bertrand, cedric.bertrand@univ-perp.fr, 04 68 66 22 58
- Marie-Virginie Salvia, marievirginie.salvia@univ-perp.fr, 04 30 19 23 09