

# TP Pesticides et Phytoprotection

Responsable : Laurence Gondet

## Etude du mode d'action de l'Atrazine

### Mots-clés

Atrazine  
Herbicides  
PSII  
Détoxification  
Activité GST  
*Spinacia oleracea*  
*Zea mays*

### Résumé

L'atrazine ( $C_8H_{14}ClN_5$ ), herbicide de la famille des triazines a été utilisé pendant de nombreuses années en agriculture. La molécule se lie à la protéine D1 du photosystème II et inhibe donc le transfert des électrons nécessaire à la photosynthèse. Des plantes ont développées des mécanismes de résistance tels que la modification de la protéine D1 ou la formation d'un complexe entre l'atrazine et la GSH (Glutathion) par la GST (Glutathion-S-Transférase) qui modifie la conformation de l'herbicide. Cette étude a porté sur la détermination in vitro du  $I_{50}$  de l'atrazine par la mesure spectrophotométrique du transport photosynthétique des électrons pendant la photosynthèse chez l'épinard et le maïs. Dans un second temps, nous étudions la détoxification de l'herbicide par la mesure de l'activité enzymatique GST dans les feuilles de maïs par deux protocoles différents. De cette façon, une  $I_{50}$  de  $0,18\mu M$  pour l'épinard et  $0,23\mu M$  pour la maïs a été obtenue et l'activité de la GST dans les racines a été mesurée 2 à 3 fois supérieure à celle des feuilles selon le protocole utilisé.

### Introduction

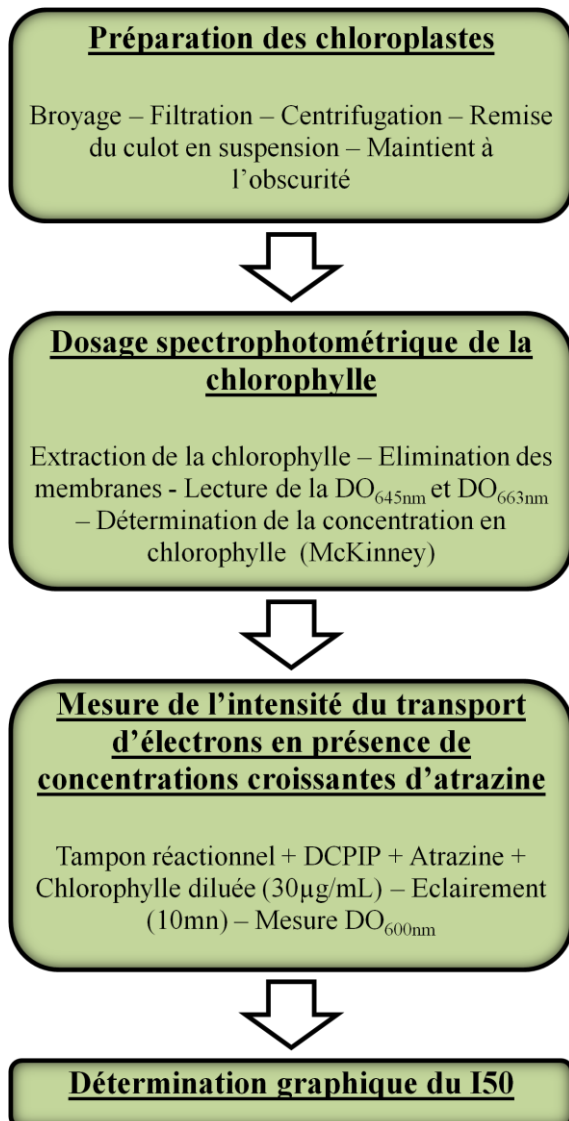
L'atrazine ou 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isoprylamine)-s-triazine, est un herbicide racinaire de la famille des triazines. Il a été largement utilisé pendant des années mais est aujourd'hui considéré comme nocif et dangereux pour l'homme et l'environnement et a de ce fait été interdit dans l'union européenne en 2004. Lorsque les premières plantes résistantes sont apparues, il a fallu déterminer quels mécanismes y étaient associés. Deux mécanismes distincts de résistance ont alors été découverts. Le premier est une modification de la cible de l'herbicide par une mutation ponctuelle. L'atrazine perd alors sa capacité de fixation à la protéine

D1 et son action ne peut plus avoir lieu [1]. Le deuxième mode d'action mis en évidence est une détoxification de l'herbicide par la formation de complexes GSH [2]. Cette réaction de détoxification est catalysée par l'enzyme GST. Cette enzyme est très présente chez le maïs, ce qui explique sa tolérance à l'atrazine. En réalisant cette expérimentation, nous avons voulu étudier le mode de fonctionnement de l'atrazine à l'aide de deux expériences. La première étant de déterminer le  $I_{50}$  de l'atrazine sur le transport photosynthétique des électrons dans les chloroplastes d'épinards ( plante sensible) et de maïs ( plante résistante) puis la seconde de mesurer l'activité enzymatique GST dans les racines et les feuilles de plantules de maïs (en utilisant

deux protocoles différents) afin d'étudier la détoxification d'une plante résistante.

## Protocole expérimental

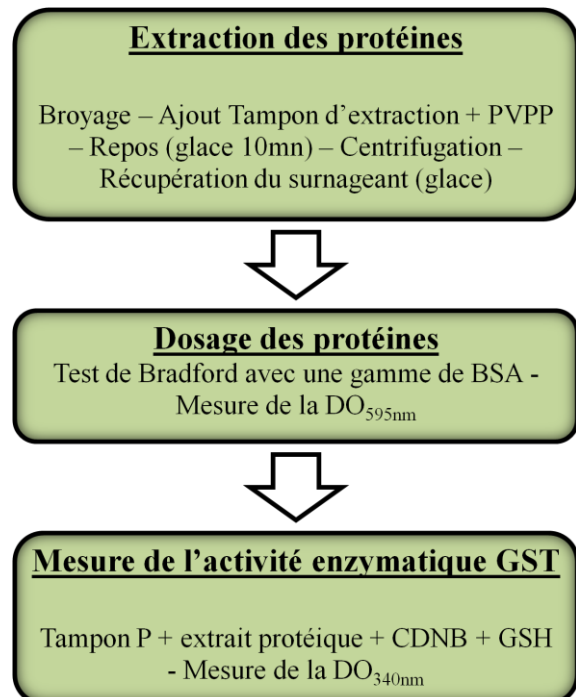
### *Détermination du I<sub>50</sub> de l'atrazine sur le transport photosynthétique des électrons*



### *Etude de la réaction de détoxification par la mesure de l'activité GST dans les racines et les feuilles de maïs*

Nous avons utilisé deux protocoles différents pour la manipulation « extraction

et quantification » mais seules les quantités du matériel de départ et des réactifs varient.

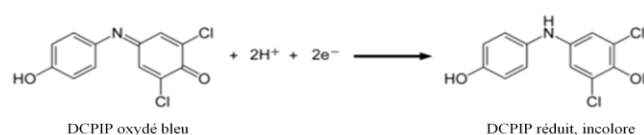


## Résultats

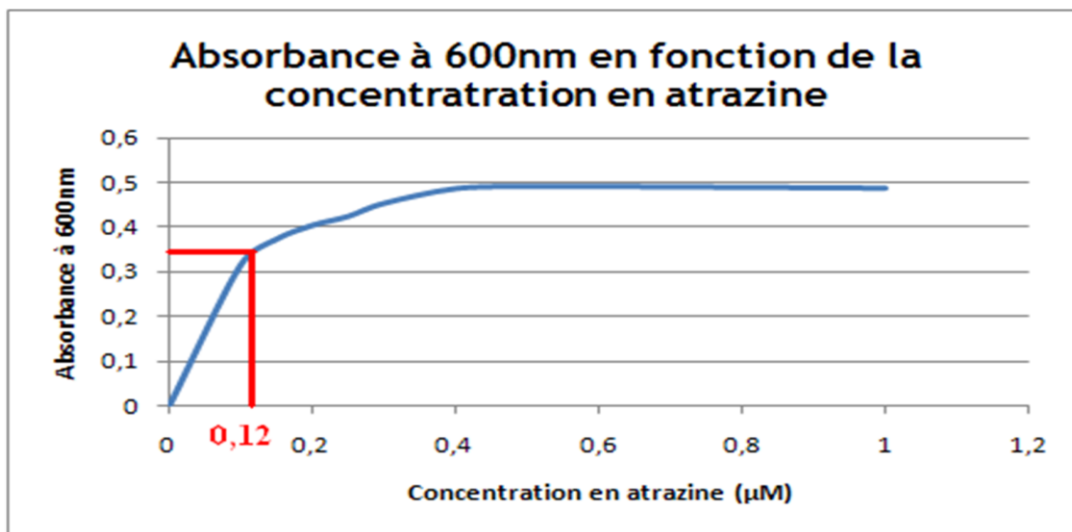
### *Détermination du I<sub>50</sub> de l'atrazine*

Le dosage spectrophotométrique de la chlorophylle à 645 et 663 nm nous a permis de calculer la concentration totale en chlorophylle de notre préparation par la formule de McKinney. Nous obtenons une concentration de 188,6 µg/mL que nous avons ramenée à 30 µg/mL par dilution afin de pouvoir mesurer l'intensité du transport d'électrons en présence de concentrations croissantes en atrazine.

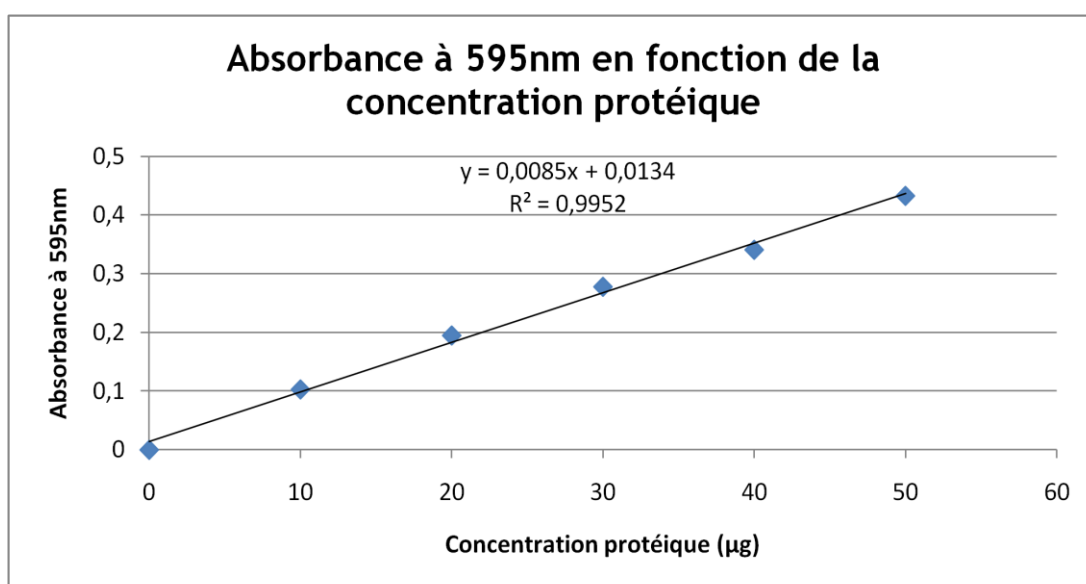
La mesure de DO<sub>600nm</sub> nous a permis de tracer une courbe de l'absorbance à 600nm en fonction de la concentration en atrazine ([document 1](#)). Cette mesure fait appel au DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol), qui possède des propriétés colorimétriques ([document 2](#)). L'absorbance mesurée pour le témoin laissé à l'obscurité (100% d'inhibition car pas de photosynthèse) donne une absorbance de 0,698. Cette valeur nous permet de déterminer



*Document 2 : Principe de réaction du DCPIP.*

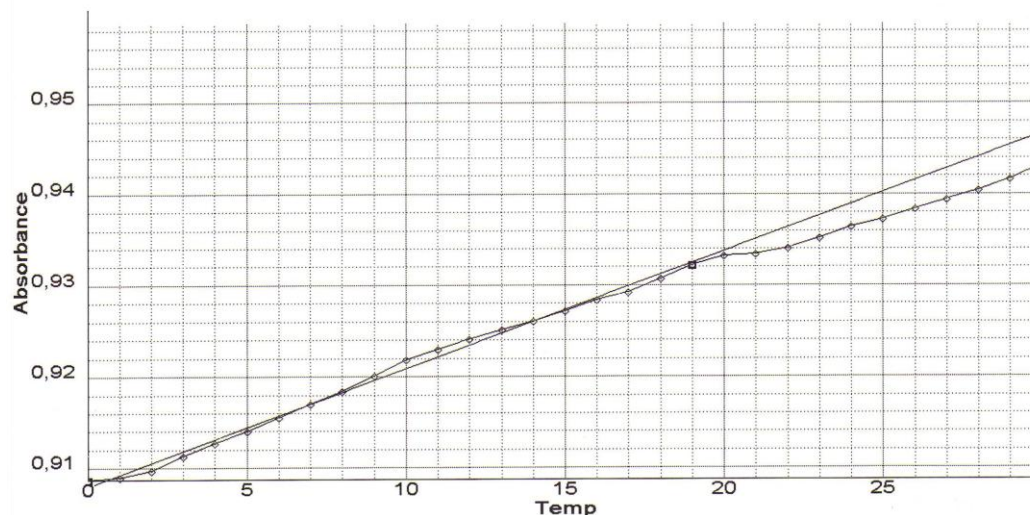


*Document 1 : détermination du  $I_{50}$  de l'épinard (valeurs personnelles).*



*Document 3 : gamme étalon de BSA.*

Echantillon 20  
 Initial 0,909A Final 0,943A Pente 0,0774 dA/min Linéarité 99,8%  
 Result 0,0774



*Document 4 : courbe de la variation de DO en fonction du temps pour les feuilles de maïs (protocole 1)*

graphiquement le  $I_{50}$  qui est de 0,12 (document 1). Idem pour le maïs.

### Mesure de l'activité enzymatique GST dans les racines et feuilles de maïs

Le dosage des protéines a été réalisé à partir d'une gamme étalon de BSA (document 3). Les protéines sont détectées par spectrophotométrie à 595nm grâce au réactif de Bradford qui forme des complexes aspécifiques avec les protéines. Grâce à cette courbe, on peut déterminer la quantité de protéine présente dans notre extrait brut. Nous avons répété trois fois l'expérience, avec 10, 20 et 30  $\mu\text{L}$  d'extrait brut de feuilles et de racines de maïs obtenu par le protocole 1 et le 2. En faisant les moyennes nous obtenons :

#### Protocole 1

[Protéines]<sub>feuilles</sub> = 1,49 mg/mL

[Protéines]<sub>racines</sub> = 0,39 mg/mL

#### Protocole 2

[Protéines]<sub>feuilles</sub> = 4,4 mg/mL

[Protéines]<sub>racines</sub> = 0,96 mg/mL

Vient ensuite la mesure au spectrophotomètre à 340nm de l'activité enzymatique de la GST qui est possible grâce à la formation du complexe entre le GSH et le CDNB (2,4-Dinitrochlorobenzene). Pour les feuilles du protocole 1, nous obtenons une droite (document 4) avec une pente de 0,0774 $\Delta\text{DO}/\text{mn}$ . On peut alors déterminer l'activité enzymatique de la GST :

Protocole 1 ( $V_{\text{total}} = 1\text{mL}$  ;  $V_{\text{extrait}} = 25\mu\text{L}$ )

$$AE_{(\text{GST})\text{feuilles}} = (\Delta\text{DO}/\text{mn} * V_{\text{total}} * 10^3) / (1 * \epsilon * V_{\text{extrait}} * [\text{protéine}]_{\text{feuilles}})$$

$AE_{(\text{GST})\text{feuilles}} = 216 \text{ nmoles/mn/mg de protéinés}$

$AE_{(\text{GST})\text{ racines}} = 1203 \text{ nmoles/mn/mg de protéinés}$

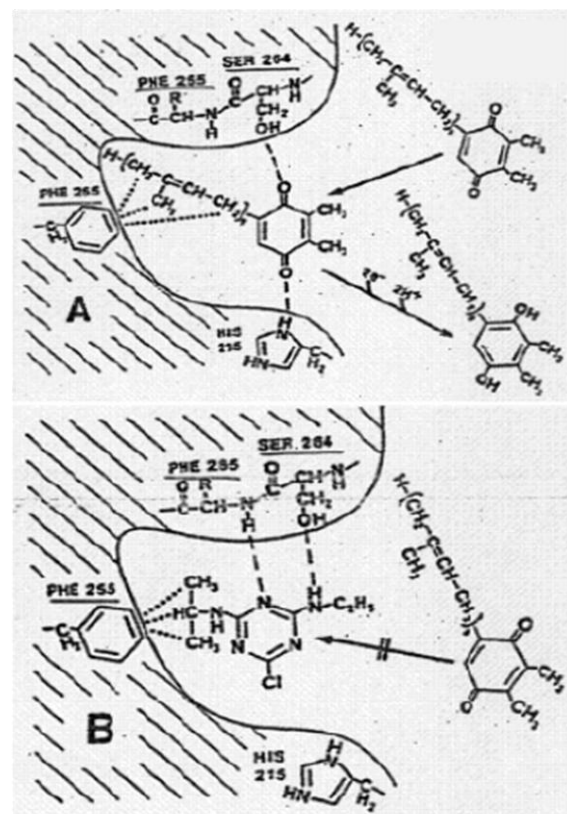
Protocole 2 ( $V_{\text{total}} = 3\text{mL}$  ;  $V_{\text{extrait}} = 100\mu\text{L}$ )

$AE_{(\text{GST})\text{ feuilles}} = 66 \text{ nmoles/mn/mg de protéinés}$

$AE_{(\text{GST})\text{ racines}} = 648 \text{ nmoles/mn/mg de protéinés}$

## Discussion

L'atrazine est un herbicide qui a été utilisé pendant de nombreuses années mais est maintenant interdit du fait de sa grande toxicité. Les doses élevées (voire excessives) utilisées de cet herbicides ont fait naître des résistances chez certaines espèces. Cela a permis de découvrir son mécanisme d'action qui est de bloquer la protéine D1 du photosystème II en s'y fixant grâce à son analogie avec la plastoquinone, le substrat physiologique (document 5).



Document 5 : mécanisme d'action de l'atrazine. A, liaison de la plastoquinone à la protéine D1 ; B, liaison de l'atrazine à la protéine D1

La plastoquinone ne peut plus être réduite et les électrons s'accumulent dans les chloroplastes et la photosynthèse est bloquée grâce à l'inhibition compétitive de l'atrazine.

Le calcul du  $I_{50}$  (valeur pour laquelle on observe 50% d'inhibition du transport photosynthétique des électrons) nous a permis de vérifier l'efficacité de l'atrazine sur l'épinard et le maïs et donc de conclure sur la présence d'une résistance ou d'une sensibilité à l'herbicide. L'étude du transport des électrons nous a donné une  $I_{50}$  de  $0,18\mu\text{M}$  (moyenne) pour l'épinard (valeurs des livres comprises entre 0,2 et 0,3). Cela indique bien que l'épinard est une plante sensible avec une  $I_{50}$  faible. En revanche, pour le maïs, nous trouvons une  $I_{50}$  de  $0,23\mu\text{M}$  (moyenne) qui apparaît assez faible pour une espèce résistante à l'atrazine. En temps normal, les plantes résistantes ont un  $I_{50}$  entre 100 et 200 fois supérieure. Mais il s'agit là des valeurs pour les résistances dues à une mutation de la cible (protéine D1) [1]. D'après le cours, le  $I_{50}$  du maïs est de  $0,3\mu\text{M}$  alors qu'il est résistant à l'atrazine. En fait, la cible n'est pas résistante à l'herbicide et donc, la détermination de l'intensité du transport des électrons en présence d'atrazine et de DCPIP par spectrophotométrie donne les mêmes résultats qu'une plante sensible [2]. Le facteur de tolérance de la protéine D1 étant nul pour les plantes résistantes et sensibles, la résistance du maïs doit provenir d'une détoxification par la GST (ce n'est pas le seul mécanisme, il existe également les transférases types glycosyl-transférase qui participent chez certaines espèces à la détoxification par exemple). C'est cette activité GST que nous allons quantifier dans la deuxième partie.

Des études ont montré que le maïs possède une forte activité GST et qu'il est capable de détoxifier plusieurs herbicides. Notre étude s'est concentrée sur le mécanisme de formation des complexes

GSH-atrazine par la GST tout en comparant 2 protocoles différents.

La formation de ce complexe fait que l'atrazine prend une nouvelle conformation et n'est alors plus capable de se fixer à la place de la plastoquinone sur la protéine D1. La complexation GSH-atrazine constitue donc un mécanisme spécifique de détoxification mis en place par le maïs pour survivre à l'herbicide. Cette capacité de détoxification peut être quantifiée en mesurant l'activité de la GST.

L'activité GST est déterminée grâce à un substrat artificiel, le CDNB. L'activité GST est plus importante dans les racines que dans les feuilles du maïs (2 à 3 fois plus selon le protocole utilisé). L'atrazine étant un herbicide racinaire, ce fonctionnement plus important de la GST dans les racines doit probablement permettre d'éviter la montée de l'herbicide dans les parties aériennes.

Les résultats des deux protocoles ne donnent pas les mêmes résultats mais sont cohérents pour la comparaison de l'activité enzymatique dans les feuilles et racines (2 à 3 fois plus dans les racines). Il faut juste prendre en compte que pour le protocole 2, la concentration protéique dans les feuilles est trop importante dans 20 et  $30\mu\text{L}$  pour pouvoir rentrer dans la gamme de BSA réalisée et donc le calcul ne se base que sur une seule valeur ce qui pourrait poser des problèmes dans d'autres circonstances.

## Conclusion

L'atrazine agit sur le transport des électrons lors de la photosynthèse. Elle entre en compétition pour la protéine D1 avec la plastoquinone et empêche sa réduction ce qui conduit à la mort de la plante.

Elle possède une forte action cytotoxique sur les plantes sensibles comme l'épinard, mesurable par le  $I_{50}$ .

Des plantes comme la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) ont développé une résistance suite à la mutation d'un acide

aminé de la protéine cible [1]. Mais d'autres comme le maïs (*Zea mays*) ou l'abutilon d'Avicenne (*Abutilon theophrasti*) ont développé des mécanismes de détoxification de l'herbicide comme celui réalisé par la GST [2].

La GST catalyse la formation d'un complexe entre le GSH et l'atrazine empêchant son action sur la protéine D1.

L'atrazine fait partie des herbicides systémique ascendant, c'est pourquoi les mécanismes de détoxification sont plus importants au niveau racinaire qu'au niveau foliaire afin de combattre le mal à sa source et d'éviter la propagation de l'herbicide.

## Bibliographie

[1] Reid j. Smeda, Paul M. Hasegawa, Peter B. Goldsbrough, Narendra K. Singh, and Stephen C. Weller. A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. *Plant Physiol.* (1993) 103: 911-917.

[2] Michael P. Anderson and John W. Gronwald. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced Glutathione S-Transferase activity. *Plant Physiol.* (1991) 96, 104-109.

Aqel W. Abu-Qare, Harry J. Duncan. Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. *Chemosphere* 48 (2002) 965–974.