



## 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](mailto: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

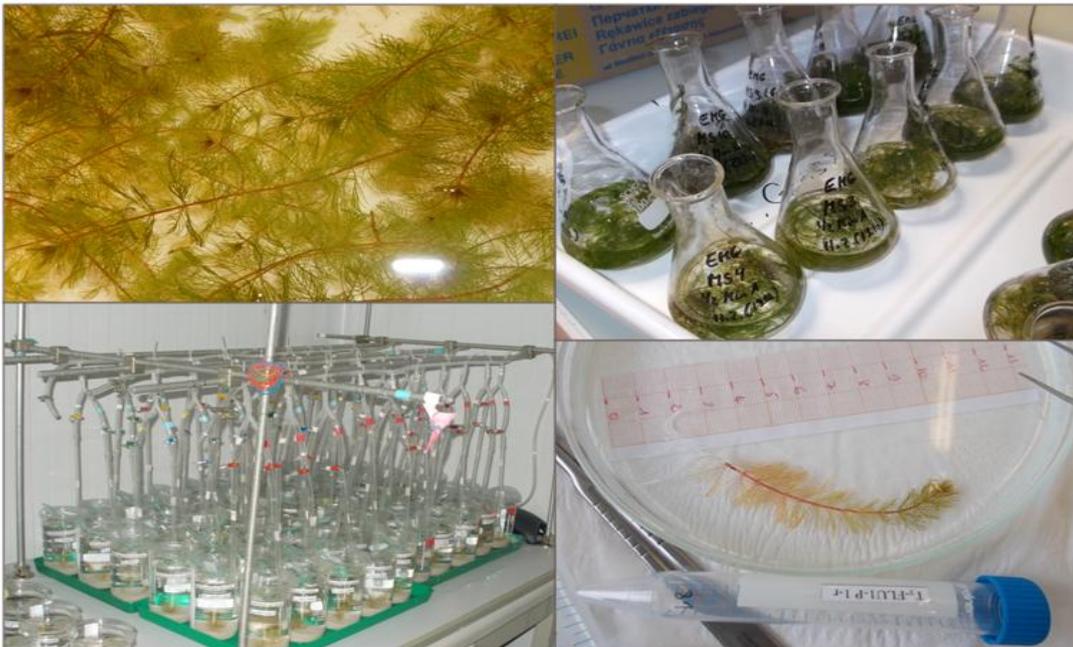
[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

Faculté des Sciences et technologies  
Département géosciences  
Master 2 Sols, Eaux et Environnement

## Rapport de Stage

### Etude de *Myriophyllum spicatum* comme bioindicateur de la qualité des eaux en zone agricole



TRAORE Mohamed  
2012-2013

Responsables de stage

DE JUNET Alexis  
DOUSSET Sylvie  
GROSS Elisabeth Maria

## **Préambule**

Cette partie de l'étude de *Myriophyllum* comme bioindicateur de la qualité des eaux en zone agricole du projet Myri-aide, dans le Programme National de Recherche- Environnement-Santé-Travail, a été réalisé au Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC).

Le LIEC est une unité mixte de recherche (UMR 7360) créée en janvier 2013 par fusion de l'UMR 7146 LIEBE, de l'UMR 7137 LIMOS et de l'UMR 7569 LEM.

L'objectif premier du LIEC est de comprendre le fonctionnement des écosystèmes continentaux fortement perturbés par l'activité humaine, avec pour finalité leur réhabilitation. Dans ce but, nous mettons en œuvre une recherche interdisciplinaire alliant les concepts et méthodes de la géochimie environnementale, de la science du sol, de l'écologie microbienne, de la physico-chimie colloïdale, de l'écotoxicologie, de l'écologie fonctionnelle.

Cinq thématiques structurent l'activité scientifique du LIEC :

- Eco-dynamique et écotoxicité des contaminants
- Fonctionnement des écosystèmes perturbés
- Diversités et interactions biotiques et abiotiques
- Théorie et modélisation intégrée des systèmes
- Caractérisation et remédiation des milieux anthropisés

Le LIEC dépend de deux Etablissements : le CNRS et l'Université de Lorraine

## **Remerciement**

C'était un grand bonheur de rencontrer des personnes si spéciales, Mme DOUSSET, Mr DE JUNET et Mme GROSS. Je ne pourrai vous remercier assez car grâce à vous j'ai passé les meilleurs moments de mon cursus. Vous avez tellement été là quand il le fallait, encore merci pour tout ce que vous m'avez appris.

Qu'il me soit permis de présenter ici mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans réussite de ce stage :

- Mes chers parents pour leur soutien moral et matériel
- Mes amis et collègues

Un merci très spécial à tout le personnel du LIEC pour l'accueil et le soutien que vous m'avez accordé.

Merci !!!

## Sommaire

Introduction .....	1
I. Synthèse bibliographique .....	2
1. Pollution par les pesticides .....	2
2. Notion de Bioindicateurs ou indicateurs biologiques de pollution.....	3
3. <i>Myriophyllum spicatum</i> (Myriophylle à épi).....	4
3.1. Facteurs de croissance du <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	4
3.2. <i>Myriophyllum spicatum</i> comme espèce bioindicatrice de la qualité des eaux .....	4
4. Effet des pesticides sur <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	5
4.1. Doses et type de mélange de pesticides appliquées.....	5
4.2. Effets sur la croissance de la plante :.....	6
4.3. Effets sur la capacité photosynthétique : .....	6
5. <i>Myriophyllum spicatum</i> et production de métabolites secondaires .....	6
6. Cultures de <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	8
6.1. Conditions de culture.....	8
6.2. Milieu de culture.....	8
7. Contexte de l'étude .....	8
II. Matériels et méthodes.....	8
1. Culture des apex de <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	8
2. Les molécules utilisées .....	9
2.1. Choix de molécules .....	9
2.2. Modalités de traitement .....	10
3. Echantillonnages .....	11
4. Dosage des molécules pesticides.....	11
5. Croissance de <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	12
6. Dosage des chlorophylles de l'anthocyane et des polyphénols totaux .....	12
7. Dosage du phosphore, du carbone et de l'azote .....	13
8. Analyses statistiques.....	13
III. Résultats et discussions .....	13
1. Evolution des teneurs en pesticides présents dans la solution .....	13
2. Effets des pesticides sur la croissance de <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	15
2.1. Effets sur la longueur des tiges et des racines .....	15
2.2. Effets sur la masse humide et sèche des tiges et des racines de <i>Myriophyllum spicatum</i> .	17
3. Effets sur les teneurs en carbone, azote et phosphore de <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	19

4. Effets sur les teneurs en chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i> de <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	20
5. Effets sur les teneurs en métabolites secondaires .....	22
5.1. L'anthocyanine .....	22
5.2. Teneurs en polyphénols totaux (PT).....	23
Conclusions et perspectives.....	23
Références bibliographiques .....	25

## Liste des figures

Figure 1 : Les processus de transfert des pesticides des zones agricoles vers les masses d'eau. ....	3
Figure 2 : Formules de 5 polyphénols produits par <i>Myriophyllum spicatum</i> (Gross 1999 ; Nakai et al. 2000).....	7
Figure 3 : Les différentes modalités des traitements et concentrations appliquées .....	10
Figure 4 : Modalités utilisées et béciers tests avec et sans sédiment.....	11
Figure 5 : Teneurs des herbicides en solution par contamination simple, par contamination multiple (mélange $\Sigma 100$ ) et par contamination multiple (mélange $\Sigma 300$ ) pendant les 21 jours de l'étude. ....	15
Figure 6 : Suivi temporel de la longueur des tiges et des racines des plantes <i>Myriophyllum spicatum</i> . 16	
Figure 7 : Biomasses humides de <i>Myriophyllum spicatum</i> pour les 4 temps de mesure, (A) pour les tiges et (B) pour les racines .....	18
Figure 8 : Biomasses sèches de <i>Myriophyllum spicatum</i> pour les 4 temps de mesure, (A) pour les tiges et (B) pour les racines.....	18
Figure 9 : Teneur en carbone (A), azote (B) et phosphore (C) de <i>Myriophyllum spicatum</i> pour les 4 temps de mesure .....	20
Figure 10 : Teneur en chlorophylle de <i>Myriophyllum spicatum</i> pour les 4 temps de mesure, (A) pour chlorophylle <i>a</i> et (B) pour chlorophylle <i>b</i> .....	21
Figure 11 : Teneur en anthocyanine de <i>Myriophyllum spicatum</i> pour les 4 temps de mesure.....	22
Figure 12 : Teneur en polyphénols totaux de <i>Myriophyllum spicatum</i> pour les 4 temps de mesure.....	23

## Liste des tableaux

Tableau 1 : molécules étudiées et leurs principales propriétés physiques (footprint-PPDB 2013).....	10
Tableau 2 : temps de demi-vie (en jours) des trois herbicides étudiés pour les différentes modalités..	15

## Introduction

La dégradation de la qualité des eaux reste un phénomène de plus en plus inquiétant. Les ressources en eau superficielle et souterraine sont touchées par des polluants dont les plus préoccupants sont les produits phytosanitaires. Malgré qu'il y a des efforts entrepris dans la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE) et du plan Ecophyto 2018. Le plan Ecophyto 2018 est en France l'une des mesures proposées par le Grenelle de l'environnement fin 2007, afin de réduire de 50% l'usage des pesticides d'ici 2018 (Ecophyto 2018, 10 septembre 2008).

Ces substances chimiques sont parmi les polluants organiques rencontrés dans l'environnement ; du fait de leurs propriétés physicochimiques, certains pesticides sont rencontrés même si ils ne sont plus utilisés (Markert et al. 2003). En dépit de l'intérêt de leur usage, ils détériorent la qualité des eaux de surface et des nappes par le ruissellement et le lessivage de terrains agricoles (Soulsby et al. 2001; Zalidis et al. 2002; Davies et al. 2003). En Lorraine, des dispositifs rustiques de remédiation ont été mis en place afin de contribuer à la restauration de la qualité des eaux (Vallée et al. 2013). Le suivi de l'efficacité de ces dispositifs peut être renforcé avec l'implantation d'indicateurs biologiques de pollution. Un bioindicateur est un organisme ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème et de mettre en évidence, aussi précocement que possible, leurs modifications naturelles ou provoquées (Blandin 1986 ; Bispo et al. 2009). Ces organismes peuvent être présents ou non dans leur écosystème, et sont capables d'informer sur les conditions écologiques existantes dans le milieu contaminé.

Les macrophytes aquatiques jouent un rôle important dans l'écosystème, par leur fonction dans les cycles du carbone et des nutriments, et leur action de producteur primaire et d'abris pour le phytoplancton (Knauer et al. 2008 ; Coutris et al. 2011). *Myriophyllum spicatum* est un macrophyte aquatique submergé dicotylédone, proposé par l'OCDE comme organisme test. C'est une plante ubiquiste reconnue par sa capacité à produire des antioxydants lui permettant de gérer le stress apporté par les pesticides (Leu et al. 2002). *Myriophyllum spicatum* est une espèce qui pourrait être utilisée dans la biosurveillance de pollutions (Selim et al. 1989).

L'objectif de ce travail est d'étudier *Myriophyllum spicatum* comme bioindicateur de pollution des pesticides par des essais au laboratoire. L'étude portera sur l'effet sur *Myriophyllum spicatum* de trois herbicides appliqués en Lorraine, ces molécules seront utilisées en contaminations simples et en multicontaminations. Nous étudierons leurs effets sur :

- La croissance de la plante par des mesures de longueur et de biomasse
- La photosynthèse par l'évaluation de la production de chlorophylle *a* et *b*
- Les teneurs en carbone, azote et phosphore de *Myriophyllum spicatum*
- La production de métabolites secondaires comme antioxydants : les anthocyanes et les polyphénols totaux.

## I. Synthèse bibliographique

### 1. Pollution par les pesticides

Conformément à la directive du conseil européen du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (91/414/CEE), les produits phytopharmaceutiques sont l'ensemble des substances actives ou des préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur. Ils sont destinées à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action ;
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives ;
- assurer la conservation des produits végétaux,
- détruire les végétaux indésirables ou détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

L'utilisation de ces produits s'est intensifiée dans les années 1950. Après la seconde guerre mondiale l'industrie chimique a progressé très rapidement (Oturan et al. 2007). C'est l'essor de la chimie organique qui a permis une évolution dans la fabrication des produits de synthèse. Et ont contribué aux mesures relatives à l'autosuffisance alimentaire de plusieurs pays dans le monde. Malgré cet avantage de protection des cultures, ces pesticides sont reconnus comme une menace pour l'environnement. Dans la Figure 1 sont illustrées des voies de transfert des pesticides dans l'environnement. Les pesticides épandus qui ne sont pas volatilisés percolent de la zone racinaire à l'aquifère, ou sont transférés directement à la rivière par les ruissellements de surface et de sub-surface, ou indirectement par la contribution de la nappe. Ils sont partiellement dégradés dans tous les compartiments traversés. Les pesticides sont aussi directement appliqués dans les eaux de surface, afin d'éliminer les plantes envahissantes dans ces écosystèmes aquatiques (Selim et al. 1989 ; Christopher et al. 1992 ; Brown et al. 2004 ; Belgers et al. 2011).

Les mesures pour atténuer cette problématique environnementale de pollution, consistent à intervenir sur les procédés d'usage et sur les flux de transfert des pesticides. En Lorraine sont utilisés des dispositifs rustiques de filtration. Ces derniers permettent de réduire la concentration en pesticide des eaux drainées vers les cours d'eau. Ces eaux chargées en pesticide dépassent 5 µg/l dans certains points de prélèvement (**Annexe 1**). Ces doses bien que faibles, induisent des effets sur l'ensemble des organismes du milieu aquatique contaminé, surtout du fait que certaines molécules sont persistantes (Belgers et al. 2011 ; Selim et al. 1989). L'activité toxique d'un pesticide est un phénomène lié à sa nature, à sa concentration et à sa durée d'exposition (Belger et al. 2011 ; Bounias 1999).

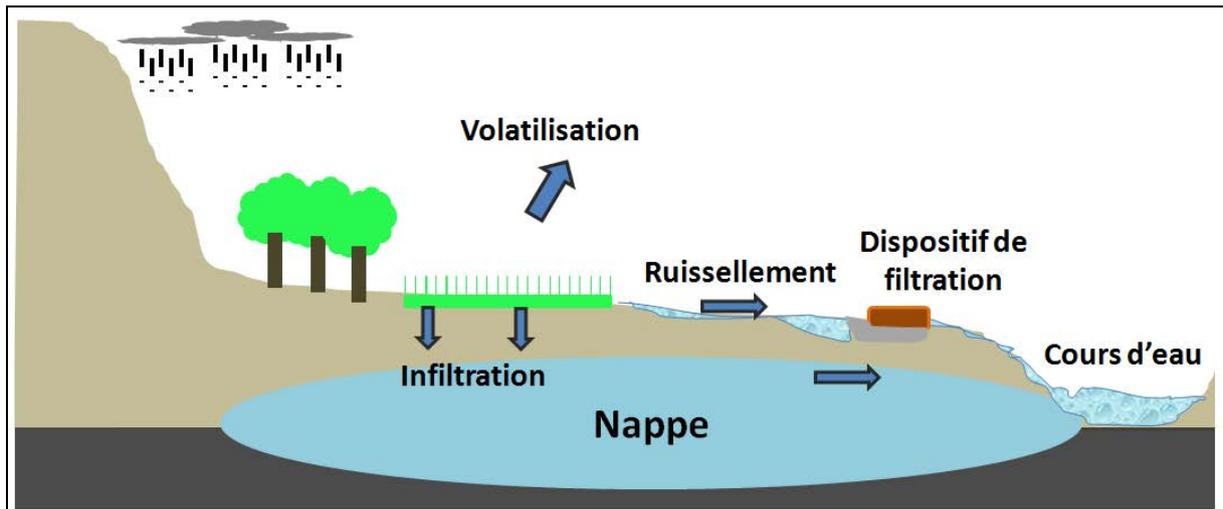


Figure 1 : Les processus de transfert des pesticides des zones agricoles vers les masses d'eau.

## 2. Notion de Bioindicateurs ou indicateurs biologiques de pollution

Le terme de bioindicateur a un sens très large et désigne tout organisme ou système biologique utilisé pour apprécier une modification de la qualité d'un milieu (Blandin 1986). Un bioindicateur est un organisme, une partie d'un organisme ou un groupe d'organismes qui peut fournir des informations sur la qualité de l'environnement ou d'une partie de l'environnement (Markert et al 1999). La bioindication consiste à utiliser des paramètres biologiques afin de déterminer un niveau de qualité de l'environnement. Les macrophytes aquatiques sont très souvent utilisés dans cette perspective, en raison de leur caractère intégrateur, de leur mobilité réduite, de leur cycle de vie, ainsi que de leurs abondances et de leur variété (Carbiener *et al.* 1995). De façon générale la bioindication en milieu aquatique a pour finalité soit d'indiquer un niveau de perturbation du milieu, soit d'informer sur un niveau de contamination de ce milieu (Adam 2011). L'utilisation de bioindicateurs fait appel au concept de biosurveillance, qui consiste à décrire et à comprendre des phénomènes environnementaux par l'intermédiaire d'organismes indigènes ou non. En outre, l'usage d'un bioindicateur a l'avantage d'être moins coûteux que les méthodes classiques de suivi de la qualité de l'environnement (Markert et al 1999).

Les bioindicateurs sont classés selon deux modes de réaction (Markert et al 2008). Les indicateurs d'accumulation ont la propriété d'accumuler un ou plusieurs composés se trouvant dans leur environnement, ils manifestent une augmentation de la concentration des composés chimiques sans perturber la croissance de l'organisme (Franzaring et al. 2007). Les indicateurs d'effets ou d'impacts génèrent des effets spécifiques en réponse à l'exposition à une substance ou un groupe de substances (Markert et al 2008). Mais un organisme peut avoir à la fois les deux réactions de bioindication, c'est-à-dire qu'un bioindicateur d'effet peut être accumulateur et inversement (Markert et al. 1999). En vue d'obtenir des résultats pertinents, un bioindicateur doit être présent dans une vaste gamme de milieux, et devrait avoir des réactions faces aux troubles engendrés par les contaminants et autres organismes. Ces réactions sont liées à la nature de l'organisme considéré et elles doivent être facilement évaluées.

### **3. *Myriophyllum spicatum* (Myriophylle à épi)**

Les myriophylles sont des genres de macrophytes aquatiques dicotylédones de la famille des Haloragacées, se trouvant presque sur tous les continents de notre planète sauf en antarctique (Cook 1985 ; Getsinger et al. 1997 ; Craig et al. 1990). Environ 39 espèces, elles sont généralement spécifiques à des régions où elles sont natives, notamment le *Myriophyllum aquaticum* qui est natif du sud du continent américain (Kane et al. 1991), le *Myriophyllum sibiricum* qui est natif du nord du continent américain, et aussi *Myriophyllum spicatum* qui est natif d'Europe, Asie et du Nord de l'Afrique (Aiken et al. 1979 ; Couch et Nelson 1985 ; Verma et al 1993 ; Newman 2004 ; Onion et Gross 2004).

*Myriophyllum spicatum* est une hydrophyte entièrement submergée avec des feuilles finement découpées, et des tiges rougeâtres. Il est caractérisé par une croissance rapide avec un fort développement dans l'eau à des profondeurs variant de 1 à 4 m où il forme un couvert végétal en canopée (Nichol et al 1986 ; Cason et Roost 2011). S'enracinant au fond de la masse d'eau sur les sédiments de préférence sableux, le myriophylle à épi peut atteindre une longueur de 7 à 10 m (Aiken et al. 1979). Sa reproduction asexuée facilite sa multiplication dans le milieu par un transfert de bourgeons par les organismes aquatiques et aussi par la dynamique de l'eau (Vassios et al. 2011). Ce macrophyte proposé par l'OCDE possède plusieurs propriétés lui donnant des caractéristiques de bioindicateur.

#### **3.1. Facteurs de croissance du *Myriophyllum spicatum***

*Myriophyllum spicatum* est une plante très sensible à certains facteurs environnementaux contribuant à la réduction des conditions favorables à sa croissance, sa multiplication, sa distribution, sa propagation et sa physiologie. Le développement racinaire de cette plante est influencé par la turbidité de l'eau. Plus l'eau est trouble plus les racines ont du mal à se développer (Titus et al. 1979 ; Madsen et al. 1989 ; Craig et al. 1990; McGregor et al. 2008). Son fort développement au printemps s'explique par le fait qu'à cette saison la température augmente dans les masses d'eaux. La température favorable à la croissance et à la photosynthèse du *Myriophyllum spicatum* est comprise entre 15 et 35 °C. La granulométrie des sédiments à sable fin lui est favorable, car elle permet aux racines de se développer abondamment et d'avoir accès aux éléments nutritifs (Aiken et al. 1979 ; Craig et al. 1990).

#### **3.2. *Myriophyllum spicatum* comme espèce bioindicatrice de la qualité des eaux**

Cette espèce est identifiée comme l'une des plantes aquatiques les plus sensibles aux pesticides (Netherland et al. 1997; Davies et al. 2003 ; Knauert et al. 2010). Les effets qu'elle manifeste faces à ces produits chimiques suscitent qu'elle peut servir de bioindicateur de la qualité des eaux dans les zones agricoles. Cette plante ubiquiste renferme des propriétés qui permettent un bon maintien de la plante dans le laboratoire ainsi que dans le milieu naturel ; ces propriétés lui permettent aussi de faire face à d'autres organismes dans son écosystème. *Myriophyllum spicatum* est une espèce capable de dominer des communautés de macrophytes pendant de nombreuses années (Aiken et al. 1979 ; Kimbel 1982 ; Trebitz et al. 1993 ; Madsen et al 2002 ; Cason et Roost 2011).

Les anomalies observées sur la plante sont des moyens d'évaluation de l'effet de la toxicité des pesticides (McGregor et al. 2008 ; Lewis, 1995). Ces stress sont souvent visibles à l'œil

ou en évaluant des paramètres morphologiques et physiologiques de la plante. Les effets sur la croissance sont évalués au moyen de mesures de tailles et de masses sur les tiges et les racines, l'évaluation des pigments et métabolites secondaires produits par la plante peut également renseigner sur l'effet des pesticides sur ce macrophyte. Cette plante déclarée comme bioaccumulateur de métaux (Sanchez et al. 2007), est aussi capable de bio-accumuler les pesticides. En effet Vassios et al. (2011) ont démontré que *Myriophyllum spicatum* absorbe 0,5% de la quantité herbicide appliqué à 24h mais cette quantité atteint 0,95% à 72 h d'exposition. L'absorption par ce macrophyte dépend de la quantité disponible en pesticide. Cette espèce de myriophylle absorbe 1,05µg d'une dose de 200 µg/l tandis qu'il absorbe 4,06 µg d'une dose de l'herbicide imazamox de 800 µg/l.

#### **4. Effet des pesticides sur *Myriophyllum spicatum***

Les effets de pesticides sont mis en évidence en se basant sur des mesures liées à la morphologie et à la physiologie de la plante (Hanson et al. 2004 ; Arts et al. 2008) :

- la longueur des tiges (principales et secondaires)
- les poids secs et humides de la biomasse formée,
- la biomasse racinaire
- la production de pigments et de métabolites secondaires

Ces mesures permettent une interprétation de la multiplication et du développement de la plante dans un écosystème. Les effets peuvent fortement varier en fonction des paramètres (Knauer et al. 2012).

##### **4.1. Doses et type de mélange de pesticides appliquées**

L'importance de l'effet d'un pesticide sur la plante varie en fonction de la dose appliquée et aussi du temps d'exposition. Netherland et al. (1997) ont montré qu'une dose 5 µg/l de fluridone peut avoir des conséquences considérables sur la croissance de la plantes avec une réduction de 100% de la biomasse sèche. Certains pesticides n'ont pas d'effet lorsqu'ils sont appliqués seuls, mais lorsqu'ils se trouvent en mélange avec d'autres molécules peuvent induire des effets importants sur la plante. C'est le cas du carfentrazone-éthyle une molécule non persistante, caractérisée par un temps de demi-vie très court de 0,5 jour (footprint-PPDB, 2013). Cette molécule appliquée seule à une dose supérieure à 150 µg/l, ne peut avoir un contrôle total sur la croissance du *Myriophyllum spicatum*, mais une dose de 100 µg/l de la même molécule mélangée à une dose de 2,4 D (100 µg/l n'ayant pas aussi un contrôle total sur la plante) peut en 2 semaines causer une réduction de la biomasse totale à 100% (Gray *et al.* 2007). Cette étude fait ressortir une des particularités de la multicontamination par des mélanges de pesticides tels qu'ils sont retrouvés dans l'environnement. L'action d'un mélange de pesticides est plus accentuée que celle d'une simple contamination.

Par ailleurs l'effet d'une molécule peut être accentué par la présence d'un autre organisme qui se lie à la plante. Par exemple l'endophyte *Mycoleptodiscus terrestris* réduit la capacité de résistance de cette plante (Verma et al. 1993 ; Nelson et al. 1998 ; Shearer et al. 2002 ; Nelson et al. 2005a et 2005b). C'est pourquoi pour une étude concernant *Myriophyllum spicatum*, il est bon de s'assurer de l'absence de tout autre organisme pouvant générer une influence.

#### **4.2. Effets sur la croissance de la plante :**

Le taux de croissance est estimé par des mesures régulières des longueurs ou des masses des tiges et des racines. A 21 jours de culture de cette plante, a été enregistré un taux de croissance se basant sur sa masse sèche de  $0,03 \pm 0,01$  par jour (Coutris et al. 2011). Variant en fonction des propriétés physicochimiques et aussi des modes d'action des pesticides appliqués, le taux de croissance change également suivant la dose ainsi que le temps d'exposition de la plante. Toutes doses de diquat appliquées sur *Myriophyllum spicatum* à des concentrations entre 0 et 0,19 mg/l pendant trois semaines d'exposition, ont causé une réduction de la biomasse des tiges de 97 à 100% (Skogerboe et al. 2006). Tout comme les résultats obtenus par Glomski et al. (2010) montrant qu'à 7 semaines d'exposition, la biomasse de Myriophylle est significativement réduite par les deux pesticides imitateurs de l'auxine, le Triclopyr (avec une réduction de 90 à 100%) et le 2, 4 D (avec une réduction de 42 à 100%) à des concentrations de 25 ; 70 ; 100 et 250 µg/l. Toutefois sachant que l'effet escompté ne dépend pas uniquement de la concentration mais aussi du temps d'exposition ; une réduction de 85% de la croissance a été observé avec différentes concentrations de triclopyr (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2,5 mg/l) appliqué pendant des temps d'exposition différents (72 ; 48 ; 36 ; 24 et 18 heures) (Netherland et al. 1992). Une dose de 5 µg/l de fluridone réduit environ de 28 à 100% à des temps d'exposition de 30 à 90 jours alors qu'une dose de 10 à 20 µg/l réduit rapidement à 90% la biomasse (Netherland et al. 1997). Dans certains cas, il n'y a pas d'effet sur la croissance mais l'influence se manifeste sur d'autres paramètres comme les pigments ou les métabolites secondaires (Knauert et al. 2010).

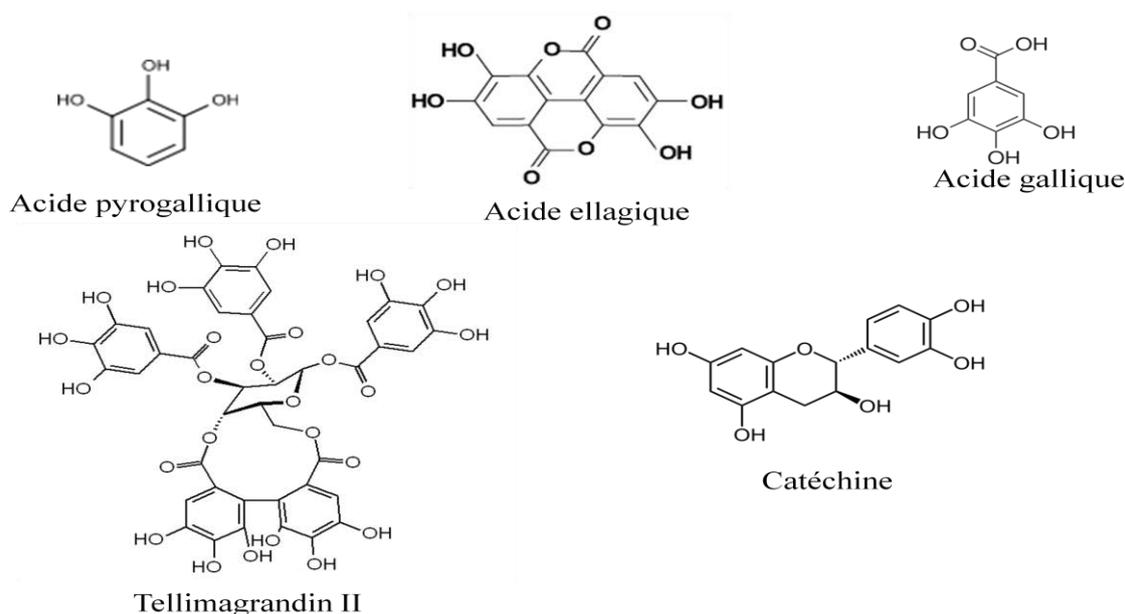
#### **4.3. Effets sur la capacité photosynthétique :**

Les pesticides reconnus pour avoir une action inhibitrice de la photosynthèse, agissent significativement sur ce processus. Une réduction de la capacité photosynthétique se produit en appliquant de l'atrazine, de l'isoproturon ou du diuron sur le myriophylle (McGregor et al. 2008 ; Coutris C et al 2011). Au bout de 2 à 5 jours d'exposition, une réduction de 30 à 60% de la photosynthèse de la plante est induite par ces molécules (l'atrazine, de l'isoproturon ou du diuron) à des concentrations de 70, 14 et 5 µg/l respectivement aux trois molécules qu'ils soient aussi bien en contamination simple que multiple (Knauert et al. 2010). Tout comme les effets sur la croissance, ceux sur la photosynthèse dépendent également de la concentration appliquée sur *Myriophyllum spicatum*. Le fluridone présente également un effet significatif sur la plante à une dose supérieure à 5µg/l, par une réduction à plus de 40% de la capacité photosynthétique du macrophyte. La perturbation de la photosynthèse dans certains cas peut être temporaire, par la suite on observe une restauration de la capacité photosynthétique. L'atrazine influence également la photosynthèse des macrophytes, à des doses comprises entre 50 et 100 µg/l mais avec une possibilité de restauration de la photosynthèse après 2 ou 3 semaines d'exposition (Kemp et al 1985).

#### **5. *Myriophyllum spicatum* et production de métabolites secondaires**

Les pesticides qui influencent *Myriophyllum spicatum*, sont susceptibles d'avoir un effet sur la production de métabolites secondaires, mais l'influence des herbicides sur ces métabolites secondaires est très peu étudié.

Les métabolites secondaires produits par *Myriophyllum spicatum* sont des substances allélochimiques, ces dernier lui permettent d'effectuer des interactions biochimiques avec d'autres organismes (Gross 1999). Ces substances allélochimiques sont des composés phénoliques (**Figure 2**) (Hättenschwiler et Vitousek 2000). Les deux principaux groupes de polyphénols sont les composés à poids moléculaire élevé (les polyphénols hydrolysables : les éllagitannins) et les composés à faible poids moléculaire (les polyphénols flavonoïdes : les anthocyanes) (Hättenschwiler et Vitousek 2000 ; Samuel Oliver Neill 2002). Ces composés phénoliques jouent un grand rôle dans les mécanismes de défense de cette plante car ils permettent de tuer des bactéries, des épiphytes et des algues (Haslam 1989 ; Gross et al. 1994 ; Leu et al. 2002). La résistance de *Myriophyllum spicatum* dans le milieu face à divers stress est due à cette forte production de composés phénoliques. Le contact direct entre les espèces d'un écosystème favorise ce transfert de composés allélochimiques (Gross 1999). En condition axénique 6 à 15% de la masse sèche du *Myriophyllum spicatum* est composée du métabolite secondaire, dont le plus important produit par cette plante est représenté par le Tellimagrandin II (Gross et al. 1996 ; Gross 1999 ; Leu et al 2002).



**Figure 2 : Formules de 5 polyphénols produits par *Myriophyllum spicatum* (Gross 1999 ; Nakai et al. 2000)**

Les études de ces métabolites secondaires du *Myriophyllum spicatum* sont surtout basées sur les effets sur des phytoplanctons, des bactéries et des insectes herbivores (Gross et Sutfield 1994 ; Leu et al. 2002 ; Gross et al 2003). Les polyphénols extraits du *Myriophyllum spicatum* à 1.6 mg/l ont causé une inhibition de 60% de l'exoenzyme algal, la Phosphatase Alcaline (PAL) (Gross et al 1994 ; 1996). De même 10% de la PAL de la cyanobactérie *Trichormus variabilis* sont inhibées par une dose de Tellimagrandin II à 0,2 mg/l, 40% d'inhibition par une dose de 3.4 mg/l (Gross et al 1996). L'algue *Mycrocystis aeruginosa* est également affectée par d'autres polyphénols produits par le *Myriophyllum spicatum* ; 50% de sa croissance sont affectés par des doses de 0,65 ; 1 ; 5,5 et 5,1 mg/l respectivement d'acide pyrogallique, d'acide gallique, de catéchine et d'acide ellagique (Nakai et al 2000).

## **6. Cultures de *Myriophyllum spicatum***

### **6.1. Conditions de culture**

Le développement rapide de cette plante au printemps est dû au fait d'une combinaison de la température et de la lumière pendant cette saison. Les cultures en laboratoire de *Myriophyllum spicatum* sont effectuées à des températures variant entre 19 et 25°C sur un cycle de temps dans lequel le jour et la nuit diffèrent par une luminosité d'intensité allant de 30 à 650  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  (Kemp et al. 1985 ; Selim et al. 1989 ; Kane et al. 1991 ; Netherland et al. 1992 ; Leu et al. 2002 ; Gross 2003 ; Knauer et 2008).

### **6.2. Milieu de culture**

Les cultures de cette plante peuvent s'effectuer par voie axénique ou non axénique, mais sa croissance diffère entre les deux modes de culture. *Myriophyllum spicatum* est une plante capable d'absorber les éléments nutritifs par leurs tiges, feuilles et racines. L'usage de nutriment liquide est généralement mise en application dans les cultures en milieu sans sédiments (Kane et al. 1991 ; Christopher et al. 1992 ; Nelson et al 2005 ; Knauer et al. 2006 ; Pouvey et al. 2007 ; Cray et al. 2007 ; Glomski et al. 2010). Dans ce cas la plante se trouve dans un milieu de culture riche en éléments nutritifs où l'absorption des ces éléments est facilement effectué au niveau des tiges, feuilles et racines. Dans ce type de culture la plante développe moins de racines que dans un milieu à sédiments. Dans les milieux de culture avec sédiments, les nutriments utilisés sont mélangés dans les sédiments (Nelson et al. 1993 ; Sprecher et al 1995). Ceci permet de favoriser l'adsorption des éléments minéraux sur les particules des sédiments. Ce type de culture permet un bon développement de la plante et une limitation de la prolifération d'algue (Knauer et al. 2006 ; Knauer et al. 2008). Dans ces types de culture, il faut privilégier les sédiments artificiels car ils diminuent le risque lié à la prolifération d'algue que peut présenter les sédiments naturels qui sont recueillis au niveau des lacs et des rivières (Knauer et al. 2006 ; Feiler et al. 2013).

## **7. Contexte de l'étude**

L'originalité de cette étude vient du fait que peu d'études écotoxicologiques se sont focalisées sur les macrophytes dicotylédones. Cette étude portée sur *Myriophyllum spicatum* s'effectuera par l'évaluation de paramètres influencés par les pesticides, notamment la croissance, la production de pigments et de métabolites secondaires. Les paramètres morphologiques sont les indicateurs dont l'évaluation est beaucoup plus simple que les paramètres physiologiques. Les paramètres physiologiques quant à eux, leur étude est d'une complexité qui pourra être la cause des rares études sur le stress oxydatif engendré par *Myriophyllum spicatum*. Les molécules utilisées et les concentrations appliquées tiennent compte de la pollution telle qu'elle se trouve dans l'environnement.

## **II. Matériels et méthodes**

### **1. Culture des apex de *Myriophyllum spicatum***

Des boutures de *Myriophyllum spicatum* issues de cultures axéniques au LIEC de Bridoux, ont permis de lancer une première phase de préculture. Ces précultures ont été faites dans des

aquariums de dimension 35,5 x 26 x 14 cm. L'objectif de cette première phase était de produire une quantité suffisante de plantes pour les manipulations. Ces conditions sont strictement liées au milieu de culture qui se définit par la nature du sédiment et de la solution de culture, mais aussi de l'intensité de la lumière. Dans cette étude le choix s'est porté sur un sédiment artificiel et une solution de culture (**Annexe 2**), afin de limiter tout risque de prolifération d'algues et d'autres microorganismes pouvant influencer la croissance du *Myriophyllum spicatum*. La chambre de culture était éclairée par des lampes sodium haute pression de 400W, les plantes se trouvaient à une intensité lumineuse de 3100 à 3800 lx à une température de 20±2°C et une photopériode de 14 heures à la lumière et 10 heures à l'obscurité.

La multiplication de ces plantes a permis de lancer les manipulations pendant lesquelles les cultures ont été effectuées dans des béciers de 600 ml. Dans chaque bécier ont été plantés deux apex de 3,5 à 4 cm. Ces apex ont été plantés à 1 cm de profondeur dans une couche de sédiment de 120 g pour faciliter l'accès des plantes aux nutriments dans les sédiments; et dans chaque bécier a été rajouté un volume de 500 ml de solution de culture. Les plantes ont été laissées pendant deux semaines afin qu'elles s'adaptent au milieu.

## 2. Les molécules utilisées

### 2.1. Choix de molécules

Le choix de molécules s'est effectué en se basant sur les critères suivants :

- Dans un premier temps, l'attention a porté sur les molécules appliquées dans les zones agricoles en Lorraine. Les 81 molécules dosées par l'ANSES (**Annexe 1**) au niveau des dispositifs rustiques de filtration ne sont pas toutes retrouvées car certaines sont inférieures au seuil de quantification.
- les propriétés physicochimiques et les modes d'action des molécules fortement présentes, ont été pris en compte (solubilité, coefficient d'adsorption, temps de demi-vie...).
- La limite de quantification des pesticides au laboratoire et la durée prévue pour les manipulations ont permis de définir la dose appliquée.

Le choix s'est finalement porté sur trois herbicides le flufénacet, l'isoproturon et le mésosulfuron-méthyle. Ces molécules possèdent chacune un mode d'action particulier ; le flufénacet est un inhibiteur de la synthèse des lipides, l'isoproturon agit sur la photosynthèse et le mésosulfuron-méthyle inhibe la synthèse des acides aminés (ACTA 2011). Les principales propriétés physicochimiques sont données dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1 : molécules étudiées et leurs principales propriétés physiques (footprint-PPDB 2013)**

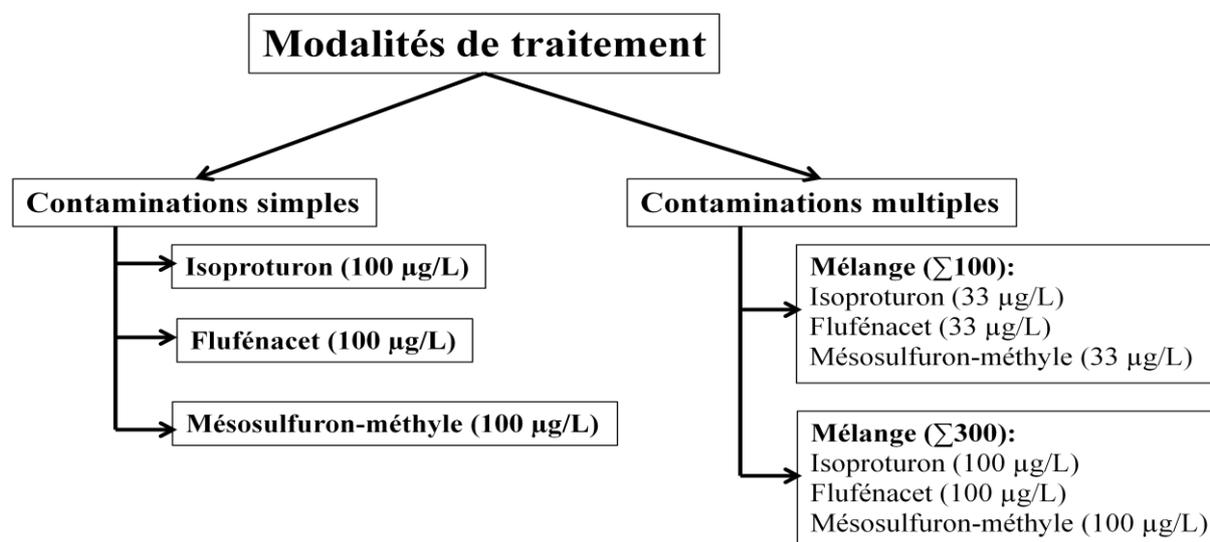
Molécules	Voies de pénétration et modes d'action	Solubilité à l'eau (mg/L)	Coefficients d'adsorption ( $K_f$ )	DT <sub>50</sub> *	Pression de vapeur à 25°C (mPa)
<b>Flufénacet</b>	Foliaire et inhibiteur de la synthèse des lipides	56	3,2	32	0,09
<b>Isoproturon</b>	Racinaire et Foliaire, et inhibiteur de la photosynthèse	70,2	13,7	12	$5,50 \cdot 10^{-03}$
<b>Mésosulfuron méthyle</b>	Racinaire et Foliaire, et inhibiteur de la synthèse des acides aminés	483	1,27	45	$1,10 \cdot 10^{-05}$

\* : le temps de demi-vie (en jours) au laboratoire à 20°C

L'isoproturon a été choisi car lors d'une campagne de prélèvement de 2011 à 2012 cette molécule a été détectée au niveau de sept dispositifs sur neuf dont Manoncourt où la teneur a dépassé 4 µg/l au niveau de celui de (**Annexe 1**). Cet herbicide a fait l'objet d'études sur *Myriophyllum spicatum* (Knauer et al. 2012 ; Coutris et al. 2011 ; Knauert et al. 2010). Dans cette étude l'isoproturon joue le rôle de molécule modèle. Quant au deux autres molécules, le flufénacet est retrouvé dans six dispositifs avec une teneur maximale de 274 ng/L et le mésosulfuron-méthyle également détecté dans six dispositifs rustiques de filtration avec des teneurs de 1 à 14 ng/L.

## 2.2. Modalités de traitement

Les trois molécules utilisées ont fait l'objet de deux types de contamination, une contamination simple, et une contamination multiple (**Figure 3**).



**Figure 3 : Les différentes modalités des traitements et concentrations appliquées**

Les simples contaminations consistaient à apporter un seul herbicide à 100 µg/L dans un bécher. Les deux types de mélange consistaient à contaminer avec des solutions dont la somme des concentrations était à 100 et à 300 µg/L. Au total l'étude a été réalisée avec cinq modalités de traitement dont trois contaminations simples et deux contaminations multiples.

La dose de 100 µg/L tient compte de la période d'étude prévue de 21 jours, et de la limite de quantification des molécules par la méthode utilisé au laboratoire.

### 3. Echantillonnages

Les échantillonnages ont été effectués aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>7</sub> et T<sub>21</sub> jours après traitement. Pour chaque pas de temps, trois fois 1,5 ml de solution ont été prélevés dans chaque béccher pour les dosages par HPLC. Une modalité témoin a également été réalisée (**Figure 4**).

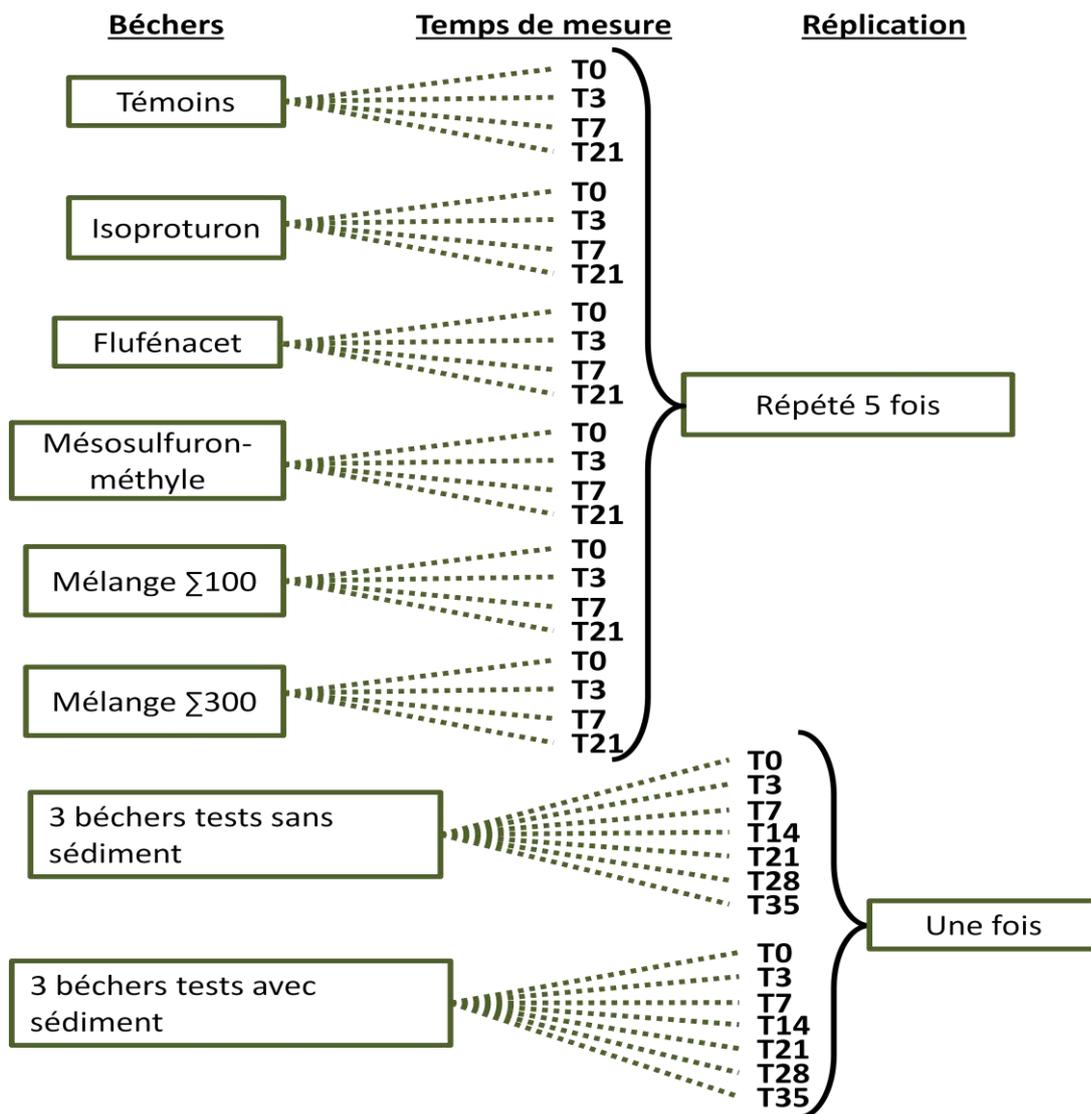


Figure 4 : Modalités utilisées et bécchers tests avec et sans sédiment

### 4. Dosage des molécules pesticides

Le dosage des pesticides en solution a été effectué au moyen d'une chaîne de Chromatographie Liquide (U3000 - Dionex). Les molécules ont été séparées sur une colonne Kinetex C18 (2,6 µm ; 4,6x100mm - Phenomenex). L'élution gradient s'est fait à un débit de 333 µL/min et la phase mobile était initialement composée de 60% d'acétonitrile et de 40% d'eau acidifié (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 0,2%). Un volume de 500 µL de la solution pesticide est injecté sur

une cartouche SPE (Oasis HLB 25  $\mu\text{m}$  ; 2.1 x 20 mm - Waters) pour purifier et concentrer l'échantillon. Une élution à contre flux de la cartouche SPE permet d'éluer les composés cibles sur la colonne analytique. Les molécules sont détectées par un détecteur à barrette de diode à une longueur d'onde de 230 nm. Le temps d'élution est de 5,6 ; 5,8 ; et 8,5 minutes respectivement pour l'isoproturon, le mésosulfuron-méthyle et le flufénacet. La limite de détection est de 5  $\mu\text{g/L}$  pour chacune des molécules étudiées.

### 5. Croissance de *Myriophyllum spicatum*

A chaque temps de mesure, les tiges et les racines sont soigneusement séparées, disposées sur un papier millimétré sous une boîte de pétri. Une photo de chaque plante est prise afin de compter ultérieurement le nombre de verticilles et de ramifications.

Les tiges et les racines de chaque plante sont mises dans des tubes Falcon de 15 ml prépesés, puis les masses humides des tiges et racines sont ensuite pesées. Les tubes sont plongés dans de l'azote liquide (à  $-195,79^\circ\text{C}$ ) pendant 30 secondes puis transférés au congélateur (à  $-80^\circ\text{C}$ ). Les tubes sont placés dans un lyophilisateur pendant 24 heures, puis les masses sèches des racines et des tiges sont pesées. Les plantes sont ensuite broyées à l'aide du micro-broyeur (Fritsch GmbH, modèle pulverisette 23).

Le taux de croissance (ou relative growth rate : RGR) relative à la longueur des plantes ( $\text{RGR}_L$ ), et à leur biomasse ( $\text{RGR}_B$ ) est calculé à l'aide de la relation suivante.

$$\text{RGR} = [\log_{10}(X_T) - \log_{10}(X_0)]/T \quad (\text{Knauer et al. 2006})$$

Avec :  $X_T$  est la mesure (longueur ou poids) au temps T (jours),  $X_0$  est la mesure initiale

### 6. Dosage des chlorophylles de l'anthocyane et des polyphénols totaux

Les pigments dosés à partir des tiges sont les chlorophylles *a* et *b* et l'anthocyane. L'extraction de chacun de ces pigments a été effectuée par des solvants spécifiques : le méthanol pour les chlorophylles et l'acétone pour l'anthocyane. L'extraction se fait sur 2 et 1 mg de plantes broyées respectivement pour les chlorophylles et l'anthocyane. La mesure de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Varian Cary 50 Bio UV/Visible Spectrophotometer), à des longueurs d'onde de 664 et 647 nm pour les chlorophylles et des longueurs d'onde de 532 et 653 nm pour l'anthocyane.

Les relations suivantes permettent d'obtenir les différentes teneurs en pigment (Chappelle et al. 1992 ; Wellburn et al. 1994) :

- Chlorophylle *a* =  $(12.25 \times A_{664} - 2.55 \times A_{647})/\text{masse}$
- Chlorophylle *b* =  $(20.31 \times A_{647} - 4.91 \times A_{664})/\text{masse}$
- Chlorophylle *a+b* =  $(17.76 \times A_{647} - 7.34 \times A_{664})/\text{masse}$
- Anthocyane =  $((A_{532} - 0.24 \times A_{653})/30) \times 287.25/\text{masse}$

Avec :  $A_{664}$ ,  $A_{653}$ ,  $A_{647}$  et  $A_{532}$  les absorbances respectives à 664, 653, 647 et 532 nm

L'extraction des polyphénols totaux est effectuée à partir de 3 mg de poudre de plante à laquelle est ajouté 500  $\mu$ L d'acétone dilué à 50% avec de l'eau ultra-pure. La solution d'extraction a été mixée à l'aide de l'agitateur Eppendorf Thermomixer Comfort (pendant 2 heures, à 13000 rpm avec une pause de 2 minutes à 16°C) suivie d'une centrifugation (à 13000 rpm pendant 10 minutes à 16°C). Une coloration est effectuée avec le réactif de Folin 2N qui devient bleu en présence de composés phénoliques. Une courbe d'étalonnage effectuée par colorimétrie a permis de quantifier la teneur en polyphénols totaux. (Gross et al 1994 et 2003).

## 7. Dosage du phosphore, du carbone et de l'azote

Pour mesurer la teneur en phosphore ; 1,5 mg de plante broyée sont digérés dans un tube en verre en présence d'eau ultra-pure, de persulfate de sodium et d'hydroxyde de sodium. Les solutions sont transvasées dans des cuves puis placées dans l'Analyseur Thermo Scientific Konelab 20XT (avec des mesures d'absorbance 880 nm) dans lequel un ajout de réactifs combinés (acide sulfurique 15% (v/v) à 1,84 g/L + tartrate de potassium et d'antimoine à 2,8 g/L + molybdate d'ammonium 40 g/L) et d'acide ascorbique 20 g/L. Quand au carbone et à l'azote, ils ont été dosés à l'aide d'un analyseur élémentaire CHNS (Flash EA1112 – Thermo). Des masses d'environ 1 mg de plante broyée finement sont pesées dans des capsules en étain, puis injectées dans l'analyseur CHNS, qui permet d'obtenir les teneurs massiques en carbone et en azote des plantes.

## 8. Analyses statistiques

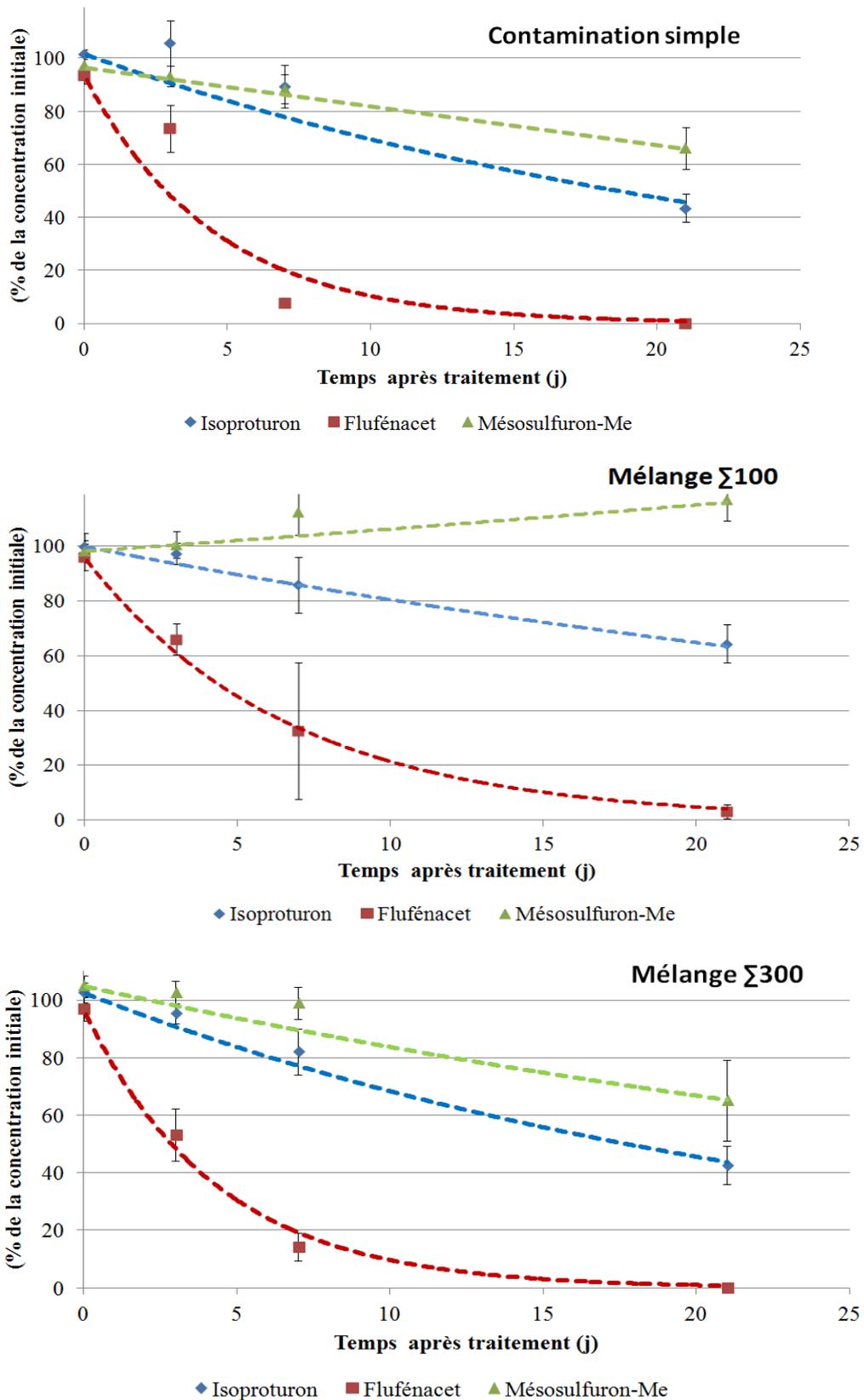
L'analyse statistique s'est effectuée au moyen d'ANOVA à deux facteurs, le temps et le traitement. Cette analyse a permis d'étudier les différences entre les différentes modalités de traitements dans le temps. L'ANOVA à un facteur a aussi été effectuée pour déterminer s'il y avait un changement significatif dû au temps d'exposition ou au traitement appliqué. Le test de Newman-Keuls (SNK) est appliqué avec un intervalle de confiance de 95%.

# III. Résultats et discussions

## 1. Evolution des teneurs en pesticides présents dans la solution

Dans le traitement par contamination simple, le flufénacet apparaît comme la molécule qui se dégrade le plus rapidement par rapport aux autres. Après 7 jours sa concentration en solution correspondait à moins de 20% de la dose appliquée (**Figure 5**) ; cette rapide dégradation a fait qu'à 21 jours après le traitement la concentration en flufénacet était inférieure à la limite de quantification. Le mésosulfuron méthyle est la molécule qui se dégrade le moins rapidement, de  $T_{0j}$  à  $T_{7j}$  jours après traitement moins de 20% de la concentration initiale était dégradé. Et à 21 jours après traitement sa teneur mesurée était supérieure à 60% de la concentration initialement appliquée. L'isoproturon est la molécule avec une dégradation intermédiaire. De  $T_{0j}$  à  $T_{7j}$  10% de la teneur initiale était dégradés et à 21 jours la concentration en isoproturon était de 44%. Ces cinétiques de dégradation des herbicides en contamination simple sont

identiques à celles des pesticides en contamination multiple avec le mélange  $\Sigma 300$ . Par contre les molécules se dégradent moins vite lorsqu'elles sont en mélange  $\Sigma 100$ .



**Figure 5 : Teneurs des herbicides en solution dans le cas d'une contamination simple, par contamination multiple (mélange  $\Sigma 100$  et mélange  $\Sigma 300$ ) pendant 21 jours (Les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats).**

Ces données ont permis d'estimer les temps de demi-vie des trois herbicides (**Tableau 2**). Quelque soit le traitement, le DT50 du mésosulfuron-méthyle (31 à 52 jours) est supérieur à celui de l'isoproturon (17 à 32 jours) qui est supérieur à celui du flufénacet (1 à 5 jours). Ces DT50 calculés sont différentes de ceux qui sont définis pour ces herbicides à 20°C dans les conditions de laboratoire (45, 12 et 32 jours respectivement pour le mésosulfuron-méthyle, l'isoproturon et le flufénacet) [footprint-PPDB, 2013].

**Tableau 2 : temps de demi-vie (en jours) des trois herbicides étudiés pour les différentes modalités**

Type de traitement	Isoproturon	Flufénacet	Mésosulfuron-Méthyle
Simple contamination	18,26±0,61 <b>a*</b>	3,15±0,03 <b>d</b>	38,64±2,50 <b>b</b>
Mélange $\Sigma 100$	32,33±5,01 <b>b</b>	4,61±0,10 <b>e</b>	99,00±50,00 <b>a</b>
Mélange $\Sigma 300$	17,20±0,93 <b>a</b>	3,00±0,03 <b>c</b>	30,90 ±3,18 <b>b</b>
Test avec sédiments	25,18±9,79 <b>a</b>	0,66±0,01 <b>a</b>	46,53±10,02 <b>c</b>
Test sans sédiments	21,47±1,00 <b>a</b>	1,13±0,01 <b>b</b>	49,99±5,77 <b>bc</b>

\* pour une molécule donnée, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman-Keuls (SNK) à 95%)

Dans la contamination simple, le DT50 du mésosulfuron-méthyle est le plus long avec 38,6 jours, suivi par celui de l'isoproturon avec 18,3 jours et le flufénacet avec le plus faible temps de demi-vie de 3,2 jours. Les temps de demi-vie des pesticides en contamination simple sont identiques à ceux du mélange  $\Sigma 300$ , donc la vitesse de dégradation des molécules n'est pas influencée par la présence des autres molécules. Par contre les temps de demi-vie des molécules dans le mélange  $\Sigma 100$  sont élevés, cela fait ressortir l'hypothèse des temps de demi-vie élevés pour de faible concentration de pesticide. D'autres auteurs montrent également que la concentration des herbicides est un facteur influant sur la dégradation des molécules. Le DT50 du fluridone augmente en fonction de la concentration, avec 6,8 ; 13,3 et 30,1 jours pour des concentrations respectives de 100, 50 et 25  $\mu\text{g/L}$  (Nétherland et al. 1995). La faible concentration de 14  $\mu\text{g/L}$  de l'isoproturon par rapport à notre étude a eu un temps de demi-vie supérieur à 35 jours (Knauer et al. 2012).

Il n'y a pas de différence significative entre les DT50 des trois herbicides des béciers tests et ceux des contaminations simples et des contaminations multiples du mélange  $\Sigma 300$  donc ni les plantes ni les sédiments n'influencent la dégradation des trois herbicides (**Annexe 3**). La rapide dégradation du Flufénacet pourrait expliquer ces temps de demi-vies significativement différentes.

## **2. Effets des pesticides sur la croissance de *Myriophyllum spicatum***

### **2.1. Effets sur la longueur des tiges et des racines**

Les effets sont plus significatifs sur les racines que sur les tiges de *Myriophyllum spicatum* (**Figure 6**).

Au cours du temps (de  $T_{0j}$  à  $T_{21j}$ ), les racines des plantes témoins et celles sous flufénacet et isoproturon ont significativement augmenté de taille : de 29,8 à 223,9 cm pour les plantes témoins, de 29,6 à 122,6 cm pour les plantes sous flufénacet et de 24,2 à 114,4 cm pour les plantes sous isoproturon. Il n'y a pas eu de différence significative dans la croissance des racines des plantes qui étaient sous influence des mélanges ( $\Sigma 100$  et  $\Sigma 300$ ). Par contre une réduction de la croissance a été observée pour les racines des plantes sous influence du mésosulfuron-méthyle de 26,2 cm à  $T_{0j}$  à 18,2 cm à  $T_{21j}$ .

Il n'y a pas de différence significative entre les différents traitements à  $T_{0j}$  et à  $T_{3j}$ . C'est à partir de  $T_{7j}$  que nous avons observé des différences significatives. Les plantes témoins ont des tiges et racines plus longues que celles des autres modalités, sauf les racines des plantes sous la contamination simple de l'isoproturon pour lesquelles il n'y a pas de différence significative avec les racines des plantes témoins. A  $T_{21j}$  les longueurs des racines sont significativement différentes entre modalités. Les racines des plantes témoins de 223,9 cm étaient plus grandes que celles des plantes sous contamination simple de flufénacet et d'isoproturon de 122,6 et 114,4 cm. Les traitements par le mésosulfuron-méthyle et les mélanges ( $\Sigma 100$  et  $\Sigma 300$ ) ont le plus réduit la longueur des racines respectivement de 18,2 ; 40,2 et 32,4 cm.

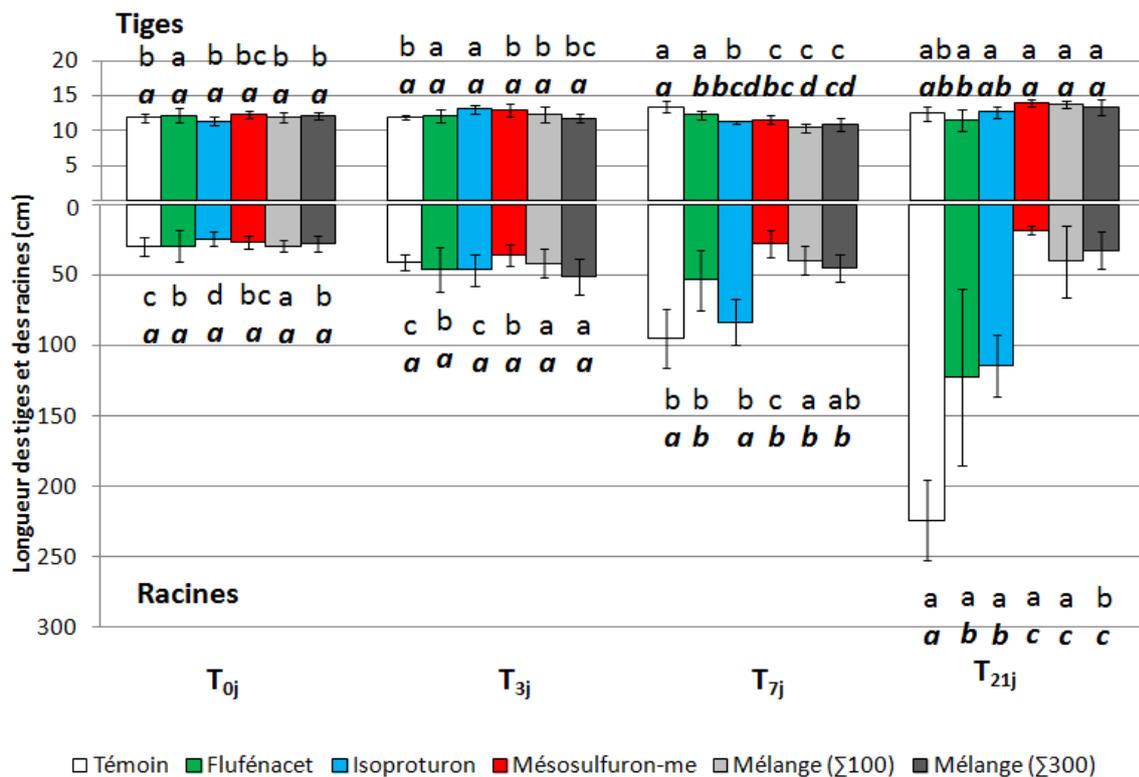


Figure 6 : Suivi temporel de la longueur des tiges et des racines des plantes *Myriophyllum spicatum*. (Les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).

Une forte élongation des tiges de *Myriophyllum spicatum* est observée les 15 premiers jours suivant sa culture, puis ce sont les racines qui se développent le plus (Mohr et al. 2013), le

nombre de verticille a aussi augmenté lors de ce temps d'acclimatation. Un développement de racines secondaires s'est effectué pour les plantes témoins et celles sous influence du flufénacet et de l'isoproturon, mais le nombre de verticille n'a pas significativement augmenté de  $T_{0j}$  à  $T_{21j}$  (**Annexe 4**). Les racines continuent leur développement car les nutriments n'étaient présents que dans les sédiments. Knauer et al. (2006) ont également mis en évidence que dans un milieu de culture avec du sédiment, *Myriophyllum spicatum* est susceptible de développer plus de racines que de tiges.

Le mode d'action du mésosulfuron-méthyle pourrait expliquer la réduction de croissance des racines. En effet l'inhibition de la synthèse des acides aminés contribue à la perturbation de la production de protéine. C'est la présence de cette molécule dans les mélanges qui pourrait entraîner cette faible croissance des racines. Sa pénétration racinaire favoriserait son influence plus importante sur les racines que sur les tiges. Wendt-Rasch et al. (2003) ont également observé cet effet induit par le metsulfuron-méthyle (même famille que le mésosulfuron-méthyle) sur *Myriophyllum spicatum*, les plantes sous influence de metsulfuron-méthyle ou de mélange contenant cette molécule n'ont pas développé de racines. Plus la plante était stressée moins il y avait de racines secondaires. Le flufénacet même avec sa pénétration foliaire, a une faible influence car ce dernier est rapidement dégradé dans la solution.

Le rapport de la longueur des racines sur celle des tiges (**Annexe 5**) pourrait être un indicateur de stress pour *Myriophyllum spicatum*. En effet plus la plante est stressée moins elle produit de racines, le ratio est faible. A  $T_{21j}$  ce ratio était de  $236,4 \pm 29,1$  pour les plantes témoins et de  $32,2 \pm 3,0$  à  $127,0 \pm 22,6$  pour les sous influences des herbicides.

## **2.2. Effets sur la masse humide et sèche des tiges et des racines de *Myriophyllum spicatum***

Dans les 21 jours d'étude, l'évolution de la biomasse humide ou sèche a été faiblement significative pour les tiges et fortement significative pour les racines pour certaines modalités de traitement (**Figure 7**). De  $T_{0j}$  à  $T_{21j}$  les biomasses humides des racines ont augmenté de 68,9 à 226,8 mg pour les plantes témoins, de 52,9 à 134 mg pour les plantes sous flufénacet et de 60 à 173,3 mg pour les plantes sous isoproturon. Les racines des autres modalités à  $T_{21j}$  ne pesaient que 41 mg pour la modalité mésosulfuron-méthyle ; 54,8 mg pour la modalité mélange  $\Sigma 100$  et 64,5 mg pour la modalité mélange  $\Sigma 300$ . Une tendance similaire est observée avec moins de biomasse sèche pour la modalité mésosulfuron-méthyle et les mélanges et plus de biomasse sèche pour les plantes témoins et les modalités flufénacet et isoproturon.

Les modalités étudiées n'ont pas montré de différence significative à  $T_{0j}$  et à  $T_{3j}$  sur les biomasses humides et sèches (Figures 9 et 10). A  $T_{7j}$  les tiges des plantes témoins ainsi que celles des modalités flufénacet et mésosulfuron-méthyle ont le plus de biomasse sèche et humide que les autres modalités. Quant aux racines il n'y avait pas de différence significative en biomasse sèche. A  $T_{21j}$  la tendance s'est inversé au niveau des tiges avec de plus faible biomasse pour les plantes témoins et celles des modalités flufénacet et isoproturon. Mais la tendance des racines reste la même que celle observé à  $T_{7j}$ .

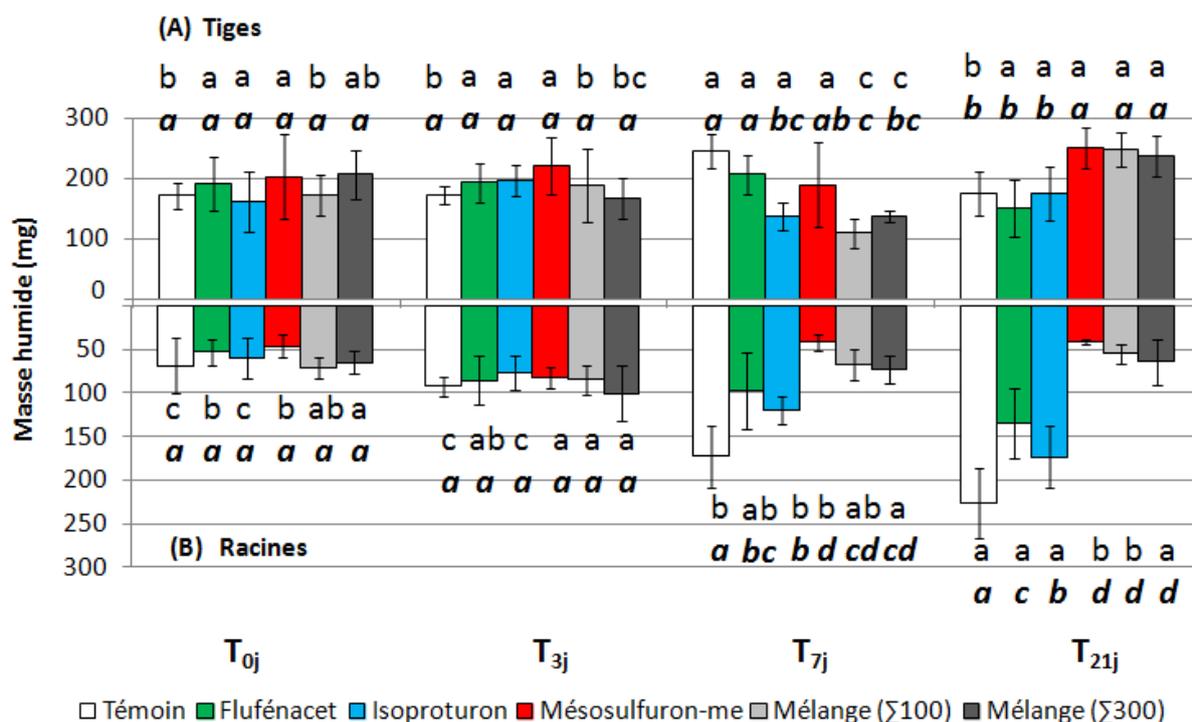


Figure 7 : Biomasses humides de *Myriophyllum spicatum* pour les 4 temps de mesure, (A) pour les tiges et (B) pour les racines, les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).

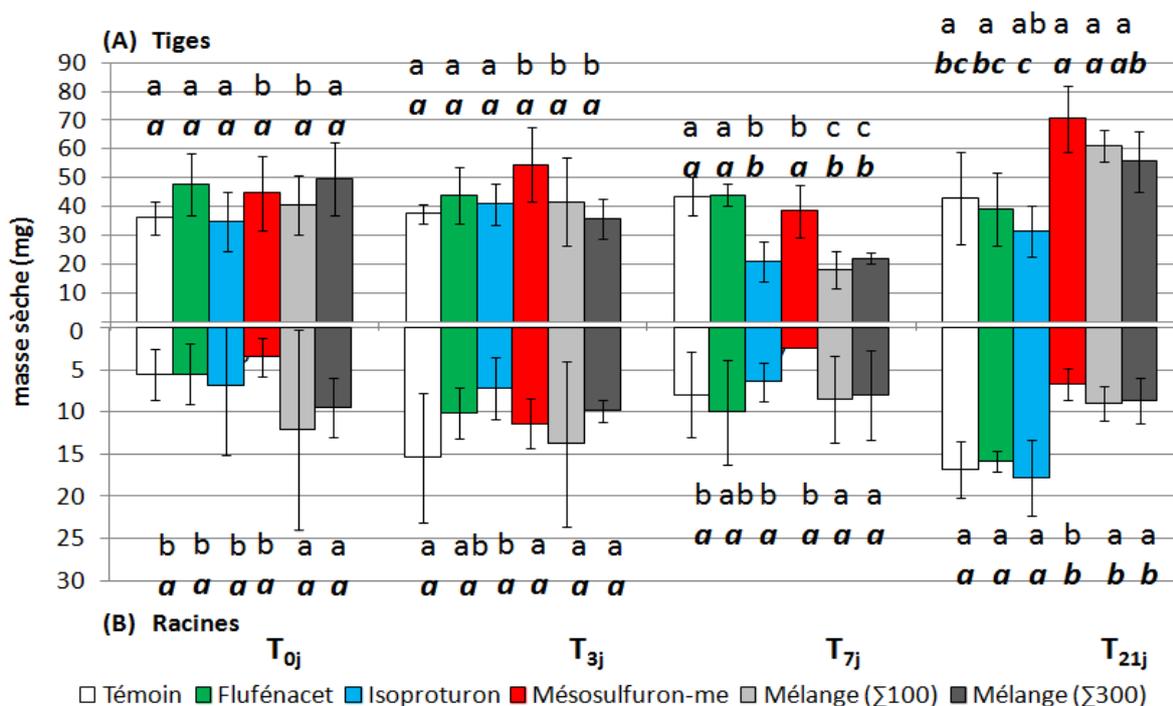


Figure 8 : Biomasses sèches de *Myriophyllum spicatum* pour les 4 temps de mesure, (A) pour les tiges et (B) pour les racines, les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).

Le taux de croissance des plantes sur 21 jours par rapport à la biomasse sèche totale de  $0,02 \pm 0,01$  par jour (**Annexe 6**), est similaire à celui obtenue dans certaines études (Knauer et al. 2006, Arts et al. 2008 et Belgers et al. 2011). Les plantes stressées produisent moins de biomasse par rapport aux plantes non traitées (Wendt-Rasch et al. 2004). Nelson et al (2005 et 2008) ont observé que le traitement de *Myriophyllum spicatum* par le 2,4-D entraîne une réduction de la biomasse sèche ; la faible dose de 0,15 mg de triclopyr/L a entraîné une réduction de 53 et 52% respectivement aux tiges et aux racines. Les mêmes observations ont été faites par Skogerboe et al. (2006), avec le diquat qui a également entraîné une forte réduction de la biomasse sèche de *Myriophyllum spicatum*.

Le rapport de la biomasse sèche / biomasse humide des racines et des tiges (**Annexe 5**) pourrait également indiquer le stress, ce rapport est plus élevé pour les plantes stressées. Les plantes stressées contiennent moins d'eau que les plante normales, ce ratio est élevée pour les plantes stressées. A  $T_{21j}$  ce ratio était de  $0,15 \pm 0,03$  pour les plantes témoins et de  $0,21 \pm 0,02$  à  $0,26 \pm 0,02$  pour les plantes sous influences de mésosulfuron-méthyle et des mélanges. Les plantes stressées ont moins de biomasse humide et plus de biomasse sèche par rapport aux plantes témoins (**Annexe 7**).

### **3. Effets sur les teneurs en carbone, azote et phosphore de *Myriophyllum spicatum***

Les teneurs en carbone (**Figure 9 A**) de *Myriophyllum spicatum* varient de 35 à 42% de sa masse sèche sans différence significative, entre modalités et au cours du temps.

Les teneurs en azote sont en revanche plus variables, et notamment à  $T_{0j}$ , suivant les différents traitements. De  $T_{3j}$  à  $T_{21j}$  une diminution de la teneur en azote est observée par les traitements avec le mésosulfuron-méthyle et les mélanges  $\Sigma 100$  et  $\Sigma 300$  respectivement de 0,8 à 0,5%, de 1 à 0,5% et de 0,9 à 0,7% (**Figure 9 B**).

Quand à la teneur en phosphore (**Figure 9 C**), il n'y a pas d'effets significatifs entre les différentes modalités de traitement à  $T_{0j}$  et  $T_{3j}$ . A  $T_{7j}$  et  $T_{21j}$  les tendances sont relativement similaires. La différence est faiblement significative entre les traitements. Les plantes traitées par le mésosulfuron-méthyle présentent les plus faibles teneurs en phosphore avec 0,04 g par kg de plante sèche à  $T_{21j}$ .

Les teneurs en carbone de cette étude sont en accord avec celles obtenues par Gross (2003), comprises entre 35 à 40% de carbone. Mais dans son étude les teneurs en azote (supérieures à 2% d'azote) sont plus importantes que celles que nous avons trouvées. Cette différence de teneur en azote est due au fait que pendant nos manipulations il n'y a pas eu d'apport de source d'azote dans le milieu de culture et que ce dernier avait des teneurs faibles en azote (**Annexe 8**). Les teneurs en phosphore de nos plantes sont largement inférieures à celles obtenues par Gerloff et Krombholz (1966) qui avaient trouvé des teneurs supérieures à 0,3% de phosphore. Nos plantes avaient de faibles teneurs en azote et en phosphore. Gerloff et Krombholz (1975) avaient proposé que la teneur limite moyenne pour les plantes submergées était de 1,5% d'azote et de 0,15% de phosphore (par rapport à la masse sèche). Mais plus tard Mickle et al (1975) et Gerloff (1975) ont démontré les teneurs minimales en azote et en

phosphore de *Myriophyllum spicatum* sont encore plus faible avec 0,75% d'azote et 0,07% de phosphore (Grace et al 1978).

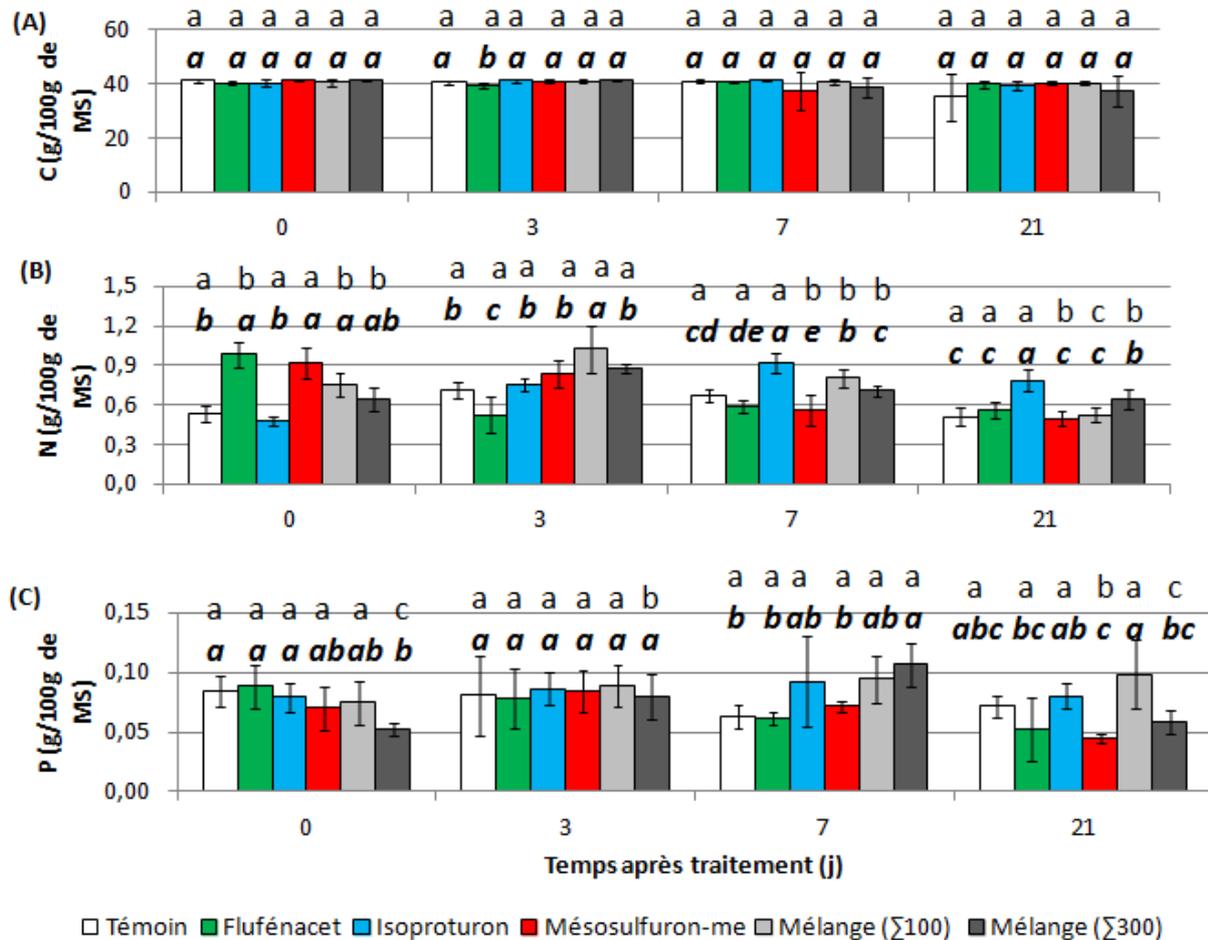
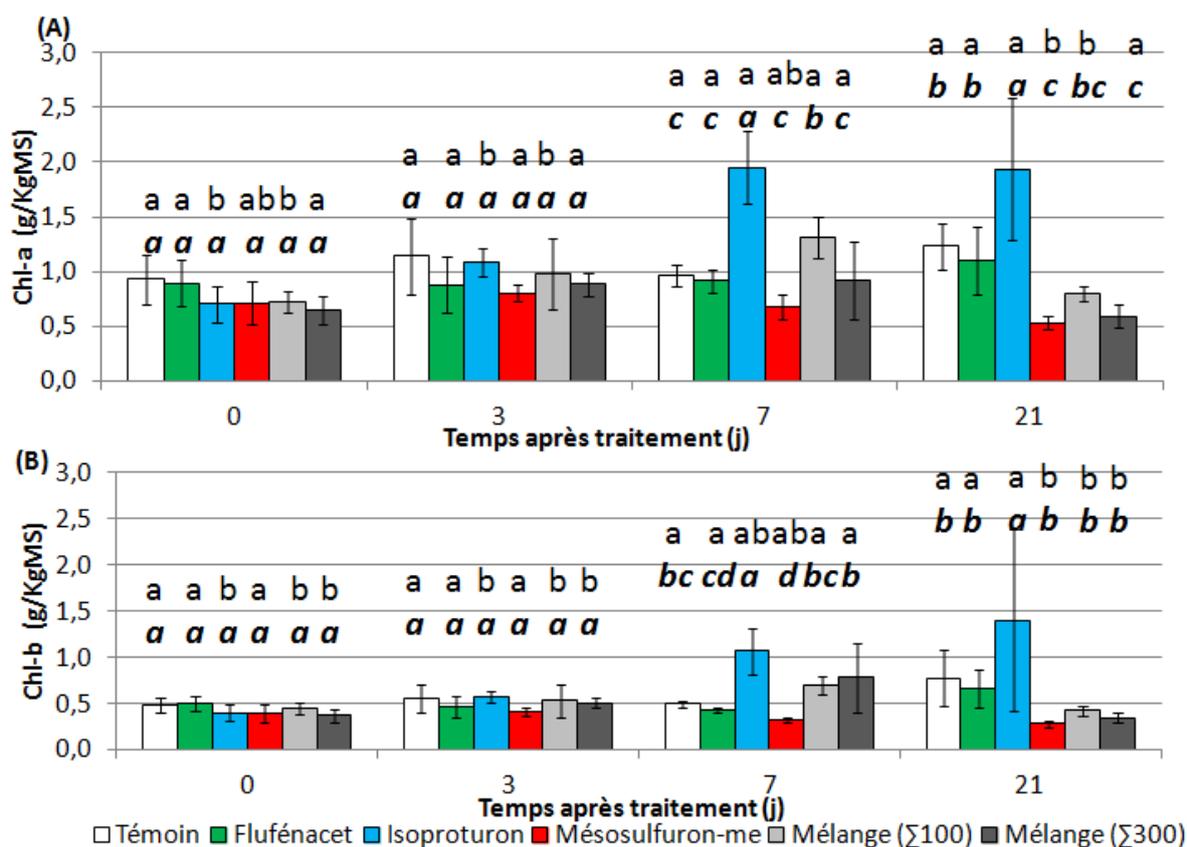


Figure 9 : Teneur en carbone (A), azote (B) et phosphore (C) de *Myriophyllum spicatum* pour les 4 temps de mesure, les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 répliquats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).

#### 4. Effets sur les teneurs en chlorophylle *a* et *b* de *Myriophyllum spicatum*

Quelque soit le type et la durée du traitement, la quantité de chlorophylle *a* produite est supérieure à celle de chlorophylle *b* (Figure 10). Jusqu'à T<sub>3j</sub> les teneurs en pigments chlorophylliens sont similaires entre le témoin et les différents traitements. A partir de T<sub>7j</sub>, nous commençons à observer des différences significatives entre le témoin et certains traitements. Le flufénacet n'a pas d'effet significatif tout au long de l'étude sur les teneurs en chlorophylle. La présence d'isoproturon dans la solution semble induire une augmentation de la production des teneurs en chlorophylles *a* et *b* par rapport au témoin. Les plantes sous influence du mésosulfuron-méthyle sont en revanche celles qui produisent le moins de chlorophylle à partir de T<sub>7j</sub>. La diminution des teneurs en chlorophylle est également observée pour les deux types de mélange à T<sub>21j</sub>.



**Figure 10 : Teneur en chlorophylle de *Myriophyllum spicatum* pour les 4 temps de mesure, (A) pour chlorophylle a et (B) pour chlorophylle b, les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).**

Au cours de cette étude, les teneurs en chlorophylle sont proches de celles obtenues par Netherland et Getsinger (1995) avec une teneur de 1,25 g de chlorophylle totale par Kg de masse fraîche de plante témoin. Le mode d'action des herbicides agissant sur la photosynthèse est de réduire cette activité dans la plante (Nelson et al. 1998). Mais toutefois l'effet souhaité sur la plante n'est pas immédiate comme le cas du triclopyr et du 2,4D (Poovey et al 2007 ; Glomski et al. 2010 ; Wersal et al. 2010). L'isoproturon en tant qu'inhibiteur de la photosynthèse, a en revanche induit une augmentation des teneurs en chlorophylle de la plante. Cet effet est le même que celui observé par Knauert et al. (2010) où une importante activité photosynthétique par rapport à celle des plantes témoins a été observée entre 10 et 21 jours après le traitement. Toutefois cette forte production de chlorophylle diminuait au delà de 21 jours d'exposition des plantes sous cet herbicide. De même, l'atrazine affecte la plante dans les cinq premières semaines suivant le traitement par une forte production de chlorophylle à des concentrations inférieures ou égales à 100 µg/L (Kemp et al 1985).

Le flufénacet n'a pas eu d'effet significatif sur la photosynthèse de *Myriophyllum spicatum*, car cet herbicide était dégradé dès la première semaine qui a suivie le traitement, et son mode d'action de la synthèse des lipides n'est pas lié à la photosynthèse. Les effets sur la croissance dus aux traitements par le mésosulfuron-méthyle et les mélanges sont reflétés par une faible production de pigments par rapport aux témoins à T<sub>21j</sub>. Le mésosulfuron-méthyle est un

inhibiteur de la synthèse des acides aminés, qui sont des composés utilisés dans la synthèse de la chlorophylle. Les herbicides sont capables de détruire les membranes thylakoïdales, ou la synthèse des protéines (Romero et al 2011). La forte sensibilité photosynthétique de *Myriophyllum spicatum* est essentiellement liée à ses paramètres morphologiques (Selim et al 1989) et à la pénétration des herbicides, qui est favorisée par les racines, la finesse de sa cuticule et ses verticilles. L'activité photosynthétique des plantes varie aussi suivant le stress induit et en fonction du temps ; dans l'étude de Sivaci et Elmas (2012), les effets sont observés à 21 jours après traitement.

L'isoproturon a tendance à plus influencer les plantes quand il se trouve seule que quand il se trouve en mélange avec les deux autres herbicides. Les autres herbicides en mélange seraient susceptibles de neutraliser l'effet de l'isoproturon.

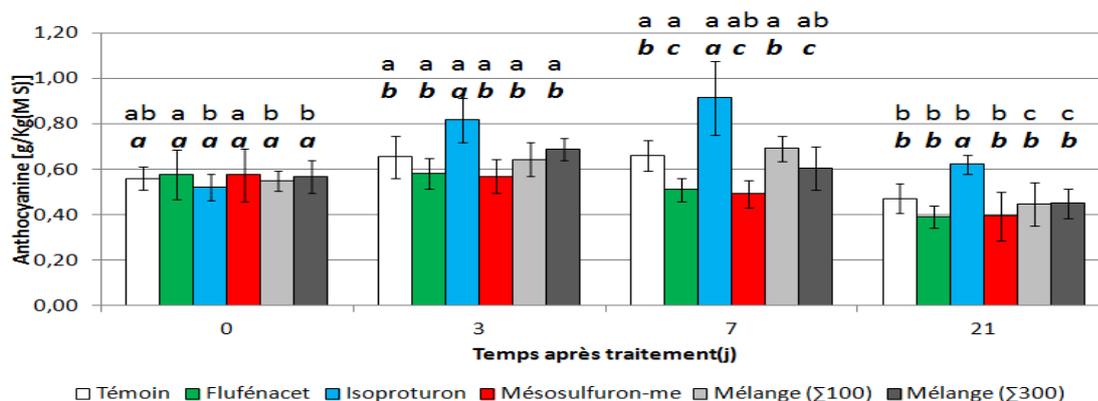
## 5. Effets sur les teneurs en métabolites secondaires

### 5.1. L'anthocyanine

Au cours du temps il n'y a pas de différence significative entre les traitements. Seul le traitement avec l'isoproturon a fait une exception avec des teneurs supérieures à ceux des autres traitements (**Figure 11**), avec une teneur maximale à T<sub>7j</sub> de 0,91 g d'anthocyanine par Kg de masse sèche qui se réduit à 0,62 g/Kg à T<sub>21j</sub>.

Une diminution de la teneur en anthocyanine est observée pour les plantes sous influence du mésosulfuron-méthyle et des mélanges  $\Sigma 100$  et  $\Sigma 300$  de T<sub>3j</sub> à T<sub>21j</sub>.

Les résultats obtenus par Onion et Gross (2004) s'accordent bien avec ceux que nous avons obtenus : dans leur étude les plantes témoins avaient des teneurs entre 0,05 et 0,07% d'anthocyanine. La production de ces pigments est liée au stress induit par des facteurs de luminosité, de température et aussi de teneur en nutriment du milieu de culture (Doong et al 1993). L'isoproturon affaiblit la capacité à faire face aux UV c'est pourquoi la production d'anthocyanine (flavonoïde lutant contre les effets néfastes des UV) augmente (Swanson 2002, Onion 2004).

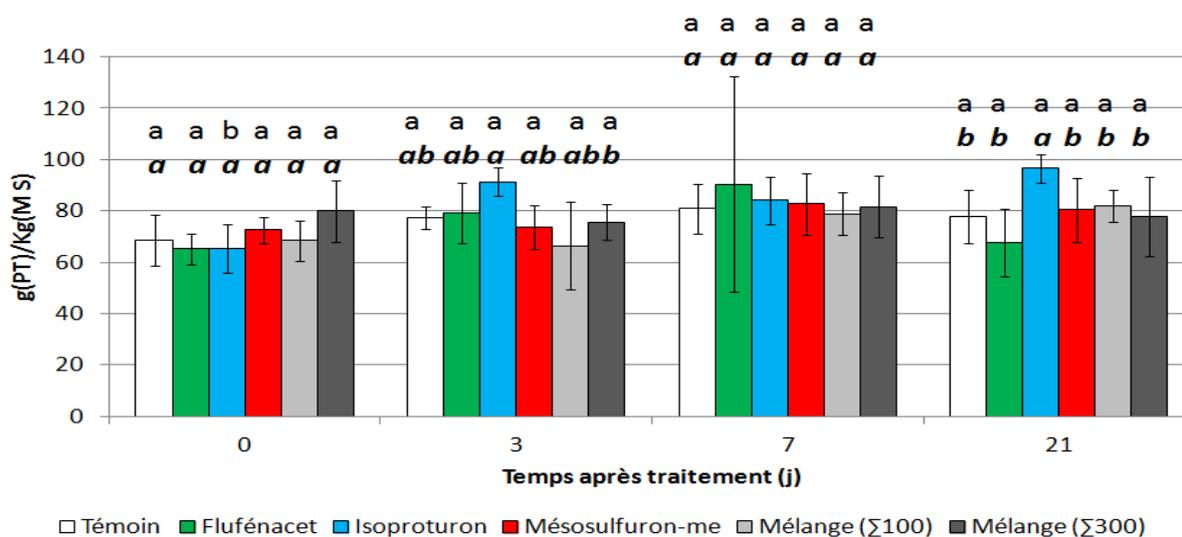


**Figure 11 : Teneur en anthocyanine de *Myriophyllum spicatum* pour les 4 temps de mesure**, les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).

## 5.2. Teneurs en polyphénols totaux (PT)

La production de polyphénols totaux n'a pas été affectée par les traitements sauf par l'isoproturon qui entraîne une faible augmentation de sa teneur à partir de T<sub>7j</sub> (**Figure 12**). Les teneurs sont stables au cours temps pour chaque traitement. A T<sub>21j</sub>, le traitement par l'isoproturon induit une forte production de polyphénols totaux avec une teneur maximale de 96,55 g de polyphénols totaux par kilogramme de masse sèche, soit 9,66% de la masse sèche des plantes sous influence de cet herbicide.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Onion et Gross (2004) avec des teneurs en polyphénols dans les plantes témoins entre 6 et 9% de la masse sèche des plantes sous influence de cet herbicide. Gross et al (1996) avaient trouvé des teneurs en polyphénols totaux de 77 et 82 g de polyphénols totaux par kilogramme de masse sèche respectivement pour des plantes de culture axénique et non axénique. La production plus importante de polyphénols totaux pour les plantes sous influence de l'isoproturon est une réponse de la plante face aux stress induit par cet herbicide.



**Figure 12 : Teneur en polyphénols totaux de *Myriophyllum spicatum* pour les 4 temps de mesure, les écart-types sont obtenus au moyen des valeurs des 5 réplicats (Les lettres au dessus des écart-types représentent les classes de données issues du test de Newman-Keuls (SNK) avec un intervalle de confiance à 95%. En caractère simple : la comparaison se fait par modalité en fonction du temps, en gras italique : les différentes modalités sont comparées pour un temps donné).**

## Conclusions et perspectives

Lors de ce travail *Myriophyllum spicatum* s'est montré influencé par les trois molécules et aussi les deux types de mélange. Les effets causés par les herbicides sont liés à leur mode d'action et aussi à la concentration appliqués. Dans cette étude, la contamination simple par le mésosulfuron-méthyle est celle qui a le plus influencée, même plus que les mélanges qui contenait aussi cette molécule. Ce dernier apparaissait comme le plus persistant des trois

herbicides. Le flufénacet quant à lui était le moins persistant, son temps de demi-vie était inférieur à 5 jours.

L'évaluation de la croissance de *Myriophyllum spicatum* par la longueur a surtout été marquée par le développement racinaire. Ces dernières permettent l'absorption des nutriments essentiels à la croissance de la plante. L'herbicide ayant le plus d'influence a été le mésosulfuron-méthyle qui a inhibé leur développement. Les mêmes tendances ont été observées avec les biomasses humides et sèches. Les ratios entre racines et tiges et aussi entre biomasses humides et biomasses sèches pourraient être considérés comme indicateur de stress sur *Myriophyllum spicatum*.

La production de chlorophylle (*a* et *b*) a aussi permis de mettre en évidence les différents effets induits par les herbicides aussi bien en contaminations simples qu'en contaminations multiples. L'isoproturon qui était sensé diminuer la production de chlorophylles, a contribué à une forte production de ces pigments. Le mésosulfuron-méthyle a eu plus d'effet sur les teneurs en chlorophylle (*a* et *b*), l'influence de cette molécule dont le mode d'action n'est pas l'inhibition de la photosynthèse, serait due à la réduction de la production de protéine lors de la perturbation de la synthèse des acides aminés par cet herbicide.

Les teneurs en carbone, azote, phosphore et métabolites secondaires n'ont pas significativement été modifiés vis-à-vis des herbicides dans cette étude. Une plante stressée devrait produire plus de polyphénols hydrolysables ou flavonoïdes par rapport aux plantes témoins. Ces paramètres physiologiques de *Myriophyllum spicatum* pourraient ne pas être influencés par les herbicides.

En conclusion, *Myriophyllum spicatum* pourrait être considéré comme un indicateur biologique de pollution, car en plus de sa capacité à se développer facilement dans une vaste gamme de condition, cette plante est capable de manifester les influences causées par des contaminants de l'environnement.

En perspective les prochaines études de pesticides sur cette plante devront tenir compte du temps d'étude. Un temps d'étude supérieure à 21 jours pourrait permettre de voir l'influence de certaines molécules par exemple l'isoproturon sur la production de chlorophylle. Il faut s'assurer de travailler dans un milieu où l'apport en nutriment serait favorable à ce macrophyte, évitant un stress pouvant être dû à une carence en éléments nutritifs. La mise en application de cette étude au niveau des dispositifs permettrait de confirmer l'hypothèse d'un bioindicateur.

## Références bibliographiques

- Adam O (2011) ; Bioindication de la qualité de l'eau par les gammares ; Presse universitaire de Franche-Comté ; 197 p.
- Aiken S G, Newroth P R, Wile I (1979) "the biology of Canadian weeds. 34. *Myriophyllum spicatum* L." Canadian plant science 59: 201-215
- Arts G H P, Belgers J D M, Hoeckzema C H, Thissen J T N M (2008) "Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests." Environmental Pollution 153(1): 199-206.
- Belgers, J D M, Aalderink G H, Arts G H P, Brock T C M (2011). "Can time-weighted average concentrations be used to assess the risks of metsulfuron-methyl to *Myriophyllum spicatum* under different time-variable exposure regimes?" Chemosphere 85(6): 1017-1025.
- Bispo A, Grand C et Galsomies L (2009) Le programme ADEME "Bioindicateurs de qualité des sols": Vers le développement et la validation d'indicateurs biologiques pour la protection des sols, Etude et Gestion des Sols, Volume 16 - pages 145 à 158
- Blandin P. 2010. Biodiversité. L'avenir du vivant. Collection Albin Michel Sciences. Albin Michel, Paris : 263 p.
- Bounias M (1999). Traité de toxicologie générale, Springer 789 p.
- Brown, C.D., Dubus, I.G., Fogg, P., Spirlet, M., Gustin, C., 2004. Exposure to sulfosulfuron in agricultural drainage ditches: field monitoring and scenariobased modeling. Pest Manage. Sci. 60, 765–776.
- Carbineer D (1995) Les arbres qui cachent la forêt. : La gestion forestière à l'épreuve de l'écologie, Edisud 243 p.
- Cason C, Roost B A (2011). "Species Selectivity of Granular 2,4-D Herbicide When Used to Control Eurasian Watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) in Wisconsin Lakes." Invasive Plant Science and Management 4(2): 251-259.
- Chappelle EW, Kim MS, McMurtrey III JE. (1992) Ratio Analysis of Reflectance Spectra (RARS): An Algorithm for the Remote Estimation of the Concentrations of Chlorophyll A, Chlorophyll B, and Carotenoids in Soybean Leaves. Remote Sens Environ 39:239-247
- Christopher S V, Bird K T (1992). "The effects of herbicides on development of *Myriophyllum spicatum* L. cultured *in vitro*." Journal of Environmental Quality 21(2): 203-207.
- Cook CDK (1985). Worldwide distribution and taxonomy of *Myriophyllum* species. In: LWJ Anderson (ed), Proceedings of of the first international Symposium on the watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) and related Haloragaceae species. Aquat. Plant. Manage. Soc., Washington, D.C. pp 1-7.
- Couch R, and Nelson E (1985) *Myriophyllum spicatum* in north America. In: L. W. J. Anderson (ed), Proceedings of the first international symposium on watermilfoil and related Haloragaceae species. Aquat. Plant Manage. Soc., Washington, D.C. pp. 8-18
- 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 101(1): 49-56.
- Davies J, Honegger J L, Tencalla F G, Meregalli G, Brain P, Newman J R, Pitchford H F (2003) "Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron - a case study." Pest Management Science 59(2): 231-237.
- Doong RL, Macdonald GE, Shilling DG (1993) Effect of fluridone on chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content of hydrilla. J. Aquat. Plant Manage. 31 : 55-59

- Feiler, U., S. Hoss, et al. (2013). "Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in German waters." *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(1): 144-155.
- FOOTPRINT. (2013). "The FOOTPRINT pesticide properties Database. Database collated by the University of Hertfordshire as part of the EU-funded FOOTPRINT Project (FP6-SSP-022704)."
- Franzaring, J., Klumpp, A., Fangmeier, A. (2007): Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. *Atmospheric Environment* 41: 4828–4840.
- Gerloff GC, Krombholz PH (1966) Tissue analysis as a measure of nutrient availability for the growth of angiosperm aquatic plants, *Limnology and Oceanography* Volume 11 issue 4
- Getsinger KD Turner EG, Madsen J D, Netherland M D (1997) "restoring native vegetation in a eurasian water milfoil-dominated plant community using the herbicide triclopyr" regulated rivers: research & management, VOL. 13, 357-375
- Glomski, L. M. and M. D. Netherland (2010) "Response of Eurasian and Hybrid Watermilfoil to Low Use Rates and Extended Exposures of 2,4-D and Triclopyr." *Journal of Aquatic Plant Management* 48: 12-14.
- Grace J B, Wetzel R G (1978) "The production biology of Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L.): a review" *journal of aquatic plant management* 16: 1-11
- Gray C J, Madsen J D, Wersal R M, Getsinger K D (2007). "Eurasian watermilfoil and parrotfeather control using carfentrazone-ethyl." *Journal of Aquatic Plant Management* 45: 43-46.
- Gross E M, Sutfeld R (1994) "Polyphenols with algicidal activity in the submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*" *Acta horticulturae* 381: 710-716
- Gross E M, Meyer H, Schilling Gerhard (1996) "Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*" *phytochemistry*, 41: 133-138
- Gross E M (1999) "Allelopathy in benthic and littoral Areas: case study on allelochemicals from benthic cyanobacteria and macrophytes" CRC press pp 179-199
- Gross EM (2003) "Differential response of Tellimagrandin II and total bioactive hydrolysable tannins in an aquatic angiosperm to change in light and nitrogen" *OIKOS* 103: 497-504
- Hanson ML, Solomon KR (2004) "Haloacetic acids in the aquatic environment. Part I: macrophyte toxicity." *environmental pollution* 130 : 3 : 371-383
- Haslam S., 1982.- A proposed method for monitoring rivers pollution using macrophytes. *Sciences and technology*, 3, 19-34.
- Hättenschwiler S, Vitousek PM (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling, *Trends in ecology and evolution*, Volume 15, Issue 6, 1 June 2000, Pages 238–243
- Kane M E, Gilman E F (1991) "in vitro propagation and bioassays systems for evaluating growth regulator effects on *Myriophyllum* species" *journal of aquatic plant management* 29: 29-32
- Kane M E, Gilman E F, Jenks M A (1991) "regenerative capacity of *myriophyllum*-aquaticum tissues cultured invitro" *journal of aquatic plant management* : 29 : 102-109
- Kemp W M, Boynton W R, Cunningham J J, Steveson 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" *marine environment research* 16: 255-280
- Kimbel, J. C. 1982. Factors influencing potential intralake colonization by *Myriophyllum Spicatum* L. *Aquat. Bot.* 14: 295-307
- Knauer K, Vervliet-Scheebaum M, Dark R J, MAUND S J (2006) "Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants." *Pest Management Science* 62(8): 715-722.

- 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* 15(4): 322-331.
- Knauer K, Hommen U (2012). "Sensitivity, variability, and recovery of functional and structural endpoints of an aquatic community exposed to herbicides." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 178-183.
- Knauer S, Singer H, Hollander J, Knauer K (2010). "Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms." *Environmental Pollution* 158(1): 167-174.
- Leu E, Krieger-Liszkay A, Goussias C, Gross E M (2002) "Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II" *plant physiology* :130 : 4 : 2011-2018
- Madsen JD, Getsinger KD, Stewart R M, Owens C S (2002) "Whole lake fluridone treatments for selective control of Eurasian watermilfoil: II. Impacts on submersed plant communities" *lake and reservoir management* : 18 : 3 : 191-200
- Madsen, Kim Halskov (1989) 'Breakthrough by Breakdown: Metaphors and structured Domains', In: K. Klein & K. Kumar *System Development for Human Progress*. North-Holland Publishing Company: 41-53.
- Markert B, Wappelhorst O, Weckert V, Herpin U, Siewers U, Friese K, Breulmann G (1999) "The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment" *journal of radioanalytical and nuclear chemistry* 240: 425-429
- Markert, B.A., Breure, A.M. et Zechmeister, H.G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications*, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors. (Oxford : Elsevier Science Limited), pp. 3-39
- McGregor E B, Solomon K R, Hanson M L (2008). "Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* to atrazine." *Chemosphere* 73(3): 249-260.
- Nelson L S, Shearer J F (2005) "2,4-D and *Mycoleptodiscus terrestris* for control of Eurasian watermilfoil." *Journal of Aquatic Plant Management* 43: 29-34.
- Netherland MD, Getsinger K D (1992) "efficacy of triclopyr on eurasian watermilfoil - concentration and exposure time effects" *journal of aquatic plant management* : 30 : 1-5
- Netherland MD, Getsinger K D (1995) "Laboratory Evaluation of Threshold Fluridone Concentrations Under Static Conditions for Controlling Hydrilla and Eurasian Watermilfoil" *journal of aquatic plant management* 33: 33-36
- Netherland MD et al. (1995). "potential control of hydrilla and eurasian watermilfoil under various fluridone half-life scenarios" *journal of aquatic plant management* : 33: 36-42
- Netherland MD, Getsinger K D, Skogerboe J D (1997). "Mesocosm Evaluation of the Species-Selective Potential of Fluridone" *journal of aquatic plant management* 35: 41-50
- Newman, R.M. 2004. Invited review -biological control of Eurasian watermilfoil by aquatic insects: basic insights from an applied problem. *Arch. Hydrobiol.* 159: 145–184
- Nichols SA, Shaw BH. 1986. Ecological life histories of the three aquatic nuisance plants, *Myriophyllum spicatum*, *Potamogeton crispus* and *Elodea canadensis*. *Hydrobiologia.* 131:3-21.
- Onion AM, (2004); Herbivore resistance in invasive and native *Myriophyllum spicatum* and *Myriophyllum heterophyllum* ; A Thesis Presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.

- Oturan M et Mouchel JM (2007) ; pesticides : impacts environnementaux, gestion et traitements ; Presse de l'école nationale des ponts et chaussées ; 334 p.
- Poovey AG, Getsinger KD, Skogerboe JG, Koschnick T J, Madsen J D, Stewart R M (2004) "Small-plot, low-dose treatments of triclopyr for selective control of Eurasian watermilfoil" lake and reservoir management 20(4): 322-332
- Poovey A G, Slade J G, Netherland M D (2007) "Susceptibility of Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) and a milfoil hybrid (*M. spicatum* x *M. sibiricum*) to Triclopyr and 2,4-D amine." Journal of Aquatic Plant Management 45: 111-115.
- Romero G, von Zastrow M, Friedman PA. (2011) Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity. Adv Pharmacol. 62:279-314.
- Samuel Oliver Neill (2002) The functional role of anthocyanins in leaves A thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. School of Biological Sciences. University of Auckland.
- Sanchez D, Graca MAS, Canhoto J (2007) Testing the Use of the Water Milfoil (*Myriophyllum spicatum* L.) in Laboratory Toxicity Assays. Bull Environ Contam Toxicol 78:421–426
- Selim S A, O'Neal S W, Ross M A, Lembi C A (1989) "Bioassay of photosynthetic inhibitors in water and aqueous soil extracts with Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) Weed science, 37: 810-814
- Shearer JF (2002) "The potential role of an endophytic fungus in the decline of stressed Eurasian watermilfoil" journal of aquatic plant management : 40 : 76-78
- Sivaci A et Elmas E (2012) The combined effects of cadmium and salinity on some pigments total phenolic compounds of *Myriophyllum heterophyllum* Michx. And *Potamogeton crispus* L. African journal of agricultural research 7: 26: 3813-3818
- Skogerboe, J. G., Getsinger K. D., et al. (2006). "Efficacy of diquat on submersed plants treated under simulated flowing water conditions." Journal of Aquatic Plant Management 44: 122-125.
- Smith C S, Barko J W (1990) "Ecology of Eurasian watermilfoil" Journal aquatic plant management, 28: 55-64
- Soulsby C., Youngson A.F., Moir H.J. & Malcolm I.A. (2001) Fine sediment influence on salmonid habitat in a lowland agricultural stream: a preliminary assessment. Science of the Total Environment 265, 295±307
- Sprecher SL, Stewart AB (1995). "Triclopyr Effects on Peroxidase Activity in Target and Non-target Aquatic Plants" journal of aquatic plant management 33: 43-48
- Swanson WJ and Vacquier VD (2002) Reproductive protein evolution, Ecol. Syst. 2002. 33:161–79
- Titus JE, Adams MS (1979), Coexistence and the comparative light relations of the submersed macrophytes *Myriophyllum spicatum* L. and *Vallisneria spiralis* L., Springer Volume 40, Issue 3, pp 273-286
- Trebitz AS, Nichols SA, Carpenter SR, Lathrop RC (1993) Patterns of vegetation change in Lake Wingra following a *Myriophyllum spicatum* decline, Volume 46, Issues 3–4, Pages 325–340
- Vallée R, Dousset S, Benoit M, Billet D (2013) ; Sorption of selected pesticides on soils, sediment and straw from a constructed agricultural drainage ditch or pond; Environmental Science and Pollution Research, ISSN 1614-7499
- Vassios J D, Nissen S J, Brunk G R (2011). "Imazamox absorption, desorption, and metabolism by Eurasian watermilfoil." Journal of Aquatic Plant Management 49: 44-49.

- Verma U, Charudattan R (1993) "host-range of *mycoleptodiscus-terrestris*, a microbial herbicide candidate for eurasian watermilfoil, *myriophyllum-spicatum*" *biological control* : 3 : 4 : 271-280
- Vervliet-Scheebaum M, Straus A, Tremp H, Hamer M, Maund S J, Wagner E, Schulz R (2010). "A microcosm system to evaluate the toxicity of the triazine herbicide simazine on aquatic macrophytes." *Environmental Pollution* 158(2): 615-623.
- Wellburn AR (1994); The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution; *Journal of Plant Physiology*, 144: 307–313
- Wendt-Rasch L, Pirzadeh P, Woin P (2003) "Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems" *AQUATIC TOXICOLOGY* : 63 : 3 : 243-256
- Wendt-Rasch L, Van den Brink PJ, Crum S J H, Woin P (2004) "The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community" *ecotoxicology and environmental safety* : 57 : 3 : 383-398
- Wersal R M, Madsen J D, Woolf T E, Eckberg N (2010) "Assessment of Herbicide Efficacy on Eurasian Watermilfoil and Impacts to the Native Submersed Plant Community in Hayden Lake, Idaho, USA." *Journal of Aquatic Plant Management* 48: 5-11.
- Zalidis, G. C., Crisman, T.L. and Gerakis, P.A. (2002); Restoration of Mediterranean Wetlands Hellenic Ministry of the Environment, Physical Planning and Public Works, Athens & Greek Biotope/Wetland Centre, Thermi, Greece.



20	Ioxynil	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> I <sub>2</sub> NO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	Bénoxacor	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	Boscalid	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	34 à 151	4 à 9	6 à 30	13 à 58	0 à 27	2 à 35	0 à 4	4 à 41	
23	Cyproconazole	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	6 à 35	0	8 à 25	0	0 à 3	0	0 à 3	0	0 à 16
24	DMTA-P	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub> S	0 à 2	0	0	0 à 1	0 à 2	0 à 5	0 à 2	0 à 1	0
25	Méfenpyr-diéthyl	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Metconazole	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	0 à 4	0	0	0	0 à 4	0 à 4	0	0	0
27	Paclobutrazol	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	Cléthodime	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0 à 36	0
29	Nicosulfuron	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	0 à 522	0	30 à 843	517 à 2521	0 à 13	0 à 2	0	0 à 3	0
30	Acétochlore	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>	0 à 227	0	0	0	0	0 à 1	0 à 26	0	0
31	Azoxystrobine	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	0 à 1	0	0 à 1	0 à 1	0	0	0	0	0 à 49
32	Carbendazime	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	2 à 8	0	0 à 1	0 à 2	0 à 1	0 à 3	0	0	
33	Chlorpyrifos-ethyl	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Chlortoluron	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	0 à 3	0	0 à 781	0 à 1	0 à 4	0 à 1	0 à 39	0 à 2	5 à 52993
35	Cloquintocet-mexyl	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	Dichlormid	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	Fenpropidine	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N	0	0	0	0	0	0	0	0 à 8	0
38	Flufénacet	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	0 à 274	0	0 à 12	0	0 à 37	0 à 160	0 à 1	0	0 à 2
39	Flurtamone	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	Isoxadifen-ethyl	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	10
41	Isoproturon	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	0 à 4085	0	0	0 à 6	3 à 39	0 à 2	0 à 64	0 à 1	0 à 5
42	Isoxaflutole	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	Kresoxim-Me	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	Mésosulfuron-Me	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	1 à 5	0	2 à 6	0	2 à 4	1 à 8	0	0 à 3	4 à 14





## Annexe 2 : Milieu de culture

### Les sédiments

Le sédiment est composé de :

- 5% du volume de nutriment
- 10% du volume d'argile
- 85% du volume de sable

**Nutriment** : le nutriment appliqué est le tétra substrat complète, c'est un substrat pour aquarium qui est sans azote ni phosphore ajouté (Tetra CompleteSubstrate).

**L'argile** est du White kaolin de référence RLO-5272, dont les proportions en éléments minéraux sont données dans le tableau suivant :

Résultats d'analyse du white kaolin RLO-5272 par ICP

Eléments	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Teneurs en solution ppm	194,33	< 5 ppb	< 5 ppb	< 5 ppb	18,33 ppb	4.13	< 5 ppb	< 5 ppb	126,33 ppb	< 5 ppb
Teneurs par Kg de kaolin ppm	225,33	< 5,79	< 5,79	< 5,79	21,25	4,788	< 5,79	< 5,79	146,48	< 5,79

Le sable utilisé est du sable fin de fontainebleau à une densité de 1.6 ; ce sable a été chauffé dans un four pendant 2 heures à une température de 500 °C.

2 cm de sédiments dans le bécher sont constitués d'une couche de sable de 1 cm (64 g) sur une couche de mélange sable-argile-nutriment (54,4-0,88-2,6 g) soit environ 120g au total.

### La solution de culture (*ligne directrice de l'OCDE 203 adopté le 17-07-1992*)

Cette solution est constituée de quatre composés dont le chlorure de calcium, le sulfate de magnésium, le bicarbonate de sodium et le chlorure de potassium. Elle est préparée en deux étapes.

### Préparation des solutions mères

- **Solution de chlorure de calcium** : dissoudre 11,76 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans de l'eau désionisée ; compléter jusqu'à un litre avec de l'eau désionisée.
- **Solution de sulfate de magnésium** : dissoudre 4,93 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dans de l'eau désionisée ; compléter jusqu'à un litre avec de l'eau désionisée.

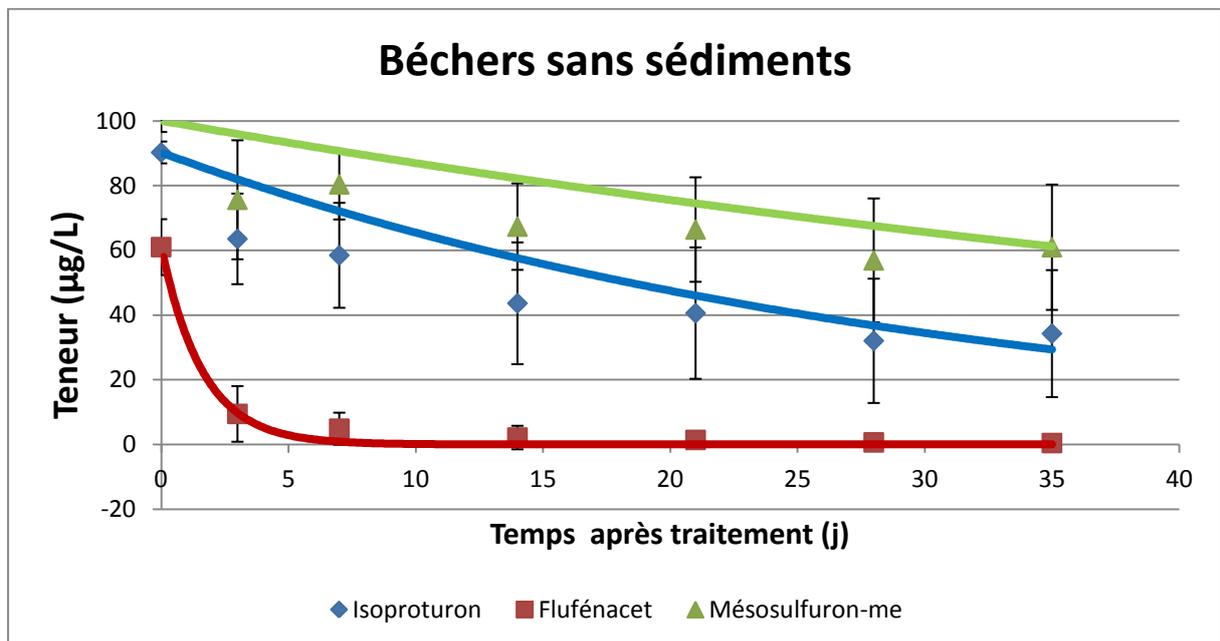
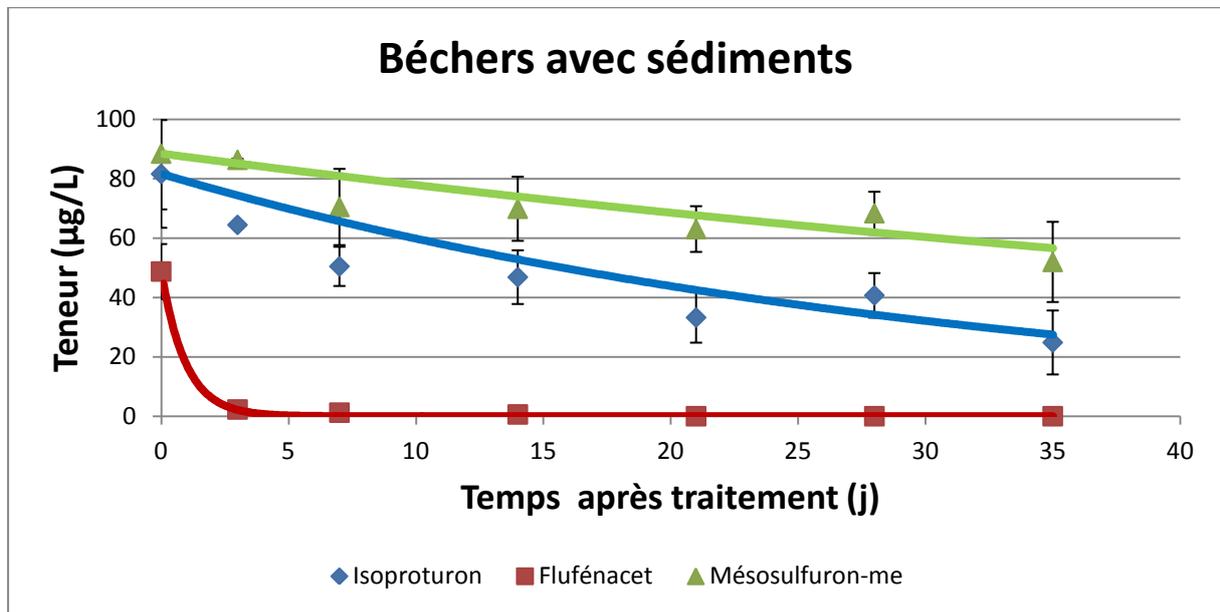
- **Solution de bicarbonate de sodium** : dissoudre 2,59 g de  $\text{NaHCO}_3$  dans de l'eau désionisée ; compléter jusqu'à un litre avec de l'eau désionisée.
- **Solution de chlorure de potassium** : dissoudre 0,23 g de  $\text{KCl}$  dans de l'eau désionisée ; compléter jusqu'à un litre avec de l'eau désionisée.

Tous les produits doivent être de qualité pour l'analyse. La conductivité de l'eau distillée ou désionisée ne doit pas dépasser  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

Pour 1 L de solution : mélanger 25 ml de chacune des solutions mères et compléter à un litre au moyen d'eau désionisée. Dans cette solution, la somme des ions calcium et magnésium s'élève à 2,5 mmol/l. le rapport entre les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  est de 4 à 1 et celui entre les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  de 10 à 1. La capacité acide de cette solution est de 0,8 mmol/L.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à atteindre le point de saturation en oxygène, puis conserver cette eau pendant environ deux jours sans aération supplémentaire avant de l'utiliser.

### Annexe 3 : Evolution des teneurs en herbicides des bchers tests



#### Annexe 4 : Nombre de racines secondaires (r) et de verticilles (v)

	T <sub>0j</sub>		T <sub>3j</sub>		T <sub>7j</sub>		T <sub>21j</sub>	
	r	v	r	v	r	v	r	v
Témoin	0	27 ± 2	2 ± 2	24 ± 5	4 ± 2	30 ± 3	11 ± 7	30 ± 3
Isoproturon	0	24 ± 6	0	25 ± 7	2 ± 2	26 ± 2	2 ± 2	21 ± 8
Flufénacet	0	19 ± 7	0	29 ± 2	1 ± 1	28 ± 3	18 ± 8	27 ± 4
Mésosulfuron-me	0	28 ± 2	0	28 ± 2	0	20 ± 11	1 ± 1	29 ± 1
Mélange $\Sigma$ 100	0	26 ± 6	0	27 ± 1	0	25 ± 2	1 ± 1	26 ± 7
Mélange $\Sigma$ 300	0	27 ± 2	0	25 ± 6	0	26 ± 1	1 ± 1	29 ± 1

#### Annexe 5 :

##### Ratio racine/tige Longueur

	T <sub>0j</sub>	T <sub>3j</sub>	T <sub>7j</sub>	T <sub>21j</sub>
Témoin	41,6 ± 6,3 <b>a</b>	52,9 ± 5,4 <b>a</b>	108,3 ± 20,8 <b>a</b>	236,4 ± 29,1 <b>a</b>
Isoproturon	35,6 ± 4,4 <b>a</b>	59,4 ± 10,4 <b>a</b>	94,6 ± 16,5 <b>a</b>	127,0 ± 22,6 <b>b</b>
Flufénacet	41,5 ± 10,3 <b>a</b>	57,8 ± 15,7 <b>a</b>	65,8 ± 20,8 <b>b</b>	134,2 ± 62,7 <b>b</b>
Mésosulfuron-me	38,5 ± 4,6 <b>a</b>	48,7 ± 8,2 <b>a</b>	39,2 ± 10,0 <b>b</b>	32,2 ± 3,0 <b>c</b>
Mélange $\Sigma$ 100	41,2 ± 4,3 <b>a</b>	53,9 ± 10,5 <b>a</b>	49,9 ± 9,7 <b>b</b>	54,0 ± 25,8 <b>c</b>
Mélange $\Sigma$ 300	40,3 ± 5,7 <b>a</b>	63,1 ± 13,1 <b>a</b>	55,7 ± 9,8 <b>b</b>	45,8 ± 13,9 <b>c</b>

##### Ratio racine/tige Biomasse humide

	T <sub>0j</sub>	T <sub>3j</sub>	T <sub>7j</sub>	T <sub>21j</sub>
Témoin	0,4 ± 0,2 <b>a</b>	0,5 ± 0,1 <b>a</b>	0,7 ± 0,2 <b>ab</b>	1,3 ± 0,4 <b>a</b>
Isoproturon	0,4 ± 0,2 <b>a</b>	0,4 ± 0,1 <b>a</b>	0,9 ± 0,1 <b>a</b>	1,0 ± 0,1 <b>a</b>
Flufénacet	0,3 ± 0,1 <b>a</b>	0,5 ± 0,2 <b>a</b>	0,5 ± 0,2 <b>b</b>	1,0 ± 0,4 <b>a</b>
Mésosulfuron-me	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,4 ± 0,1 <b>a</b>	0,2 ± 0,1 <b>c</b>	0,2 ± 0,0 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 100	0,4 ± 0,1 <b>a</b>	0,5 ± 0,2 <b>a</b>	0,6 ± 0,2 <b>ab</b>	0,2 ± 0,0 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 300	0,3 ± 0,1 <b>a</b>	0,6 ± 0,1 <b>a</b>	0,5 ± 0,1 <b>b</b>	0,3 ± 0,1 <b>b</b>

##### Ratio racine/tige (Biomasse sèche)

	T <sub>0j</sub>	T <sub>3j</sub>	T <sub>7j</sub>	T <sub>21j</sub>
Témoin	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,4 ± 0,2 <b>a</b>	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,4 ± 0,2 <b>a</b>
Isoproturon	0,2 ± 0,3 <b>a</b>	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,3 ± 0,1 <b>a</b>	0,6 ± 0,2 <b>a</b>
Flufénacet	0,1 ± 0,1 <b>a</b>	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,5 ± 0,2 <b>a</b>
Mésosulfuron-me	0,1 ± 0,0 <b>a</b>	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,1 ± 0,0 <b>a</b>	0,1 ± 0,0 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 100	0,3 ± 0,2 <b>a</b>	0,4 ± 0,5 <b>a</b>	0,4 ± 0,3 <b>a</b>	0,1 ± 0,0 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 300	0,2 ± 0,1 <b>a</b>	0,3 ± 0,0 <b>a</b>	0,4 ± 0,2 <b>a</b>	0,2 ± 0,0 <b>b</b>

## Ratio masse sèche/masse humide (Biomasse totale)

	T <sub>0j</sub>	T <sub>3j</sub>	T <sub>7j</sub>	T <sub>21j</sub>
Témoin	0,17 ± 0,02 <b>a</b>	0,20 ± 0,03 <b>a</b>	0,12 ± 0,01 <b>b</b>	0,15 ± 0,03 <b>d</b>
Isoproturon	0,19 ± 0,03 <b>a</b>	0,17 ± 0,01 <b>a</b>	0,10 ± 0,03 <b>b</b>	0,14 ± 0,01 <b>d</b>
Flufénacet	0,22 ± 0,01 <b>a</b>	0,19 ± 0,04 <b>a</b>	0,17 ± 0,02 <b>a</b>	0,19 ± 0,02 <b>c</b>
Mésosulfuron-me	0,20 ± 0,02 <b>a</b>	0,22 ± 0,01 <b>a</b>	0,17 ± 0,02 <b>a</b>	0,26 ± 0,02 <b>a</b>
Mélange $\Sigma$ 100	0,21 ± 0,05 <b>a</b>	0,20 ± 0,03 <b>a</b>	0,12 ± 0,04 <b>b</b>	0,23 ± 0,01 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 300	0,22 ± 0,01 <b>a</b>	0,17 ± 0,02 <b>a</b>	0,13 ± 0,02 <b>b</b>	0,21 ± 0,02 <b>bc</b>

## Annexe 6 : Taux de croissance (j<sup>-1</sup>) à T<sub>21j</sub>

	Témoin	Isoproturon	Flufénacet	Mésosulfuron-méthyle	Mélange $\Sigma$ 100	Mélange $\Sigma$ 300
RGR <sub>longueur</sub>	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02	-0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,02
RGR <sub>masse humide</sub>	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,02
RGR <sub>masse sèche</sub>	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,01

## Annexe 7 :

### Biomasse humide totale (mg)

	T <sub>0j</sub>	T <sub>3j</sub>	T <sub>7j</sub>	T <sub>21j</sub>
Témoin	241,1 ± 42,8 <b>a</b>	264,0 ± 7,9 <b>a</b>	418,2 ± 44,7 <b>a</b>	402,0 ± 51,9 <b>a</b>
Isoproturon	221,8 ± 42,8 <b>a</b>	274,1 ± 20,7 <b>a</b>	257,3 ± 34,9 <b>bc</b>	348,5 ± 75,5 <b>ab</b>
Flufénacet	245,0 ± 40,0 <b>a</b>	278,3 ± 22,8 <b>a</b>	304,0 ± 49,4 <b>b</b>	284,9 ± 56,2 <b>b</b>
Mésosulfuron-me	249,2 ± 77,3 <b>a</b>	303,0 ± 44,9 <b>a</b>	231,7 ± 71,0 <b>cd</b>	292,9 ± 32,5 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 100	244,1 ± 38,1 <b>a</b>	273,8 ± 54,0 <b>a</b>	177,4 ± 26,9 <b>d</b>	303,4 ± 37,2 <b>b</b>
Mélange $\Sigma$ 300	272,0 ± 46,1 <b>a</b>	267,7 ± 61,3 <b>a</b>	209,8 ± 19,3 <b>cd</b>	303,1 ± 57,0 <b>b</b>

### Biomasse sèche totale (mg)

	T <sub>0j</sub>	T <sub>3j</sub>	T <sub>7j</sub>	T <sub>21j</sub>
Témoin	41,7 ± 7,6 <b>a</b>	53,0 ± 7,1 <b>ab</b>	51,6 ± 7,2 <b>a</b>	59,7 ± 17,0 <b>ab</b>
Isoproturon	41,7 ± 10,7 <b>a</b>	48,0 ± 5,3 <b>b</b>	26,0 ± 9,2 <b>bc</b>	49,2 ± 10,6 <b>b</b>
Flufénacet	53,2 ± 10,7 <b>a</b>	54,0 ± 10,5 <b>ab</b>	52,0 ± 9,5 <b>a</b>	54,9 ± 11,8 <b>b</b>
Mésosulfuron-me	48,2 ± 14,4 <b>a</b>	65,8 ± 12,5 <b>a</b>	39,0 ± 8,7 <b>ab</b>	77,2 ± 11,1 <b>a</b>
Mélange $\Sigma$ 100	52,4 ± 20,0 <b>a</b>	55,4 ± 9,7 <b>b</b>	21,5 ± 10,1 <b>c</b>	70,1 ± 7,3 <b>ab</b>
Mélange $\Sigma$ 300	59,2 ± 9,3 <b>a</b>	45,6 ± 7,5 <b>ab</b>	26,8 ± 6,7 <b>bc</b>	64,4 ± 12,1 <b>ab</b>

## Annexe 8 : Teneur en C/N du milieu de culture

	%C	%N
Solution de culture	0,00	0,00
Sédiments de culture	0,01	0,00
Tétra complete	0,41	0,00

## Résumé

L'étude a porté sur *Myriophyllum spicatum*, un macrophyte aquatique submergé dicotylédone proposé par l'OCDE comme organisme test de la qualité des eaux. Cette plante est reconnue par son caractère ubiquiste et résistant à des perturbations influençant son milieu de culture. C'est un organisme pouvant être utilisé comme bioindicateur de la qualité des eaux contaminées par les pesticides. Le but de cette étude a été d'étudier *Myriophyllum spicatum* pendant 21 jours sous l'influence de trois herbicides détectés aux niveaux des dispositifs rustiques de filtration dans la Lorraine. Le flufénacet, l'isoproturon et le mésosulfuron-méthyle ont fait l'objet de contaminations simples à 100 µg/L chacun et de contaminations multiples par des mélanges constitués par les trois herbicides à 33 et à 100 µg/L chacun. Au cours de l'étude les molécules ont subi chacune une dégradation particulière, le flufénacet est celle qui s'est dégradé le plus rapidement avec un temps de demi-vie de 3 à 5 jours ; tandis que le mésosulfuron-méthyle est celle qui s'est dégradé le plus lentement avec un temps de demi-vie de 31 à 39 jours. Le fort développement racinaire a été observé avec les racines des plantes témoins de 223,9 cm alors que ceux des plantes sous influences d'herbicide avaient une longueur maximale de 122,6 cm à T<sub>21j</sub>. Les plantes qui ont été soumis à une contamination avaient plus de biomasse sèche par rapport à la biomasse humide que les plantes témoins. L'isoproturon et le mésosulfuron-méthyle ont le plus influencé les teneurs en chlorophylle *a* et *b*. Les teneurs en composés phénoliques n'ont pas été significativement affectées par les différents traitements.

Mots clés : *Myriophyllum spicatum*, bioindicateur, herbicide, biomasses, composés phénoliques, chlorophylles.