



HAL
open science

Évaluation des Myriophylles comme bioindicateurs des milieux aquatiques en zones agricoles

Sonia Chatellier

► **To cite this version:**

Sonia Chatellier. Évaluation des Myriophylles comme bioindicateurs des milieux aquatiques en zones agricoles. Sciences de la Terre. 2014. hal-02345603

HAL Id: hal-02345603

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02345603v1>

Submitted on 4 Nov 2019

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Master 2 GPRE
Sols, Eaux, Environnement

RAPPORT DE STAGE

Evaluation des Myriophylles comme bioindicateurs des milieux aquatiques en zones agricoles



<http://www.ecy.wa.gov/programs/wq/plants/wceds/aqua004.html>



http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=295984



<http://www.graines-et-plantes.com/index.php?LaPlante=Myriophylle-spicatum>

Sonia CHATELLIER
Sous la tutelle d'Elisabeth-Maria GROSS
Et d'Andréina NUTTENS

2013/2014

Remerciements

Je tiens à remercier Fabien THOMAS, directeur du LIEC, ainsi que Pascale BAUDA, directrice adjointe du LIEC sur le site de Metz, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser cette étude.

Mes remerciements se tournent plus particulièrement vers Madame Elisabeth-Maria GROSS, professeur en écotoxicologie, responsable de l'étude et tutrice de stage, pour son accueil chaleureux, son écoute, son aide ainsi que sa confiance.

J'exprime ma gratitude envers Andréïna NUTTENS, doctorante au LIEC sur le site de Metz, pour le temps qu'elle m'a consacré, ainsi que pour l'aide apportée sur le projet et à la rédaction du mémoire.

Et enfin, merci à toutes les personnes qui ont été présentes et qui ont contribué à ce projet à mes côtés, en me fournissant toutes les informations nécessaires à sa bonne réalisation.

Sommaire

I. Présentation de l'entreprise d'accueil.....	1
II. Introduction.....	1
III. Etat de l'art.....	2
1. <i>Myriophyllum spicatum</i> un nouveau modèle d'étude pertinent.....	2
a. Les macrophytes : un compartiment clé dans l'étude des écosystèmes.....	2
b. Intérêts de <i>M. spicatum</i>	2
2. Effet des pesticides étudiés sur les Myriophylles.....	3
a. Choix des pesticides.....	3
b. L'isoproturon (IPU).....	3
i. Présentation du polluant.....	3
ii. Effets et résistances connus sur les Myriophylles.....	4
c. Le mésosulfuron-méthyle (MSM).....	4
i. Présentation du polluant.....	4
ii. Effets et résistances connues sur le Myriophylle.....	5
d. Le cuivre (Cu).....	5
i. Présentation du polluant.....	5
ii. Effets et résistances connus sur les Myriophylles.....	6
3. Effets du stress nitrate sur les macrophytes.....	6
a. Alimentation azotée : entre carence et excès.....	6
b. Interactions avec les pesticides.....	7
IV. Objectifs de l'étude.....	7
V. Matériels et méthodes.....	7
1. Matériel végétal et conditions de culture.....	7
2. Modalités de traitement.....	8
3. Mesures de croissances.....	9
4. Analyses physiologiques.....	9
a. Extraction et quantification des pigments.....	9
b. Extraction et quantification des polyphénols.....	9
c. Dosage des C/N des plantes.....	10
d. Dosage du P des plantes.....	10
5. Mesures des concentrations en pesticides.....	10
a. L'isoproturon et le mésosulfuron-méthyle.....	10
b. Le cuivre.....	10
6. Analyses statistiques.....	11
VI. Résultats.....	11

1.	Concentrations en pesticides	11
2.	Isoproturon (IPU)	11
a.	Mesures de croissance.....	11
b.	Mesures des pigments : chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes	12
c.	Mesures du contenu en polyphénols totaux (TPC).....	12
d.	Mesures des nutriments dans les plantes	13
3.	Mésosulfuron-méthyle (MSM)	13
a.	Mesures de croissance.....	13
b.	Mesures des pigments : chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes	14
c.	Mesures des polyphénols totaux (TPC).....	15
d.	Mesures des nutriments dans les plantes	15
4.	Sulfate de cuivre penta hydrate (CuSO ₄ , 5H ₂ O).....	16
a.	Mesures de croissance.....	16
b.	Mesures des pigments : chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes	16
c.	Mesures des polyphénols totaux (TPC).....	17
d.	Mesures des nutriments dans les plantes	17
VII.	Discussion.....	18
1.	Impact des pesticides sur <i>M. spicatum</i>	18
a.	L'isoproturon	18
b.	Le mésosulfuron-méthyle	19
c.	Le cuivre	21
2.	Impact de la stœchiométrie du ratio N:P sur la toxicité des plantes.....	22
a.	Effet des nitrates sur <i>M. spicatum</i>	22
b.	Effets de l'interaction des nitrates avec les pesticides sur <i>M. spicatum</i>	22
VIII.	Conclusion	22
	Références bibliographiques.....	24
	Annexes.....	27

Table des figures

Figure 1 : Structure de la molécule d'IPU (Université of Hertfordshire, Mars 2014)	3
Figure 2 : Structure du mésosulfuron-méthyle (Université of Hertfordshire, Mars 2014)	4
Figure 3 : modalités de traitements du test de toxicité	8
Figure 4 : Courbes dose-réponse du taux de croissance en biomasse des <i>M. spicatum</i> en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	11
Figure 5 : Courbes dose-réponse des pigments (chlorophylles totales et anthocyanes) des <i>M. spicatum</i> en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1).....	12
Figure 6 : Courbes dose-réponse des TPC des <i>M. spicatum</i> en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1).....	13
Figure 7 : Courbes dose-réponse du ratio C:N des <i>M. spicatum</i> en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	13
Figure 8 : Courbes dose-réponse des taux de croissance (en longueur et en biomasse) des <i>M. spicatum</i> en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1).....	14
Figure 9 : Courbes dose-réponse des pigments (chlorophylles totales, caroténoïdes et anthocyanes) des <i>M. spicatum</i> en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	14
Figure 10 : Courbes dose-réponse des polyphénols totaux des <i>M. spicatum</i> en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	15
Figure 11 : Courbes dose-réponse du ratio C:N des <i>M. spicatum</i> en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	15
Figure 12 : Courbes dose-réponse des taux de croissance en biomasse des <i>M. spicatum</i> en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	16
Figure 13 : Courbes dose-réponse des pigments (chlorophylles totales et anthocyanes) des <i>M. spicatum</i> en contact avec le $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	17
Figure 14 : Courbes dose-réponse des TPC des <i>M. spicatum</i> en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	17
Figure 15 : Courbes dose-réponse du ratio C:N des <i>M. spicatum</i> en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	18
Figure 16 : Courbes dose-réponse du contenu en matières sèches des <i>M. spicatum</i> en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	20
Figure 17 : Courbes dose-réponse des teneurs en eau des <i>M. spicatum</i> en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)	20
Figure 18 : Courbe dose-réponse de la croissance des plantes exposées à différentes concentrations en nutriments (modifié d'après Meyer et al, 2008).....	21
Tableau 1 : Gamme de concentrations des trois pesticides.....	8

I. Présentation de l'entreprise d'accueil

Le Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), implanté à Metz et à Thionville, a récemment fait l'objet, avec deux autres laboratoires de Lorraine (LIMOS et LEM sur Nancy), d'un regroupement sous le terme de LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux).

Cette nouvelle unité a pour but d'étendre davantage les connaissances et de pouvoir réaliser des projets communs, dont les compétences de chacun sont nécessaires. En effet, l'ancien LIEBE, qui couvre cinq thématiques de recherches dont l'étude du fonctionnement des écosystèmes anthropisés va apporter de nouvelles compétences en écotoxicologie à la nouvelle unité.

Leur objectif principal est donc d'étudier les différentes pressions anthropiques ainsi que leurs effets sur les différents biotopes et de comprendre comment ces modifications affectent le fonctionnement des écosystèmes (LIEC, Février 2014).

II. Introduction

La Lorraine, région agricole très active, produit de nombreux polluants ; notamment des pesticides et fertilisants. Les phénomènes de lessivage, d'infiltration, de ruissellement et de volatilisation des parcelles agricoles (Tang *et al*, 2012) ont généré des situations de pollutions diffuses des eaux de surface et des eaux profondes. Pour limiter ces contaminations, de nouvelles législations environnementales ont été mises en place. Parmi elles, la Directive Cadre sur l'Eau ("DCE" 2000/60/CE), est une législation européenne qui vise à un retour au bon état chimique et écologique des masses d'eau d'ici 2015. Elle fixe notamment les concentrations maximales autorisées en pesticides dans les eaux brutes, avec un seuil de $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour chaque substance et un seuil de $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'ensemble des pesticides et produits de dégradation retrouvés.

Pour atteindre les niveaux de qualité des eaux définis par la DCE il faut agir à deux niveaux. D'abord, réduire les émissions et applications de molécules ; c'est l'objectif du plan Ecophyto 2018 qui vise une diminution de 50% de l'utilisation des pesticides d'ici 2018 ; et ensuite, limiter les flux de polluants pouvant atteindre les cours d'eau et les nappes phréatiques. Pour ce dernier point, la Politique Agricole Commune (PAC, 2005) par exemple, prône la mise en place de "Bandes Enherbées", ne recevant aucun traitement phytosanitaire. Ces zones tampon forment un espace limitant la dérive directe des brouillards d'épandage dans les cours d'eau et permettent la rétention et la dégradation des composés présents dans les eaux de ruissellement.

Cependant, malgré ces nouvelles législations les cours d'eau continuent de recevoir des contaminants (notamment en Lorraine, où les champs sont souvent drainés, supprimant ainsi toute fonction aux bandes enherbées), de plus, très peu de solutions ne sont proposées pour les cours d'eaux déjà pollués. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier les impacts des polluants sur les écosystèmes aquatiques, de manière à comprendre et même prédire les conséquences des contaminations, et afin de pouvoir proposer des solutions de remédiation adéquates.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche, faisant partie du programme "Myri-aide" financé par l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail),

dont l'objectif est d'étudier les impacts de pesticides retrouvés dans les cours d'eau, sur une plante aquatique très répandue : *Myriophyllum spicatum*. Cependant, afin de tenir compte de la complexité des pollutions agricoles, l'impact des pesticides sera étudié en présence de différentes doses de nitrates. Les pesticides choisis, au nombre de trois étaient de deux types différents : deux herbicides organiques, l'isoproturon (IPU) et le mésosulfuron-méthyle (MSM) ; et un élément trace métallique, le cuivre (Cu), utilisé comme fongicide, dans certains produits phytosanitaires. Le choix du modèle d'étude, des pesticides ainsi que l'intérêt de tenir compte de la dose de nitrate dans les études écotoxicologiques, seront détaillés dans la partie ci-dessous.

III. Etat de l'art

1. *Myriophyllum spicatum* un nouveau modèle d'étude pertinent

a. Les macrophytes : un compartiment clé dans l'étude des écosystèmes

Au sein des écosystèmes, les macrophytes, à l'instar des autres organismes photosynthétiques sont les premiers impactés par les contaminations. En tant qu'organismes sessiles et par les flux d'absorption qu'ils mettent en place, ils sont en effet en contact direct avec les contaminants présents dans les eaux et les sédiments. Or, de par leur fonction de producteurs primaires, leur rôle dans les cycles biogéochimiques, dans la production de matière organiques et d'oxygène, ainsi que par les sources de nourriture, d'habitat et/ou de substrat qu'elles offrent, ces macrophytes constituent un compartiment clé du fonctionnement des écosystèmes (Carpenter et Lodge, 1986). L'étude de leurs réponses aux situations de contaminations environnementales multiples et complexes (pesticides + nitrates) constitue donc une étape importante dans l'analyse des effets des polluants au niveau écosystémique (Coutris *et al*, 2011).

b. Intérêts de *M. spicatum*

L'évaluation de la toxicité des pesticides en milieu aquatique s'est longtemps cantonnée à deux types d'organismes : les microalgues vertes (comme *Pseudokirchneriella subcapitata*), des organismes unicellulaires ; et plus récemment aux Lentilles d'eau du genre *Lemna* (*Lemna minor*, *Lemna gibba*), des macrophytes flottantes, ayant des caractéristiques morphologiques et physiologiques bien différentes de celles des algues (Turgut et Fomin, 2002). Cependant, ces deux types d'organismes ne sont pas représentatifs de l'ensemble des organismes photosynthétiques, et notamment des végétaux supérieurs, plus complexes (Vervliet-Sheebaum *et al*, 2006).

En effet, parmi les plantes supérieures, dont font partie les macrophytes, il existe deux groupes : les monocotylédones (auquel appartient le genre *Lemna*) et les dicotylédones ; chacun possédant des caractéristiques propres. Or, dans un souci de sélectivité et d'efficacité, beaucoup d'herbicides sont spécifiques de tel ou tel groupe. Donc, évaluer l'impact d'un herbicide spécifique des dicotylédones avec uniquement une monocotylédone (ou encore plus difficilement : une algue unicellulaire) semble peu fiable. De plus, les Lentilles d'eau étant flottantes, elles, ne permettent de tester que les polluants dissous dans la colonne d'eau, et pas ceux contenus dans les sédiments. C'est pourquoi le Myriophylles en épi (*Myriophyllum spicatum*), en tant que macrophytes dicotylédones enracinée dans le sédiment, a donc été proposée à l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) comme nouvel organisme test (Federal Environment Agency

(UBA), Mars 2014 ; Communication personnelle du Plant Advisory Group (PAG) SETAC 2014). Par ailleurs, ces plantes, largement retrouvées dans les cours d'eau de par le monde (Smith et al, 2002), ont l'avantage : (i) d'avoir une croissance et une reproduction asexuée efficaces, permettant une culture et une multiplication en laboratoire aisées ; et (ii) d'être capables d'absorber leurs nutriments par leurs racines aussi bien que par leurs feuilles, autorisant des tests avec sédiments, aussi bien avec que sans, sans risques de carence (Shengrui Wang et al, 2009). Enfin, *M. spicatum* produit de grandes quantités de composés allélochimiques, à activité inhibitrice du développement des autres organismes photosynthétiques et des herbivores (Gross et al, 1996). Ces molécules, responsables des interactions de la plante avec d'autres compartiments de l'écosystème, constituent un paramètre intéressant dans le cas des tests écotoxicologiques (Salminen et Karonen, 2011). De ce fait, leur mesure donne des indications de "qualité" de la ressource, qui complètent les indications de "quantité" obtenues avec la croissance (paramètre largement et presque exclusivement utilisé dans les tests écotoxicologiques normalisés).

2. Effet des pesticides étudiés sur les Myriophylles

a. Choix des pesticides

Le choix des pesticides de cette étude a été aiguillé par un précédent test, également intégré au projet "Myri-aide", qui s'intéressait à trois herbicides : l'isoproturon (IPU), le méso-sulfuron-méthyle (MSM) et le flufenacet. Ces herbicides ont été sélectionnés car ils ont été retrouvés dans plusieurs spots de prélèvement en Lorraine en quantités non négligeables, et parce qu'ils ont des modes d'action différents. Cependant, le flufenacet, qui ne présentait pas de grands effets toxiques sur *M. spicatum* en sédiments, en raison d'une dégradation très rapide (Traore et al, 2013), n'a pas été gardé dans cette seconde partie du projet et a été remplacé par le cuivre (sous forme de CuSO_4). En effet, bien qu'il s'agisse d'un polluant minéral, le cuivre correspond à la molécule active d'un grand nombre de fongicides (Delmail et al, 2011 ; Jakobson et al, 2005), tels que l'oxyde de cuivre, l'acétate de cuivre II, le carbonate de cuivre II, le chlorure de cuivre II, le sulfate de cuivre etc... (Université of Hertfordshire, Mars 2014) Ce dernier est l'ingrédient de la fameuse Bouillie Bordelaise, une préparation autorisée même en agriculture biologique, donc largement appliquée. C'est pourquoi, le Cu peut donc être considéré comme biocide, au même titre que les deux autres molécules étudiées : IPU et MSM.

Ainsi, en raison de leurs différents modes d'action, de leurs différentes cibles agricoles, et de leur présence sur la région Lorraine mais aussi sur le territoire français, ces trois polluants constituent un ensemble réaliste, intéressant à étudier.

b. L'isoproturon (IPU)

i. Présentation du polluant

L'IPU est un herbicide appartenant à la famille des Urées, ayant pour formule chimique $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ et dont la structure est donnée à la Figure 1 (Université of Hertfordshire, Mars 2014). Cette molécule active qui est utilisée en France dans différentes spécialités commerciales, telles que : Alpha IPU 500, Alpha Isoproturon, Ingot, Protugan, Tolugan Extra, etc ;

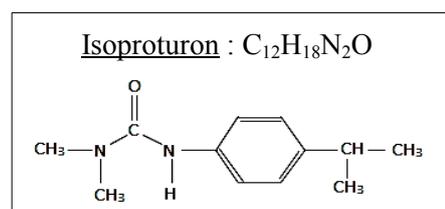


Figure 1 : Structure de la molécule d'IPU (Université of Hertfordshire, Mars 2014)

inhibe la photosynthèse, en bloquant le transfert des électrons au niveau du photosystème II (PS II) (Université of Hertfordshire, Mars 2014) ; Knauert et al, 2010). Souvent appliqué dans les cultures céréalières (blé, orge, seigle, triticale) ou encore dans les cultures porte graines mineures (ex : radis, fétuque élevée, fétuque des prés, brome et ray-grass) (Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire, Mars 2014) l'IPU est largement retrouvé dans l'environnement, et notamment en Lorraine.

ii. Effets et résistances connus sur les Myriophylles

L'étude de Mohr et al (2013) expose les effets de l'IPU sur *M. spicatum*, dans le milieu de croissance Andrews modifié (ajout de 3 % de saccharose). L'Annexe 1 présente les résultats des CE₅₀ (concentration ayant un effet inhibant 50 % de la croissance des plantes) obtenus après 14 jours d'exposition, sur différents paramètres.

Cette étude montre que les CE₅₀ de l'IPU sur *M. spicatum* varient entre 222 et 530 µg/L. Cependant, les paramètres mesurés ne concernent que des paramètres de croissance, donc des paramètres qui répondent tardivement, et sont souvent moins sensibles que des paramètres plus en amont tels que, les paramètres physiologiques, métaboliques, ou moléculaires. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de ce polluant sur ce type de paramètres, et de comparer les CE₅₀. En effet, la molécule inhibant la photosynthèse, des mesures de chlorophylles et/ou d'activité photosynthétique auraient été intéressantes.

En effet, Knauert et al (2010) ont mesuré l'effet de l'IPU à une concentration de 14 µg/L sur l'activité photosynthétique et les taux de croissance en longueur de trois espèces de macrophytes, dont *M. spicatum*. Les résultats, présentés en Annexe 2, montrent que *M. spicatum* est la plus sensible des trois espèces testées, avec une inhibition de l'activité photosynthétique allant jusque 50 % du contrôle. Néanmoins le macrophyte semble présenter une tolérance au polluant puisqu'après 5 jours de traitement, l'activité photosynthétique reprend jusqu'à atteindre une activité supérieure à celle du témoin après 12 jours de traitement. Enfin, dans cette étude, le taux de croissance en longueur (RGR_L) de *M. spicatum* n'a pas été affecté (Knauert et al, 2010). Ce résultat confirme bien que les paramètres de croissance, comme la longueur de la tige principale, peuvent-être moins sensibles que les paramètres physiologiques.

c. Le mésosulfuron-méthyle (MSM)

i. Présentation du polluant

Le MSM (C₁₇H₂₁N₅O₉S₂) (Figure 2) est également un herbicide, mais de la famille des Sulfonylurées, dont le mode d'action connu est l'inhibition de l'enzyme acétolactate synthase (ALS), enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (valine, leucine et isoleucine). L'absence de ces acides aminés entraîne une sénescence prématurée de la plante (Cedergreen et al, 2004). Cette molécule active est utilisée en

France sous différentes spécialités commerciales : Atlantis WG, Othello et Pacifica (Université of

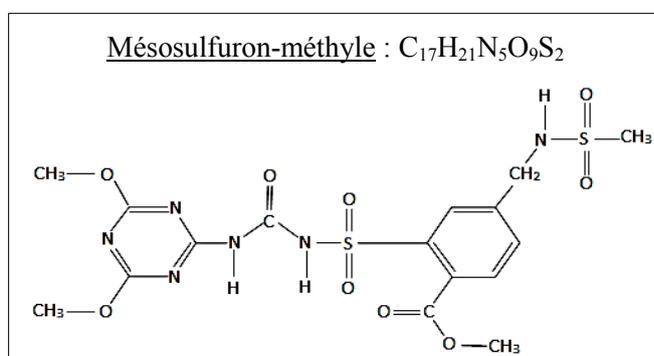


Figure 2 : Structure du mésosulfuron-méthyle (Université of Hertfordshire, Mars 2014)

Hertfordshire, Mars 2014) et est généralement appliquée sur les cultures céréalières de type blé dur et tendre d'hiver et de printemps, seigle et triticales (toutes les monocotylédones) (Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire, Mars 2014) dans le but de contrôler les adventices, souvent dicotylédones (Cedergreen et al, 2004). Enfin, tout comme pour l'IPU, au vu de sa large utilisation, cette molécule est retrouvée au niveau régional (Lorraine), aussi bien que national (*Annexe 3*).

ii. Effets et résistances connues sur le Myriophylle

La famille des Sulfonylurées regroupe un grand nombre de molécules ayant la même structure de base que le MSM, et notamment le metsulfuron-méthyle dont la structure est présentée en *Annexe 4*. En effet, cette molécule présente le même mode d'action que ce dernier, c'est pourquoi une extrapolation bibliographique à partir du metsulfuron-méthyle a été possible. Quelques études se sont déjà intéressées à l'effet du metsulfuron-méthyle sur *M. spicatum* ou *M. aquaticum* (Turgut et Fomin, 2002). Bien que des différences de conditionnement soient observables entre les publications : espèces testées, milieux de culture, paramètres mesurés, les résultats montrent une forte toxicité du metsulfuron-méthyle, avec une CE_{50} variant entre 0.29 et 4 $\mu\text{g/L}$ (*Annexe 5*).

Cependant, cette même étude Turgut et Fomin (2002), d'autres Sulfonylurées avec des structures similaires au MSM ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}_2$) ont été étudiés : thifensulfuron-méthyl ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$) et rimsulfuron ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$). Bien que ces trois herbicides soient de la même famille et bien qu'ils soient chimiquement proches, les CE_{50} sur *M. aquaticum* diffèrent beaucoup, et ce, notamment entre le metsulfuron-méthyle et le rimsulfuron (ex : CE_{50} longueur des tiges = 4 $\mu\text{g/L}$ avec le metsulfuron-Me, = 11 $\mu\text{g/L}$ avec le thifensulfuron-Me ; = 1498 $\mu\text{g/L}$ avec rimsulfuron) (*Annexe 6*). Ainsi, ces résultats de toxicité avec le metsulfuron-méthyle, malgré qu'ils constituent une bonne piste pour la toxicité du MSM, sont relativisés : des molécules similaires peuvent induire des toxicités bien différentes.

d. Le cuivre (Cu)

i. Présentation du polluant

Enfin, le cuivre est la molécule active d'un certain nombre de fongicides, comme cités précédemment (cf 2.a.). En tant que cofacteur de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides, de l'azote, et de la paroi cellulaire, le cuivre est un métal essentiel, qui, comme tout oligonutriment qui doit être présent en faibles quantités pour une croissance optimale des plantes. Cependant, comme tout métal, à forte dose, le cuivre devient toxique pour la plante, et agit en modifiant la perméabilité de sa membrane, les activités enzymatiques, la photosynthèse, et les processus respiratoire, induisant une sénescence du macrophyte Delmail et al, 2011. Le sulfate de cuivre pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) est l'ingrédient principal des mélanges de Bouillie Bordelaise et, en France, est généralement appliqué sur les arbres fruitiers (abricotier, olivier, cerisier, pêcher, poirier...), les légumes (pommes de terre, tomates...), mais surtout sur les vignes (Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire, Mars 2014). Ainsi, au vu de son utilisation cette molécule est, à l'instar des deux herbicides, retrouvée partout en France et notamment en Lorraine (*Annexe 3*).

ii. Effets et résistances connus sur les Myriophylles

L'étude de Delmail et al (2011), montre les effets du sulfate de cuivre (CuSO_4) sur *M. alterniflorum*, dans le milieu nutritif Murashige et Skoog modifié. Le détail des effets du cuivre sur différents paramètres de la plante, à la suite d'une exposition de 27 jours (résultats également donnés à 15 jours d'exposition) et à une concentration de 100 $\mu\text{g/L}$, sont visibles dans l'Annexe 7A. Tout d'abord, la croissance est inhibée, et notamment : la longueur de la tige principale (~ 27%) et la longueur totale des ramifications (~ 48 %). Les résultats physiologiques montrent que les teneurs en chlorophylles ainsi que les caroténoïdes ont légèrement diminué entre les plantes témoins et les plantes traitées au cuivre, mais pas de manière significative (Annexe 7B).

De la même façon, Caillat (2014) ont également montré les inhibitions de croissance sur *M. aquaticum*, avec une CE_{50} de 36.6 $\mu\text{g/L}$ sur le paramètre « taux de croissance en biomasse » et une CE_{50} de 24.5 $\mu\text{g/L}$ sur le paramètre « taille des racines ».

3. Effets du stress nitrate sur les macrophytes

Les cours d'eau constituant des points de convergence de l'ensemble des pollutions anthropiques, les pesticides mais également les fertilisants se retrouvent et forment des mélanges complexes pouvant impacter les milieux aquatiques.

a. Alimentation azotée : entre carence et excès

Toutes les plantes, qu'elles soient aquatiques ou terrestres, ont besoin pour se développer d'apports de nutriments : micro- et macroéléments. Tous ont un rôle dans la croissance et la physiologie des végétaux (Annexe 8). Les macro-éléments sont indispensables à la plante pour sa croissance, et sont présents en grandes quantités, alors que les micro éléments, présents en petites quantités, sont moins indispensables, mais permettent une croissance optimale des végétaux. Cependant, d'après la Loi de Liebig : une carence en un minéral empêche l'absorption des autres minéraux ; il est donc primordial que la plante reçoive un apport équilibré de chaque élément, sous peine de voir son développement altéré (Hopkins, 2003).

L'azote (N) et le phosphore (P) sont les nutriments limitant le plus la croissance des plantes aquatiques et la production primaire des systèmes aquatiques (Bian et al, 2013). En effet, le N et le P sont indispensables à la croissance, du fait qu'ils correspondent aux principaux constituants des protéines essentielles à la vie. La stœchiométrie écologique, qui est définie comme l'équilibre de plusieurs substances chimiques en interactions écologiques et leurs processus, ou comme l'étude de cet équilibre (Sterner et Elser, 2002), peut être modifiée. En effet, le ratio N:P du milieu peut varier sous la pression des nitrates et donc entraîner un stress chez les organismes (Lei et Lu, 2011). Fulton et al (2009) et Bian et al (2013) ont montré que la croissance de *Lemna gibba* était limitée lorsque le ratio molaire N:P était inférieur à 16. Par ailleurs, ils ont remarqué que le nombre de frondes ainsi que le taux de croissance des lentilles d'eau diminuaient de manière significative en cas d'excès d'azote ou de carence en phosphore (ratio N:P > 22). Parallèlement, Huang et al (2013) ont démontré qu'au-delà de 4 mM d'ammonium, le taux de croissance de *Lemna minor* ainsi que leurs teneurs en chlorophylles et caroténoïdes diminuaient par rapport à des teneurs plus faibles en ammonium.

b. Interactions avec les pesticides

Cedergreen et *al* (2004) et Vervliet-Sheebaum et *al* (2006), ont montré que des modifications des conditions d'essai, telles que le milieu de culture, pouvaient conduire, dépendamment des paramètres analysés, à de grandes différences de résultats. Ces études ont en effet montré que les modifications des nutriments du milieu pouvait influencer la toxicité des herbicides, et dans le cas de Cedergreen et *al* (2004), du metsulfuron-méthyle. La principale cause dans la différence de sensibilité des espèces aux herbicides réside dans les différences de métabolismes des plantes. La source de carbone (CO_2 ou HCO_3^-), et les éléments nutritifs et notamment azoté (NH_4^+ , NO_3^- ou N_2) utilisés par la plante affectent la perméabilité des feuilles, le pH proche des racines et de la couche limite des feuilles, et les voies métaboliques des plantes ; modifiant leur sensibilité aux polluants (Cedergreen et *al*, 2004).

IV. Objectifs de l'étude

Cette étude a pour vocation d'étudier les impacts de l'IPU, du MSM et du Cu, de manière indépendante dans un premier temps, sur le futur organisme modèle de l'OCDE qu'est *M. spicatum* ; en fonction de la dose de nitrates présents dans le milieu.

Des courbes dose-réponses ont été réalisées pour chaque polluant, dans des milieux avec plus ou moins de nitrates : un milieu avec une dose de nitrate et donc un ratio N:P moyen (Ventura et *al*, 2008), et un milieu avec une dose élevée. Les tests ont été réalisés en conditions axéniques, afin d'éviter toute intrusion de pathogène, ou de microalgues susceptibles de perturber les réponses de la plante (Knauer et *al*, 2008).

Ce travail de recherche utilise une approche multiparamétrique intégrant aussi bien des paramètres de croissance (classiquement utilisés en écotoxicologie) que des paramètres physiologiques et métaboliques, afin de proposer des résultats plus intégrés à l'échelle de l'organisme et de l'écosystème. Il s'agit de la première étude combinant le stress pesticide à l'état nutritionnel du milieu (dose de nitrates), tout en proposant pour cela une approche multiparamétrique.

V. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal et conditions de culture

Les expérimentations menées ont été réalisées sur le macrophyte submergé *Myriophyllum spicatum* ou Myriophylle en épi, plante aquatique présente en Europe, Asie, et Afrique du Nord, de la famille des Haloragaceae (Muller et *al*, 1997).

Des plantules de *M. spicatum* ont été cultivées en conditions axéniques, dans un milieu Murashige and Skoog (MS) modifié (Murashige et Skoog, 1962), avec un ratio N:P de 25:1 (sous-forme de NO_3^- et KH_2PO_4), dans une enceinte thermostatée avec une photopériode : 16 h jour (22°C) et 8 h nuit (20°C) et avec une intensité lumineuse maximum de $140 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR.

2. Modalités de traitement

Quel que soit le polluant, les publications montrent que selon le paramètre mesuré (paramètres de croissance : racine, tige, poids... ; paramètres physiologiques : chlorophylle, caroténoïdes...) la toxicité diffère grandement (Art *et al*, 2008). C'est donc dans le but de pouvoir comparer la toxicité des trois produits phytosanitaires sélectionnés, qu'une gamme de concentrations assez large, de 0 à 1000 µg/L, et commune aux trois polluants a été choisie (Tableau 1).

Tableau 1 : Gamme de concentrations des trois pesticides

Concentration	Témoin	1	2	3	4	5	6
Gamme (µg/L)	0	0,05	0,5	5	50	500	1000

Chaque concentration de chaque pesticide a été réalisée en triplicat, et ce pour les deux milieux de culture testés. Le milieu avec un ratio N:P de 25:1 correspond au rapport stœchiométrique moyen de l'environnement Ventura *et al* (2008) ; tandis que le milieu avec un ratio N:P de 100:1, reflète un environnement fortement concentré en azote (sous forme nitrate). Les caractéristiques des deux milieux ont été détaillées en Annexes 9 et 10.

Pour cela, des apex coupés à 2 cm à l'aide d'un scalpel ont été placés dans du milieu exempt de contamination pendant 5 jours, pour permettre la cicatrisation. Une partie était dans un milieu MS modifié avec un ratio molaire N:P de 25:1 ; alors que l'autre partie était dans un milieu avec un ratio de 100:1.

Au terme de ce laps de temps, les apex ont été transférés dans des flacons de culture cellulaire (4 apex par flacon) contenant les différents milieux à tester (à 25:1 ou 100:1), puis 150 µL de solution stock de polluant ont été ajoutés par flacon (Figure 3). Il est à noter, que pour des problèmes de solubilités de polluants (Annexe 11), l'IPU et le MSM ont été dissous dans du méthanol pur, tandis que le cuivre a été préparé dans de l'eau MQ ; c'est pourquoi deux témoins ont été réalisés : un témoin eau et un témoin méthanol.

L'expérimentation a été réalisée dans des flacons de culture de 75 cm² (250 mL) pendant 14 jours (durée de l'exposition) ; avec un renouvellement du milieu à 7 jours.

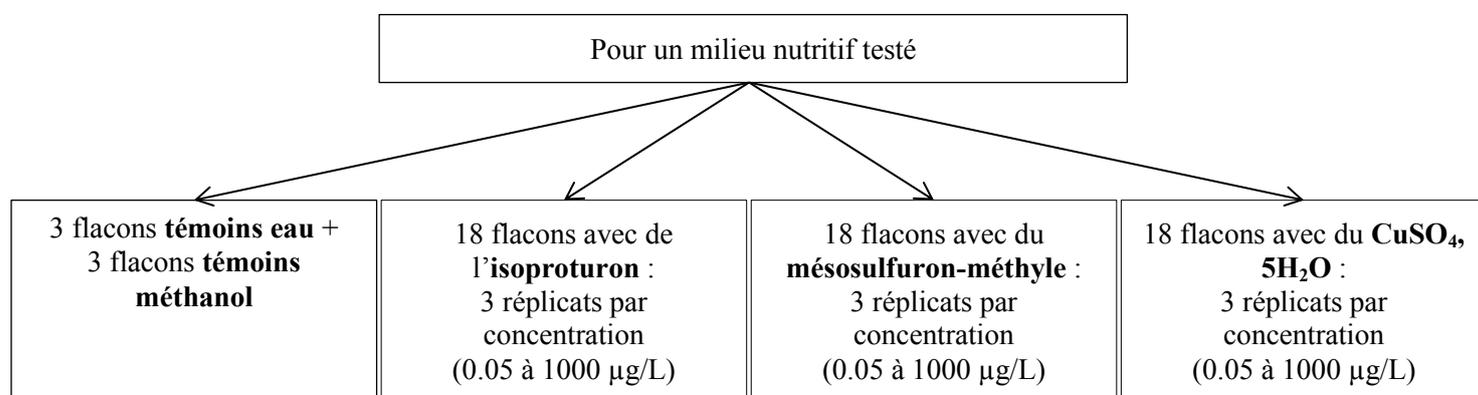


Figure 3 : modalités de traitements du test de toxicité

3. Mesures de croissances

A l'arrêt du traitement, les plantes ont été rincées pendant 5 min dans une solution de CaCl₂ (5 mM), afin d'éliminer les polluants éventuellement adsorbés sur les plantes, puis quelques secondes dans de l'eau MQ afin d'éliminer les résidus de CaCl₂. Chaque plantule a ensuite été mesurée et photographiée. Les plantes ont été pesées (masse fraîche, MF) puis congelées dans l'azote liquide. Après cryolyophilisation les plantes ont de nouveau été pesées afin d'obtenir la masse sèche (MS). Ainsi, la croissance a pu être déterminée de deux façons différentes : en longueur et en biomasse. Les taux de croissance sont donnés par le Relative Growth Rate (RGR) selon les formules suivantes :

$$\text{RGR}_L = \frac{\ln(\text{longueur à } T_7) - \ln(\text{longueur à } T_0)}{\text{nombre de jours}}$$

$$\text{RGR}_{DM} = \frac{\ln(\text{masse sèche à } T_7) - \ln(\text{masse sèche à } T_0)}{\text{nombre de jours}}$$

4. Analyses physiologiques

a. Extraction et quantification des pigments

Les plantes lyophilisées ont été broyées mécaniquement à l'aide d'un broyeur à bille (*Mini-Mill PULVERISETTE 23, Fritsch*) pendant 2 min à 30 hertz, de façon à obtenir une poudre fine et homogène.

Environ 0.5 mg de chaque poudre ont été pesés dans des Eppendorfs pour le dosage de la chlorophylle totale (Chl) et des caroténoïdes totaux (Car) ; et, entre 1 et 2 mg pour le dosage des anthocyanes (Aty). 1 mL de solvant d'extraction, acétone et Tris-HCl 0.1 M 8/2 [v/v] pH 7,8 pour la chlorophylle et les caroténoïdes d'une part ; méthanol, H₂O, et HCl 37% 80/20/1 [v/v/v] pour les anthocyanes d'autre part, a été ajouté dans chaque Eppendorf. Après agitation, à l'*Eppendorf Thermomixer Comfort*, dans l'obscurité, pendant 2h à 16°C et 1200 rpm, et centrifugation pendant 10 min à 13000 rpm à 16°C (*Eppendorf Centrifuge 5430 / 5430 R ; rotor FA-45-24-11-HS*), 800 µL de surnageant de chaque échantillon ont été prélevés pour réaliser les mesures d'absorbance au spectrophotomètre Varian Cary 50 Bio UV / Visible *Spectrophotometer*, à 470, 664 et 647 nm pour la Chl et les Car, et à 532 et 653 nm pour les Aty.

Les concentrations en pigments photosynthétiques ont été obtenues via les équations de (Lichtenthaler and Wellburn, 1983) en *Annexe 12*

b. Extraction et quantification des polyphénols

De la même manière que pour les pigments, 10 mg de poudre de Myriophylles ont été pesés. 1 mL de solvant d'extraction (acétone/eau MQ 50/50 [v/v]) a été ajouté à la poudre. Les échantillons ont ensuite été passés au thermomixer pendant 2 h à 1200 rpm puis centrifugés 10 min à 13000 rpm et 16°C.

Dans un tube à hémolyse en verre ont été déposés : 10 µL d'extrait, 2000 µL d'eau MQ, 300 µL d'une solution de Na₂CO₃ saturée, et 100 µL de réactif Folin-Ciocalteu 2N, en triplicata. Après 30 min de repos, permettant à la coloration bleue de se développer, les absorbances ont été mesurées au spectrophotomètre à 750 nm. La quantité de composés phénoliques a été déterminée à partir de l'équation de la courbe de calibration obtenue grâce à une solution d'acide tannique.

c. Dosage des C/N des plantes

Entre 1,5 et 2 mg de poudre de Myriophylles ont été pesés dans des capsules en étain qui ont ensuite été pliées. De la même façon a été réalisée une gamme EDTA pour l'étalonnage. Le dosage a été réalisé par *M. Philippe Rousselle* via l'analyseur élémentaire *Carlo-ERBA Na 2100 CE instrument*. Cette technique permet le dosage simultané du carbone et de l'azote, et consiste en un brûlage à haute température permettant la libération de gaz C et N pouvant être mesurés via une spectrométrie gazeuse.

d. Dosage du P des plantes

Environ 1 mg de chaque poudre a été pesé directement dans des tubes en verres préalablement lavés à l'acide (HCl 1%) afin d'éliminer les éventuelles traces de phosphore. Le dosage a été réalisé dans des conditions alcalines, pour cela, 6,62 mL d'eau MQ, 2,38 mL de persulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (à 125 g/L), ainsi que 1 mL de NaOH 1N ont été ajoutés dans chaque tube. Ces derniers ont ensuite été mis à l'autoclave pendant 2 h, à 120 °C, pour la digestion de la matière organique.

Les analyses ont ensuite été effectuées à l'analyseur *Konelab 420-XTi (Thermofischer)*, avec des mesures d'absorbance à 880 nm à 9 min 30 s, 10 min, et 10 min 30 s, via un transvasement dans des cuves et l'ajout de réactif combiné (acide sulfurique H_2SO_4 15% (v/v) 1,84 g/L + tartrate de potassium et d'antimoine $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ 2,8 g/L + molybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 40 g/L) et d'acide ascorbique 20 g/L. Une gamme étalon a également été réalisée à partir d'une solution de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 . L'équation de la droite d'étalonnage obtenue a permis le calcul des doses de P présentes dans les échantillons.

5. Mesures des concentrations en pesticides

a. L'isoproturon et le mésosulfuron-méthyle

Le dosage des molécules organiques de pesticides (IPU et MSM) a été réalisé par Chromatographie Liquide d'Ultra Haute Performance (CLUP) (*U3000-Dionex*) par *M. David Billet* sur le site des Aiguillettes. Les échantillons ont été purifiés au moyen d'une cartouche SPE (Oasis HLB 25 μm ; 2.1×20 mm Waters). Par la suite, 500 μL de solution passent au travers de la colonne Kinetex (Phenomenex ; C18 2,6 μm ; 4.6×100 m) à 333 $\mu\text{L}/\text{min}$; grâce à une phase mobile (initialement 60 % d'acétonitrile + 40 % d'eau acidifiée) utilisée en mode « élution graduée ». Les molécules sont éluées en fonction de leur hydrophobicité (5.6 min pour l'IPU et 5.8 min pour le MSM) et détectées par un détecteur à barrettes à diodes à 230 nm. La limite de détection minimale de l'appareil est de 5 $\mu\text{g}/\text{L}$.

b. Le cuivre

Les échantillons de milieux nutritifs contenant le cuivre seront analysés par *M. Philippe Rousselle* sur le site Bridoux, en Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) (*Perkin-Elmer, modèle AAnalyst 100*) après acidification à 1 % avec de l'acide nitrique à 69 %.

6. Analyses statistiques

Les données présentées sont les moyennes des triplicats de chaque condition, En raison du petit nombre de réplicats, c'est la SEM (Standard Error of Mean) qui a été associée aux moyennes et non les SD (Standard Deviation). Suite aux tests Shapiro vérifiant la normalité des tests, les tests de comparaison de moyenne ont été réalisés grâce à des tests ANOVA à deux facteurs et les différences significatives ont été obtenues via des tests de Bonferroni, sur le logiciel Sigma-Plot 11.

VI. Résultats

Le récapitulatif des données statistiques sont présentées en *Annexe 13*

1. Concentrations en pesticides

Les premières mesures de concentrations des herbicides (IPU et MSM) réalisées à 7 jours ont montré que les concentrations étaient bien dans la gamme de $\pm 20\%$ de la concentration initialement ciblée (à l'exception de la concentration 1000 $\mu\text{g/L}$ à T_7 et la concentration 50 $\mu\text{g/L}$ à T_0 lors du renouvellement de milieu, de l'IPU du milieu 25:1) (*Annexe 14*). Il n'y a donc pas eu de dégradation importante des pesticides ; l'intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration a été respecté pendant toute la durée du test, en raison d'un renouvellement des milieux après 7 jours d'exposition.

En raison d'un grand nombre d'analyses à réaliser, les mesures des concentrations en cuivre dans les milieux sont en cours d'analyse. Malgré tout, le cuivre étant un métal lourd, ses concentrations sont beaucoup plus stables que celles des pesticides susceptibles d'être dégradés.

2. Isoproturon (IPU)

a. Mesures de croissance

Les taux de croissance en biomasse sèche (RGR_{DM}) et en longueur (RGR_{L}) ont été déterminés pour chaque milieu de culture : N:P 25:1 et N:P 100:1. Les deux paramètres évoluant de façon similaire, seules les données pour du RGR_{DM} sont présentées *Figure 4* (RGR_{L} est en *Annexe 15*). Sans polluant, seul le taux de croissance est différent selon le milieu.

En présence d'IPU, le taux de croissance décroît avec des doses croissantes de polluant (mais surtout à partir de 50 $\mu\text{g/L}$), et ce pour les deux milieux de culture : inhibitions moyennes de 84.94 % et de 83.89 % par rapport aux témoins, respectivement pour les milieux 25:1 et 100:1. De plus, les taux de croissance étaient toujours inférieurs avec le milieu N:P 100:1, mais il n'y a pas d'interaction significative entre les deux facteurs. Enfin, les valeurs négatives pour la

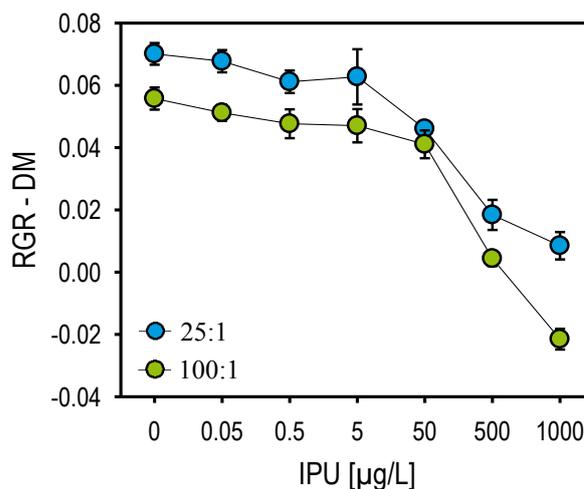


Figure 4 : Courbes dose-réponse du taux de croissance en biomasse des *M. spicatum* en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

concentration 1000 $\mu\text{g/L}$ avec le milieu 100:1 signalent une mort des plantes ; résultat qui n'est pas retrouvé sur les plantes du milieu 25:1.

b. Mesures des pigments : chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes

Les teneurs en chlorophylles totales (a+b), en caroténoïdes et en anthocyanes ont été mesurées dans les plantules de *M. spicatum* (Figure 5). Les teneurs en caroténoïdes présentant les mêmes variations que les chlorophylles totales, seuls les résultats de ces dernières sont présentés (caroténoïdes en Annexe 15) De façon générale, les teneurs en pigments sans herbicides sont plus importantes dans le milieu 25:1 que dans le milieu 100:1.

En présence d'IPU, une augmentation nette de la teneur en pigments photosynthétiques et en anthocyanes a été observée pour les deux milieux. Le maximum en pigments est atteint, pour le milieu 25:1 à la concentration 1000 $\mu\text{g/L}$ pour les chlorophylles et caroténoïdes (augmentations respectives de 124 et de 112 % des témoins), tandis que pour les anthocyanes le pic se trouve à la concentration 50 $\mu\text{g/L}$ (augmentation de 60 % du témoin) puis s'ensuit une diminution des teneurs. Pour le milieu 100:1 le maximum est atteint à la concentration 500 $\mu\text{g/L}$, pour les trois pigments ; avec des augmentations maximales de 186 %, de 91 % et de 47 % des témoins, respectivement pour les chlorophylles, les caroténoïdes et les anthocyanes. Pour ce même milieu, au-delà de 500 $\mu\text{g/L}$, les teneurs en pigments chutent à des valeurs inférieures aux témoins, traduisant la mort des plantes à cette concentration. Tout comme pour les témoins les plantes du milieu 25:1 présentent des concentrations en pigments plus élevées que celles du milieu 100:1 ; avec une différence moyenne de 35 % pour les chlorophylles et de 33 % pour les caroténoïdes et de 22 % pour les anthocyanes.

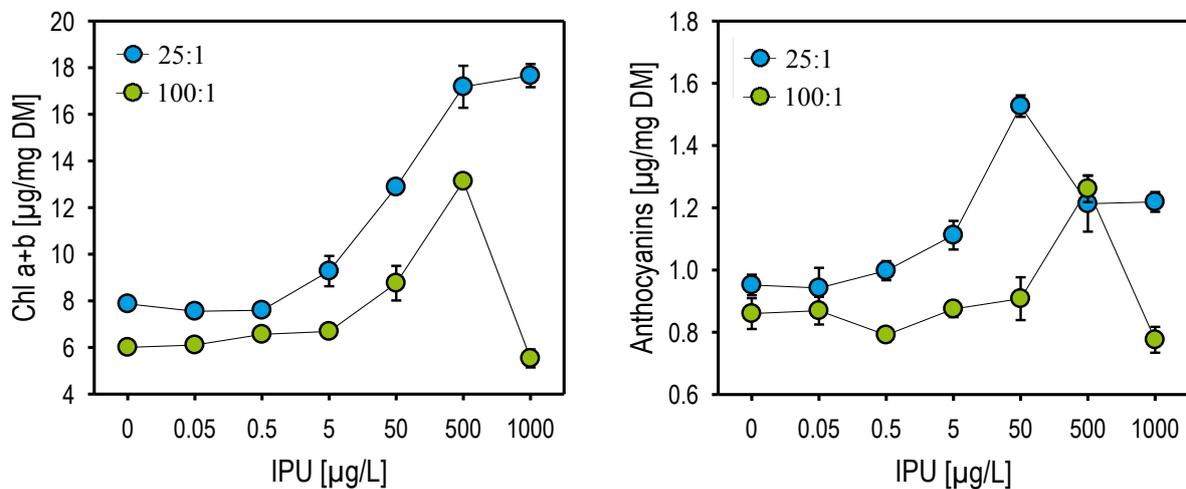


Figure 5 : Courbes dose-réponse des pigments (chlorophylles totales et anthocyanes) des *M. spicatum* en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

c. Mesures du contenu en polyphénols totaux (TPC)

Les contenus en polyphénols totaux (TPC) des plantules de *M. spicatum* dans les deux milieux de culture ont été mesurés (Figure 6). Ce paramètre, à l'instar des précédents, montre une différence significative des TPC dans les témoins selon le milieu, avec des valeurs plus importantes de 27 % pour le milieu 25:1.

Les teneurs en TPC du milieu 25:1 varient peu (autour de 75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MS), à l'exception du TPC à la concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ d'IPU qui descend à 65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MS. A contrario dans le milieu 100:1, les teneurs en TPC augmentent petit à petit avec la dose de polluant jusque 50 $\mu\text{g}/\text{L}$, augmentent fortement à 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ puis chutent brutalement à 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ en raison de la mort des plantes pour cette concentration. Enfin, aux concentrations 5 et 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ d'IPU, la différence de milieu n'est pas significative sur les résultats de TPC.

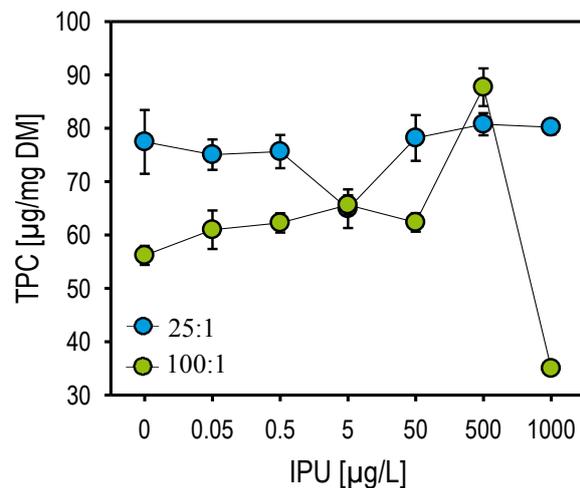


Figure 6 : Courbes dose-réponse des TPC des *M. spicatum* en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

d. Mesures des nutriments dans les plantes

Les ratios molaires stœchiométriques C:N, C:P et N:P des plantules ont été calculés à partir des pourcentages élémentaires de C, N et P. De manière générale, les ratios C:P et N:P (*Annexe 15*) sont stables pour des doses croissantes de polluant, excepté pour la plus forte dose dans le milieu 100:1. Dans cette condition, les plantules étant mortes, les contenus en P ont fortement chuté, augmentant les ratios. En ce qui concerne les ratios C:N, ils diminuent pour les deux milieux avec des doses croissantes d'IPU (diminution de 37 % et de 40 % respectivement pour les milieux 25:1 et 100:1 entre la dose la plus forte d'herbicide et le témoin) (*Figure 7*). Cette diminution d'absorption est principalement liée au pourcentage d'N, qui augmente quand la dose d'IPU augmente (augmentation du pourcentage d'N de 62 % et de 74 %; contre une augmentation d'absorption du carbone de 4.2 % et de 4.4 % ; respectivement pour les milieux 25:1 et 100:1).

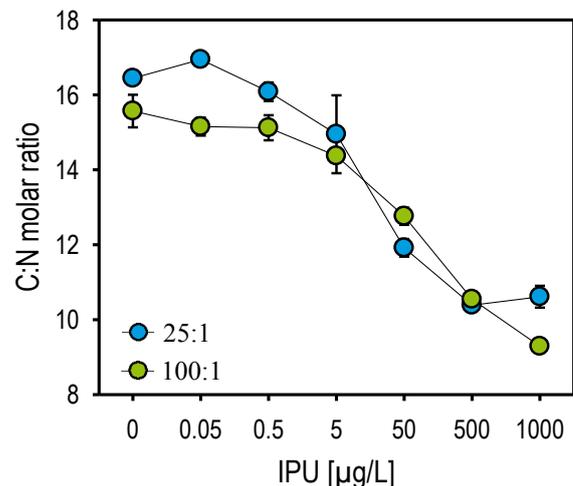


Figure 7 : Courbes dose-réponse du ratio C:N des *M. spicatum* en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

3. Mésosulfuron-méthyle (MSM)

a. Mesures de croissance

Pour chacune des conditions (N:P 25:1 et N:P 100:1 et dose de MSM), les taux de croissance en biomasse sèche (RGR_{DM}) et en longueur (RGR_{L}) ont été calculés. Pour les deux paramètres une diminution des valeurs a été observée ; bien qu'ils évoluent quelques peu différemment (*Figure 8*). Sans polluant, le taux de croissance est différent selon le milieu (25:1 ou 100:1).

En présence de MSM, les taux de croissances décroissent, pour les deux milieux de culture, avec des doses croissantes de polluant. Cette tendance est d'autant plus forte avec le RGR_L (surtout à partir de $0.5 \mu\text{g/L}$) qu'avec le RGR_{DM} qui lui, est un peu plus stable (surtout le milieu 25:1 ; forte décroissance dans le milieu 100:1 à partir de $500 \mu\text{g/L}$) : avec des inhibitions maximales de 93 % pour le RGR_L (milieu 25:1 et 100:1 confondus) contre de 31 % pour le milieu 25:1 et 55 % pour le milieu 100:1 pour le RGR_{DM} .

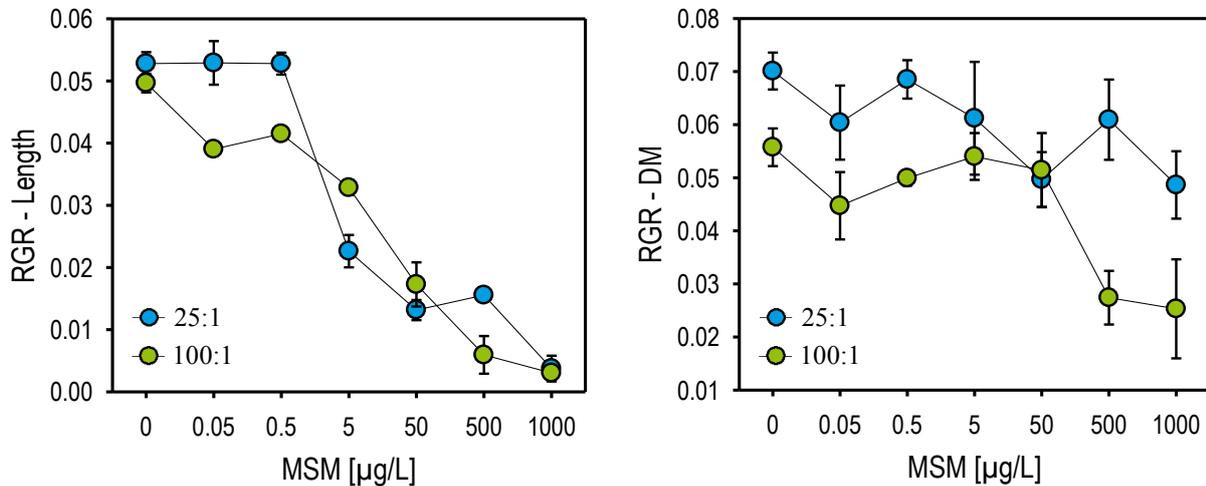


Figure 8 : Courbes dose-réponse des taux de croissance (en longueur et en biomasse) des *M. spicatum* en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

b. Mesures des pigments : chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes

Les teneurs en chlorophylles totales (a+b), en caroténoïdes et en anthocyanes ont été mesurées dans les plantules de *M. spicatum* (Figure 9). Les teneurs en caroténoïdes présentant les mêmes variations que les chlorophylles totales, seuls les résultats de ces dernières sont présentés (caroténoïdes en Annexe 16). De manière globale, sans polluant, les teneurs en pigments sont plus importantes dans le milieu 25:1 que dans le milieu 100:1.

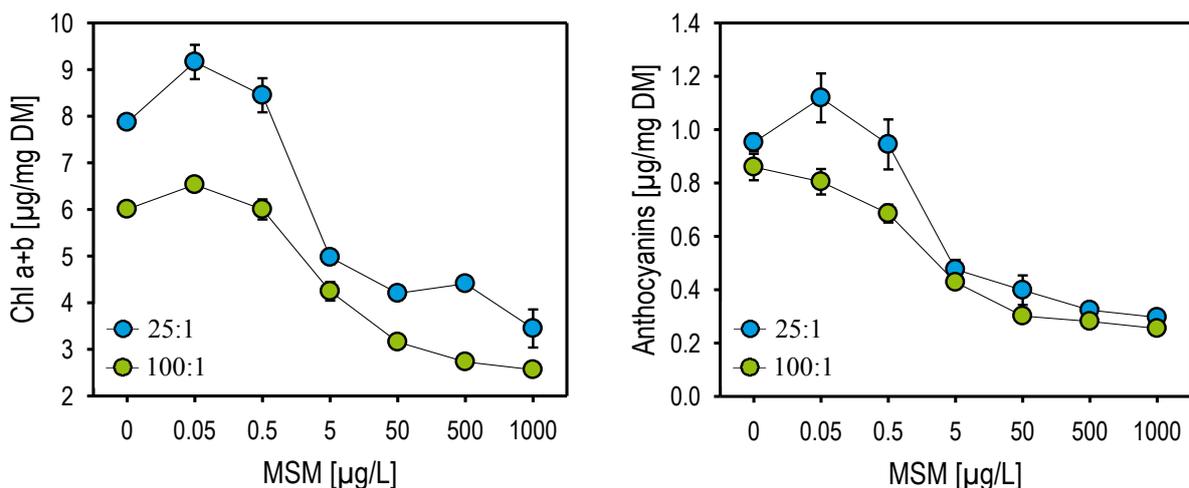


Figure 9 : Courbes dose-réponse des pigments (chlorophylles totales, caroténoïdes et anthocyanes) des *M. spicatum* en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

L'ajout du MSM a significativement diminué les teneurs en pigments photosynthétiques ; et ce au fur et à mesure que la dose de polluant augmente. Les minimums en pigments sont atteints, pour les deux milieux, à $1000 \mu\text{g/L}$ (inhibitions de 57 % pour les chlorophylles, de 43 % pour les caroténoïdes et de 70 % pour les

anthocyanes ; les deux milieux confondus). Tout comme pour les témoins, les plantes issues du milieu 25:1 possèdent davantage de pigments que les plantes issues du milieu 100:1 (différence de 27 % pour les chlorophylles, de 18 % pour les caroténoïdes et de 20 % pour les anthocyanes entre les milieux 25:1 et 100:1). Bien que pour les trois pigments, les courbes des deux milieux se rejoignent aux concentrations 5 et 1000 µg/L, il y a une interaction des deux facteurs (du milieu et du MSM) sur les effets du *M. spicatum*. Enfin, des petites augmentations de teneurs en pigments, par rapport aux témoins, ont été observées pour les concentrations 0.05 et 0.5 µg/L et les deux milieux nutritifs testés, à l'exception du milieu 100:1 sur le paramètre anthocyanes.

c. Mesures des polyphénols totaux (TPC)

La *Figure 10* présente les contenus en polyphénols totaux (TPC) des plantules de *M. spicatum* pour les deux milieux de culture. Tout comme pour les paramètres précédents, une différence significative des TPC a été mesurée entre les témoins des deux milieux ; les teneurs dans le milieu 25:1 étant 27 % plus élevées que dans le milieu 100:1.

Bien que lors de l'ajout du polluant, l'écart entre les deux milieux diminue (3 % en moyenne), l'effet du milieu est toujours significatif. Enfin, les courbes dose-réponses de ce paramètre ont une tendance à la baisse (inhibition moyenne de 38 %) et évoluent en « marches d'escalier » avec successivement, des pics ascendants et descendants des teneurs en TPC.

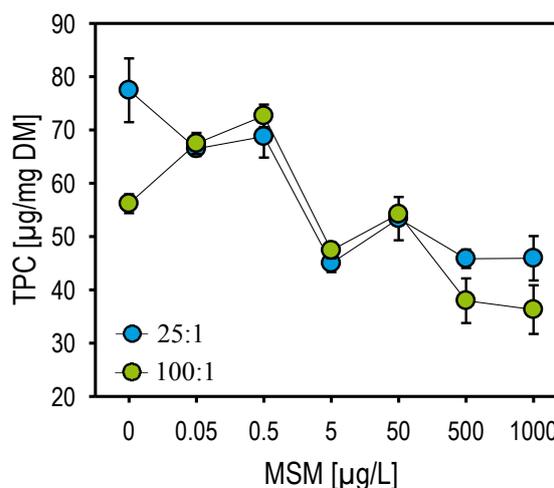


Figure 10 : Courbes dose-réponse des polyphénols totaux des M. spicatum en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

d. Mesures des nutriments dans les plantes

Les ratios stœchiométriques C:N, C:P et N:P des plantules ont été calculés à partir des pourcentages élémentaires de C, N et P. De manière générale, les ratios C:P et N:P (*Annexe 16*) sont stables pour des doses croissantes de polluant, à l'exception des deux plus fortes doses de MSM dans le milieu 100:1. Hors, pour ces deux modalités de traitement, les plantes étant mortes, les contenus en P ont fortement diminué, augmentant ainsi les ratios.

En revanche, après une légère baisse des ratios C:N pour les plus petites concentrations en MSM (0.5 et 5

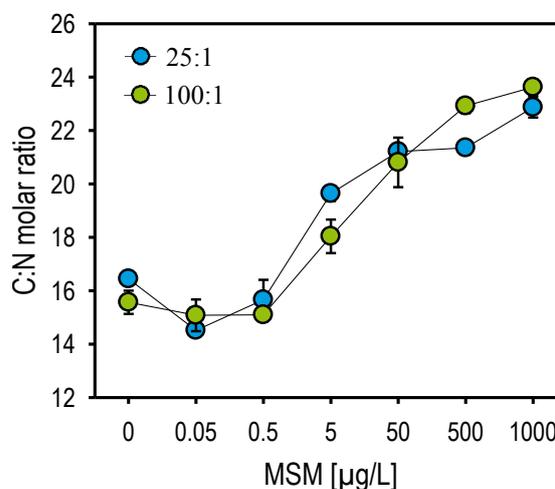


Figure 11 : Courbes dose-réponse du ratio C:N des M. spicatum en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

$\mu\text{g/L}$) (uniquement significative pour le milieu 25:1), les ratios C:N augmentent avec des doses croissantes de MSM, pour les deux milieux de culture (augmentations d'environ 39 % et 52 %, respectivement pour les milieux 25:1 et 100:1). Cette augmentation d'absorption est principalement liée à la diminution progressive de l'absorption du N (en moyenne 30 % pour les deux milieux nutritifs). A contrario, la petite diminution des ratios C:N pour les plus faibles concentrations en MSM est due à une augmentation de l'absorption du N (en moyenne 8.5 %) (Figure 11).

4. Sulfate de cuivre penta hydrate ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)

a. Mesures de croissance

Les taux de croissance en biomasse sèche (RGR_{DM}) et en longueur (RGR_{L}) ont été déterminés pour chaque milieu de culture : N:P 25:1 et N:P 100:1 . Les deux paramètres évoluant de façon similaire, seules les données pour du RGR_{DM} sont présentées Figure 12 (RGR_{L} est en Annexe 17). Sans ajout de polluant par rapport à la dose initiale de Cu dans le milieu nutritif, le taux de croissance n'est pas significativement différent selon le milieu (25:1 ou 100:1).

Avec ajout supplémentaire de cuivre, les taux de croissance des deux milieux sont assez stables malgré une tendance à la décroissance pour les plantes du milieu 25:1 (inhibition moyenne de 12 %) et une tendance à la croissance pour les plantes du milieu 100:1 (augmentation moyenne de 16 %). Néanmoins, une augmentation de croissance est observée dans les plantes du milieu 25 :1 pour les deux plus petites concentrations en cuivre (0.05 et 0.5 $\mu\text{g/L}$) (augmentation moyenne de 33 %). Enfin, contrairement aux témoins, les taux de croissance des plantes provenant du milieu 25:1 sont plus élevés que les taux de croissances des plantes provenant du milieu 100:1 (en moyenne 27 %) ; à l'exception de la concentration 1000 $\mu\text{g/L}$.

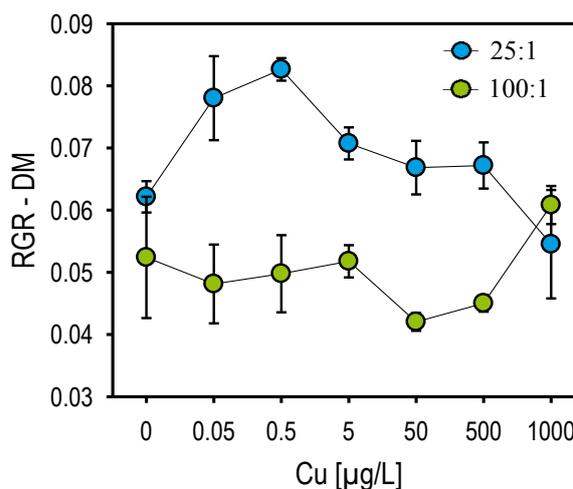


Figure 12 : Courbes dose-réponse des taux de croissance en biomasse des *M. spicatum* en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

b. Mesures des pigments : chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes

Les teneurs en chlorophylles totales (a+b), en caroténoïdes et en anthocyanes ont été mesurées dans les plantules de *M. spicatum* (Figure 13). Les teneurs en caroténoïdes présentant les mêmes variations que les chlorophylles totales, seuls les résultats de ces dernières sont présentés (caroténoïdes en Annexe 17). De façon générale, les teneurs en pigments sans herbicides sont plus importantes dans le milieu 25:1 que dans le milieu 100:1.

En présence de cuivre, les pigments photosynthétiques restent stables dans les deux milieux nutritifs. Néanmoins, les courbes dose-réponse des deux milieux se rapprochent, voire se rejoignent à la concentration 5 $\mu\text{g/L}$; suite à une diminution des teneurs en pigments dans les plantes du milieu 25:1. Enfin, tout comme

pour les témoins, les plantes du milieu 25:1 possèdent plus de pigments que celles provenant du milieu 100:1 ; avec un écart moyen entre les deux milieux de 32.9 % pour les chlorophylles totales, de 16.7 % pour les caroténoïdes et de 19.4 % pour les anthocyanes.

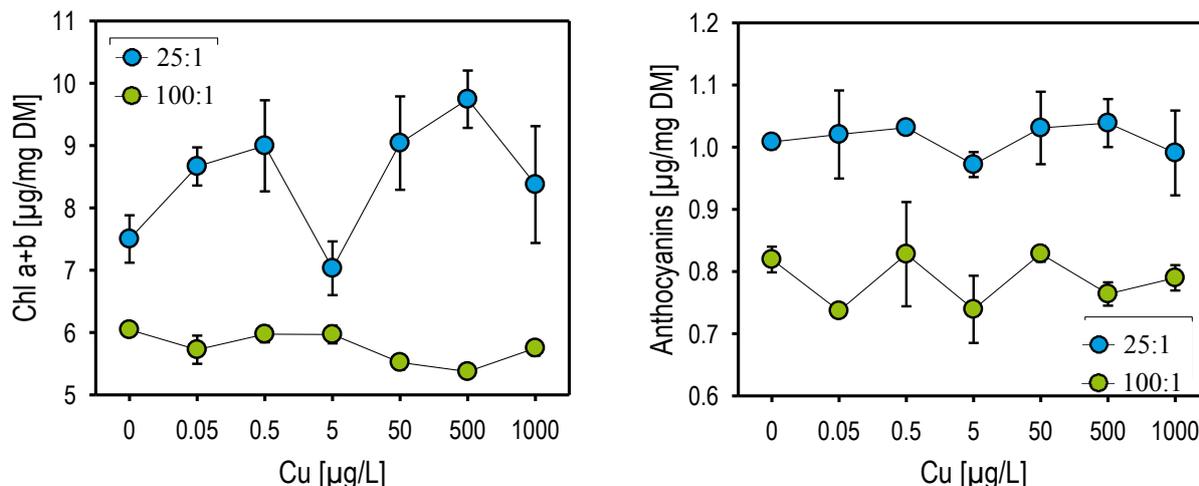


Figure 13 : Courbes dose-réponse des pigments (chlorophylles totales et anthocyanes) des *M. spicatum* en contact avec le $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

c. Mesures des polyphénols totaux (TPC)

Les contenus en polyphénols totaux (TPC) des plantules de *M. spicatum* dans les deux milieux de culture ont été mesurés (Figure 14). Ce paramètre, tout comme les paramètres précédents, montre une différence significative des TPC dans les témoins selon le milieu, avec des valeurs plus importantes de 34% pour le milieu 25:1.

Suite à l'ajout du polluant, les teneurs TPC du milieu 100:1 augmentent fortement jusqu'à atteindre les teneurs en TPC des plantes provenant du milieu 25:1 (augmentation d'environ 31 %). Après 0.05 µg/L, les courbes suivent sensiblement la même tendance et restent stables (autour de 80-85 µg/mg MS).

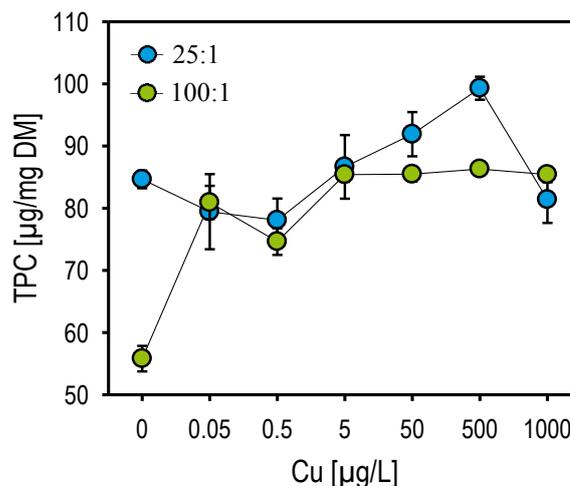


Figure 14 : Courbes dose-réponse des TPC des *M. spicatum* en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

d. Mesures des nutriments dans les plantes

Les ratios stœchiométriques C:N, C:P et N:P des plantules ont été calculés à partir des pourcentages élémentaires de C, N et P. De manière générale, les ratios C:P et N:P (Annexe 17) sont stables pour des doses croissantes de polluant.

Les ratios C:N sont assez stables (autour de 16 pour le milieu 25:1 et autour de 14.5 pour le milieu 100:1), pour des doses croissantes de cuivre. Cependant, une différence significative du milieu a pu être observée ; avec des ratios C:N 10 % plus élevés dans les plantes provenant du milieu 25:1 que dans celles provenant du milieu 100:1. Enfin, bien que peu de variations n'aient pu être observées sur les ratios des nutriments dans les plantes, l'écart entre les courbes de l'N dans les plantes provenant des deux milieux nutritifs est inversé. En effet, les plantes du milieu 100:1 ont absorbé plus d'N que les plantes du milieu 25:1 ; avec une différence de 11 % (Figure 15).

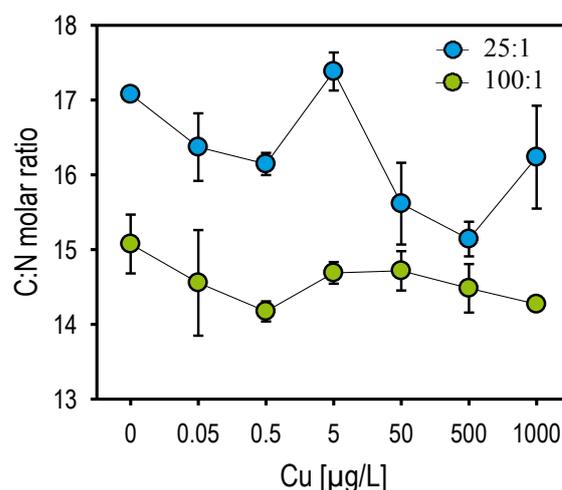


Figure 15 : Courbes dose-réponse du ratio C:N des *M. spicatum* en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

VII. Discussion

L'ensemble des travaux réalisés ont permis de caractériser, à deux échelles différentes (morphométrique et physiologique), les effets de deux facteurs : la dose du polluant (IPU, MSM et Cu), et le ratio molaire N:P, sur *M. spicatum*.

1. Impact des pesticides sur *M. spicatum*

a. L'isoproturon

L'isoproturon étant un herbicide inhibant le transfert des électrons dans le photosystème II de la photosynthèse ; un arrêt du fonctionnement de la cellule des *M. spicatum* en contact avec cet herbicide, peut-être supposé. Les résultats obtenus avec les RGR sont en accord avec cette supposition ; puisqu'à la fois la longueur et la biomasse décroissent avec des doses croissantes de polluant ; et ce, dans les deux milieux nutritifs. D'ailleurs, plusieurs études présentent des résultats similaires et notamment Forney *et al* (1981) ; Kemp *et al* (1985) ainsi que Fairchild *et al* (1998) ont montré que l'atrazine (herbicide des triazines qui agit sur la photosynthèse) réduisait fortement la croissance du *M. spicatum* entre 30 et 1100 µg/L de polluant.

Par ailleurs, bien que l'isoproturon inhibe la photosynthèse et qu'une diminution des chlorophylles est attendue, les teneurs en pigments chlorophylliens augmentent. Cependant plusieurs hypothèses peuvent être apportées à ce résultat étonnant. D'une part, Berard *et al* (1999) a démontré que l'inhibition du transfert des électrons au niveau du photosystème II de la photosynthèse occasionné par l'IPU, entraînait dans un premier temps une activation des chlorophylles dans le but de produire de l'oxygène fortement actif (ROS) (radical superoxyde O_2^- , peroxyde d'hydrogène H_2O_2). Ce serait ensuite ces ROS, qui à une certaine concentration détruiraient les pigments de la plante. D'autre part, il est possible que le dosage des chlorophylles ait été biaisé par les phéophytines, qui sont les premières molécules provenant du catabolisme des chlorophylles (Folly, 2000). Effectivement, le dosage réalisé dans cette étude ne permet pas de différencier les deux

molécules, l'hypothèse d'une phase de catabolisme des pigments photosynthétiques des plantes ne doit pas être écartée.

De plus, dans notre étude le milieu 100:1 est quatre fois plus concentré en NO_3^- que le milieu 25:1. Cependant une augmentation d'absorption du NO_3^- entraîne, par la même occasion, une augmentation de l'absorption du K^+ et une diminution de l'absorption du Mg^{2+} . Or le Mg^{2+} fait partie du noyau porphyrrique des chlorophylles (ce qui n'est pas le cas des phéophytines) (Hopkins *al*, 2003). Ainsi, dans l'étude de Berard *et al* (1999), il est possible que l'IPU ait également entraîné une augmentation des phéophytines et non des chlorophylles.

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de doser l'activité photosynthétique, via des mesures de fluorescence ; ce que Knauert *et al* (2010) ont fait. Dans cette étude, ils ont montré que jusqu'à 5 jours d'exposition à 14 $\mu\text{g/L}$ d'IPU, le *M. spicatum* présentait une baisse de son activité photosynthétique. Cependant au-delà de ces 5 jours et jusque 14 jours de traitement l'activité photosynthétique réaugmente jusqu'à une valeur supérieure à celle du témoin ; pour ensuite rediminuer. L'effet de l'IPU sur l'activité photosynthétique du *M. spicatum* n'est donc pas si fort et est compensé par la plante. Or, dans notre étude, les teneurs en chlorophylles augmentent jusque 500 $\mu\text{g/L}$ et semblent atteindre un plateau à 1000 $\mu\text{g/L}$ pour le milieu 25:1, tandis qu'elles chutent brutalement à 1000 $\mu\text{g/L}$ d'IPU dans le milieu 100:1 ; une réaction du milieu est donc observée. Ainsi, deux hypothèses peuvent-être émises : (i) la plante a pu acquérir une tolérance au polluant, qui n'est pas vu dans cette étude du fait qu'aucune cinétique n'ait été réalisée, ou bien (ii) dans l'étude de Knauert *et al* (2010) qui a été réalisée en mésocosmes complexes, il est possible qu'il y ait eu des interactions entre la plante et le l'IPU avec l'environnement biotique et abiotique ; entraînant des modifications de réponses au polluant. D'ailleurs, l'auteur pense que dans son étude, la tolérance de la plante au polluant est due à une meilleure disponibilité et à une meilleure absorption des nutriments en raison d'une diminution de la compétition.

Enfin, l'augmentation du pourcentage d'N dans les plantes peut s'expliquer par l'augmentation des teneurs en chlorophylles ou des phéophytines. Effectivement, les molécules de chlorophylle et de phéophytine sont constituées d'une queue phytol ainsi que d'un noyau porphyrrique ; lui-même composé de beaucoup d'N (Folly, 2000 ; Hopkins, 2003). Ainsi, une augmentation des chlorophylles ou des phéophytines augmente nécessairement les teneurs en N des plantes.

b. Le mésosulfuron-méthyle

Le mésosulfuron-méthyle, qui est un autre type d'herbicide, présente des résultats bien différents de ceux de l'isoproturon. Tout d'abord, les résultats des taux de croissance (en longueur et en biomasse) diffèrent entre eux. D'une part le RGR_L décroît assez fortement, et d'autre part le RGR_{DM} reste assez stable malgré une légère tendance à la décroissance. Ce résultat a d'ailleurs été retrouvé par de Zhou *et al* (2007) qui explique que les herbicides Sulfonylurées bloquent le canal permettant à l'enzyme ALS (Acétolactate Synthase) d'accéder aux sites actifs pour la biosynthèse de trois acides aminés essentiels : la valine, la leucine et l'isoleucine. Cette action induit ensuite une réduction de la synthèse des protéines et de la division cellulaire. Ainsi, ce type d'herbicide agirait principalement sur les nouvelles pousses et sur l'élongation de la plante.

Néanmoins, le calcul des DMC (Dry Matter Content) qui correspond au rapport de la masse sèche sur la masse fraîche (MS/MF) a montré une augmentation du taux de matière sèche dans les plantes, avec l'augmentation de la dose de polluant (Figure 16). Cela signifierait donc que l'élongation de la plante est affectée par le MSM (au vue des résultats du RGR_L) ; tandis que son taux de matière sèche augmente. Par ailleurs, Cedergreen et al (2004) ont démontré que le MSM entraînait une accumulation d'amidon dans les feuilles et les racines des plantes, pouvant être à l'origine de la stabilité du poids sec. Cependant, dans notre étude, le C des plantes est resté stable dans les deux milieux nutritifs (à l'exception des concentrations 500 et 1000 µg/L du milieu 100:1). Ainsi, l'hypothèse d'une augmentation de production ou d'un stockage d'amidon dans la plante ne peut donc pas être possible ; d'autant plus que l'augmentation du C dans le milieu 100:1 n'est pas corrélée à l'augmentation du DMC.

On peut donc se demander quel paramètre entraîne une augmentation du DMC dans la plante. Pour y répondre, il faut revenir à la formule du DMC (MS/MF) ; trois justifications sont possibles quant à l'augmentation du DMC : (i) soit la masse sèche augmente, (ii) soit la masse fraîche diminue, (iii) ou bien il s'agit d'une combinaison des deux premières possibilités émises. Les résultats n'ayant pas montré d'augmentation de la MS des plante ; en raison d'une inhibition des autres paramètres (chlorophylles, caroténoïdes, anthocyanes, TPC, N et P) et d'une stabilité du C ; ce serait donc la MF qui aurait diminué. En effet, les teneurs en eau sont inversement corrélées au DMC : le DMC augmente lorsque la MF est plus élevée ; en raison d'une teneur en eau plus importante. En revanche, les réponses de teneurs en eau varient entre les deux milieux de culture (25:1 et 100:1) (Figure 17). Il est possible qu'un stress osmotique soit à l'origine de ce fait. D'ailleurs, Camargo et Alonso (2006) expliquent que les organismes marins supportent mieux le stress nitrate que les organismes d'eau douce, en raison de leur adaptation à la salinité ; ce qui leur conférerait donc une résistance au stress osmotique. Ainsi il est possible que la meilleure résistance des organismes marins aux nitrates provienne d'une meilleure résistance au stress osmotique, provoqué par les nitrates.

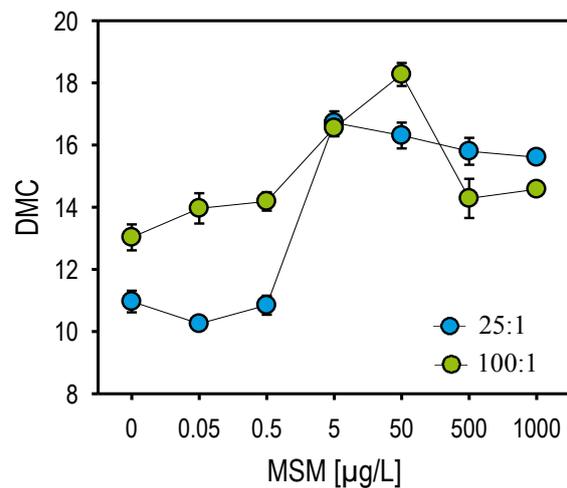


Figure 16 : Courbes dose-réponse du contenu en matières sèches des *M. spicatum* en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

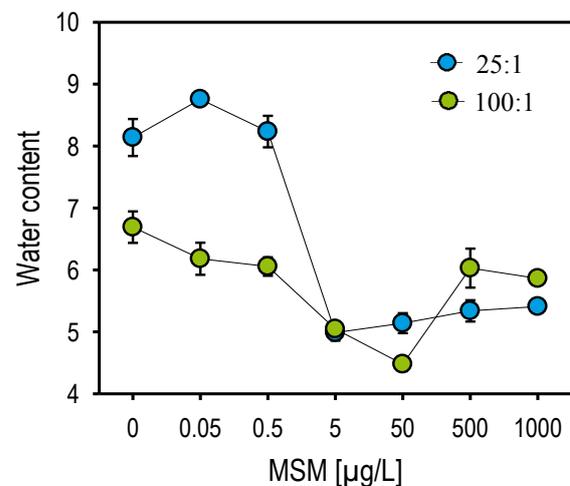


Figure 17 : Courbes dose-réponse des teneurs en eau des *M. spicatum* en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25:1 et 100:1)

Enfin, les décroissances retrouvées sur les paramètres physiologiques (pigments photosynthétiques, anthocyanes et TPC) de notre étude sont en accord avec ce qui a pu déjà être démontré dans la bibliographie. Notamment, Turgut et Fomin (2002) qui avaient montré que les CE₅₀ du metsulfuron-méthyle sur le *M. aquaticum* étaient plus faibles (environ d'un facteur 10) entre les paramètres morphométriques et les paramètres physiologiques.

c. Le cuivre

Le cuivre qui est utilisé comme fongicide dans certains types de culture, est avant tout un élément trace métallique (ETM). Par ailleurs, *M. spicatum* est considéré comme étant relativement tolérant aux ETM et est même capable de les accumuler (Keskinan et al, 2003). Ainsi, l'absence d'effet néfaste sur les différents paramètres mesurés (chlorophylles, anthocyanes, taux de croissance ...) ne signifie pas forcément l'absence d'une toxicité. Effectivement, le cuivre peut être absorbé par la plante, et mettre en place tout son système de détoxification des ETM : chélation et séquestration dans la vacuole ou excrétion ; pour ne pas subir d'effets toxiques (Ngaliya et al, 2009).

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps, de doser le Cu dans la plante afin de voir s'il a bien été absorbé par celle-ci. Si c'est le cas, une seconde étape de dosage des molécules du système de détoxification de la plante pourrait être réalisée ; et notamment les mesures du glutathion ou des phytochélatines ainsi que des acides aminés qui les composent (cystéine, glycine et acide glutamique) (Ngaliya et al, 2009).

Par ailleurs, les résultats des paramètres mesurés dans les plantes du milieu 25:1 montrent une augmentation des teneurs et des croissances jusque 0.5 µg/L (voire 5 µg/L) de Cu ; puis une diminution de ces teneurs jusqu'à des valeurs proches de celles des témoins. Il est donc possible que la dose initiale de Cu du milieu nutritif, normalement optimale, soit en réalité inférieure à l'optimum. Par conséquent, le milieu nutritif utilisé peut être légèrement déficient en Cu ; sans parler de carence puisque les plantes arrivent à croître malgré tout. De ce fait, les ajouts de Cu supplémentaires, réalisés lors des tests (expliquant l'augmentation des paramètres mesurés) auraient permis d'atteindre une « consommation de luxe » (stagnation des paramètres mesurés) ; puis à partir de 5 µg/L les plantes auraient commencé à entrer dans un seuil de toxicité (diminution des paramètres mesurés) (Meyer et al, 2008) (Figure 18).

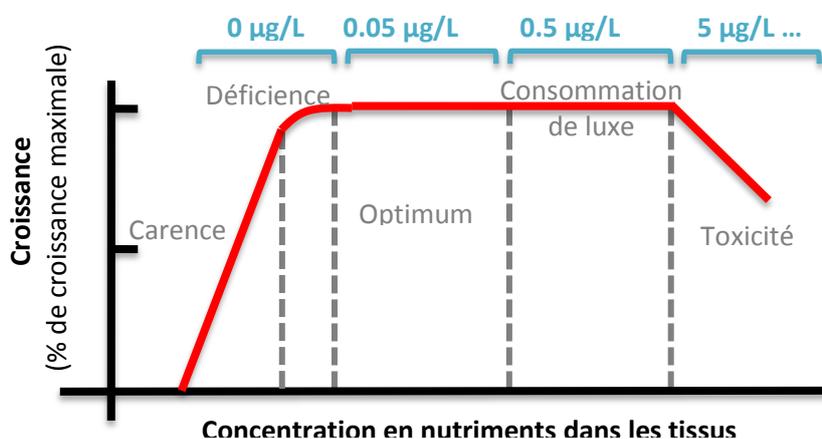


Figure 18 : Courbe dose-réponse de la croissance des plantes exposées à différentes concentrations en nutriments (modifié d'après Meyer et al, 2008)

2. Impact de la stœchiométrie du ratio N:P sur la toxicité des plantes

a. Effet des nitrates sur *M. spicatum*

A ce jour, la stœchiométrie entre les nutriments d'un milieu est un paramètre nouvellement étudié lorsqu'il est associé à une substance polluante. Les comparaisons avec d'autres études restent donc difficiles.

Néanmoins, cette étude a pu montrer que la dose de nitrate influençait fortement la réponse de la plante puisque quasiment tous les paramètres pour chaque polluant avaient des teneurs plus faibles dans le milieu 100:1 que dans le milieu 25:1. Ce résultat, qui rejoint les données présentées par Lei et Lu (2011) qui montre qu'un excès d'azote a inhibé la division cellulaire d'une algue (*Karenia mikimotoi*), pourrait être la conséquence d'un stress osmotique engendré chez les organismes d'eau douce. En effet, comme l'ont remarqués Camargo et Alonso (2006), les organismes adaptés à la salinité, et donc au stress osmotique, supportaient beaucoup mieux le stress nitrate.

De plus, les nitrates, et plus généralement l'azote, présent en quantités importantes en raison de l'agriculture intensive, entraînent une eutrophisation des écosystèmes aquatiques ; comme c'est généralement le cas en Bretagne avec le fléau des algues vertes. La prolifération de certaines espèces végétales (ex : algues et cyanobactéries, mais aussi certaines macrophytes), en raison d'un apport trop important d'azote, a été mise en cause dans la réduction et la disparition d'autres espèces, et notamment de macrophytes immergées. Cette prolifération d'algues et de cyanobactéries au détriment des macrophytes immergées serait due à la libération de toxine ; dans le cas des cyanobactéries, ou plus généralement à une pression de compétition plus élevée pour les nutriments et la lumière (Bian et al, 2013). Or, la présente étude montre bien que les nitrates pourraient également engendrer des effets toxiques sur les macrophytes et contribuer à leur sénescence.

b. Effets de l'interaction des nitrates avec les pesticides sur *M. spicatum*

Comme le montrent les résultats de cette étude, l'interaction entre les polluants et la dose de nitrates du milieu varie selon la nature et la dose des polluants. En effet, les interactions sont plus nombreuses avec l'IPU, qu'avec le MSM ou le Cu ; modifiant la toxicité du polluant vis-à-vis de la plante. L'étude du stress nitrate sur les plantes a donc montré qu'il était important de prendre en compte la stœchiométrie des nutriments majeurs (N et P) dans les études écotoxicologiques. En effet, cette possible interaction entre les constituants du milieu et les polluants pourrait expliquer les différences de résultats et d'effets entre les études travaillant sur les mêmes contaminants, mais dans des milieux différents. De plus, d'un point de vue environnemental, il semble fondamental d'étudier des combinaisons de facteurs stress afin de comprendre leurs effets sur les écosystèmes aquatiques ; et ce d'autant plus que les pollutions nitrates et pesticides, par exemple, sont souvent concomitantes dans les cours d'eau proches des zones agricoles.

VIII. Conclusion

La présente étude avait plusieurs objectifs : (i) évaluer les effets de la stœchiométrie du ratio N:P du milieu sur *M. spicatum* ; (ii) mesurer la toxicité de trois pesticides (isoproturon, mésosulfuron-méthyle et cuivre) selon une gamme de concentration bien établie et (iii) de voir s'il existait une interaction entre ces deux facteurs.

Les résultats obtenus ont montré des réactions différentes de la plante face aux trois polluants. Néanmoins, l'augmentation de la dose de nitrate du milieu semble avoir créé un stress pour la plante qui a interféré avec les polluants ; modifiant ainsi leurs toxicités sur les plantes. Ainsi l'hypothèse d'un stress nitrate évoquée au début de cette étude a pu être vérifiée.

De plus, les paramètres morphométriques (mesures de croissances) ont été inhibés pour les trois polluants et ont montré des variations entre les deux milieux nutritifs ; avec des effets plus sévères pour la plus forte dose de nitrates. Ils peuvent donc apporter des informations sur les effets indirects des polluants sur l'écosystème : une réduction ou une disparition du Myriophylle, constitue une perte d'habitat, de substrat et de nourriture pour bon nombre d'espèces, sans parler des répercussions sur les cycles de la matière (Carpenter et Lodge, 1986). Néanmoins, les paramètres physiologiques (teneurs en pigments, TPC et teneurs en nutriments dans les plantes) qui ont montré des résultats différents selon les milieux nutritifs et selon les pesticides en raison de leurs différents modes d'action, sont tout aussi importants puisqu'ils aident à comprendre les effets métaboliques et physiologiques des polluants dans les plantes, beaucoup plus précoces et sensibles que les paramètres morphologiques.

Ainsi, nos données ont donc démontré que les doses testées d'IPU, de MSM et de Cu engendraient des effets aux niveaux physiologiques et morphologiques et notamment pour les plus fortes de doses de pesticides (mais de façon moins prononcée pour ce dernier polluant). Cependant la stœchiométrie du milieu est un élément important à prendre en compte dans les études, pas seulement envisagée comme un facteur influençant l'état nutritionnel des organismes, mais aussi comme une contrainte à part entière, puisqu'elle entraîne des variations dans les réponses des plantes face aux différentes contaminations.

Afin de compléter ce travail, d'autres études sont encore à réaliser. Tout d'abord, les mesures des concentrations en pesticides et notamment en cuivre sont prévues ; afin de confirmer les hypothèses de non dégradation des pesticides, et d'accumulation du cuivre. De plus, des analyses qualitatives des polyphénols doivent être réalisées par HPLC afin de voir quelles molécules ont varié et comment, face aux polluants. Enfin, d'autres tests complémentaires sont également prévus en jouant sur plusieurs facteurs (milieu nutritif et multicontamination de pesticides). Par ailleurs, nos résultats ayant montré que la dose d'azote influençait les réponses des plantes exposées aux polluants ; il pourrait être intéressant d'étudier d'autres modifications de milieux, tel que la dose de saccharose, molécule indispensable pour les cultures axéniques, puisqu'elle sert de source de carbone aux plantes ; ou bien le rapport Na:K, qui est important pour le bon fonctionnement de plusieurs transporteurs. Cette première étude a permis de comprendre les effets de combinaisons de plusieurs facteurs environnementaux aidant à mieux appréhender les effets des polluants à l'échelle des écosystèmes aquatiques, mais également à trouver de nouvelles démarches pour évaluer leurs impacts sur l'environnement.

Références bibliographiques

- Article de périodiques

- ARTS G.H.P., DICK J., BELGERS M., HOEKZEMA C.H., THISSEN J., 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental pollution*. n° 153, p 199-206.
- BERARD A., PELTE T., 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II, effets sur les communautés algales et leur dynamique. *Revue des sciences de l'eau*. Vol. 12, n° 2, p. 333-361.
- BIAN J., BERNINGER J.P., FULTON B.A., BROOKS B.W., 2013. Nutrient stoichiometry and concentrations influence silver toxicity in the aquatic macrophyte *Lemna gibba*. *Science of the total environment*. n° 449, p. 229-236.
- CAMARGO J.A., et ALONSO A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*. n° 32; p. 831-849.
- CARPENTER S.R., LODGE D.M., 1986. Effects of submersed macrophytes on ecosystem processes. *Aquatic Botany*. n° 26, p 341-370.
- CEDERGREEN N., STREIBIG J.C., SPLIID N.H., 2004. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicology and environmental safety*. n° 57, p 153-161.
- COUTRIS C., MERLINA G., SILVESTRE J., PINELLI E., ELGER A., 2011. Can we predict community-wide effects of herbicides from toxicity tests on macrophyte species? *Aquatic toxicology*. n° 101; p. 49-56.
- DELMAIL D., LABROUSSE P., HOURDIN P., LARCHER L., MOESCH C., BOTINEAU M., 2011. Differential responses of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae) organs to copper: physiological and developmental approaches. *Hydrobiologia*. n° 664, p 95-105.
- FAIRCHILD J.F., RUESSLER D.S., CARLSON A.R., 1988. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environmental toxicology and chemistry*. n° 9, Vol. 7, p. 1830-1834.
- FORNEY D.R., DAVIS D.E., 1981. Effects of low concentrations of herbicides on submersed aquatic plants. *Weed Sci*. n° 29, p. 677-685.
- FULTON B.A., BRAIN R.A., USENKO S., BACK J.A., KING R.S., BROOKS B.W., 2009. Influence of nitrogen and phosphorus concentrations and ratios on *Lemna gibba* growth responses to triclosan in laboratory and stream mesocosm experiments. *Environmental toxicology and chemistry*. Vol. 28, n° 12, p. 2610-2621.
- GROSS E.M., MEYER H., SCHILLING G., 1996. Release and ecological impact of algalicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry*. Vol. 41, n° 1, p. 133-138.
- HUANG L., LU Y., GAO X., DU G., MA X., LIU M., GUO J., CHEN Y., 2013. Ammonium-induced oxidative stress on plant growth and antioxidative response of duckweed (*Lemna minor* L.). *Ecological engineering*. n° 58, p. 355-362.
- JACKOBSON A.R., DOUSSET S., GUICHARD N., BAVEYE P., ANDREUX F., 2005. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. *Environmental pollution*. n° 138; p. 250-259.
- KEMP W.M., BOYNTON W.R., CUNNINGHAM J.J., STEVENSON J.C., JONES T.W., MEANS J.C., 1985. Effects of atrazine and linuron on photosynthesis and growth of the macrophytes *Potamogeton perfoliatus* L. and *Myriophyllum spicatum* L. in an estuarine environment. *Mar Environ Res*. n° 16, p. 255-280.
- KESKINKAN O., GOKSU M.Z.L., YUCEER A., BASIBUYUK M., FORSTER C.F., 2003. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*). *Process biochemistry*. n° 39; p. 179-183.
- KNAUER K., MOHR S., FEILER U., 2008. Comparing growth development of *Myriophyllum spp.* in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. *Environmental Science and Pollution Research*. n° 15 ; p. 322-331.
- KNAUERT S., SINGER H., HOLLENDER J., KNAUER K., 2010. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. *Environmental Pollution*. n° 158 ; p. 167-174.

- LEI Q.Y., LU S.H., 2011. Molecular ecological responses of dinoflagellate, *Karenia mikimotoi* to environmental nitrate stress. *Marine pollution bulletin*. n° 62, p. 2692-2699.
- LICHTENTHALER H.K., WELLBURN A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 11, p.591-592.
- MOHR S., SCHOTT J., MALETZKI D., HUNKEN A., 2013. Effects of toxicants with different modes of action on *Myriophyllum spicatum* in test systems with varying complexity. *Ecotoxicology and environmental safety*. n° 97, p. 32-39.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. n° 3, vol. 15, p. 473-497.
- NGAYILA N., BOTINEAU M., BAUDU M., BASLY J.P., 2009. *Myriophyllum alterniflorum* DC. Effect of low concentrations of copper and cadmium on somatic and photosynthetic endpoints ; a chemometric approach. *Ecological indicators*. n° 9 ; p. 307-312.
- SALMINEN J.P., KARONEN M., 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*. n° 25, p. 325–338.
- SHENGRUI W., XIANGCAN J., LIXIN J., FENGCHANG W., 2009. Response in root morphology and nutrient contents of *Myriophyllum spicatum* to sediment type. *Ecological engineering*. n° 35, p. 1264-1270.
- SMITH D.H., MADSEN J.D., DICKSON K.L., BEITINGER T.L., 2002. Nutrient effects on autofragmentation of *Myriophyllum spicatum*. *Aquatic botany*. n° 74, p. 1-17.
- TANG X., ZHU B., KATOU H., 2012. A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. *Journal of environmental sciences*. n° 24, p. 351-361.
- TURGUT G., FOMIN A., 2002. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. *Environmental Contamination and Toxicology*. n° 69 ; p. 601-608.
- VENTURA M., LIBORIUSSEN L., LAURIDSEN T., SONDERGAARD M., JEPPESEN E., 2008. Effects of increased temperature and nutrient enrichment on the stoichiometry of primary producers and consumers in temperate shallow lakes. *Freshwater Biology*. Vol. 53, p. 1434-1452.
- VERVLIET-SHEEBAUM M., KNAUER K., MAUND S. J., GRADE R., WAGNER E., 2006. Evaluating the necessity of additional aquatic plant testing by comparing the sensitivities of different species. *Hydrobiologia*. n° 570, p. 231-236.
- ZHOU Q., LIU W., ZHANG Y., LIU K.K., 2007. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide biochemistry and physiology*. n° 89, p. 89-96.
- Thèse / rapport
- CAILLAT, Amélie. *Evaluation de la biodisponibilité du cuivre dans les sédiments artificiels par des méthodes biologiques avec la plante aquatique Myriophyllum spicatum (hydroponie, biotest normalisé et rhizotest) et géochimiques (DGT)*. Thèse de doctorat. Géosciences de l'environnement. Aix-Marseille : Université Paul Cezanne, 2014.
- FOLLY, Patrick. *Catabolisme de la chlorophylle b : structures, mécanismes et synthèses*. Thèse de doctorat. Sciences naturelles. Suisse : université de Fribourg, 2000.
- TRAORE Mohamed. *Etude de Myriophyllum spicatum comme bioindicateur de la qualité des eaux en zone agricole*. Rapport de M2. Géosciences : sols, eaux, environnement. Nancy : Université de Lorraine, 2013.
- Ouvrage / Chapitre de livre
- HOPKINS, William G. *Physiologie végétale* 1^{ère} Edition. De Boeck Université. Bruxelles, 2003. Chapitre 4, Les plantes et les nutriments inorganiques, p 61-75 et 177.
- MEYER S., REEB C., BOSDEVEIX R. *Botanique, biologie et physiologie végétales*. 2e édition, Editions Maloine. 2008. p 143, ISBN 978-2-224-03020-9
- MULLER S., PELTRE M.C., OLLIVIER M., PETITDIDIER D., THIEBAUT G., DUTARTRE A., MOREAU A., MUTTERLEIN C., BARBE J., LAGRANGE C. *Biologie et écologie des espèces végétales proliférant en France*. Edition Inter Agence de l'eau Artois-Picardie. 1997. p. 75-78.
- STERNER R.W., ELSER J.J. *Ecological stoichiometry : the biology of elements from molecules to the biosphere*. Edition Princeton

university press, 2002. Chapitre 1, Stoichiometrie and homeostasis, p. 42.

- Site internet

LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE DES ENVIRONNEMENTS CONTINENTAUX. *Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux* [En ligne]. Mis à jour le 28 Mars 2013. Disponible sur : <http://www.liebe.univ-metz.fr/> [Consulté en Mars 2014].

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORET. *Agreste : la statistique, l'évaluation et la prospective agricole* [En ligne]. Disponible sur : <http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/lorraine/> [Consulté le 12 Mars 2014]

LABKEM. *Fiche de données de sécurité : Sulfate de cuivre (II) pentahydraté, Analytical Grade, ACS*. Disponible sur : http://www.labbox.com/FDS/FR/FR__Copper%20II%20sulfate%20pentahydrate%20Analytical%20Grade%20ACS_CUSU-05A-500_FDS_20110310__LABKEM_.pdf [Consulté en mars 2014].

INRS. *Fiche toxicologique : Isoproturon*. Mis en ligne en Décembre 2010. Disponible sur : www.inrs.fr/default/dms/inrs/FicheToxicologique/TI-FT-283/ft283.pdf [Consulté en mars 2014]

FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY (UBA). *Myriophyllum spicatum toxicity test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system*. Mis en ligne en Septembre 2010. Disponible sur : http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Report%20of%20ring%20test%20Myriophyllum-sediment-free_5%20March%202013.pdf [Consulté en Mars 2014]

UNIVERSITE OF HERTFORDSHIRE. *PPDB : Pesticide Properties Data Base*. Mis en ligne en 2011. Disponible sur : <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/409.htm> (pour l'isoproturon) et sur : <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/441.htm> (pour le mésosulfuron-méthyle) [Consulté en Mars 2014]

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'AGROALIMENTAIRE. *E-phy*. Disponible sur : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/mata/4818.htm> (pour l'isoproturon) ; sur : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/mata/9814.htm> (pour le mésosulfuron-méthyle) et sur : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/mata/9202.htm> (pour le $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) [Consulté en Mars 2014]

Annexes

ANNEXE 1 : Valeurs des CE_{50} de l'isoproturon sur *M. spicatum* après 14 jours d'exposition (Mohr et al, 2013)

ANNEXE 2 : Effet de l'isoproturon (à 14 $\mu\text{g/L}$) sur l'activité photosynthétique de *M. spicatum*, au cours du temps (Knauert et al, 2010)

ANNEXE 3 : Cartes des orientations agricoles de la France et de la Lorraine (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, Mars 2014)

ANNEXE 4 : Structure des molécules de mésosulfuron-méthyle et de metsulfuron-méthyle (Université of Hertfordshire, Mars 2014)

ANNEXE 5 : CE_{50} du metsulfuron-méthyle sur *M. aquaticum* (Turgut et Fomin, 2002) et *M. spicatum* (Cedergreen et al, 2004) après 14 jours d'exposition et dans deux milieux nutritifs différents, respectivement Hoagland + sucrose et milieu K.

ANNEXE 6 : CE_{50} de trois herbicides de même famille et similaires : le metsulfuron-méthyle, le thifensulfuron-méthyle et le rimsulfuron (Turgut et Fomin, 2002)

ANNEXE 7 : **A)** Croissance et **B)** Evolution des teneurs en chlorophylles a et b et en caroténoïdes de *M. alterniflorum* exposé à 100 $\mu\text{g/L}$ de CuSO_4 pendant 14 jours, dans un milieu de composition chimique proche de celui d'une rivière (adaptés de Delmail et al, 2011)

ANNEXE 8 : Rôles des micros et macros nutriments chez une plante (Physiologie végétale 2003)

ANNEXE 9 : Milieu 25:1

ANNEXE 10 : Milieu 100:1

ANNEXE 11 : Caractéristiques physico-chimiques des trois pesticides choisis (PPDB ; INRS ; LABKEM, Mars 2014)

ANNEXE 12 : Equations de Lichtenthaler and Wellburn (1983) pour le calcul des teneurs en pigments des plantes

ANNEXE 13 : Analyses statistiques des trois pesticides

ANNEXE 14 : Concentrations en isoproturon et mésosulfuron-méthyle dans les milieux 25:1 et 100:1 ; à T_0 , T_7 et au renouvellement des milieux (T_0 bis).

ANNEXE 15 : Courbes dose-réponses des caroténoïdes, des ratios C:P et N:P ainsi que des teneurs en C, N et P des *M. spicatum* en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25 :1 et 100 :1)

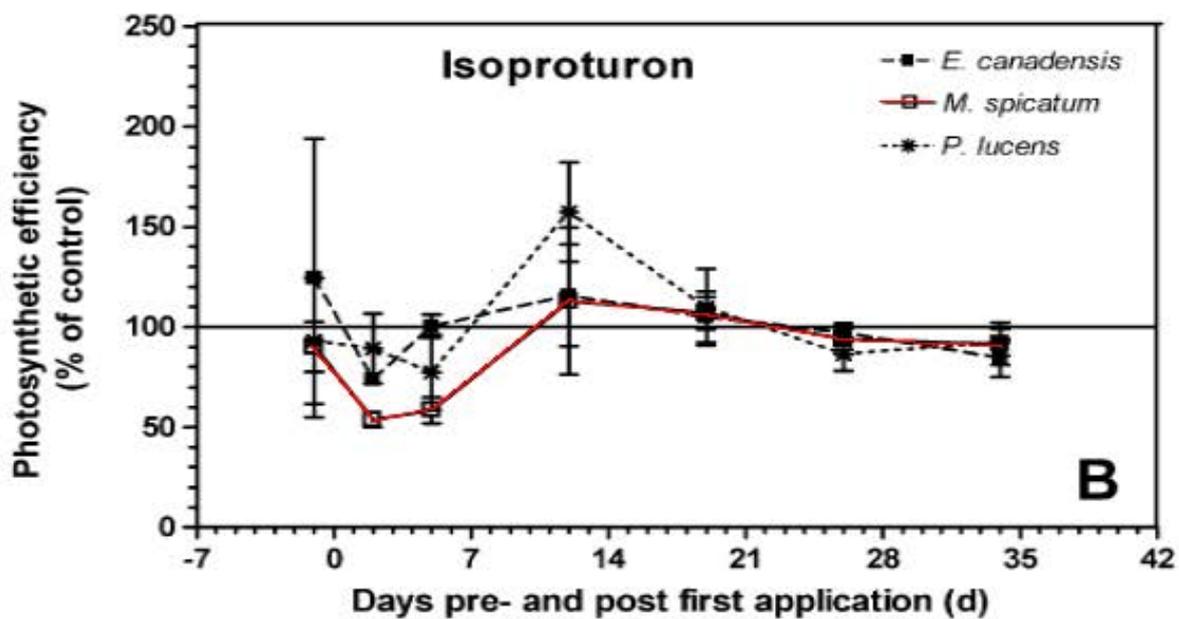
ANNEXE 16 : Courbes dose-réponse des caroténoïdes, des ratios C:P et N:P ainsi que des teneurs en C, N et P des *M. spicatum* en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25 :1 et 100 :1)

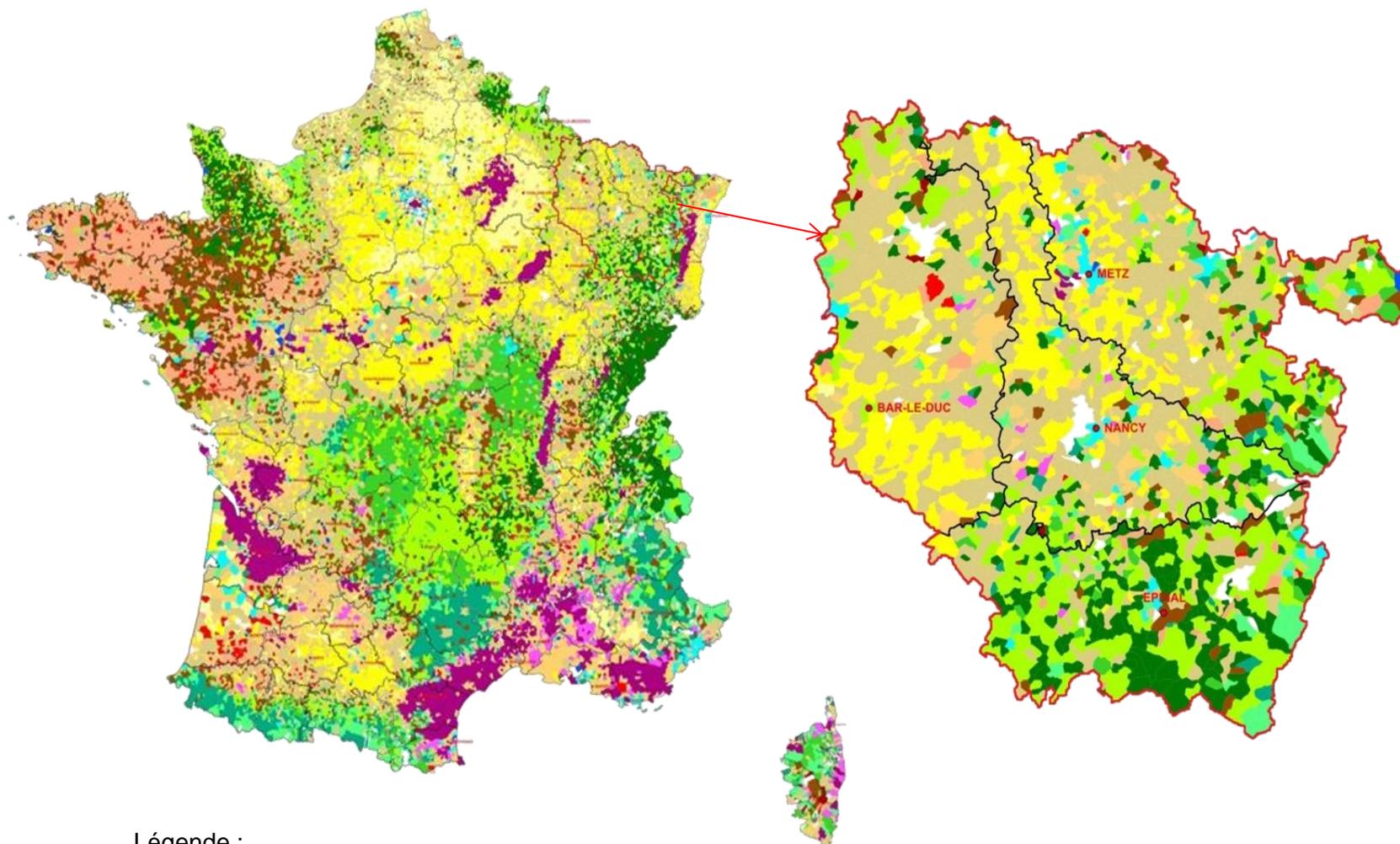
ANNEXE 17 : Courbes dose-réponse des caroténoïdes, des ratios C:P et N:P ainsi que des teneurs en C, N et P des *M. spicatum* en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25 :1 et 100 :1)

ANNEXE 1 : Valeurs des CE₅₀ de l'isoproturon sur M. spicatum après 14 jours d'exposition (Mohr et al, 2013)

Isoproturon yield EC₅₀ (mg/L)	Water TS 14 d
Total shoot length (TSL)	Increase
Main shoot length (MSL)	Increase
Side shoot length (SSL)	n.d.
Total fresh weight (TFW)	0.53 (0.174–1.326)
Total dry weight (TDW)	0.25 (0.056–0.919)
Total root dry weight (TRDW)	n.d.
Total root length (TRL)	0.22 (0.157–0.321)

ANNEXE 2 : Effet de l'isoproturon (à 14 µg/L) sur l'activité photosynthétique de *M. spicatum*, au cours du temps (Knauert et al, 2010)





Légende :

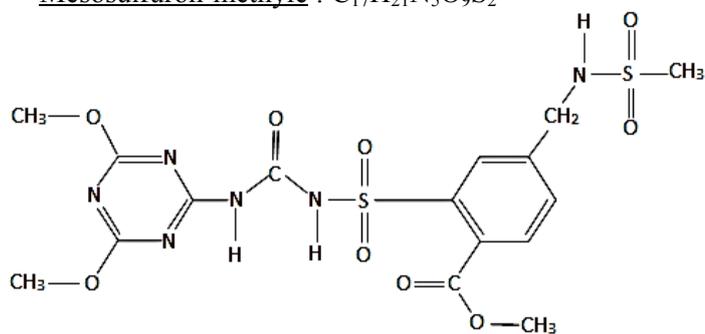
- Céréales et oléoprotéagineux
- Autres grandes cultures
- Légumes et champignons
- Fleurs et horticulture diverse
- Viticulture
- Fruits et autres cultures permanentes

- Bovins lait
- Bovins viande
- Bovins mixtes
- Ovins, caprins
- Polyélevage d'herbivores
- Porcins

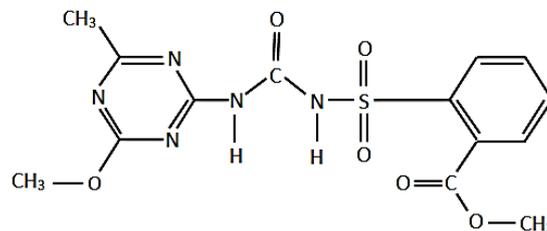
- Aviculture
- Autre polyélevage
- Polyculture dominante
- Polyélevage dominant
- Polyculture et polyélevage
- Exploitations non classées
- Sans exploitation

ANNEXE 4 : Structure des molécules de mésosulfuron-méthyle et de metsulfuron-méthyle
(Université of Hertfordshire, Mars 2014)

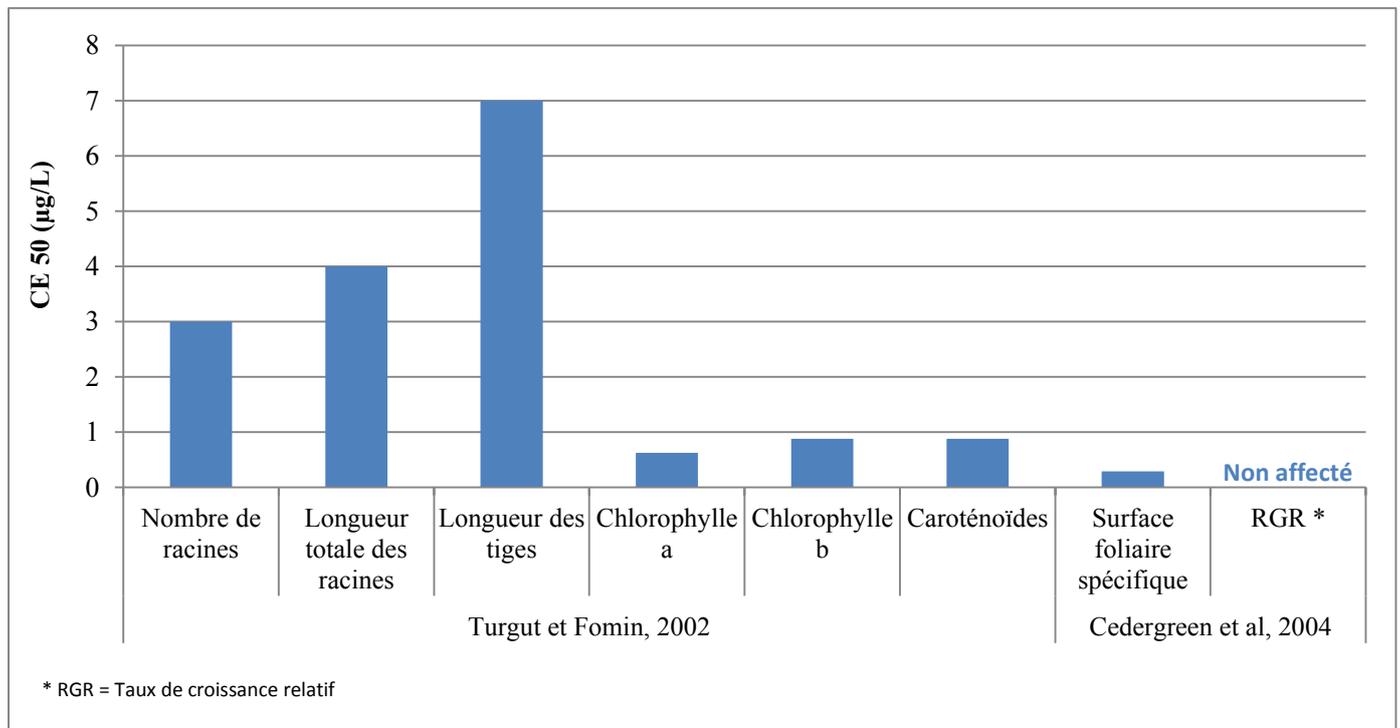
Mésosulfuron-méthyle : $C_{17}H_{21}N_5O_9S_2$



Metsulfuron-méthyle : $C_{14}H_{15}N_5O_6S$



ANNEXE 5 : CE_{50} du metsulfuron-méthyle sur *M. aquaticum* (Turgut et Fomin, 2002) et *M. spicatum* (Cedergreen et al, 2004) après 14 jours d'exposition et dans deux milieux nutritifs différents, respectivement Hoagland + sucrose et milieu K.



ANNEXE 6 : CE₅₀ de trois herbicides de même famille et similaires : le metsulfuron-méthyle, le thifensulfuron-méthyle et le rimsulfuron (Turgut et Fomin, 2002)

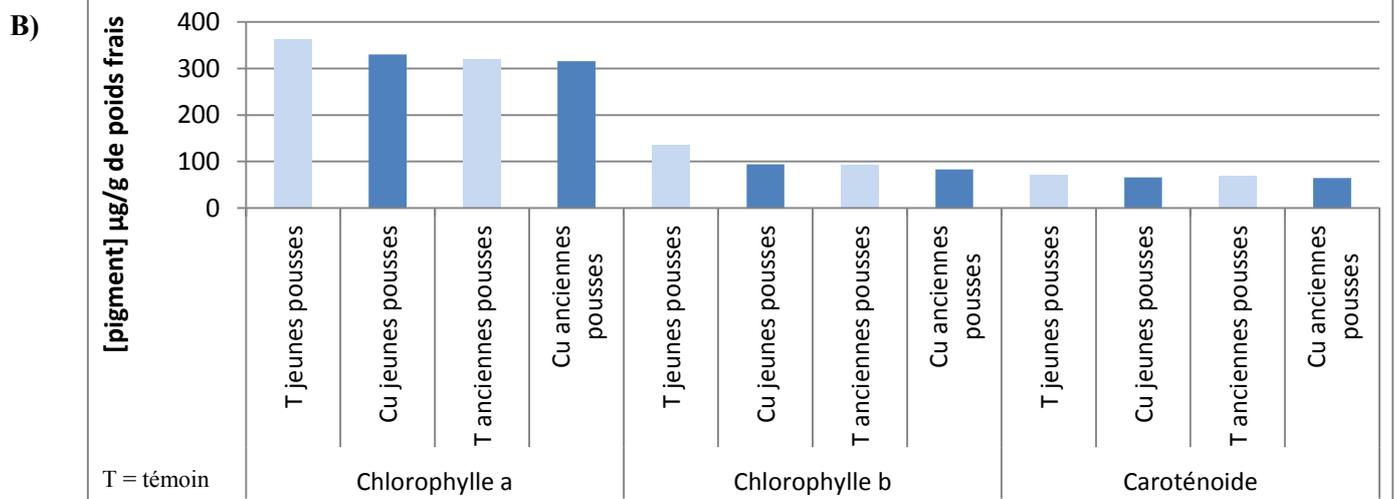
Pesticides	Influenced mechanisms	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotenoid	Area under growth curve	Increase in fresh weight	Increase in shoot length	Total root length	Root number
2,4 D (acid)	Growth ^a	0.020	0.022	0.019	nd	nd	nd	0.050	0.158
Dichlorprop	Formation of abscission zone ^a	0.070	0.063	0.087	nd	nd	nd	0.106	0.176
Dicamba	Growth ^a	0.098	0.099	0.099	nd	nd	nd	0.100	nd
Pyridate	Photosynthesis ^b	0.636	0.555	0.653	1.888	1.700	nd	0.485	nd
Propiquizafop	Fatty acid synthesis	1.098	1.172	1.430	1.831	2.452	nd	1.063	nd
Terbutryn	Photosynthesis ^b	67.160	68.660	67.970	nd	nd	nd	nd	nd
Triflurosulfuron methyl	acetolactate synthase (ALS), amino acid biosynthesis ^{a,b}	0.037	0.036	0.045	0.036	0.030	0.018	0.065	0.110
Thifensulfuron methyl		0.0088	0.011	0.012	0.0034	0.003	0.006	0.011	0.006
Metsulfuron methyl		0.000624	0.000882	0.000882	0.001	nd	0.007	0.004	0.003
Amidosulfuron		0.325	0.325	0.325	0.974	0.970	0.974	nd	nd
Rimsulfuron		0.149	0.149	0.149	0.054	0.124	0.097	1.498	nd
Glyphosate	EPSP synthase ^{a,b}	0.222	0.222	0.222	0.221	1.999	2.040	1.998	nd
Trifluralin	Cell division ^a	0.323	0.353	0.333	0.274	0.279	0.338	0.418	nd
Pendimethalin		13.970	16.450	16.360	8.550	nd	10.744	nd	24.13
Chlorthalonil	Chloronitrile ^a	2.680	2.540	2.550	4.490	nd	2.940	0.480	2.210
Propiconazole	Azole ^a	3.886	3.887	3.771	0.218	1.310	0.548	nd	2.069
Parathion	Organophosphorus ^a	15.660	15.730	15.060	6.710	8.840	6.930	16.300	nd

^a from Tomlin (1994) ^b from Ahrens (1994) nd: not determinable

ANNEXE 7 : A) Croissance et B) Evolution des teneurs en chlorophylles a et b et en caroténoïdes de M. alterniflorum exposé à 100 µg/L de CuSO₄ pendant 14 jours, dans un milieu de composition chimique proche de celui d'une rivière (adaptés de Delmail et al, 2011)

A)		MSL (mm)	CRN	LCR (mm)	TLC (mm)
T0		29.69 ± 0.77	0	0	29.69 ± 0.77
T1					
	Control	39.69 ± 1.43	0.87 ± 0.03	1.81 ± 0.05	41.26 ± 1.43
	Cu-treated	31.10 ± 1.28	0	0	31.10 ± 1.28
T2					
	Control	49.38 ± 1.33	2.62 ± 0.05	7.92 ± 0.12	70.13 ± 1.34
	Cu-treated	36.07 ± 0.49	0.27 ± 0.08	1.54 ± 0.07	36.49 ± 0.50
T3					
	Control	58.47 ± 1.34	5.70 ± 0.07	16.43 ± 0.25	152.12 ± 1.36
	Cu-treated	41.33 ± 0.81	0.58 ± 0.09	2.35 ± 0.11	42.69 ± 0.82
T4					
	Control	73.85 ± 2.44	7.09 ± 0.22	22.40 ± 0.65	232.67 ± 2.58
	Cu-treated	47.10 ± 0.98	1.31 ± 0.14	4.09 ± 0.52	52.46 ± 1.05

Exposition de 14 jours



ANNEXE 8 : Rôles des micros et macros nutriments chez une plante (Physiologie végétale 2003)

MACRONUTRIMENTS	
Azote	<ul style="list-style-type: none"> • Synthèse des acides aminés, protéines, enzymes. Un des constituants de la chlorophylle qui contrôle la photosynthèse
Phosphore	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessaire au métabolisme énergétique des cellules (ATP, ADP...) • Nécessaire dans la production d'acides nucléiques • Nécessaire à la photosynthèse
Potassium	<ul style="list-style-type: none"> • Osmo-régulateur • Activateur de nombreuses enzymes et en particulier celles impliquées dans la photosynthèse et la respiration • Régularise les échanges intercellulaires et renforce la plante
Soufre	<ul style="list-style-type: none"> • Constitutif de nombreuses protéines et entre dans la composition de trois acides aminés (méthionine, cystéine et homocystéine) • Constitutif de vitamines (thiamine, biotine) et du coenzyme A, nécessaire dans la respiration et le métabolisme des acides gras
Magnésium	<ul style="list-style-type: none"> • Favorise la production de chlorophylle et donc la photosynthèse • Stabilise la structure du ribosome • Activateur de nombreuses enzymes
Calcium	<ul style="list-style-type: none"> • Nourrit la plante et confère de bonnes propriétés au sol (stabilité, dynamique de l'eau) • Nécessaire à la construction des parois cellulaires : joue un rôle dans la division cellulaire • Régule les activités de nombreuses enzymes
MICRONUTRIMENTS	
Bore	<ul style="list-style-type: none"> • Intervient dans la production des parois • Intervient dans la division et l'élongation cellulaire
Zinc	<ul style="list-style-type: none"> • Activateur de nombreuses enzymes (<u>ex</u> : CA qui catalyse l'hydratation du dioxyde de carbone en bicarbonate)
Sodium	<ul style="list-style-type: none"> • Transporteur potentiel du pyruvate
Manganèse	<ul style="list-style-type: none"> • Cofacteur de nombreuses enzymes, en particulier les décarboxylase et déshydrogénase qui jouent un rôle dans le cycle respiratoire du carbone • Peut se substituer au magnésium dans des réactions (<u>ex</u> : ATP) • Produit de l'oxygène lors de la photosynthèse
Molybdène	<ul style="list-style-type: none"> • Constituant de certaines enzymes (nitrogénase, nitrate réductase)
Chlore	<ul style="list-style-type: none"> • Indispensable dans les réactions photosynthétiques productrices d'oxygène • L'ion chlorure maintient la neutralité électrique à travers les membranes et est nécessaire à la division cellulaire dans les feuilles et les pousses feuillées
Fer	<ul style="list-style-type: none"> • Constitutif de nombreuses enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction • Nécessaire à la synthèse de la chlorophylle

ANNEXE 9 : Milieu 25:1

MILIEU 25:1 *					
Composé	Masse molaire (g/mol)	Concentration dans le milieu final	Elément	Concentration de l'élément	Rapport stœchiométrique
Macronutriments (mM)					
KNO₃	101.1	15.619	N	15.625	N:P = 25
NaNO₃	85.0	0.006	P	0.625	
K₂HPO₄	174.2	0.625	Na	0.017	Na:K = 1.008.10 ⁻³
MgSO₄, 7H₂O	246.5	0.750	K	16.872	
CaCl₂, 2H₂O	147.0	1.500	Ca	1.500	Ca:Mg = 2.000
Na-Fe-EDTA	367.1	0.010	Mg	0.750	
Sucrose	342.3	0.088	Cl	3.100	
			Fe	0.010	C:N = 1.92
			C	30	C:P = 48
Micronutriments (µM)					
MnCl₂, 4H₂O	169.0	50.0	Mn	50.0	
ZnSO₄, 7H₂O	287.5	15.0	Zn	15.0	
H₃BO₃	61.8	50.0	B	50.0	
CuSO₄, 5H₂O	249.7	0.050	Cu	0.050	
CoCl₂, 6H₂O	237.9	0.050	Co	0.050	
Na₂MoO₄, 2H₂O	242.0	0.500	Mo	0.500	
KI	166.0	2.5	I	2.5	
			S	0.765	

* Remplacement du K₂HPO₄ par du KH₂PO₄ (à concentration égale) pour avoir le milieu ½ Min A : N:P : 25 ; NO₃ ; KH₂PO₄ utilisé pour les cultures axéniques de *M. spicatum*.

ANNEXE 10 : Milieu 100:1

MILIEU 100:1					
Composé	Masse molaire (g/mol)	Concentration dans le milieu final	Elément	Concentration de l'élément	Rapport stœchiométrique
Macronutriments (mM)					
KNO₃	101.1	62.445	N	62.500	N:P = 100
NaNO₃	85.0	0.055	P	0.625	
K₂HPO₄	174.2	0.625	Na	0.017	Na:K = 1.036.10 ⁻³
MgSO₄, 7H₂O	246.5	0.750	K	16.872	
CaCl₂, 2H₂O	147.0	1.500	Ca	1.500	Ca:Mg = 2.000
Na-Fe-EDTA	367.1	0.010	Mg	0.750	
Sucrose	342.3	0.088	Cl	3.100	
			Fe	0.010	C:N = 0.48
			C	30	C:P = 48
Micronutriments (µM)					
MnCl₂, 4H₂O	169.0	50.0	Mn	50.0	
ZnSO₄, 7H₂O	287.5	15.0	Zn	15.0	
H₃BO₃	61.8	50.0	B	50.0	
CuSO₄, 5H₂O	249.7	0.050	Cu	0.050	
CoCl₂, 6H₂O	237.9	0.050	Co	0.050	
Na₂MoO₄, 2H₂O	242.0	0.500	Mo	0.500	
KI	166.0	2.5	I	2.5	
			S	0.765	

ANNEXE 11 : Caractéristiques physico-chimiques des trois pesticides choisis (PPDB ; INRS ; LABKEM, Mars 2014)

Pesticide	Solubilité, à 20 – 25 °C	Dégradation par hydrolyse (demi-vie)
Isoproturon	<ul style="list-style-type: none"> • Eau : 70.2 mg/L : modérée • Méthanol : 70 g/L : élevée • Acétone : 30 g/L : élevée 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 °C et pH 7 : 1560 jours • 25 °C et pH 5 : 1210 jours
Mésosulfuron-méthyle	<ul style="list-style-type: none"> • Eau à pH 7 : 483 mg/L : modérée • Eau à pH 5 : 7.24 mg/L : faible • Méthanol : 7.3 g/L : élevée • Acétone : 13.7 g/L : élevée 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 °C et pH 7 : 253 jours • 20 °C et pH 5 : 7.2 jours • 25 °C et pH 5 : 3.5 jours
CuSO₄, 5H₂O	<ul style="list-style-type: none"> • Eau : 317 g/L : élevée 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 °C et pH 7 : très persistant

ANNEXE 12 : Equations de Lichtenthaler and Wellburn (1983) pour le calcul des teneurs en pigments des plantes

- Chl a : $Ca = (12,25 \times A_{664} - 2,55 \times A_{647}) / \text{masse}$;
- Chl b : $Cb = (20,31 \times A_{647} - 4,91 \times A_{664}) / \text{masse}$;
- Chl totale (Chl a+b) : $Chl\ a+b = (17,76 \times A_{647} + 7,34 \times A_{664}) / \text{masse}$;
- Caroténoïdes : $Car = (((1000 \times A_{470}) - (3,27 \times Ca) - (104 \times Cb)) / 229) / \text{masse}$
- Aty : $Aty = (((A_{532} - 0,24 \times A_{653}) / 30) \times 287,25) / \text{masse}$. (287,25 étant le poids moléculaire d'un anthocyane, la cyanidine).

Avec A : les absorbances respectives à 664, 647, 532 et 653 nm

Concentrations en $\mu\text{g/mL}$ d'extrait

ANNEXE 13 : Analyses statistiques des trois pesticides

Isoproturon (IPU)	Facteur analysé					
	Dose		Milieu		Dose * Milieu	
Paramètre	F	P	F	P	F	P
RGR L	34,891	< 0,001	0,229	0,635	6,297	< 0,001
RGR DM	66,282	< 0,001	37,669	< 0,001	1,094	0,386
Chlorophylles	123,421	< 0,001	335,642	< 0,001	41,768	< 0,001
Caroténoïdes	108,535	< 0,001	373,250	< 0,001	87,855	< 0,001
Anthocyanes	144,359	< 0,001	198,449	< 0,001	20,049	< 0,001
Polyphénols totaux	14,405	< 0,001	100,965	< 0,001	17,427	< 0,001
C:N	115,334	< 0,001	14,204	< 0,001	3,565	0,008
C:P	567,147	< 0,001	1202,586	< 0,001	613,440	< 0,001
N:P	115.334	< 0.001	14.204	< 0.001	3.565	0.008
C	48,495	< 0,001	129,182	< 0,001	5,868	< 0,001
N	234,403	< 0,001	6,458	0,016	7,530	< 0,001
P	68,976	< 0,001	442,910	< 0,001	96,651	< 0,001

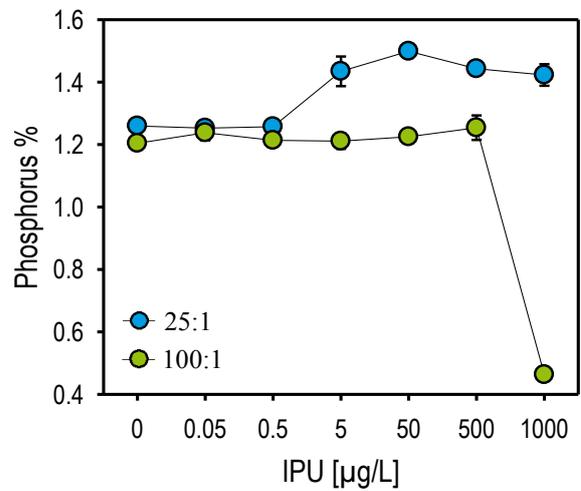
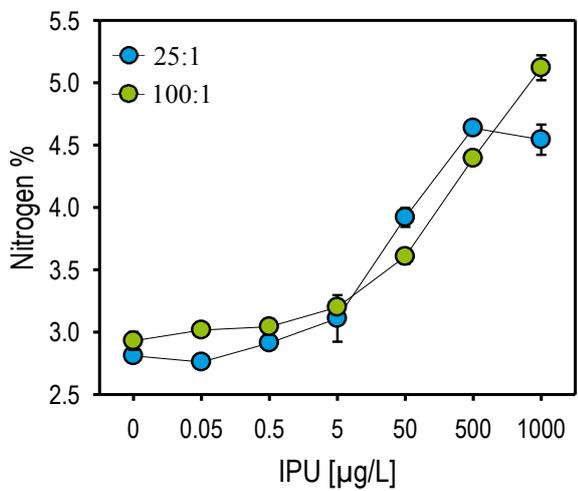
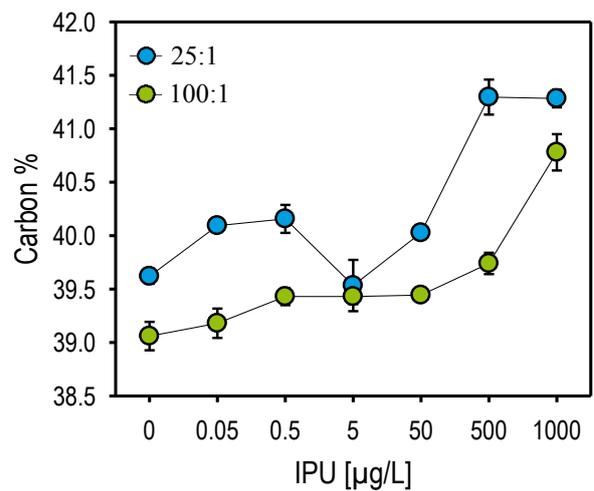
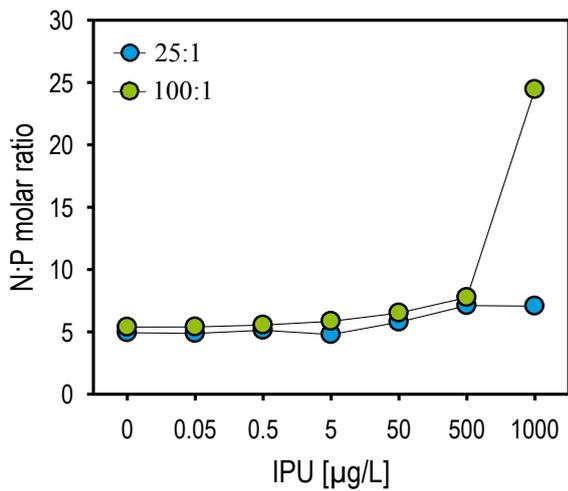
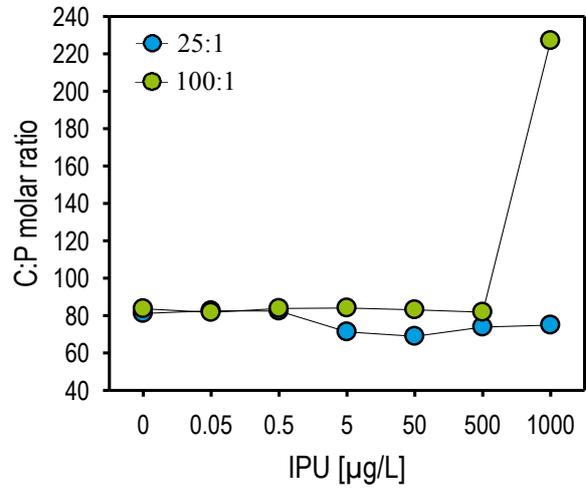
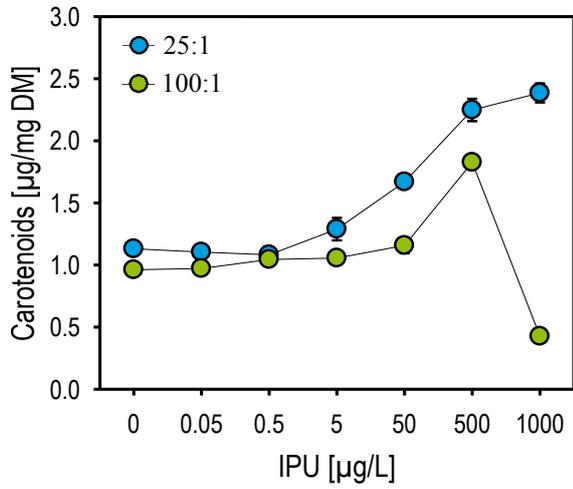
Mésosulfuron-méthyle (MSM)	Facteur analysé					
	Dose		Milieu		Dose x Milieu	
Paramètre	F	P	F	P	F	P
RGR L	231,524	< 0,001	9,764	0,004	10,058	< 0,001
RGR DM	4,256	0,003	23,145	< 0,001	1,669	0,159
Chlorophylles	145,708	< 0,001	120,145	< 0,001	5,485	< 0,001
Caroténoïdes	66,224	< 0,001	70,034	< 0,001	3,593	0,070
Anthocyanes	113,913	< 0,001	36,297	< 0,001	3,271	0,012
Polyphénols totaux	39,700	< 0,001	9,361	0,004	8,477	< 0,001
C:N	133,770	< 0,001	0,499	0,485	4,189	0,003
C:P	55,774	< 0,001	93,419	< 0,001	29,538	< 0,001
N:P	133.770	< 0.001	0.499	0.485	4.189	0.003
C	12,479	< 0,001	14,677	< 0,001	19,117	< 0,001
N	107,551	< 0,001	3,046	0,090	2,340	0,053
P	238,898	< 0,001	273,110	< 0,001	28,421	< 0,001

Cuivre (Cu)	Facteur analysé					
	Dose		Milieu		Dose * Milieu	
Paramètre	F	P	F	P	F	P
RGR L	4,121	0,003	20,996	< 0,001	2,956	0,020
RGR DM	2,205	0,067	46,683	< 0,001	3,883	0,005
Chlorophylles	1,514	0,203	150,459	< 0,001	2,750	0,026
Caroténoïdes	1.626	0.170	22.392	< 0.001	2.126	0.076
Anthocyanes	0,759	0,607	92,624	< 0,001	0,880	0,520
Polyphénols totaux	17,926	< 0,001	13,590	< 0,001	7,242	< 0,001
C:N	4,098	0,003	64,150	< 0,001	1,591	0,180
C:P	2,143	0,074	41,522	< 0,001	2,902	0,022
N:P	2,785	0,026	115,327	< 0,001	3,167	0,014
C	2,503	0,041	2,542	0,120	7,127	< 0,001
N	1,759	0,137	64,390	< 0,001	4,250	0,003
P	2,915	0,021	72,032	< 0,001	3,911	0,004

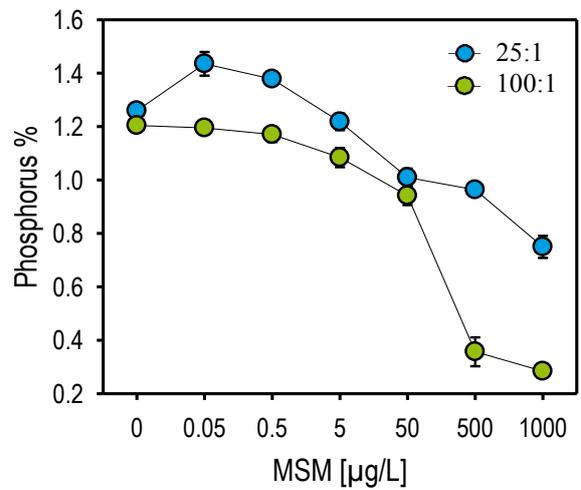
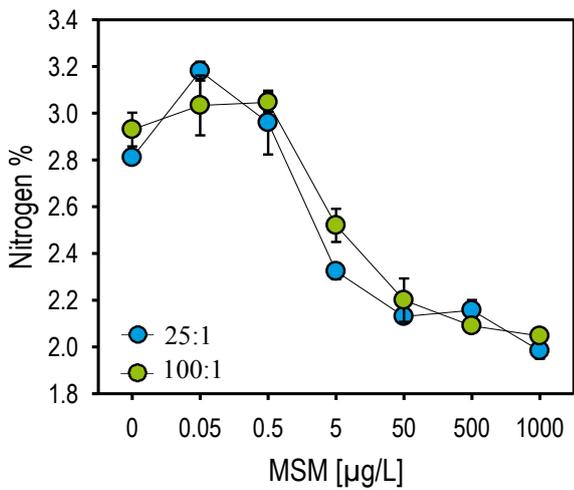
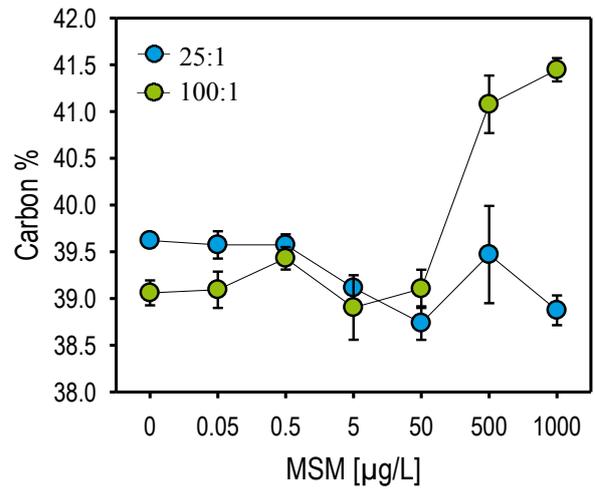
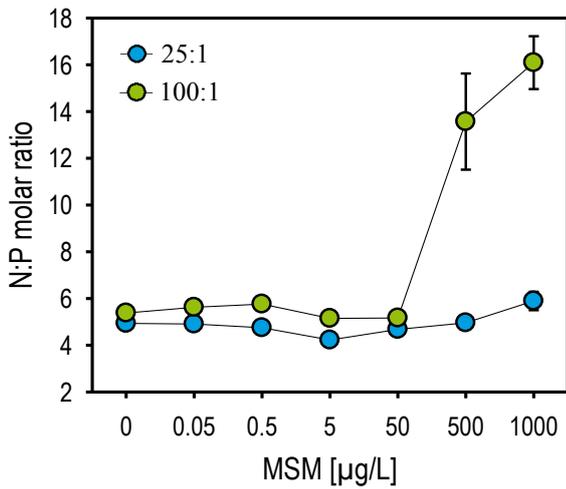
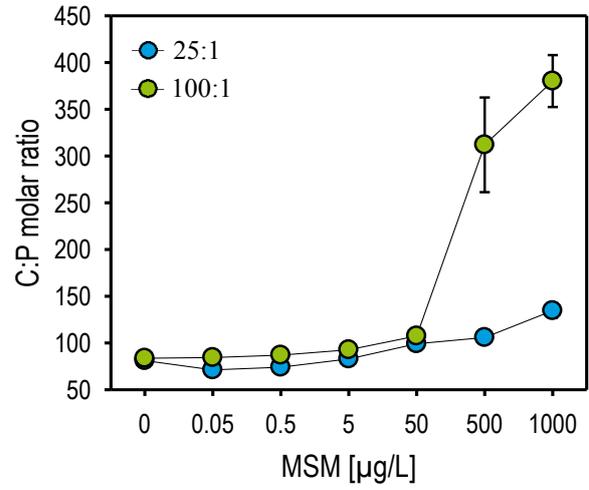
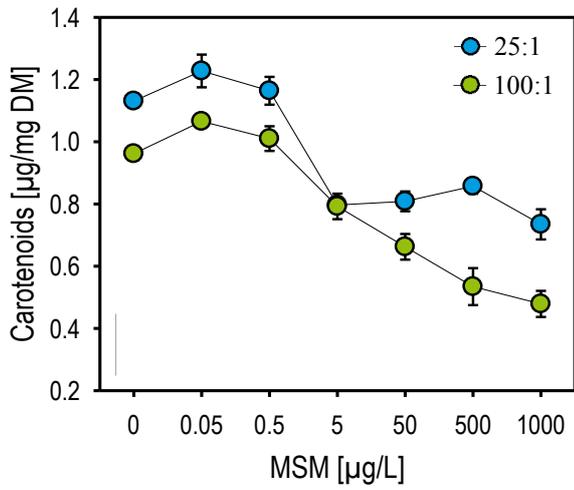
ANNEXE 14 : Concentrations en isoproturon et mésosulfuron-méthyle dans les milieux 25:1 et 100:1 ; à T₀, T₇ et au renouvellement des milieux (T₀ bis).

	Milieu 25:1			Milieu 100:1	
	Isoproturon	MSM		Isoproturon	MSM
	Concentration (µg/L)	Concentration (µg/L)		Concentration (µg/L)	Concentration (µg/L)
T0	46	45,4	T0	49,2	46,4
	455,8	465,2		471,8	465,3
	940,5	902,2		930,1	942,8
T7	38,3	44,6	T7	46	45,6
	449,2	462,3		463,4	438,5
	761,3	907,8		927,1	890,6
T0 bis	38	44,8	T0 bis	46,2	50
	467,9	457		473,9	479,1
	922,3	905,4		926,6	964,9

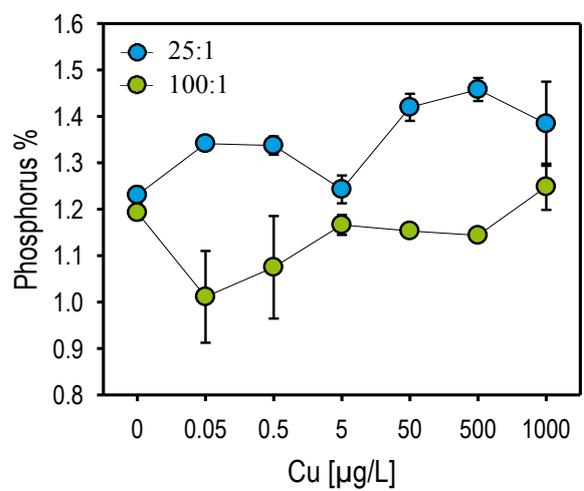
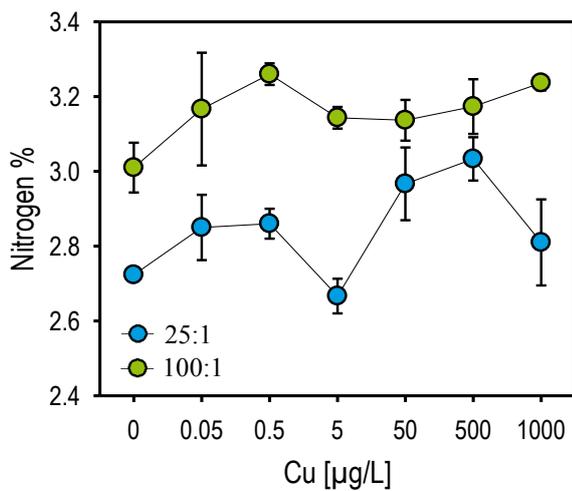
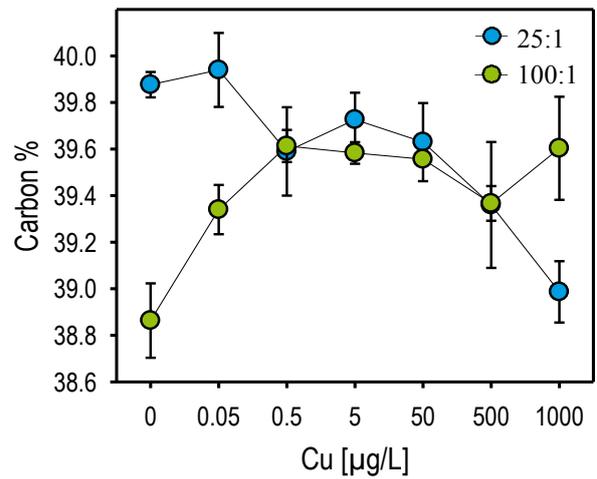
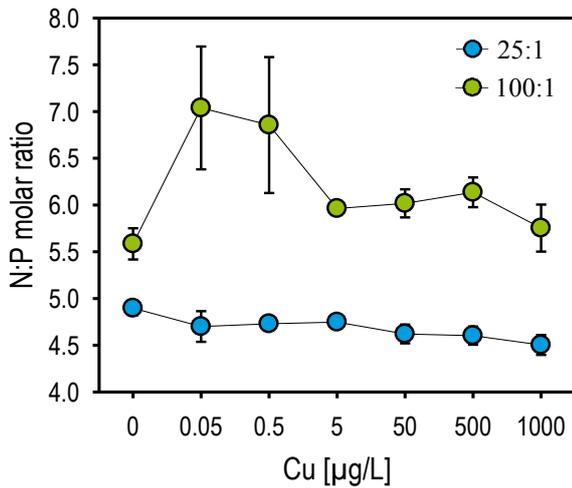
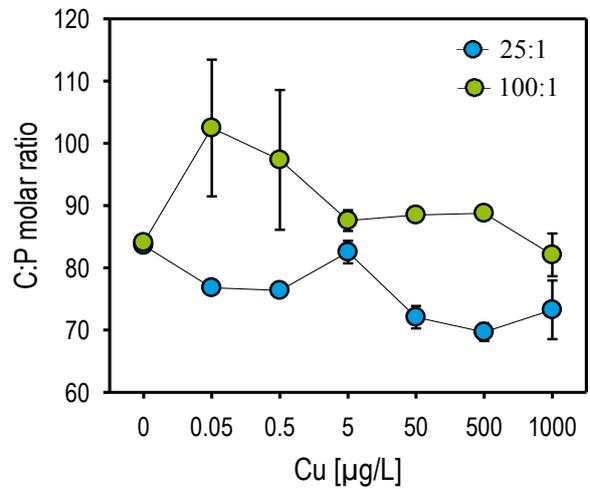
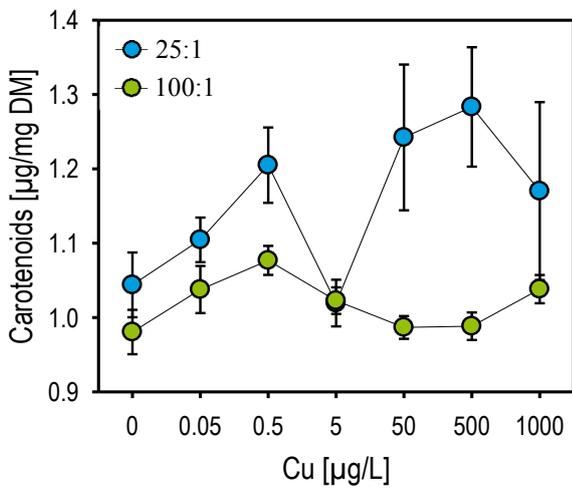
ANNEXE 15 : Courbes dose-réponses des caroténoïdes, des ratios C:P et N:P ainsi que des teneurs en C, N et P des M. spicatum en contact avec l'IPU ; pour les deux milieux de culture (25 :1 et 100 :1)



*ANNEXE 16 : Courbes dose-réponse des caroténoïdes, des ratios C:P et N:P ainsi que des teneurs en C, N et P des *M. spicatum* en contact avec le MSM ; pour les deux milieux de culture (25 :1 et 100 :1)*



ANNEXE 17 : Courbes dose-réponse des caroténoïdes, des ratios C:P et N:P ainsi que des teneurs en C, N et P des M. spicatum en contact avec le Cu ; pour les deux milieux de culture (25 :1 et 100 :1)



Evaluation des Myriophylles comme bioindicateurs des milieux aquatiques en zones agricoles

Résumé : Actuellement de nombreuses contaminations des écosystèmes aquatiques, notamment dans les zones agricoles avec les pesticides et les fertilisants, causent de nombreux problèmes sur leur fonctionnement ainsi que sur les organismes qu'ils abritent. C'est dans le but de répondre aux objectifs de la DCE (Directive Cadre d'Eau) qui vise en l'amélioration de la qualité des cours d'eau, que s'inscrit l'étude de l'impact des pesticides sur *Myriophyllum spicatum* ; une plante aquatique spécialement proposée comme nouvel organisme test par l'OCDE, pour les produits phytosanitaires. Dans ce projet, trois polluants ont été étudiés de manière indépendante (l'isoproturon (IPU), le mésosulfuron-méthyle (MSM) et le cuivre(Cu)) avec des concentrations allant de 0 à 1000 µg/L, et dans deux milieux nutritifs (N:P = 25:1 et N:P = 100:1) reflétant deux niveaux trophiques ; le tout en triplicats. A l'arrêt du test, des mesures morphométriques (longueur, biomasse) et physiologiques (contenu en pigments, polyphénols totaux, et ratios stœchiométriques) ont été réalisées. Les résultats montrent que le MSM est le polluant causant les plus d'inhibition sur les taux de croissance des plantes, puis s'ensuivent l'IPU et le Cu. Cependant les résultats physiologiques sont variables entre les polluants puisque l'isoproturon entraîne de manière générale, une hausse des pigments ; tandis que le mésosulfuron-méthyle diminue leurs concentrations et que le cuivre ne les modifie pas de manière significative. Néanmoins, pour les trois polluants, une toxicité plus forte avec le milieu présentant un excès de nitrates, ainsi que des interactions entre les milieux et les polluants ont pu être observées. Cette étude montre donc qu'afin de comprendre les effets des polluants sur l'environnement ; et notamment ici sur les écosystèmes aquatiques, il est nécessaire de réaliser des tests multistress sur les plantes aquatiques, tout en tenant compte de la stœchiométrie du milieu, qui peut refléter les déséquilibres des nutriments dans l'environnement.

Mots clés : isoproturon, mésosulfuron-méthyle, cuivre, *Myriophyllum spicatum*, ecotoxicologie, stœchiométrie

Evaluation of milfoil as bioindicators of aquatic agricultural areas

Abstract : Currently, numerous contaminations affect aquatic ecosystems, specifically pesticides and fertilizers in agricultural areas. These pollutants cause many problems for ecosystems functioning and the organisms that live in those. This study is inscribed within the context of the objectives of the WFD (water framework directive) that aims to improve the quality of aquatic systems. It is further focusing on the impact of pesticides on the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*, a species currently proposed by the OECD as a new test organism, specifically for phytosanitary products. In this project, three pollutants were studied independently (isoproturon (IPU), mesosulfuron-methyl (MSM) and copper (Cu)) at concentrations ranging from 0 to 1000 µg/L, and in two medias with different stoichiometry (N:P = 25:1 and N:P = 100:1), reflecting two trophic levels; each condition in triplicate. At the end of the test, morphometric (length, biomass) and physiological (pigments, total polyphenol content, plant stoichiometry) measures were carried out. The results show different toxicities of the pollutants on the plants; with the highest effects by MSM, followed by IPU and little effects by Cu on growth parameters. However, isoproturon generally lead to, higher pigment contents while mesosulfuron-methyl lead to a decrease, and copper did not cause many changes. However, for all three pollutants, a higher toxicity was observed in the nitrate-rich medium, and we observed for several parameters significant interactions between the factors medium and pollutant. This study shows that in order to better understand the effects of pollutants in the environment; here specifically on aquatic ecosystems, it is necessary to carry out multistress tests on aquatic plants, taking into account the stoichiometry, i.e. possible imbalances of nutrients, in the environment.

Key words : isoproturon, mesosulfuron-methyl, copper, *Myriophyllum spicatum*, ecotoxicology, stoichiometry