



# **Réponses écophysiologiques et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité : implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées**

Anne-Antonella Serra

## **► To cite this version:**

Anne-Antonella Serra. Réponses écophysiologiques et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité : implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées. Biologie végétale. Université de Rennes, 2015. Français. <NNT : 2015REN1S005>. <tel-01187712>

**HAL Id: tel-01187712**

**<https://theses.hal.science/tel-01187712v1>**

Submitted on 27 Aug 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé (VAS)**

présentée par

**Anne-Antonella Serra**

Préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6553 ECOBIO  
Écosystèmes Biodiversité Évolution

---

**Réponses  
écophysiologiques et  
moléculaires des plantes  
aux stress xénobiotiques  
complexes de faible  
intensité :  
implications dans les  
capacités de protection  
environnementale des  
bandes enherbées**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 5 mars 2015**

devant le jury composé de :

**Marie-Pascale PRUD'HOMME**

Professeur - Université de Caen Basse-  
Normandie / *rapporteur*

**Graham NOCTOR**

Professeur - Université Paris Sud / *rapporteur*

**Claudia COSIO**

Associée de recherche - Université de  
Genève / *examinatrice*

**Michel MENCH**

Directeur de recherche - INRA / *examineur*

**Gwenola GOUESBET**

Ingénieur de Recherche - CNRS  
/ *directrice de thèse*

**Cécile SULMON**

Maître de Conférence - Université Rennes 1  
/ *co-directrice de thèse*

**Ivan COUÉE**

Professeur - Université Rennes 1  
/ *co-directeur de thèse*

Mesdames et Messieurs les membres du Jury, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie sincèrement Marie-Pascale Prud'homme et Graham Noctor d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs. Je remercie également Laurent Lagadic, Jean-François Masfaraud, Antoine Gravot et Cendrine Mony pour leur implication dans mes comités de thèse et leurs commentaires constructifs sur mon travail.

C'est avec émotion que je remercie mes directeurs de thèse, Gwenola Gouesbet, Cécile Sulmon et Ivan Couée, qui m'ont permis de réaliser ce travail, qui m'ont encadrée de la meilleure façon qu'il soit, qui m'ont guidée et soutenue tout au long de ces trois années. Tous trois ont toujours été très présents et disponibles en toutes circonstances, prêts à m'apporter leur aide aussi bien pour les expérimentations que pour l'interprétation des données et les rédactions associées. Merci pour votre investissement sans faille et vos longues heures de correction ! Ce travail ne serait pas tel qu'il est aujourd'hui sans vos efforts. Merci également pour votre bonne humeur et vos conversations enrichissantes, grâce à vous je crois bien n'avoir jamais perdu mon enthousiasme pour la recherche.

Je remercie le laboratoire et l'équipe RBPE de m'avoir si bien accueillie, et merci à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, pour leur implication sur le terrain, en laboratoire ou au traitement des données : Cendrine Mony, David Renault, Sophie Coudouel, Alexandra Dheilly, Guillaume Bouger, Olivier Jambon, Valérie Gouesbet, Jean-Luc Foulon, Aude Ernoult, Anne-Kristelle Bittebiere, Yann Rantier, Françoise le Moal, Louis Parize, Nathalie Le Bris, Frédérique Pallois, Armel Salmon.

Merci à tous les stagiaires avec qui j'ai pu travailler et qui m'ont grandement aidée lors de longues manips et/ou lors de longues journées sur le terrain : Andréïna, Harold, Hélène, David, Kahina, Amandine. Merci pour votre gentillesse et votre investissement !

Merci également aux personnes de l'INRA STLO de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et permis de finaliser mes expérimentations quand des problèmes techniques inopportuns sont survenus.

Durant ces trois années j'ai également eu le plaisir de faire de l'enseignement et de travailler avec les équipes de Biologie et Physiologie végétales, que je remercie pour m'avoir initiée à ce rôle d'enseignant et pour leurs conseils.

Merci à mes (ex)colocataires de bureau, Sophie, Alexandra et nouvellement Maud, pour leur gentillesse et leur compréhension quand parfois, à cause de moi, elles devaient chuchoter ! Le bavardage lors de pauses, café ou pas, était fort sympathique.

Merci à toutes les personnes du laboratoire que j'ai côtoyées, avec plaisir, et qui ont rendu ces trois années très agréables, Anne-Sophie, Julie, Julien, Hélène, Sarah, Diana et tous les autres !

Merci également à celles qui nous simplifient la vie administrative et logistique chaque jour : Valérie, Tifenn, Sandra et Isabelle.

Enfin, je souhaite remercier mes proches pour leur soutien durant ces années bretonnes, loin de chez moi. Merci à mes amies, Hélya, Caro, Nat, Isabelle, Sabrina (courage, bientôt tu seras à l'étape des remerciements toi aussi !) et compagnie, qui depuis bien des années partagent mes aventures scientifiques et autres. Merci à Jonathan d'avoir partagé la Bretagne avec moi, et d'avoir été bénévole (un peu forcé) pour m'aider dans certaines tâches longues et pénibles de ma thèse.

Un grand merci à toute ma famille, mes parents, ma sœur, mon grand-père, toujours optimistes, encourageants et intéressés par mon travail (bien qu'ils ne comprennent pas toujours de quoi je parle et encore moins ce que j'écris, l'effort est là !). Merci pour vos colis bien remplis, surtout ces derniers mois, votre patience et pour m'avoir poussée jusque-là. Je ne sais pas encore de quoi sera fait l'avenir, mais je sais que je pourrai toujours compter sur vous !

*A mes grands-parents.*

---

*« Qu'est-ce donc qu'une mauvaise herbe, sinon une plante dont on n'a pas encore découvert les vertus ? »*

Ralph Waldo Emerson (1803 – 1882)



## SOMMAIRE

<b>Abréviations .....</b>	<b>6</b>
---------------------------	----------

### ~ Chapitre I ~

<b>Introduction générale.....</b>	<b>8</b>
-----------------------------------	----------

<b>1. Prévalence des xénobiotiques dans les pollutions environnementales .....</b>	<b>9</b>
--	----------

1.1. Diversité des xénobiotiques .....	9
--	---

1.2. Diversité des pesticides potentiellement impliqués dans les pollutions environnementales .....	9
---	---

1.3. Implication de molécules associées dans les pollutions environnementales liées aux pesticides.....	13
---	----

1.4. Dynamique des pesticides dans l'environnement .....	13
--	----

1.5. Prévalence et contrôle des pollutions environnementales impliquant des pesticides	18
--	----

<b>2. Fonctionnement des plantes terrestres en conditions de stress xénobiotique .....</b>	<b>24</b>
--	-----------

2.1. Effets des stress chimiques xénobiotiques chez les plantes.....	24
--	----

2.2. Analyse et modélisation des effets des mélanges complexes de xénobiotiques.....	31
--	----

2.3. Limitation des études prédictives d'impact .....	34
---	----

2.4. Mécanismes de réponses des plantes aux stress xénobiotiques .....	35
--	----

<b>3. Rôles des communautés végétales dans la dynamique des pollutions chimiques .....</b>	<b>42</b>
--	-----------

3.1. Importance des communautés végétales dans la remédiation des milieux pollués ...	43
---	----

3.2. Rôles protecteurs et remédiateurs des systèmes de zone tampon et de bande enherbée .....	47
---	----

<b>4. Problématique et objectifs .....</b>	<b>54</b>
--	-----------

### ~ Chapitre II ~

<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>58</b>
------------------------------------	-----------

<b>1. Matériels et analyses à l'échelle environnementale .....</b>	<b>59</b>
--	-----------

1.1. Sites d'étude et campagnes d'échantillonnage .....	59
---	----

1.2. Caractérisation du couvert végétal des bandes enherbées .....	61
--	----

1.2.1. Recouvrement spécifique.....	61
1.2.2. Biomasse végétale .....	61
1.2.3. Mesure des niveaux de chlorophylles.....	62
1.3. Prélèvements des échantillons pour les analyses de pesticides .....	62
1.3.1. Parties aériennes de plantes .....	62
1.3.2. Sol.....	62
1.3.3. Eau du sol.....	62
<b>2. Détection et quantification des pesticides dans les matrices environnementales.....</b>	<b>63</b>
2.1. Préparation des échantillons de sol .....	63
2.1.1. Extraction des pesticides.....	63
2.1.2. Purification par extraction en phase solide .....	63
2.2. Préparation des échantillons d'eau du sol .....	64
2.3. Préparation des échantillons de matrice végétale .....	64
2.4. Quantification des pesticides par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (GC-MS) .....	65
<b>3. Modèles végétaux et conditions expérimentales .....</b>	<b>67</b>
3.1. Matériel végétal .....	67
3.1.1. Espèce modèle : Arabidopsis thaliana.....	67
3.1.2. Espèces associées aux expérimentations de bandes enherbées .....	67
3.2. Conditions de cultures.....	68
3.2.1. Dispositifs et conditions de culture en milieu gélosé axénique.....	68
3.2.2. Dispositifs et conditions de culture en milieu liquide axénique.....	69
3.2.3. Conditions d'exposition aux stress chimiques .....	70
3.3. Conditions de stress xénobiotiques et chimiques.....	71
<b>4. Analyses développementales et physiologiques.....</b>	<b>73</b>
4.1. Paramètres de croissance .....	73
4.2. Paramètres photosynthétiques.....	74

4.2.1. Mesure de l'activité photosynthétique.....	74
4.2.2. Extraction et quantification des pigments photosynthétiques .....	74
<b>5. Analyses métabolomiques .....</b>	<b>75</b>
5.1. Méthodologie d'extraction.....	75
5.2. Quantification par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse .....	75
<b>6. Analyses d'expression génétique .....</b>	<b>77</b>
6.1. Stratégie de séquençage du transcriptome par RNA-Seq .....	77
6.2. Extraction des ARN totaux, enrichissement en ARNm et obtention des ADNc .....	78
6.3. Séquençage du transcriptome .....	79
6.4. Analyses des données de séquençage .....	80
6.5. Quantification ciblée de l'expression génétique .....	82
6.5.1. Choix des amorces .....	84
6.5.2. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	85
<b>7. Analyses statistiques .....</b>	<b>86</b>
<b>~ Chapitre III ~</b>	
<b>Interactions plante-xénobiotiques au sein des communautés végétales</b>	
<b>de bandes enherbées.....</b>	<b>87</b>
<b>1. Introduction générale .....</b>	<b>88</b>
<b>2. Dynamique de diffusion des pesticides dans les bandes enherbées expérimentales</b>	<b>91</b>
2.1. Introduction.....	91
2.2. Résultats.....	92
2.2.1. Développement de la méthode de quantification de pesticides issus de matrices environnementales.....	92
2.2.2. Gradients d'exposition aux stress chimiques entre les parcelles agricoles et les bandes enherbées .....	100
2.2.3. Effets des bandes enherbées sur la limitation de la diffusion des pesticides ....	103
2.3. Discussion .....	104

<b>3. Dynamique de croissance et état physiologique des espèces végétales au sein des bandes enherbées expérimentales .....</b>	<b>109</b>
3.1. Introduction.....	109
3.2. Résultats.....	110
3.2.1. <i>Etat initial des bandes enherbées expérimentales.....</i>	<i>110</i>
3.2.2. <i>Evolution temporelle du couvert végétal des bandes enherbées expérimentales .....</i>	<i>111</i>
3.2.3. <i>Implication de la distance à la parcelle agricole dans le recouvrement spécifique des bandes enherbées expérimentales et dans l'état physiologique des plantes.....</i>	<i>113</i>
3.2.4. <i>Relations entre les profils de recouvrement spécifique et les pollutions en pesticides en provenance des cultures .....</i>	<i>120</i>
3.3. Discussion .....	122
<b>4. Analyse en conditions contrôlées des effets de polluants organiques et métalliques sur la croissance des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales .....</b>	<b>125</b>
4.1. Introduction.....	125
4.2. Résultats.....	125
4.2.1. <i>Toxicités différentielles des polluants organiques et métalliques chez Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>126</i>
4.2.2. <i>Perturbations de la croissance des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales exposées aux polluants en conditions contrôlées.....</i>	<i>128</i>
4.2.3. <i>Effets polluant- et organe-dépendants des stress chimiques sur les espèces végétales des bandes enherbées .....</i>	<i>130</i>
4.2.4. <i>Réponses différentielles des espèces végétales des bandes enherbées aux polluants.....</i>	<i>131</i>
4.3. Discussion .....	134
<b>5. Implication des communautés végétales des bandes enherbées expérimentales dans la dynamique des pesticides .....</b>	<b>137</b>
5.1. Introduction.....	137
5.2. Résultats.....	137

5.2.1. Absorption de pesticides par les communautés végétales des bandes enherbées .....	137
5.2.2. Absorption et dégradation des pesticides en conditions contrôlées par une espèce végétale majeure des bandes enherbées ( <i>Lolium perenne</i> ).....	139
5.3. Discussion .....	144
6. Discussion générale.....	148
<b>~ Chapitre IV ~</b>	
<b>Mécanismes biochimiques et moléculaires des réponses des plantes aux stress chimiques résiduels et complexes .....</b>	<b>152</b>
1. Introduction .....	153
2. Article n°1 : Low environmentally-relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	155
3. Article n°2 : Physiology and toxicology of hormone-disrupting chemicals in higher plants.....	174
4. Discussion .....	185
<b>~ Chapitre V ~</b>	
<b>Caractérisation métabolomique et transcriptomique des réponses aux stress chimiques résiduels et complexes chez une espèce prairiale de bandes enherbées .....</b>	<b>188</b>
1. Introduction .....	189
2. Article n°3 : Metabolic profiling of <i>Lolium perenne</i> shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of chemical stress .....	191
3. Article n°4 : Transcriptomic analysis reveals molecular and signaling responses of the grass species <i>Lolium perenne</i> to low-level xenobiotic exposures .....	212
<b>~ Chapitre VI ~ Synthèse et perspectives.....</b>	<b>256</b>
<b>~ Références bibliographiques ~ .....</b>	<b>267</b>
<b>~ Annexes ~ .....</b>	<b>296</b>

## Abréviations

**2,4-D** : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

**ABA** : acide abscissique

**ABIMS** : Analyses and Bioinformatics for Marine Science

**ACN** : acétonitrile

**ACP** : analyse en composantes principales

**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire

**AFC** : analyse factorielle des correspondances

**AMPA** : acide aminométhylphosphonique

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ATP** : adénosine-5'-triphosphate

**BBH** : Best Blast Hits

**BCAE** : Bonnes Conditions Agro-Environnementales

**BE** : bandes enherbées

**CA** : addition de concentrations

**CL<sub>50</sub>** : concentration létale médiane

**CYP** : cytochrome P450

**DCE** : Directive Cadre sur l'Eau

**DL<sub>50</sub>** : dose létale médiane

**dSPE** : SPE dispersive

**DT<sub>50</sub>** : temps de demi-vie d'une molécule

**EPCLUST** : Expression Profile data CLUSTERing and analysis

**EPSPS** : 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase

**ETM** : élément trace métallique

**$F_0$**  : fluorescence minimum émise par les PSII

**FDR** : False Discovery Rate

**$F_m$**  : fluorescence maximale émise par les PSII

**FPKM** : fragment per kilobase of transcript per million mapped reads

**FRB** : Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité

**GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase

**GC-MS** : chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse

**GE** : groupe d'étude

**GO** : Gene Ontology

**GSH** : glutathion réduit

**GSSG** : glutathion oxydé

**GST** : glutathion S-transferase

**HAP** : hydrocarbure aromatique polycyclique

**Hi** : constante de Henry

**IA** : action indépendante

**IFEN** : Institut Français de l'Environnement

**IGN** : Institut Géographique National

**ILTER** : International Long-Term Ecological Research

**INEE** : Institut Écologie et Environnement du CNRS

**IRISA** : Institut de Recherche en Informatique et Systèmes Aléatoires

**Ka** : constante d'acidité

**Kd** : coefficient de partage eau/sol

**KEGG** : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**Koc** : coefficient de partage carbone organique/eau

**Kow** : coefficient de partage octanol/eau

**LC-MS** : chromatographie liquide couplée à un détecteur de spectrométrie de masse

**LTER** : Long-Term Ecological Research

**MF** : masse fraîche

**MS** : masse sèche

**MT** : malonyltransférase

**NASC** : Nottingham Arabidopsis Stock Centre

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**NOAEL** : dose sans effet toxique observable

**NTSR** : non-target-site resistance

**ORP** : Observatoire des Résidus de Pesticides

**OSUR** : Observatoire des Sciences de l'Univers de Rennes

**PAC** : Politique Agricole Commune

**PCB** : polychlorobiphényle

**POP** : polluant organique persistant

**PS** : photosystème

**ROS** : espèce réactive de l'oxygène

**RSEM** : RNA-Seq by expectation-maximization

**RT-qPCR** : PCR quantitative en temps réel

**RV** : coefficient de corrélation vectorielle

**SCE** : surface en couvert environnemental

**SEM** : standard error of mean

**SIM** : selective ion monitoring

**SPE** : extraction en phase solide

**Sw** : solubilité dans l'eau

**TAIR** : The Arabidopsis Information Ressource

**TER** : toxicity/exposure ratio

**Tr** : temps de rétention

**TSR** : target-site resistance

**TU** : unité toxique

**UGT** : uridine diphosphate glycosyltransférase

**UIPP** : Union des Industries de la Protection des Plantes

**VFSMOD** : Vegetative Filter Strip Modelling System

**ZAA** : Zone Atelier Armorique

## **~ Chapitre I ~**

### **Introduction générale**



## **1. Prévalence des xénobiotiques dans les pollutions environnementales**

### **1.1. Diversité des xénobiotiques**

Les activités anthropiques, en constante intensification, induisent une grande diversité de pollutions environnementales, et en particulier des pollutions chimiques de l'air, du sol, des sédiments et de l'eau (Rhind, 2009 ; Sandermann, 2004). Ces pollutions chimiques impliquent de nombreuses familles de molécules structurellement et fonctionnellement différentes, dont certaines sont qualifiées de xénobiotiques. Le terme xénobiotique, du grec « xenos (ξένος) » : étranger et « bios (βίος) » : vie, peut recouvrir différentes définitions, dont celle utilisée pour ce manuscrit, qui fait référence aux molécules étrangères à un organisme vivant et possédant pour ce dernier des caractéristiques toxiques même à de faibles concentrations (Ramade, 2007). Cette première partie s'attachera à présenter, de manière non exhaustive, les différents xénobiotiques souvent retrouvés lors de pollutions, à caractériser leur dynamique environnementale, ainsi qu'à présenter le cadre réglementaire associé à ces composés. La grande diversité de xénobiotiques retrouvés dans la biosphère peut inclure par exemple des dérivés de pétrole, des plastifiants, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des résidus médicamenteux (drogues, antibiotiques), des solvants, des pesticides et adjuvants associés, qui peuvent être présents depuis des niveaux résiduels jusqu'à de très fortes concentrations (Rhind, 2009).

### **1.2. Diversité des pesticides potentiellement impliqués dans les pollutions environnementales**

Les pesticides représentent une part importante des pollutions environnementales actuelles. Le terme « pesticide » possède une définition étendue, comprenant les « produits phytosanitaires », les « produits phytopharmaceutiques » ou les « biocides ». Il concerne donc toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes (micro-organismes, animaux ou végétaux) jugés indésirables ou nuisibles, non seulement en contexte agricole, mais également dans les domaines de l'hygiène et de la santé publique, de la santé animale et dans les traitements de surfaces non-agricoles (Aubertot et al., 2005 ; ORP, 2014).

Les premières utilisations connues de pesticides remontent à 1000 ans avant J.-C. avec l'utilisation du soufre pour lutter contre les nuisibles. Le réel développement des luttes chimiques à partir du XIX<sup>ème</sup> siècle (Fournier, 1988) a abouti à près de 100 familles chimiques de pesticides, et plus de 500 formulations commerciales utilisées de nos jours,

composées de molécules actives, mais également d'adjuvants servant à renforcer l'action de ces pesticides (ORP, 2014). De plus, certains traitements herbicides sont accompagnés par des molécules phytoprotectrices (herbicide safeners) qui augmentent la tolérance des espèces cultivées aux herbicides (Riechers et al., 2010). Il existe de ce fait une grande diversité de pesticides qui diffèrent par leur structure chimique, leur fonction et leur mode d'action. Leur classification peut ainsi s'effectuer selon leurs caractéristiques chimiques, la nature de l'organisme nuisible sur lequel ils doivent agir, ou leurs mode et période d'action, ces classifications pouvant se recouper (Calvet et al., 2005 ; Frery et al., 2010 ; Lachambre et Fisson, 2007).

En ce qui concerne la classification chimique, trois catégories se distinguent : les pesticides organiques, organo-métalliques et inorganiques (Calvet et al., 2005).

Les pesticides organiques sont les plus nombreux. Ils présentent un squelette carboné et appartiennent à diverses familles chimiques selon les atomes constituant la structure de base de la molécule et les fonctions chimiques associées. Parmi ces multiples familles, les principales sont les organochlorés (comportant au moins un atome de chlore) comme l'aldrine, le DDT, ou le lindane, les organophosphorés (comportant au moins un atome de phosphore lié directement à un carbone) comme le malathion ou le glyphosate, les carbamates (contenant une fonction R-NH-COO-R) comme l'aldicarbe, les pyréthrinoïdes (alternative aux molécules insecticides plus anciennes de type organochlorés, organophosphorés, ou carbamates), dont la structure générale est similaire aux pyréthrines comme la cyperméthrine, les triazines (structure de base *s*-triazine composée d'un hétérocycle aromatique de six atomes, trois atomes de carbone et trois atomes d'azote) comme l'atrazine, et les urées substituées comme le diuron ou le linuron (Figure 1 et Tableau 1).

Les pesticides organo-métalliques sont principalement des fongicides dont la molécule est constituée d'un complexe entre un métal, tel que le zinc ou le manganèse, et un composé carboné. Le mancozèbe (comportant du zinc) et le manèbe (comportant du manganèse) sont des exemples de ce type de molécule.

Les pesticides inorganiques, peu nombreux, n'ont pas de carbone dans leur structure et dérivent de composés minéraux stables dans le milieu naturel tels que le soufre et le cuivre. Le cuivre est appliqué de manière importante en tant que fongicide, sous forme de sulfate de cuivre (bouillie bordelaise) (Komárek et al., 2010).

Les formulations commerciales de pesticides sont généralement présentées selon une classification par type d'organismes cibles afin de faciliter leur choix par les utilisateurs, ces formulations contenant une ou plusieurs substances actives appartenant à des familles

Tableau 1. Exemples de la diversité chimique et fonctionnelle des pesticides  
(tableau synthétique d'après Calvet et al., 2005 ; Ministère de l'agriculture et de l'agroalimentaire, e-phy, 2014)

Type	Organismes cibles	Exemples de familles chimiques	Exemples de molécules	Modes d'action
Herbicides	Plantes concurrençant les cultures "mauvaises herbes"	Acides chlorophénoxy-alcanoïques	2,4 D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique)	Perturbation de la régulation de l'auxine
		Acides benzoïques	Dicamba	
		Carbamates	Carbétamide	Blocage des centres organisateurs des microtubules et désorganisation du fuseau achromatique
		Organophosphorés	Glyphosate	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés aromatiques
		Sulfonyles	Metsulfuron-méthyle	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés ramifiés
		Triazines	Atrazine	Inhibition de la photosynthèse
		Urées substituées	Isoproturon, linuron	
Fongicides	Champignons parasites des cultures "maladies"	Carbamates	Propamocarbe	Inhibition de la formation des microtubules
		Triazoles	Tébuconazole	Inhibition de la biosynthèse des stérols
		Organophosphorés	Fosétyl-Al	Inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne
		Dérivés soufrés, sulfate de cuivre	Bouillie bordelaise	Inhibition de la germination des spores
Insecticides	Insectes ravageurs "ravageurs"	Triazines	Triazoxide	Perturbation de la biosynthèse des mélanines
		Carbamates	Aldicarbe	Perturbation du système nerveux
		Pyréthrinoides	Cyperméthrine	
		Organophosphorés	Malathion	
		Organochlorés	Aldrine	
		Néonicotinoides	Thiaméthoxame	
		Amidinohydrazones	Hydraméthylnon	Perturbation du système respiratoire

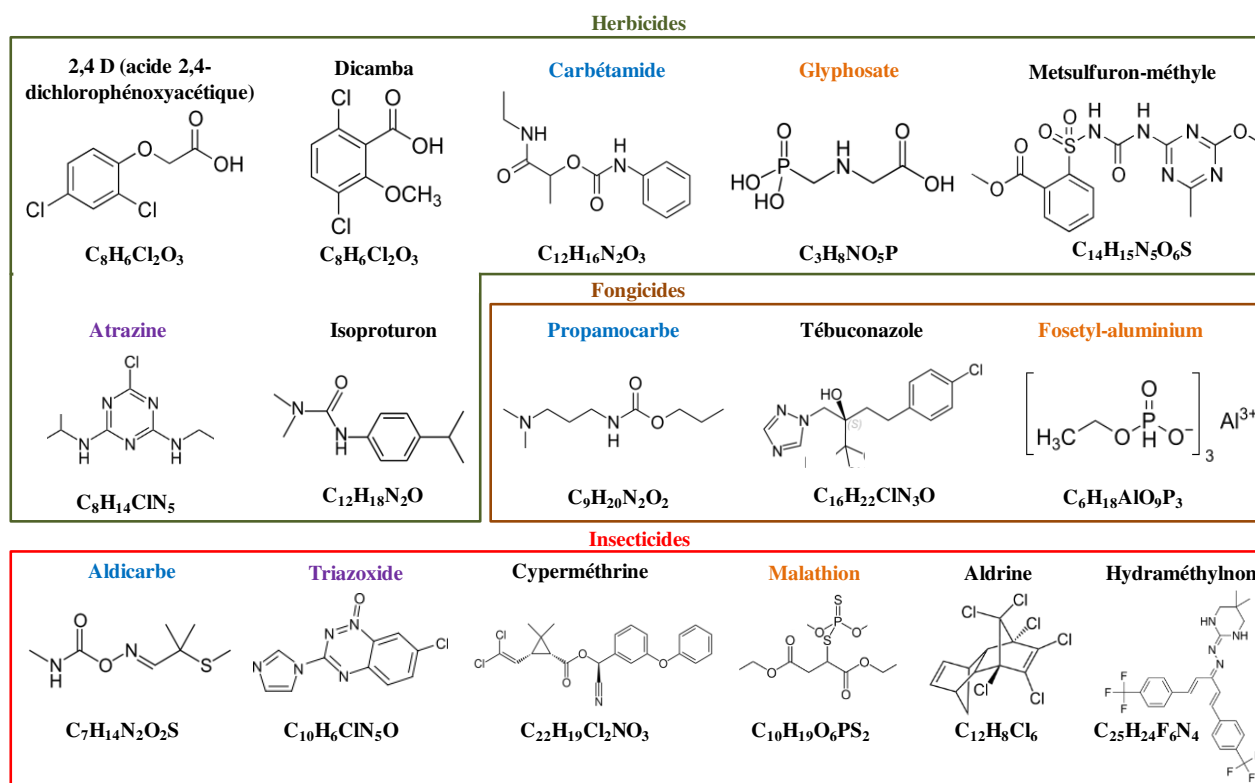


Figure 1. Structures chimiques de quelques exemples de pesticides. Les pesticides de même couleur font partie de la même famille chimique, indiquée dans le tableau 1 (Royal Society of Chemistry, 2014)

chimiques différentes (Calvet et al., 2005). Les herbicides ou désherbants, comme le glyphosate, ciblent les plantes concurrentes des cultures. Les fongicides, comme le tébuconazole, ciblent les champignons. Les insecticides, comme la cyperméthrine, repoussent ou éradiquent les insectes ravageurs. Il existe également d'autres types de pesticides adaptés aux autres indésirables comme les nématicides (nématodes), les rodenticides (rongeurs) ou les corvicides (oiseaux).

Enfin, une classification par mode d'action des pesticides est possible, la grande variété de molécules étant associée à une grande diversité de cibles biochimiques (Calvet et al., 2005). Ainsi, les herbicides peuvent agir chez les plantes selon différents modes d'action, tels que l'inhibition de la photosynthèse (exemple de l'isoproturon), la déstructuration oxydative des membranes cellulaires (exemple du paraquat), l'inhibition de la synthèse des lipides (exemple de la cléthodime), l'inhibition de la synthèse des acides aminés dont les aromatiques (exemple du glyphosate), l'inhibition de la division cellulaire (exemple du pendiméthaline) ou la perturbation de la régulation de phytohormones (exemple du dicamba). De même, les fongicides peuvent, chez les champignons, inhiber la synthèse des lipides (exemple du boscalide) ou des stérols (exemple du tébuconazole), ainsi que la germination des spores (exemple de la bouillie bordelaise). Certains fongicides perturbent aussi les processus respiratoires (exemple du chlorothalonil), ou inhibent la synthèse des microtubules (exemple du propamocarbe). Les insecticides peuvent agir sur le système nerveux (exemple de la cyperméthrine), sur la respiration (exemple de l'hydraméthylnon) ou sur la synthèse de composés cuticulaires (exemple du triazoxide). Le tableau 1 donne une vue d'ensemble de la diversité des pesticides et la figure 1 décrit la diversité de leurs structures chimiques.

### **1.3. Implication de molécules associées dans les pollutions environnementales liées aux pesticides**

Différents composés xénobiotiques ou toxiques sont couramment associés aux processus d'utilisation et de diffusion des pesticides. C'est le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) qui peuvent être contenus dans les boues d'épuration épandues sur les parcelles agricoles (Wild, 1993) ou être issus de retombées atmosphériques d'incinération incomplète de biomasse (Hildebrandt et al., 2009). Les autres origines anthropiques des HAPs (par exemple le chauffage et le trafic routier) sont cependant les plus importantes, avec 95% des émissions (CITEPA, 2013), et plus d'une centaine de molécules différentes sont mesurées dans l'ensemble des compartiments environnementaux (Seinfeld et Pandis, 1998). Ces HAPs constituent une vaste classe de composés organiques, dont la structure chimique de base est un squelette carboné comprenant au moins deux cycles aromatiques. Les HAPs sont souvent classés en fonction de leur poids moléculaire : les HAPs de faible poids moléculaire, qui possèdent deux ou trois cycles aromatiques, et les HAPs de fort poids moléculaire, avec au moins quatre cycles aromatiques (Mrozik et al., 2003).

La présence d'éléments traces comme les métaux tels que l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le plomb (Pb), l'étain (Sn), le fer (Fe) ou le zinc (Zn), est aussi avérée dans certains cas de pollution. Certains, appelés oligoéléments, sont indispensables aux processus biologiques et donc à la croissance végétale et animale, comme le Cu, le Mn, le Zn, le Fe, ou le bore (B), mais peuvent être néanmoins toxiques à des concentrations plus élevées. S'il existe des sources naturelles de ces métaux, comme l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts, leur provenance peut aussi être en partie due aux activités agricoles. L'épandage de boues, de fumiers et de lisiers pour la fertilisation des champs et l'utilisation de certaines formulations de pesticides peuvent entraîner une pollution des milieux par ces éléments (He et al., 2005 ; Monbet, 2004 ; Fishbein, 1981). C'est par exemple le cas avec l'utilisation de la bouillie bordelaise, dont la composition elle-même peut entraîner une pollution au cuivre.

### **1.4. Dynamique des pesticides dans l'environnement**

Les quantités utilisées de pesticides et des xénobiotiques qui leur sont directement associés, tels que les adjuvants, sont particulièrement importantes à l'échelle mondiale.

Si les quantités semblent diminuer dans certains pays d'Europe, les matières actives actuelles sont généralement beaucoup plus efficaces que celles des décennies précédentes (Lamberth et al., 2013) représentant ainsi un risque toxique accru pour les espèces non cibles. La France, en tant que premier pays agricole de l'Union européenne (en surface agricole utile ou utilisée et en chiffres d'affaires de production agricole), se situe au 4<sup>ème</sup> rang mondial des utilisateurs de pesticides derrière les Etats-Unis, le Brésil et le Japon (UIPP, 2012), avec des ventes d'environ 70000 tonnes par an depuis une dizaine d'années (Figure 2).

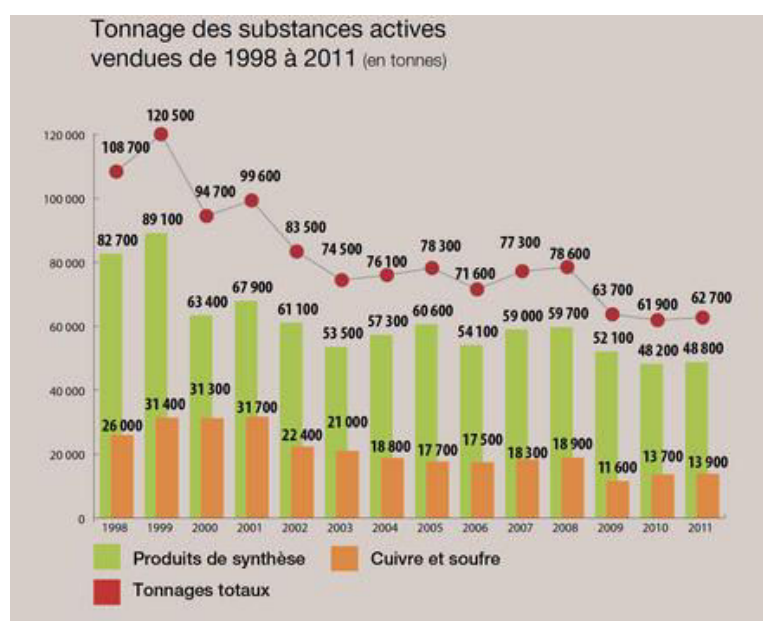


Figure 2. Tonnages des substances pesticides actives vendues en France (Sources IUPP, 2012)

Des études de l'Institut Français de l'Environnement (IFEN, 2007) sur le réseau hydrologique français ont montré une dispersion importante des pesticides et une présence généralisée dans les milieux aquatiques. Outre les contaminations des eaux, les compartiments édaphiques et atmosphériques sont également soumis à ce type de pollution durant les périodes d'épandage, mais aussi en dehors de ces périodes, provoquant ainsi une contamination rémanente des milieux ou pollution de fond. De telles pollutions peuvent être qualifiées de « pollutions résiduelles ». Leurs niveaux dépendent de plusieurs paramètres, liés à l'environnement, aux méthodes d'épandage et à la molécule elle-même, qui influencent la diffusion des pesticides hors des zones prévues, ainsi que leur persistance dans le milieu. Des études ont en particulier estimé que, dans certaines conditions, moins de 1% des épandages de pesticides atteignent réellement leurs cibles et qu'ainsi près de 99% des molécules épandues au champ pouvaient se retrouver dans l'environnement (Pimentel et Levitan, 1986 ; Pimentel, 1995).

La dynamique des pesticides est régulée par différents processus (Arias-Estévez et al., 2008 ; Figure 3). La dispersion atmosphérique, ou dérive, intervient directement lors de l'épandage, lorsqu'une partie des molécules n'atteint pas la cible et reste dans le compartiment atmosphérique. Ce phénomène se produit par entraînement par le vent de gouttelettes ou de vapeurs de pesticides hors de la parcelle cultivée. L'intensité de cette dérive est liée à la taille des gouttelettes, aux techniques d'épandage et aux conditions météorologiques (Gil et Sinfort, 2005). Des phénomènes de réémissions après traitement peuvent également avoir lieu, comme la volatilisation, qui s'effectue après le dépôt du produit à la surface du sol ou des plantes. Le produit est alors entraîné par l'évaporation de l'eau, ou bien sous l'effet du vent s'il est adsorbé sur des particules du sol pouvant être elles-mêmes entraînées (Pimentel, 1995 ; Rial-Otero et al., 2003). Au niveau du sol, le relargage de molécules provenant de granulats est l'un des processus majeurs influençant la dynamique des pesticides (López-Pérez et al., 2006). L'eau reste le principal moteur des transferts, par ruissellement en subsurface, ou en drainage profond vers les nappes phréatiques. Les pesticides transférés sont alors, soit emportés avec les particules érodées auxquelles ils sont adsorbés, soit directement dissous dans l'eau (López-Blanco et al., 2005). La pluviométrie et les caractéristiques physico-chimiques de l'eau du sol influencent de ce fait fortement ces modes de diffusion.

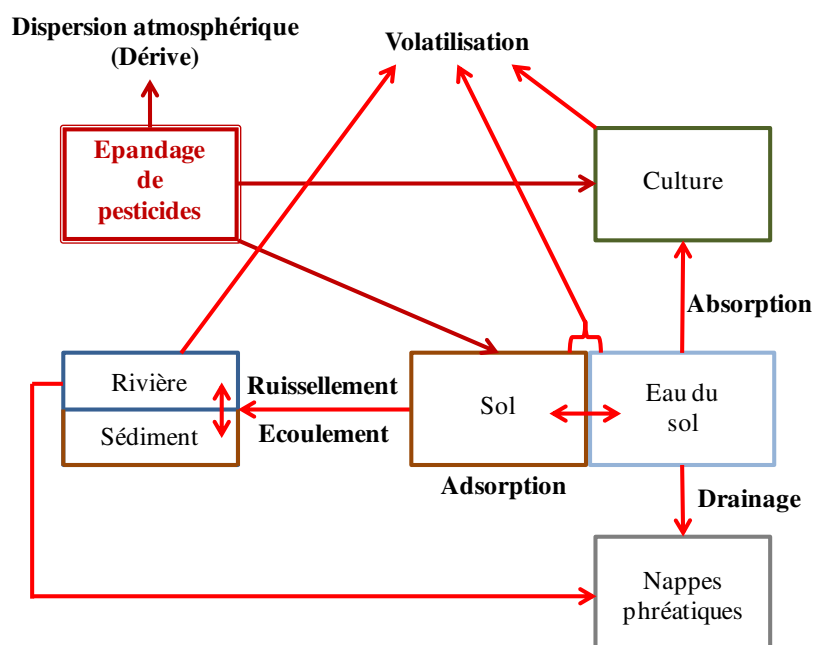


Figure 3. Processus de diffusion des pesticides dans l'environnement (d'après Arias-Estévez et al., 2008)

L'intensité de ces différents processus peut être influencée par la forme sous laquelle le pesticide est conditionné (liquide, solide ou gazeuse), mais elle est surtout liée aux



caractéristiques physico-chimiques des molécules, qui affectent leur affinité pour les différentes phases du milieu (liquide, solide minérale ou organique, gazeuse) et leur prise en charge par les compartiments biologiques (Calamari et Barg, 1993). Les principaux paramètres influençant ces processus sont :

- la solubilité dans l'eau ( $S_w$ ), indiquant la tendance du produit à être transporté sous sa forme dissoute ;
- le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ), estimant le caractère hydrophile (polaire) ou lipophile (apolaire) d'une molécule et par conséquent sa capacité à s'accumuler dans les membranes biologiques des organismes vivants. Plus  $K_{ow}$  est élevé, plus le risque de bioaccumulation membranaire est important ;
- la constante de Henry ( $H_i$ ), rendant compte de la tendance d'une substance à se volatiliser à partir d'un milieu aqueux ou à partir du sol. Plus  $H_i$  est élevé, plus la substance est volatile ;
- le coefficient de partage eau/sol ( $K_d$ ), qui est le rapport entre la quantité en solution et celle fixée par la phase solide, donnant une indication sur l'aptitude d'une molécule à être adsorbée ou désorbée.

Les caractéristiques du sol constituent également des paramètres clés dans la régulation des transferts de pesticides. Le sol affecte en effet ces transferts selon sa texture, sa perméabilité, sa saturation en eau, son acidité, mais surtout selon sa teneur en matière organique, qui est déterminante dans la mobilité des pesticides. En effet, les acides humiques ont en particulier un rôle prépondérant dans les liaisons et les interactions avec les HAPs (Akkanen et al., 2012) et les pesticides (Fang et al., 1998 ; Rama-Krishna et Philip, 2008). La mobilité des pesticides est ainsi souvent décrite par le coefficient de partage carbone organique/eau ( $K_{oc}$ ) :  $K_{oc} = K_d \times \% \text{ carbone organique du sol}$  (Wauchope et al., 2002 ; Kloppe et al., 1994), traduisant la proportion de composés retenus, ou adsorbés, par la matière organique du sol.

L'adsorption des composés sur les agrégats de sol joue un rôle fondamental dans la dynamique de transport, la persistance, la bioaccumulation et la transformation des pesticides (De Jonge et al., 1996). Bien que ce processus soit fortement lié à la teneur en matière organique du sol et aux caractéristiques de partition de la molécule, l'adsorption est également régulée d'une part par la structure chimique et la capacité d'ionisation de la molécule, et d'autre part par la force ionique et le pH du sol. En fonction de ces différentes caractéristiques, le pesticide peut alors être sous forme adsorbée et retenu dans le sol ou transféré avec les particules en mouvement, sous forme libre ou désorbée, et circuler dans la solution de sol (Arias-Estévez et al., 2008 ; Franco et al., 2009).



L'intensité du processus d'adsorption influence aussi fortement la biodisponibilité des composés, c'est-à-dire leur accessibilité pour les organismes, notamment les micro-organismes et les plantes, qui peuvent constituer des compartiments de dégradation des pesticides (Koskinen et al., 2001). Ces dégradations d'origine biologique permettent d'atténuer les niveaux de résidus de pesticides dans les sols (Fenner et al., 2013) et peuvent représenter un processus important à l'échelle de l'écosystème. En effet, bien que des processus physico-chimiques abiotiques (hydrolyse, réactions d'oxydoréduction, déhydrohalogénéation, réactions photochimiques ou photolyse) (Kookana et al., 1998 ; Van der Werf, 1996) puissent intervenir, une part importante des pesticides est dégradée par les compartiments biotiques. Ces dégradations peuvent suivre des voies complexes impliquant une variété d'interactions entre micro-organismes, plantes, constituants du sol et pesticides (Fenner et al., 2013 ; Topp et al., 1997) (Figure 4).

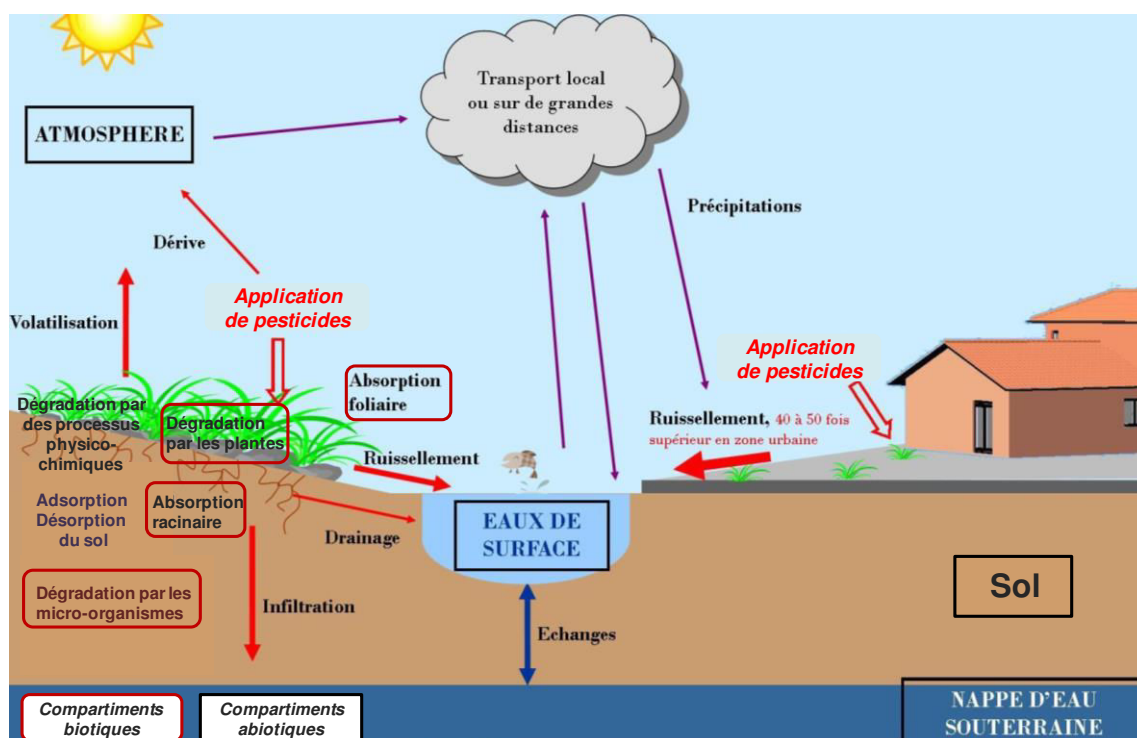


Figure 4. Schéma synthétique des mécanismes influençant la dynamique des pesticides dans l'environnement (d'après Arias-Estévez et al., 2008 ; Fenner et al., 2013 )

Divers organismes sont capables de métaboliser au moins partiellement les pesticides sous l'action d'enzymes, et de les utiliser comme source d'énergie et de carbone. Les bactéries sont particulièrement connues pour leurs capacités de métabolisation des xénobiotiques (Verma et al., 2014), mais le rôle des plantes dans l'absorption et la dégradation des pesticides n'est pas négligeable (Hussain et al., 2009). Certaines plantes possèdent des enzymes telles que des phosphatases (*Spirodela polyrhiza*), des peroxydases (*Armoracia rusticana*), ou des

déshalogénases (*Populus* sp.) qui, respectivement, clivent les groupes phosphates des pesticides organophosphorés, dégradent les phénols, et induisent la déshalogénéation des solvants chlorés (Susarla et al., 2002). Ces processus de dégradation peuvent toutefois générer des produits de dégradation indésirables et parfois plus toxiques que le pesticide de départ (Fenner et al., 2003, 2013).

Tous ces mécanismes influencent la rémanence des pesticides dans l'environnement, qui peut varier de quelques heures ou quelques jours à plusieurs années, ce qui peut expliquer que l'on retrouve, lors d'analyses environnementales, des pesticides parfois interdits depuis longtemps (Jablonowski et al., 2011). C'est le cas par exemple de l'herbicide atrazine, et de son produit de dégradation l'hydroxy-atrazine, détectés dans les sols 22 ans après l'application de la molécule mère (Jablonowski et al., 2011). Ces composés persistants représentent un problème environnemental majeur, car ils peuvent se retrouver dans les chaînes alimentaires et être bioaccumulés aux différents niveaux trophiques. Le temps de persistance dans le sol, l'eau ou l'air de la molécule mère est caractérisé par son temps de demi-vie (DT50), qui correspond à la durée au bout de laquelle la moitié de la substance initialement introduite est dégradée (Fantke et al., 2014 ; Juraske et Sanjuán, 2011). Cependant, cette notion ne donne pas d'information sur l'existence et la persistance de produits de dégradation.

### **1.5. Prévalence et contrôle des pollutions environnementales impliquant des pesticides**

Du fait des mécanismes de transport possibles précédemment détaillés, les pesticides et leurs produits de dégradation ont été détectés dans tous les milieux : dans les eaux de surface et des nappes phréatiques, dans les eaux de pluie, dans l'atmosphère, ainsi que dans les sols et les sédiments, même dans les régions les plus éloignées, telles que les pôles (Bargagli, 2008) ou les zones montagneuses (Kurt-Karakus et al., 2011). Du fait du phénomène de bioaccumulation, les pesticides sont également retrouvés dans de très nombreux organismes, dont ceux qui sont consommés, comme les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale, sous leur forme originale ou dégradée (ORP, 2010). Les concentrations de pesticides retrouvés sont variables, mais restent difficiles à apprécier. En effet, tous les milieux ne sont pas soumis à analyse et il n'est de plus pas toujours possible de détecter et quantifier toutes les molécules présentes dans les échantillons environnementaux du fait des concentrations parfois très faibles des composés. La quantification des faibles doses, pouvant représenter un risque environnemental non négligeable, n'est pas toujours réalisable du fait des limites de détection des méthodes de chimie analytique. De plus, la diversité des familles

chimiques auxquelles appartiennent les produits phytosanitaires nécessite la mise en œuvre d'une batterie de méthodes d'analyse spécifiques. Il n'est donc pas envisageable de pouvoir identifier et quantifier l'ensemble des pesticides en une seule et même analyse, même en utilisant les méthodes dites « multirésidus ». Par ailleurs, la diversité des matrices environnementales potentiellement contaminées accroît la difficulté d'analyse qui nécessite d'optimiser les méthodes pour les différents couples molécule/matrice.

Les toxicités liées à ces pollutions ont été évaluées sur une large gamme d'espèces non-cibles, de communautés et d'écosystèmes. Les écosystèmes aquatiques sont particulièrement affectés : des situations de toxicité chronique avec perturbations des cycles de reproduction et des cycles hormonaux d'espèces piscicoles, et des réductions de la diversité des peuplements algaux et végétaux, ont ainsi été observées (Bereswill et al., 2012 ; McMahon et al., 2012 ; Nyström et al., 1999). De même, des situations de toxicité aigüe suite à des pollutions accidentelles entraînant des mortalités massives de poissons, d'invertébrés et de végétaux ont été recensées (McCahon et Pascoe, 1990). Les écosystèmes terrestres sont également affectés par les pesticides avec, par exemple, des impacts sur les communautés végétales non-cibles et la faune du sol (Freemark et Boutin, 1995), et sur les populations d'oiseaux *via* notamment la raréfaction de la ressource alimentaire (Aubertot et al., 2005). De manière générale, les organismes peuvent être touchés directement par les pesticides (inhibition de processus biologiques), particulièrement en bout de chaîne trophique (biomagnification), mais aussi indirectement par le biais de la destruction de leurs habitats et de déséquilibres des ressources ou des prédateurs (Fleege et al., 2003 ; Kasai et al., 1993). Ces pollutions induisent alors de nouvelles pressions de sélection qui se traduisent, à l'échelle de l'écosystème, par des impacts sur la biodiversité (Child et al., 1993 ; Geiger et al., 2010 ; Helander et al., 2012 ; Köhler et Triebkorn, 2013), sur le fonctionnement des écosystèmes et sur la réalisation des services écosystémiques (Power, 2010).

Les études écotoxicologiques visent à estimer et quantifier les impacts des pollutions sur les écosystèmes à partir de tests sur des espèces représentatives des milieux terrestres et aquatiques. Ces études peuvent être réalisées en conditions contrôlées de laboratoire, en mésocosmes ou sur le terrain. Cependant, les études de terrain sont peu nombreuses, notamment en milieu terrestre, alors qu'elles sont nécessaires à la compréhension des mécanismes impliqués, et au développement d'outils performants de prédiction des impacts des pesticides (Aubertot et al., 2005 ; Fenner et al., 2013).

Dans un souci de protection de la santé humaine et de l'environnement, la réglementation sur les pesticides s'est accrue ces dernières années aussi bien au niveau national qu'international.

Les produits phytosanitaires sont soumis à différentes législations, intervenant à toutes les étapes du cycle de vie des molécules : de l'autorisation de mise sur le marché des matières actives au contrôle des résidus, en passant par le suivi du transport et de l'étiquetage des produits (Lamberth et al., 2013). Au niveau européen, la mise sur le marché des molécules fait l'objet d'une procédure comprenant différentes études portant sur les propriétés physico-chimiques, la toxicité et l'écotoxicité du composé, ainsi que sur son devenir dans l'environnement. L'indicateur généralement utilisé pour ces études est le rapport toxicité/exposition (toxicity/exposure ratio ou TER). La toxicité d'une molécule peut être, entre autres, la dose létale médiane ( $DL_{50}$ , qui correspond à la dose de la molécule causant la mort de 50% d'un groupe d'organismes), la concentration létale médiane ( $CL_{50}$ ), la dose sans effet toxique observable (NOAEL), ou la dose la plus faible présentant un effet. Cette toxicité est calculée pour différents groupes d'animaux et de végétaux modèles et est ensuite généralisée pour toutes les espèces. La dose d'exposition correspond aux concentrations attendues pour une molécule dans les différents milieux (air, sol, eau). Elle est exprimée dans la même unité que la toxicité (Bounias, 1999 ; Cedergreen et Streibig, 2005 ; Shore et al., 2005). Des seuils de toxicité autorisés sont fixés dans le cadre de la directive 91/414/CEE pour la mise sur le marché des pesticides. Cette procédure a conduit au retrait du marché de 691 substances actives sur 963 molécules recensées en 2008, mais seulement 8 substances nouvelles n'ont pas été homologuées sur les 163 évaluées ou en cours d'évaluation (Pflieger, 2009).

Au niveau international, la Convention de Stockholm (règlement 850/2004/CE), signée en mai 2001, et le Protocole d'Aarhus, signé en juin 1998, ont pour objectif pour les signataires de contrôler et réduire les émissions dans l'environnement de substances connues sous l'appellation de Polluants Organiques Persistants (POPs), ainsi que celles de leurs sous-produits, afin d'aboutir à leur élimination définitive. Les POPs comprennent en particulier les dioxines, les polychlorobiphényles (PCB), les HAPs et les pesticides.

Au niveau national, la législation peut être plus stricte que le cadre européen ou international. C'est le cas avec le Grenelle de l'Environnement de 2008 instaurant le plan «Ecophyto 2018», qui impose des mesures restrictives d'usage des pesticides (objectif de réduction de 50% des quantités de pesticides utilisées), et le retrait du marché des préparations contenant les substances actives les plus toxiques, si possible dans un délai de dix ans (ORP, 2014).

Hormis le plan Ecophyto 2018, d'autres actions ont été entreprises au niveau national pour parvenir, à terme, à un cadre réglementaire plus strict. En 2003, la création de l'Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP) a eu pour objectif de rassembler, analyser et valoriser les

informations sur la présence des pesticides dans différents milieux. Plusieurs actions ont été menées, dont la création du groupe d'étude (GE) Air en 2008. Le GE Air a eu pour objectif de réaliser, sur la base de données disponibles, un état des lieux de la présence de pesticides et de leurs produits de dégradation dans le compartiment aérien et les environnements intérieurs. Mais aucune réglementation n'est actuellement disponible concernant les concentrations de pesticides dans l'air. C'est également le cas concernant le compartiment édaphique, pour lequel il n'existe à l'heure actuelle aucune réglementation, européenne ou française, qui spécifie une concentration seuil autorisée pour les pesticides.

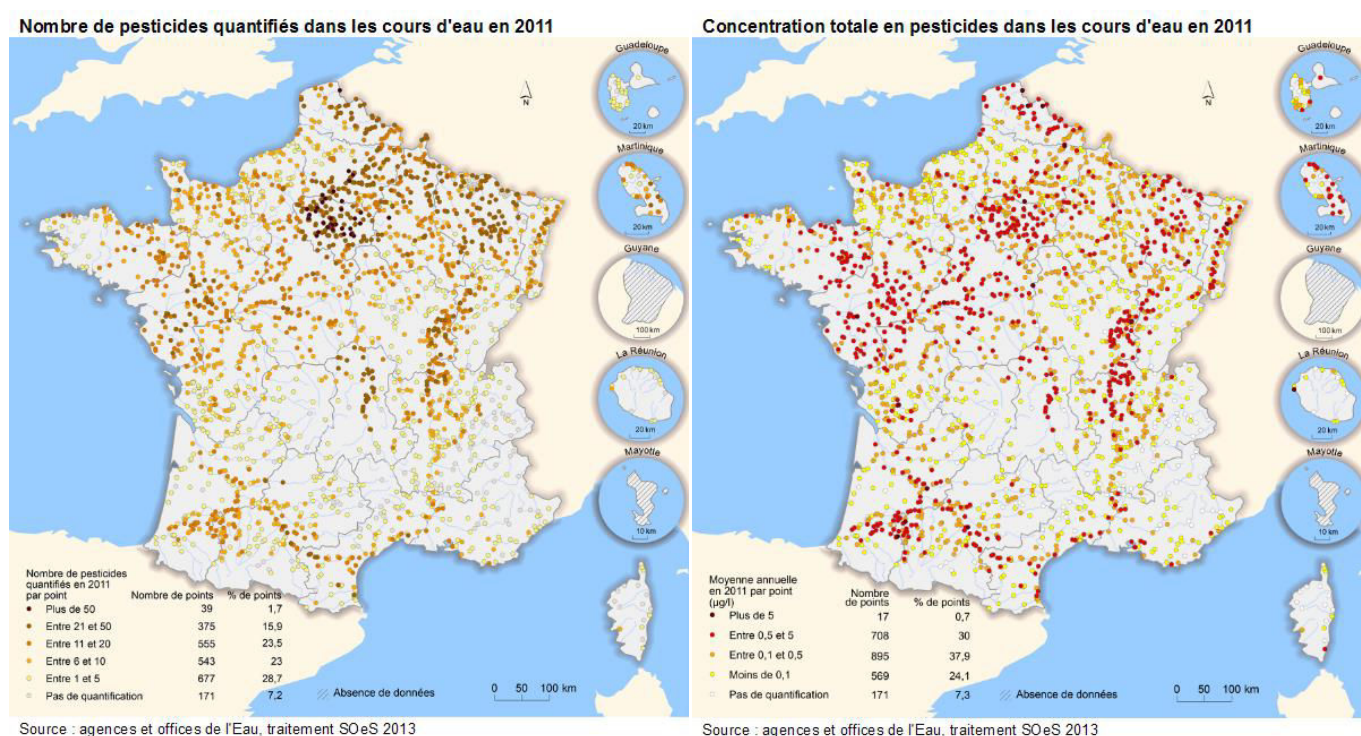
Pour les écosystèmes aquatiques, le Parlement et le Conseil européens ont adopté en 2000 la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE), qui a pour objectif la préservation et la restauration des masses d'eaux et des milieux aquatiques. La DCE s'applique aux eaux de surface, y compris les eaux littorales et les eaux de transition, et aux nappes d'eau souterraines. Elle instaure une obligation de bon état de toutes ces masses d'eau en 2015, sauf en cas de justification valable de report de délais ou de définition d'objectifs moindres. Le bon état est défini pour les eaux de surface comme un bon état chimique et écologique, et pour les eaux souterraines, comme un bon état chimique et quantitatif. La réglementation impose pour les eaux brutes utilisées pour la fabrication d'eau potable un seuil maximum de 5 µg/L pour la somme des pesticides et de 2 µg/L par pesticide. Concernant l'eau potable, elle est impropre à la consommation humaine au-delà du seuil de 0,5 µg/L pour la somme des molécules et de 0,1 µg/L par molécule.

En France métropolitaine, plusieurs organismes ont mis en place des plans de suivi de la qualité des milieux. La synthèse de ces données au niveau national (Commissariat général au développement durable, 2013) a permis de montrer qu'en 2011, sur 550 pesticides recherchés dans les cours d'eau, 377 ont été détectés au moins une fois. Les pesticides étaient présents sur 93% des points de mesure et 19% des points présentaient plus de 20 pesticides différents. Près de 70% des points présentaient toutefois une concentration totale moyenne en pesticides inférieure à 0,5 µg/L. Les points au-delà de ce seuil se situaient dans les régions céréalières, de maïsiculture ou de viticulture, notamment dans le bassin parisien, dans le Sud-Ouest, le long du Rhône et en Bretagne. Dix-sept points situés dans les zones de grandes cultures du nord de la France, du bassin parisien et du Sud-Ouest présentaient une moyenne annuelle supérieure à 5 µg/L (Commissariat général au développement durable, 2013) (Figure 5).

Les Agences Régionales de Santé fournissent aux consommateurs, une fois par an avec les factures d'eau, des informations sur la qualité de l'eau distribuée. Au niveau départemental, des initiatives de communication sur la qualité de l'eau existent également, comme par



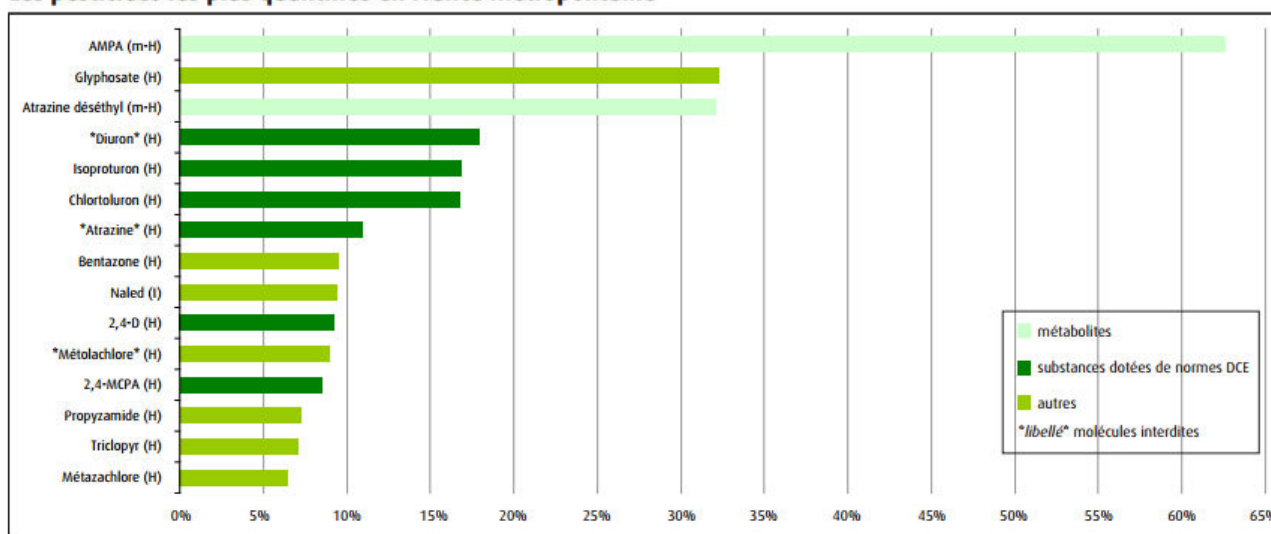
exemple en Bretagne, où le Conseil Général des Côtes d'Armor publie chaque mois un bulletin d'informations sur la situation de la ressource en eau. Ce bulletin, intitulé « Inf'Eaux », présente les analyses mensuelles de la Direction de l'Environnement, donnant l'état des précipitations, des écoulements de surface dans les rivières, ainsi que les niveaux de nitrates et de pesticides.



**Figure 5. Etat des contaminations en pesticides dans les eaux de surface en 2011**  
(Commissariat général au développement durable, 2013)

Les 15 pesticides les plus quantifiés en 2011 dans les cours d'eau étaient en majorité des herbicides (comme le glyphosate, l'isoproturon ou le chlortoluron) ou leurs dérivés. Ces contaminants majoritaires comprennent en particulier deux produits de dégradation (AMPA et atrazine déséthyl, qui sont respectivement les produits de dégradation du glyphosate et de l'atrazine) et trois substances interdites d'utilisation depuis plusieurs années (diuron, atrazine et métolachlore) (Figure 6), ce qui peut refléter la forte rémanence de certaines molécules, la tolérance de leur utilisation en mélange ou leur utilisation accidentelle ou frauduleuse.

### Les pesticides les plus quantifiés en France métropolitaine



Note : H : herbicide ou son résidu, I : insecticide, F : fongicide, m : métabolite.

Source : agences de l'eau, traitements SOeS

Figure 6. Liste des pesticides les plus retrouvés dans les eaux en France métropolitaine en 2011  
(Commissariat général au développement durable, 2013)

Ces quantifications de pesticides dans les milieux aquatiques témoignent de la présence de pollutions sur l'ensemble du territoire, ainsi que de la prépondérance des multipollutions. Il est également mis en évidence que, pour la plupart des points d'échantillonnage, la concentration des pesticides analysés est faible. Ces constats soulignent qu'il est important de prendre en compte lors d'analyses écotoxicologiques les effets des pollutions multiples et de leurs faibles doses. Toutefois, la littérature souffre d'un manque de données concernant ces problématiques.

## 2. Fonctionnement des plantes terrestres en conditions de stress xénobiotique

Les plantes terrestres, de par leur caractère sessile, sont très fréquemment soumises à des stress biotiques et abiotiques. Les pollutions par les xénobiotiques, et en particulier les pesticides, qu'elles soient ponctuelles ou persistantes, font partie intégrante des contraintes auxquelles sont confrontées les espèces végétales non cibles, indirectement exposées à ces mélanges de composés. Les xénobiotiques peuvent affecter fortement la survie, le développement et la reproduction des plantes, et induire à plus grande échelle des changements dans les communautés végétales pouvant entraîner des impacts écologiques et agronomiques importants (Helander et al., 2012) (Figure 7). Nous développerons dans cette partie une vue d'ensemble des effets des stress xénobiotiques chez les plantes, dans des contextes de mono- et multipollution, ainsi que les mécanismes de réponses associés.

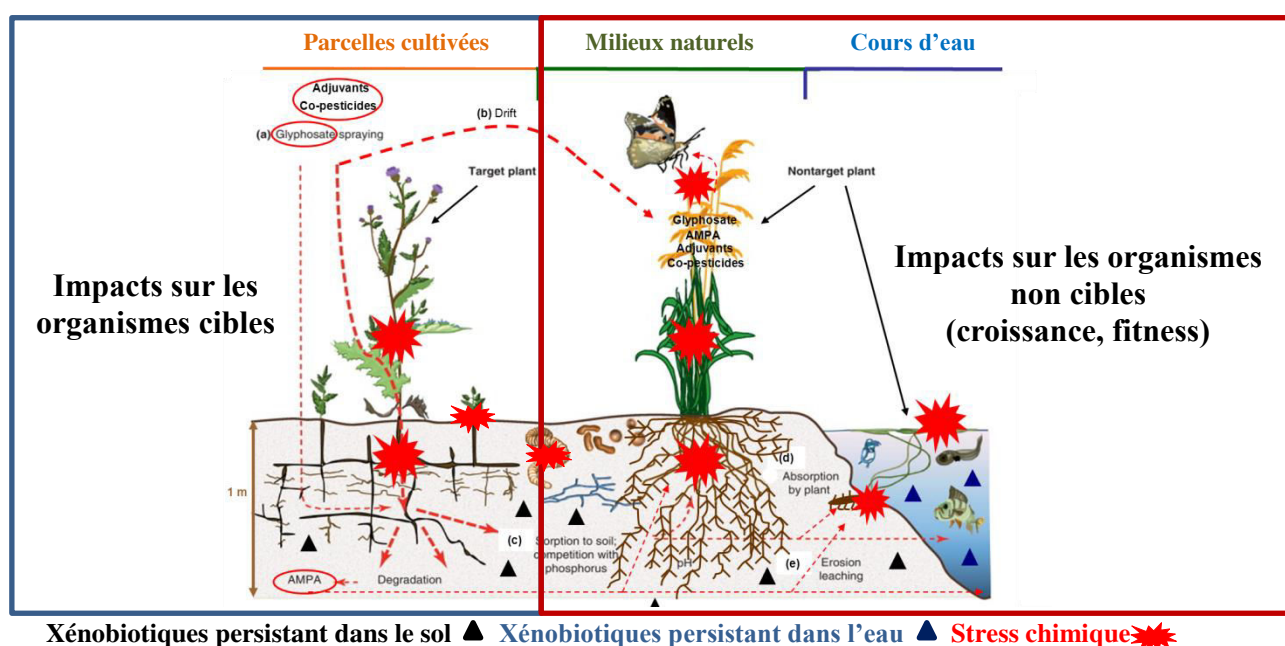


Figure 7. Stress chimiques causés par des xénobiotiques (exemple de l'herbicide glyphosate) sur les organismes cibles et non cibles (d'après Helander et al., 2012)

### 2.1. Effets des stress chimiques xénobiotiques chez les plantes

Les stress chimiques sont induits par des facteurs chimiques de nature variée (salinité, pH, métaux lourds, polluants organiques) qui sont responsables de perturbations au sein de la plante au cours de son développement. Ces perturbations associées au stress influencent généralement de façon défavorable le fonctionnement de la plante (Jackson, 1986). Dans le



cas présent, nous nous intéressons plus particulièrement aux stress chimiques provoqués par des polluants organiques de type xénobiotique.

En fonction de leurs caractéristiques physiques et chimiques (sous forme dissoute ou émulsifiée) et des conditions d'exposition subies par les plantes (exposition foliaire ou racinaire), les xénobiotiques vont pénétrer dans les tissus végétaux de manière différente. Les composés hydrophobes vont passer directement dans les cellules par diffusion passive au travers des membranes. Les molécules plus polaires peuvent être absorbées de manière passive ou active *via* les flux d'eau (Hart et al., 1992), et être transportées dans le xylème ou le phloème (Schreiber, 2005 ; Watanabe, 2002). Elles peuvent aussi emprunter les systèmes de transport cellulaire (Fujita et al., 2012). Ces xénobiotiques peuvent alors avoir des effets primaires, globaux et en cascade sur les organismes.

- Effets primaires des xénobiotiques

L'analyse exhaustive de la littérature met en évidence que les processus physiologiques et biochimiques des plantes peuvent être perturbés par toutes les classes chimiques de xénobiotiques. Ces perturbations ont pour la plupart été évaluées chez des organismes exposés à un xénobiotique unique utilisé à forte concentration ou à des concentrations correspondant aux doses de traitement agricole lorsqu'il s'agit de pesticides. Les travaux menés sur la toxicité des pesticides aux niveaux cellulaire et moléculaire ont montré que, quel que soit le type d'organisme initialement ciblé, les pesticides présentent également des propriétés cytotoxiques et génotoxiques pour divers autres organismes (Zang et al., 2000 ; Ateeq et al., 2002 ; Poli et al., 2003).

Dosnon-Olette et al. (2009) ont par exemple mis en évidence que des fongicides induisent des effets toxiques (perturbations des processus photosynthétiques) non négligeables sur diverses plantes aquatiques, telles que *Lemna minor*, *Spirodela polyrrhiza*, *Cabomba aquatica*, *Callitriche palustris* et *Elodea canadensis*. Les fongicides de la famille des triazoles ont une action de compétition avec les gibbérellines, phytohormones impliquées notamment dans les processus d'élongation des tiges (Child et al., 2003). Des xénobiotiques industriels comme les HAPs ont également des effets cytotoxiques chez les plantes. Kummerová et Kmentová (2004) ont montré que le fluoranthène inhibe le taux de germination et la croissance des racines et des parties aériennes chez des plantules de laitue (*Lactuca sativa* L.), d'oignon (*Allium cepa* L.) et de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.).

Les herbicides restent néanmoins la classe de xénobiotiques ayant les plus forts impacts de stress chimique sur les plantes, puisqu'elles constituent leur cible biologique. L'effet des

herbicides est lié le plus souvent à un mode d'action défini. En fonction de leur structure chimique, les herbicides ciblent différents processus cellulaires, et peuvent *in fine* perturber la croissance et le développement, en agissant sur le métabolisme des tissus, en inhibant la division cellulaire, en modifiant les dynamiques cellulaires par des effets sur le cytosquelette, en désorganisant les parois et les membranes cellulaires par inhibition de la synthèse des composés structuraux (polysaccharides, phospholipides), ou enfin en affectant la signalisation cellulaire par interférence avec les phytohormones (Calvet et al., 2005). Certains composés utilisés comme herbicides sont en effet des analogues structuraux d'hormones végétales, comme le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) ou le dicamba (analogues d'auxine) (Grossmann, 2010), ou le thidiazuron (analogue des cytokinines) (Heyl et al., 2012). D'autres herbicides comme le glyphosate (Figure 8), l'asulame, ou l'atrazine, perturbent les métabolismes cellulaires en inhibant respectivement la synthèse d'acides aminés aromatiques, la synthèse d'acides foliques, et le fonctionnement photosynthétique.

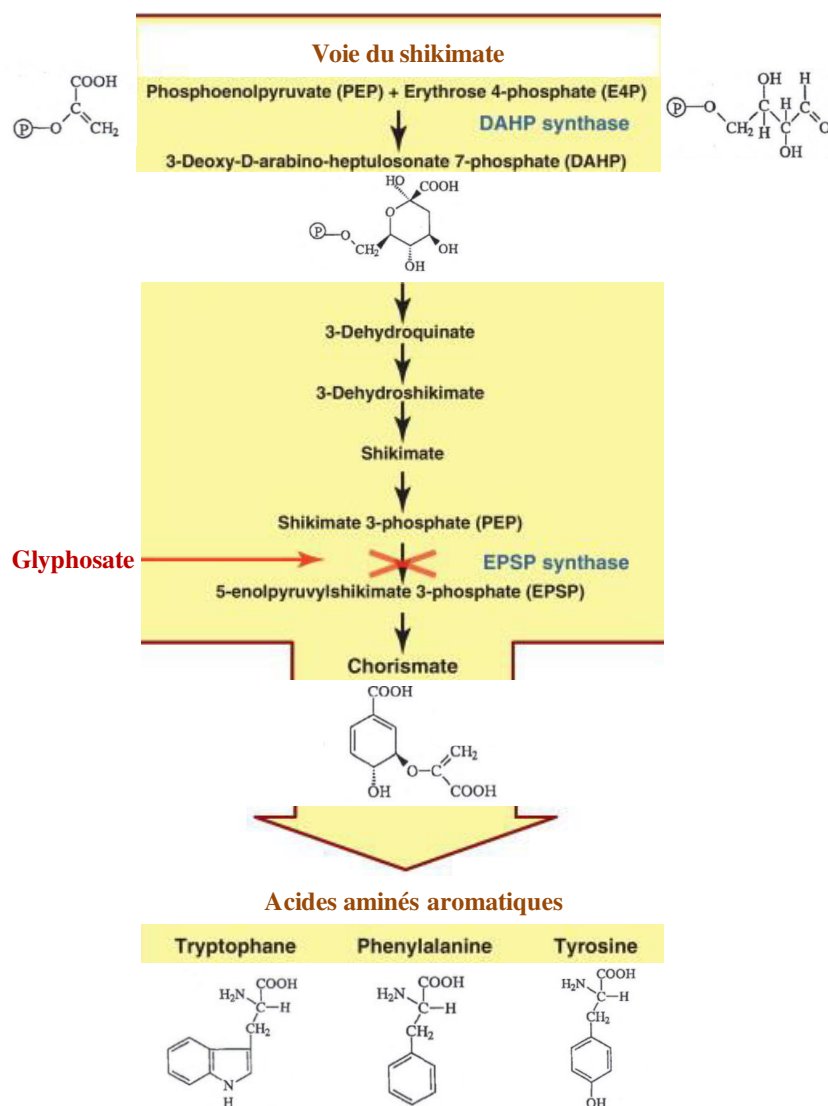


Figure 8. Inhibition de la synthèse d'acides aminés aromatiques par l'action de l'herbicide glyphosate sur la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), enzyme de la voie du shikimate (d'après Helander et al., 2012)

La perturbation directe de la photosynthèse par les herbicides est liée à des blocages des flux d'électrons entre les photosystèmes (PS) le long des membranes thylakoïdiennes. Trois zones de transfert d'électrons sont principalement ciblées par les herbicides : (i) les transferts entre les plastoquinones QA et QB au niveau du PSII, (ii) les transferts au niveau des plastoquinones, (iii) les transferts au niveau des ferrédoxines du PSI (Funke et al., 2006 ; Ramel et al., 2009ab ; Sulmon et al., 2004). L'atrazine, par exemple, bloque le transfert d'électrons au cours de la phase de réduction photochimique de la photosynthèse en se fixant sur la niche lipophile de la protéine thylakoïdienne D1 du centre réactionnel du PSII (Fettker, 1982 ; Trebst and Draber, 1978). La mort cellulaire qui en résulte (Figure 9) ne provient pas de l'interruption du métabolisme énergétique, mais des réactions de photo-oxydation provoquées par les états excités de la chlorophylle, et par la production de formes réactives de l'oxygène (Dan Hess, 2000).

Les HAPs peuvent également affecter la photosynthèse par blocage du transfert d'électrons. Ainsi, le fluoranthène peut agir au niveau des plastoquinones QA (Kummerová et al., 2008). Certains explosifs, insecticides et solvants organiques peuvent aussi perturber la photosynthèse (Medina et al., 2003). Les métaux lourds, comme le cuivre (Cu) et le cadmium (Cd), provoquent aussi un stress chimique sur les plantes en agissant au niveau de la photosynthèse. La perturbation par les métaux lourds s'effectue généralement au niveau de la manganoprotéine émettrice d'oxygène du PSII et au niveau de la ferrédoxine du PSI par compétition avec le fer (Prasad et Strzałka, 1999 ; Siedlecka et Baszyński, 1993). Les métaux lourds pourraient également affecter la synthèse des chlorophylles (Prasad et Strzałka, 1999).

- Effets globaux et effets en cascade des xénobiotiques

Dans une large gamme de stress chimiques provoqués par des xénobiotiques de cibles variées, les organismes photosynthétiques subissent souvent un stress oxydatif généralisé lié à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mittler et al., 2004). Les ROS possèdent une configuration électronique spécifique très réactive générant des cascades de réactions d'oxydation de molécules biologiques. Les principales ROS sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ). Ces molécules sont naturellement et continuellement produites chez les plantes par différentes voies métaboliques, comme les processus liés à la respiration ou la photosynthèse, et sont retrouvées au niveau des mitochondries, des chloroplastes, des peroxysomes, du réticulum endoplasmique et du cytoplasme (Dat et al., 2000). Les ROS jouent un rôle important dans

l'homéostasie cellulaire, et la balance entre la production et l'élimination (détoxification) des ROS peut être considérée comme essentielle pour de nombreux processus cellulaires (Foyer et Noctor, 2005).

Les ROS sont aussi à l'origine d'un système de signalisation cellulaire, notamment en contexte de stress où leur rôle comme messenger secondaire est clairement établi (Baxter et al., 2014 ; Desikan et al., 2001 ; Foyer et Noctor, 2009, 2013 ; Mittler et al., 2011 ; Noctor et al., 2014 ; Vranova et al., 2002). Leur implication dans la régulation de l'expression génétique a aussi permis de démontrer leur rôle d'inducteur de la mort cellulaire programmée (Van Breusegem et Dat, 2006). En conditions de stress, notamment abiotiques, la surproduction de ROS aboutit à un stress oxydatif quand leur détoxification est moins performante ou inhibée. Les ROS perturbent alors le fonctionnement cellulaire du fait de leur action sur les protéines (oxydation d'acides aminés, altération des charges électriques, fragmentation des chaînes polypeptidiques), sur les acides nucléiques (oxydation) et sur les lipides (Foyer et Noctor, 2005, 2009 ; Ramel et al., 2009a). C'est le cas, par exemple, avec l'atrazine (Figure 9). L'inhibition du transfert d'électrons au niveau du PSII empêche le retour de la chlorophylle sous forme excitée par l'énergie lumineuse vers son état fondamental. La chlorophylle peut cependant transférer son énergie d'excitation à des molécules de dioxygène ( $O_2$ ), produisant une forme très réactive de l' $O_2$ , l'oxygène singulet. Celle-ci déclenche alors la peroxydation des lipides et la destruction des pigments photosynthétiques, d'abord des caroténoïdes, puis des chlorophylles, ce qui conduit au symptôme de chlorose observé sur le feuillage. D'autre part, les lipides qui assurent l'intégrité des membranes cellulaires étant peroxydés, celles-ci se déstructurent, ce qui conduit à la mort des cellules (Dan Hess, 2000).

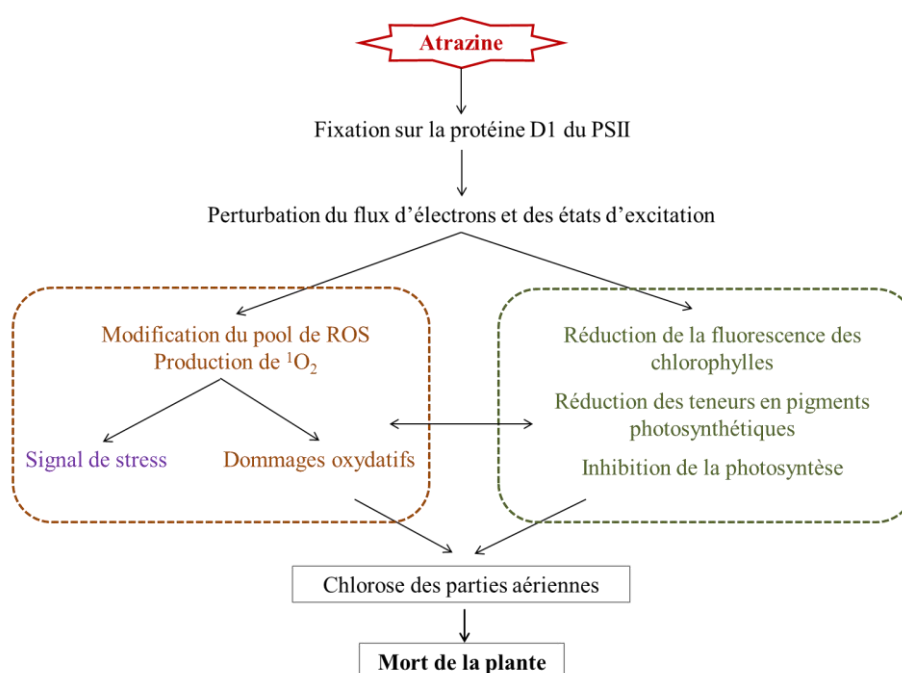


Figure 9. Différents effets de l'herbicide atrazine sur les plantes

Les xénobiotiques, en particulier les pesticides, induisent donc des effets variés chez les plantes, dépendant entre autres de la nature chimique du composé. Néanmoins, des études comportant des analyses d'expression de gènes dans le cadre de la caractérisation des mécanismes de réponses des plantes ont mis en évidence des réponses communes à une grande diversité de xénobiotiques. Celles-ci font intervenir l'expression de gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, dans la protection et la réparation des cellules, et dans les processus de métabolisation, de détoxification, de conjugaison et de transport des xénobiotiques (Fufezan et al., 2002 ; Liu et al., 2009 ; Nobels et al., 2011 ; Ramel et al., 2007, 2009ab ; Teixeira et al., 2007 ; Xie et al., 2010). De telles variations d'expression génétique, complexes et à grande échelle, suggèrent que les xénobiotiques affectent des voies de signalisation et de régulation cellulaires. Toutefois, il est difficile de déterminer si ces modifications sont dues à la perception directe du stress chimique ou à des effets indirects en réponse aux détections de perturbations et de dommages générés par le stress, comme la surproduction de ROS (Wagner, 2004 ; Wang et al., 2010). Des voies de perception des xénobiotiques et les voies de signalisation associées sont connues chez des organismes comme les levures, les invertébrés (Dias et al., 2010 ; Kretschmann et al., 2011 ; Misra et al., 2011 ; Teixeira et al., 2007) et les vertébrés (Baker, 2005 ; McMillan et Bradfield, 2007 ; Ulrich, 2003). De tels senseurs de xénobiotiques, permettant la perception du stress chimique, n'ont pas encore été caractérisés chez les plantes (Ramel et al., 2012). Ces systèmes de détection pourraient avoir une grande importance dans la réponse au stress chimique chez les plantes et dans leur capacité de tolérance (Figure 10).

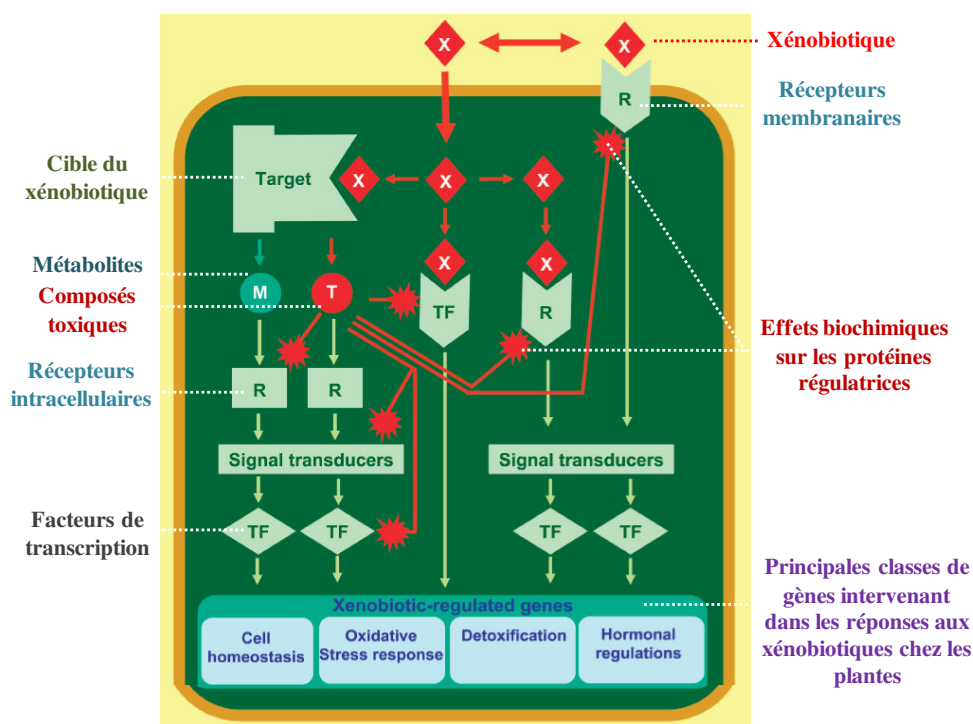


Figure 10. Voies potentielles de perception et de signalisation des xénobiotiques chez les plantes (d'après Ramel et al., 2012)

- Effets de dose et effets paradoxaux

Les effets des xénobiotiques sont également fonction des doses auxquelles les plantes sont exposées. Le phénomène d'hormèse peut être observé à des doses subtoxiques d'herbicides ou d'autres composés (Belz et Duke, 2014 ; Calabrese et al., 2007), et rappelle le principe de Paracelse (1493-1541) "tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison". L'hormèse est un effet stimulateur ou positif d'un stress faible sur l'organisme, par l'activation de voies de signalisation et de régulation indépendamment de dommages cellulaires (Belz et Duke, 2014) (Figure 11). Plusieurs auteurs ont ainsi montré, chez certaines espèces végétales, une augmentation de croissance suite à l'application de faibles doses de pesticides. Velini et al. (2008) observent par exemple une augmentation de la croissance du maïs, du soja conventionnel, d'*Eucalyptus grandis*, de *Pinus* L. et de *Commelia benghalensis* suite à l'application de glyphosate. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que de faibles doses de glyphosate puissent stimuler la photosynthèse, bien que les causes de cette augmentation ne soient pas bien caractérisées (Cedergreen et Olesen, 2010).

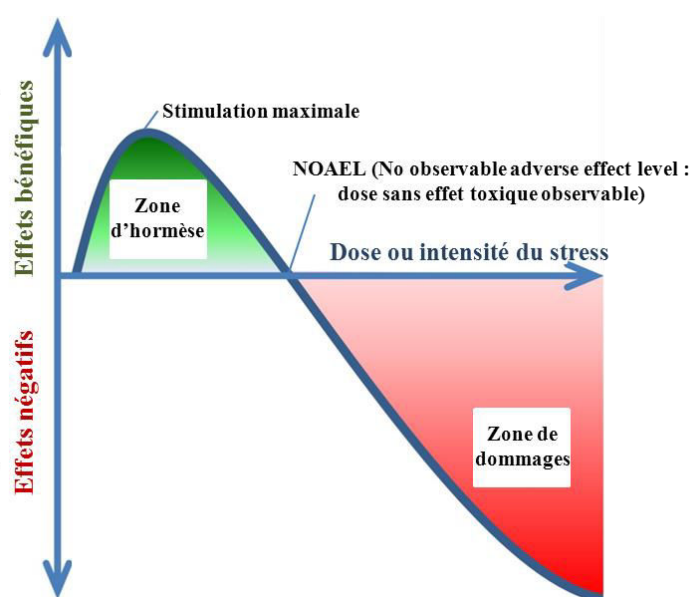


Figure 11. Courbe théorique de dose-réponse représentant l'effet d'hormèse chez les plantes

Ces résultats témoignent de l'importance de considérer la dose de polluant dans les études d'effets des xénobiotiques sur les plantes, les faibles doses pouvant entraîner des réponses différentes des fortes doses. Des études sont de ce fait nécessaires afin de comprendre les mécanismes sous-jacents de ces réponses. Afin de prendre en compte la complexité des pollutions environnementales, il est de plus important de prendre en considération la présence simultanée de nombreux polluants de classes chimiques différentes.

## 2.2. Analyse et modélisation des effets des mélanges complexes de xénobiotiques

Les traitements phytosanitaires utilisent généralement des combinaisons de différents pesticides à modes d'action variés, ce qui induit des pollutions multiples dans les milieux naturels. De plus, l'application simultanée de mélanges de pesticides s'est généralisée afin d'améliorer l'efficacité des traitements en élargissant le spectre d'action et les organismes ciblés, tout en réduisant le dosage de chaque molécule (Li et al., 2008) et le coût d'épandage. De manière générale, les pollutions chimiques sont majoritairement des mélanges de différents xénobiotiques d'origines diverses. Ces mélanges de xénobiotiques, auxquels peuvent s'ajouter les produits de dégradation associés, sont susceptibles d'entraîner chez les plantes des effets différents de ceux causés par une exposition à chaque xénobiotique seul. Ces effets sont souvent dénommés "effets cocktail", et sont liés au fait que les composés d'un mélange peuvent interagir à divers niveaux cellulaires et moléculaires, et perturber des processus biologiques dépendants ou indépendants (Lydy et al., 2004).

L'écotoxicologie actuelle tente d'évaluer et de comprendre la toxicité de tels mélanges pour *in fine* estimer les effets de telles expositions complexes. Les techniques récentes en chimie analytique, ainsi que les approches « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique), qui analysent de manière parallèle un grand nombre de paramètres biochimiques et moléculaires des organismes affectés, sont des apports majeurs pour de telles études écotoxicologiques sur les mélanges complexes.

De plus, il existe des méthodes d'évaluation des risques à l'échelle écosystémique pour cette problématique des contaminations multiples. Ces méthodes sont basées sur la modélisation des effets des substances présentes dans le mélange, sur des prédictions à partir de résultats de bioessais, et sur les mesures des effets engendrés effectuées directement dans la biosphère (RECORD, 2011).

Concernant les méthodes de modélisation, l'une des premières (Loewe et Muischnek, 1926) se base sur le concept d'Addition de Concentrations (CA), selon lequel la toxicité du mélange correspondrait à l'addition de la toxicité de chaque molécule à sa concentration dans le mélange. Cette méthode ne s'applique cependant qu'aux molécules possédant le même mode d'action, les études mettant en effet en évidence une surestimation de la toxicité pour des mélanges de composés à modes d'action différents. Au contraire, le concept d'Action Indépendante (IA) proposé par Bliss (1939) a comme hypothèse que les composants du mélange ont des modes d'action différents et indépendants, et agissent donc sur des cibles différentes produisant des effets qui ne s'influencent pas. Ce modèle introduit à son tour un



biais en sous-estimant les effets de mélanges de xénobiotiques ayant les mêmes modes d'action (Figure 12).

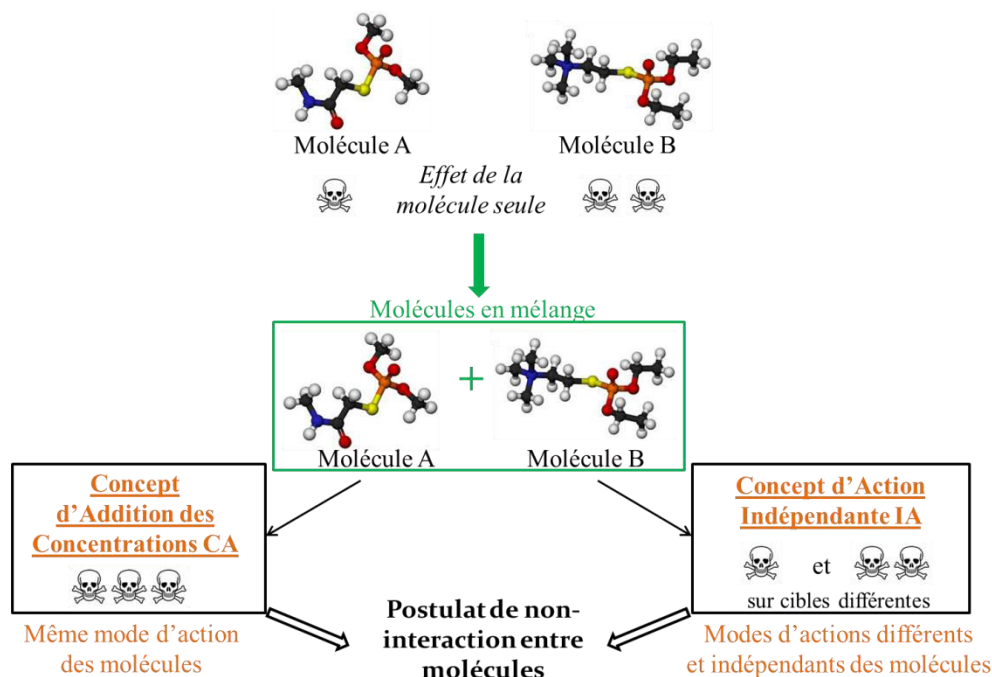


Figure 12. Représentation des deux concepts majeurs de prédiction de l'effet d'un mélange de xénobiotiques en absence d'interaction entre ces composés

Pour une exploitation fiable, ces deux méthodes nécessitent de connaître avec précision les modes d'actions d'un grand nombre de contaminants, ce qui rend difficile leur utilisation pour des mélanges de composés peu ou pas connus et pouvant intégrer notamment des produits de dégradation (Junghans et al., 2006 ; Spurgeon et al., 2010). De plus, ces modèles sont basés sur le postulat qu'il n'y a pas d'interaction entre les constituants du mélange. Ils ont donc des conditions d'utilisation limitées, ne pouvant être fiables que pour des mélanges artificiels simples de xénobiotiques à mode d'action caractérisé, tandis que les pollutions environnementales ne présentent que très rarement des composés à modes d'action identiques pour tous ou des modes d'action tous différents. Néanmoins, plusieurs auteurs ont démontré l'intérêt du modèle CA, souvent utilisé et bien représentatif des effets observés pour certains mélanges sans interaction apparente (Knauert et al., 2008 ; Munkegaard et al., 2008 ; Wendt-Rasch et al., 2004). Le terme d'interaction est employé lorsque la réponse observée d'un mélange est significativement différente d'une réponse additive, théorique, calculée à partir du modèle d'additivité précédemment décrit (Cedergreen et al., 2013). Différents termes sont utilisés pour décrire la diversité des interactions possibles au sein d'un mélange. La synergie traduit un effet observé (dit effet supra-additif) du mélange plus important que celui prédit par



le modèle d'additivité. A contrario, un effet plus faible que celui attendu (effet sub-additif) est qualifié d'antagonisme (Greco et al., 1995 ; Hertzberg et MacDonell, 2002). D'autres termes peuvent également être employés, tels que potentialisation ou coalition (effet supérieur), ou bien inhibition (effet inférieur). Ces déviations de réponse d'un organisme à un mélange par rapport aux modèles de références peuvent être évaluées par des méthodes graphiques, comme les isobologrammes (Altenburger et al., 1990 ; Gessner, 1995) (Figure 13). Un isobologramme est un graphique en deux dimensions avec sur chaque axe la concentration d'un composé. Les isoboles relient différentes combinaisons de doses qui produisent le même effet. Le modèle d'addition des concentrations est caractérisé par une ligne droite qui relie les concentrations des deux composés A et B ayant un même effet. Une déviation de la ligne droite indique un antagonisme (courbe jaune) ou une synergie (courbe rouge).

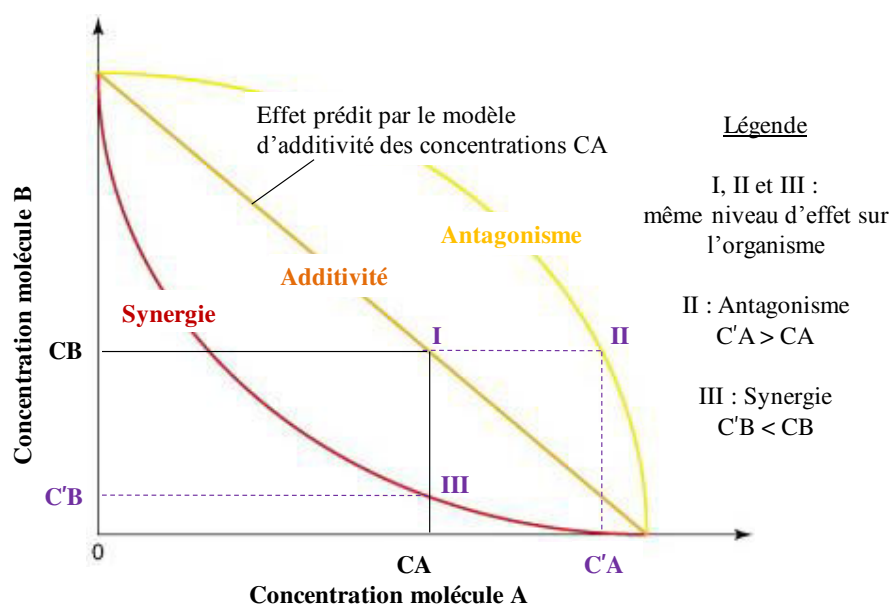


Figure 13. Isobologramme de l'effet d'un mélange de xénobiotiques

Des approches numériques basées sur les différences statistiques entre les données expérimentales et les données prédites grâce aux modèles de référence sont également possibles pour estimer ces interactions. Ces comparaisons numériques sont généralement réalisées grâce à des index, comme les indices de toxicité tels que l'Unité Toxique (TU) définie par Sprague (1970). Cette approche normalise la concentration de chaque composé du mélange par rapport à une toxicité en la convertissant en unité toxique. Pour ce faire, la concentration de chaque composé présent dans le mélange est divisée par la concentration du composé produisant seul un effet toxique précis, qui est le même pour tous les composés du mélange, comme par exemple la concentration entraînant 50% de mortalité. L'équation est alors la suivante :  $TU_i = c_i / CE_{50i}$ , où  $c_i$  est la concentration du composé  $i$  dans le mélange et

$CE_{50i}$  la concentration de ce même composé qui cause seul l'effet de 50% de mortalité. La somme des TUs individuelles représente donc la toxicité totale du mélange. Si cette somme est égale à 1, alors le mélange est strictement additif, et il n'y a donc pas d'interaction entre les différents composés. Si la somme des unités toxiques est inférieure à 1, l'effet du mélange est antagoniste, et si elle est supérieure à 1, l'effet est synergique.

Il existe de même des modèles spécifiques qui prennent en compte une interaction possible entre composés (Jonker et Svendsen, 2005 ; Sørensen et al., 2007). Ces modèles présentent l'avantage de pouvoir non seulement qualifier, mais aussi estimer les effets d'interactions.

Les travaux mettant en œuvre des mélanges complexes dans des conditions environnementales réalistes sont toutefois peu nombreux et principalement effectués sur des mélanges binaires. Pourtant, Parvez et al. (2009) ont montré que, plus un mélange est complexe, moins il se produit d'interaction. Ils montrent également, que plus le mélange est complexe, plus le modèle d'additivité surestime les effets.

An et al. (2004) présentent un exemple de réponses de plantes dépendant du nombre de molécules en mélange et de leurs caractéristiques. Les résultats montrent des effets antagonistes sur la croissance des tiges et additifs sur les racines de *Cucumis sativus* pour un mélange Cu+Cd et Cu+Pb, tandis que pour un mélange Cd+Pb, l'effet est au contraire synergique pour les racines et proche de l'additivité pour les tiges. De plus, le mélange des trois composés montre un antagonisme fort pour les deux paramètres. La formation de complexes entre les molécules, qui peuvent les rendre moins biodisponibles ou moins efficaces pour pénétrer dans la plante, serait une explication de ces effets.

Des effets d'interactions ont également été mis en évidence pour les pesticides. C'est par exemple le cas avec un mélange d'herbicide (flumioxazine) et de cuivre qui entraîne une légère synergie dans l'inhibition de la photosynthèse de *Lemna minor* (Frankart et al., 2002). Lorsque le mélange contient des fongicides (fludioxonil ou procymidone) et du cuivre, selon la quantité du fongicide, l'effet observé est synergique ou antagoniste. Ces effets sont en partie expliqués par des phénomènes de complexation entre les polluants à faibles doses, tandis que la synergie proviendrait des adjuvants additionnés aux fongicides, qui dissolveraient la cuticule des feuilles et permettraient ainsi au cuivre d'atteindre plus facilement le milieu intracellulaire (Frankart et al., 2002).

### 2.3. Limitation des études prédictives d'impact

L'évaluation et la prédiction des effets des pollutions multiples en conditions naturelles restent toutefois difficiles malgré le développement de ces modèles. Ceci est notamment lié à la

diversité des composés polluants retrouvés et au manque de connaissances sur leurs modes d'action. De même, l'influence des paramètres biotiques et abiotiques sur leur biodisponibilité, leur diffusion, et leur dégradation reste méconnue. Plusieurs facteurs peuvent de plus modifier les interactions potentielles entre composés, augmentant ainsi la difficulté d'appréhender la toxicité des mélanges. Outre la dose d'exposition de chaque molécule, la proportion respective de chacune d'entre elles, et l'ordre dans lequel les substances sont introduites dans le milieu, peuvent modifier l'intensité des réponses des plantes (Cedergreen et al., 2013 ; Warne et Hawker, 1995). De même, la fréquence d'exposition des plantes et leur sensibilité individuelle sont autant de facteurs à prendre en considération.

## **2.4. Mécanismes de réponses des plantes aux stress xénobiotiques**

Les caractéristiques propres à chaque plante, et notamment leur génotype, conditionnent le niveau de toxicité du xénobiotique (Ramel et al., 2009b). Les plantes présentent en effet des capacités intrinsèques de perception et de réponse aux stress chimiques qui peuvent être à l'origine de phénomènes de tolérance et de résistance aux xénobiotiques, qui permettent alors la survie, le développement ou la croissance sur des milieux pollués. Des différences majeures de sensibilité ou de tolérance sont ainsi trouvées entre espèces, entre écotypes ou entre populations.

- Mécanismes de tolérance des plantes aux xénobiotiques

### ➤ Rôle du xénome végétal dans la tolérance des plantes aux xénobiotiques

La tolérance vis-à-vis d'un xénobiotique correspond à la capacité d'un organisme à se développer en présence de ce xénobiotique malgré des effets négatifs sur sa croissance. Cette tolérance est souvent due à la mise en place chez les plantes de systèmes d'accumulation, de détoxification et de métabolisation des xénobiotiques, qui restent mal connus. Des modèles généraux de détoxification des xénobiotiques par les plantes ont toutefois été proposés, avec notamment le modèle "green-liver" de Sandermann (1992) concernant les polluants organiques. Ce modèle, proche des mécanismes décrits chez les mammifères, se compose de deux parties : (i) la perception et signalisation des xénobiotiques ou de leurs effets (section 2.1.), (ii) le transport et la biotransformation des xénobiotiques. Le terme de "xénome" proposé par Edwards et al. (2005, 2011) définit l'ensemble des biosystèmes moléculaires et biochimiques intervenant dans le devenir des xénobiotiques dans les cellules végétales. La Figure 14 décrit les 4 étapes de défense métabolique qui sont généralement impliquées.

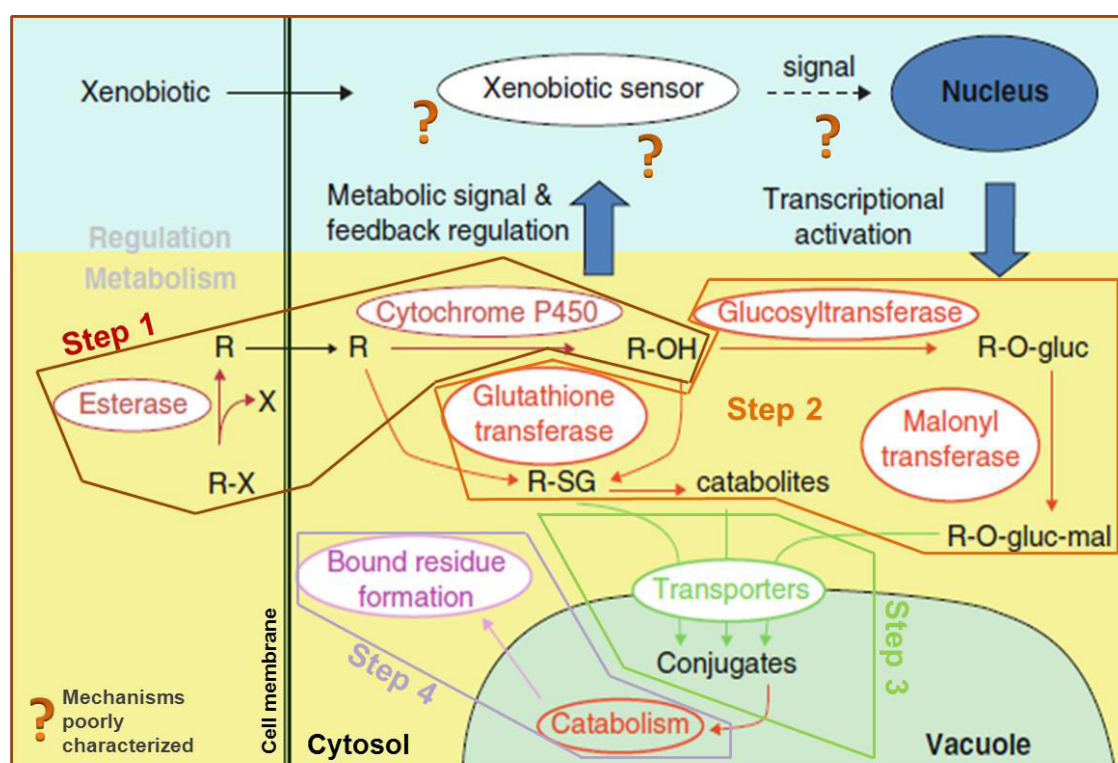


Figure 14. Mécanismes de défense des plantes contre les xénobiotiques (d'après Edwards et al., 2011)

R-X : xénobiotique, R-OH : xénobiotique après oxydation, hydroxylation ou désalkylation, R-SG : conjugaison au glutathion, R-O-gluc : conjugaison à des résidus glycosyl, R-O-gluc-mal : estérification (acide malonique)

La phase 1 implique l'action d'estérases et/ou de cytochromes P450 (CYP) qui modifient la structure chimique, l'activité et la mobilité du xénobiotique, réduisant généralement sa toxicité. Les produits formés sont plus hydrophiles que la molécule d'origine, permettant ainsi une diminution de leur affinité avec les membranes biologiques, et assurant de ce fait une réduction de leur distribution au sein des cellules et des tissus (Coleman et al., 1997). Cette phase permet de plus d'introduire, *via* des réactions d'oxydation, d'hydroxylation ou de déalkylation, des groupes fonctionnels nécessaires à la phase 2 de bioconjugaison.

Cette phase 2 permet une désactivation des xénobiotiques dans le cytosol, par liaison covalente à des composés endogènes hydrophiles tels que le glutathion (GSH) et des résidus glycosyl. Ces réactions de conjugaison sont sous contrôle enzymatique, les principales enzymes impliquées étant des glutathion S-transférases (GSTs) et des uridines diphosphates glycosyltransférases (UGTs). Une étape d'estérification avec l'acide malonique, catalysée par des malonyltransférases (MTs), peut également rentrer en jeu pour les produits glucosylés.

Les conjugués et catabolites obtenus sont ensuite activement éliminés du cytosol par l'action de transporteurs ATP-dépendants lors de la phase 3, et accumulés dans la vacuole.

Enfin, durant la phase 4, les xénobiotiques peuvent rester dans la vacuole et subir une transformation supplémentaire, et/ou être exportés hors de la cellule pour être incorporés dans la paroi cellulaire, formant ainsi des résidus liés inactifs et insolubles.

Bien que les voies métaboliques de détoxification des xénobiotiques soient décrites, la plupart des gènes spécifiquement impliqués dans ces étapes restent à caractériser. Excepté pour les MTs, qui sont codés par deux gènes (*At5g39050* et *At3g29670*) chez *Arabidopsis thaliana* (Taguchi et al., 2010), toutes les autres composantes du modèle de détoxification sont codées par des familles multigéniques complexes au sein desquelles seulement quelques gènes doivent être associés au xénome. Chez *Arabidopsis*, 244 gènes codants des CYPs, 55 gènes de GSTs, 107 gènes d'UGTs et 120 gènes de transporteurs ABC ont été annotés (Dixon et Edwards, 2010 ; Bak et al., 2011 ; Edwards et al., 2011). De même, l'activité du xénome est régulée au niveau transcriptionnel par des mécanismes de perception et de signalisation qui restent mal connus (Ramel et al., 2007, 2012).

La variabilité d'activité du xénome pourrait donc être responsable de la différence de réponse des plantes aux xénobiotiques en termes de sensibilité ou de tolérance. Pour Chen et al. (2000) et Cho et Sohn (2004), la sensibilité est en grande partie la conséquence d'un xénome défectueux ou ayant une faible activité. Au contraire, un génotype générant des combinaisons optimales d'expression de gènes d'intérêt, et coordonnant ainsi les différentes étapes du processus de détoxification, devrait aboutir à un xénome fonctionnel et à une tolérance au moins partielle de la plante aux xénobiotiques.

#### ➤ Mécanismes anti-oxydants de tolérance des plantes aux xénobiotiques

La majorité des xénobiotiques génèrent *in planta* un stress oxydatif. De nombreuses études ont mis en évidence que la lutte contre les effets délétères des ROS est assurée par différents systèmes de défense, chargés non seulement de capter et de neutraliser les ROS, mais aussi d'éliminer et de remplacer les molécules endommagées (Foyer et Noctor, 2005). Ces systèmes de défense sont présents dans le cytosol, mais également dans les différents organites, tels que les chloroplastes (Asada, 2006), les mitochondries (Møller, 2001 ; Møller et al., 2007), les peroxysomes (Del Rio et al., 2006) et le reticulum endoplasmique (Ozgur et al., 2014). Les systèmes antioxydants assurent trois fonctions majeures. La première consiste à empêcher la formation ou l'amplification des ROS par "quenching" (désactivation de molécule) de biomolécules excitées telles que les chlorophylles ou l'oxygène singulet, afin

d'éviter la surexcitation et le transfert d'énergie à l'O<sub>2</sub>. La seconde fonction repose sur le processus de "scavenging" (détoxification chimique) par des molécules antioxydantes impliquées dans des processus enzymatiques ou non-enzymatiques. Les molécules antioxydantes majoritairement utilisées dans les cellules sont le glutathion et l'ascorbate (Foyer et al., 1994 ; Foyer et Noctor, 2011 ; Noctor et al., 2012 ; Noctor et Foyer, 1998 ; Sharma et Davis, 1997). Le glutathion est un tripeptide ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) dont la fonction antioxydante est due à la présence du groupement sulphydryl de la cystéine (Rennenberg, 1982). Il réagit avec différents intermédiaires du stress oxydatif, peroxyde d'hydrogène et radicaux superoxydes et hydroxyles, pour donner sa forme oxydée, le GSSG, composée de deux molécules de glutathion reliées par un pont disulfure. L'ascorbate est synthétisé à partir d'hexose (Loewus, 1988) et réagit également avec les ROS, principalement l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Glutathion et ascorbate interviennent en particulier dans le cycle de Halliwell-Asada pour la dégradation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Foyer et Noctor, 2009). La troisième fonction des systèmes antioxydants assure la réparation des dommages oxydants et l'élimination des molécules endommagées.

Plusieurs autres molécules ont des propriétés multi-fonctionnelles et présentent, en plus de leurs propriétés métaboliques ou régulatrices, des propriétés antioxydantes, en piégeant ou désactivant les ROS. C'est le cas par exemple des caroténoïdes (Dellapenna et Pogson, 2006), des flavonoïdes (Gould et al., 2002), des polyamines (Scandalios, 2005), de la proline (Matysik et al., 2002), des thiorédoxines (Das et Das, 2000), des résidus méthionine des protéines (Luo et Levine, 2008), ou des polyols (Nishizawa et al., 2008 ; Shen et al., 1997ab). L'état physiologique et nutritionnel de la plante (comme la teneur en composés carbonés) peut induire des réponses différentes face au stress oxydatif. Les sucres solubles (notamment le saccharose et le glucose), qui jouent un rôle central dans la structure et le métabolisme de la plante, sont aussi impliqués dans les réponses aux stress. Les phénomènes de tolérance inductibles par le saccharose sont liés à des mécanismes de régulation plutôt qu'à un effet nutritionnel strict des sucres solubles. Ces composés agissent comme des molécules signal activant des voies de régulation des réponses. Sulmon et al. (2004, 2006, 2007a) ont en effet montré que le saccharose confère une forte tolérance à l'atrazine chez *Arabidopsis*, qui se traduit par un maintien de la croissance et du développement phototrophique, y compris pour des concentrations normalement létales de cet herbicide. Cette protection est liée à des interactions entre les voies de signalisation du saccharose, des xénobiotiques et des ROS induits par ces xénobiotiques. Ces interactions entraînent des modifications de l'expression de gènes liés aux mécanismes de défense contre les ROS, de gènes liés aux mécanismes de



réparation, mais aussi de gènes de transduction de signal et de communication cellulaire (Couée et al., 2006, 2013 ; Ramel et al., 2007, 2009ab, 2012, 2013). Les familles de gènes présentant ces modifications d'expression génétique comprennent les ascorbate-péroxydases, les glutathion S-transférases et les cytochromes P450s, dont l'importance dans les réponses aux xénobiotiques a été vue précédemment.

Les espèces végétales pour lesquelles la dynamique du carbone implique de manière importante le fructose et les fructanes montrent aussi des relations fortes entre l'état nutritionnel et la tolérance aux stress. Chez ces plantes, comme le Ray-grass (*Lolium perenne*) (AbdElgawad et al., 2014 ; Pavis et al., 2001 ; Prud'homme et al., 1992), les fructanes constituent des composés majeurs de réserve de polysaccharides (Hisano et al., 2008). Ces composés sont naturellement présents en solution dans les cellules des feuilles adultes et dans leurs parties en élongation (Guerrand et al., 1996 ; Hendry, 1993 ; Pavis et al., 2001), mais peuvent aussi être présents dans les racines (Prud'homme et al., 1992) et dans les tiges (Smith, 1967). Selon le stade de développement de la plante, la concentration en fructanes évolue. Les fructanes s'accumulent lorsque la vitesse d'assimilation du carbone est supérieure à sa vitesse d'utilisation (notamment pendant la phase végétative). Au contraire, ils sont mobilisés lorsque la demande en composés carbonés devient plus importante que la production de photoassimilats (Archbold, 1940 ; Pollock, 1984 ; Pollock et Cairns, 1991). Les niveaux de fructanes ont été associés à la capacité de tolérance aux stress abiotiques (Hisano et al., 2004, 2008 ; Kawakami et al., 2008 ; Valluru et Van den Ende, 2008). Ces tolérances, permettant notamment une survie au froid et à la sécheresse (Amiard et al., 2003ab ; Hisano et al., 2008 ; Kawakami et al., 2008), sont probablement liées à la stabilisation des membranes cellulaires (Hinch et al., 2007 ; Livingston et al., 2009). Les fructanes participeraient également aux fonctions antioxydantes de la plante par le piégeage chimique des ROS au niveau du tonoplaste (Peshev et al., 2013). Ils pourraient aussi jouer un rôle en tant que signaux de stress (Van den Ende, 2013).

#### ➤ Implication des phytohormones dans la tolérance aux xénobiotiques

Les phytohormones jouent également un rôle important dans la tolérance des plantes face aux stress. En effet, ces molécules, qui interviennent dans la régulation de tous les aspects du développement végétal, sont aussi essentielles pour l'adaptation des plantes aux stress abiotiques en régulant un large panel de réponses (Argueso et al., 2009 ; Peleg et Blumwald, 2011 ; Santner et Estelle, 2009). Ces hormones modifient profondément l'expression du génome en induisant des modifications des niveaux de régulateurs de transcription, par des

régulations de phosphorylation ou de dégradation *via* le système Ubiquitine-Protéasome (Santner et Estelle, 2010). C'est le cas par exemple de l'acide abscissique (ABA), des cytokinines, de l'acide salicylique, des jasmonates ou de l'éthylène. L'éthylène est d'ailleurs généralement considéré comme une hormone de stress qui régule de nombreuses réponses aux stress (Cao et al., 2008). Des études de mutants affectés dans la transduction du signal éthylène ont confirmé qu'il existait des interactions entre les xénobiotiques et l'action des hormones, et que ces interactions étaient impliquées dans les réponses des plantes à ces xénobiotiques. Sulmon et al. (2007a) ont ainsi montré qu'en présence d'atrazine, le saccharose et le glucose activent, de manière indépendante de l'hexokinase, la voie de l'éthylène chez *Arabidopsis*. Cette activation serait responsable, d'une part, de la dérégulation des gènes liés à la photosynthèse généralement inhibés en présence de sucres par la voie de l'hexokinase, et d'autre part, de l'induction des mécanismes de défense contre les effets de l'atrazine. Weisman et al. (2010) ont également montré l'implication des voies de signalisation de l'éthylène dans la tolérance d'*Arabidopsis* au phénanthrène.

La sensibilité ou tolérance d'un organisme aux xénobiotiques est de plus influencée par d'autres facteurs, tels que le stade de développement de la plante, le stade graine étant moins sensible aux contaminants que le stade plantule (Li et al., 2005). De même, les facteurs biotiques et abiotiques peuvent perturber les réponses aux stress chimiques en partageant avec elles des étapes de signalisation ou des composés communs (Fujita et al., 2006).

- Mécanismes de résistance des plantes aux xénobiotiques

La notion de résistance à un composé phytotoxique correspond à la capacité de certains individus à éviter ou contourner les effets d'inhibition de la cible, par des phénomènes d'adaptation issus de mutations génétiques. Les bases génétiques de telles adaptations concernent non seulement le codage génétique des cibles, mais aussi l'ensemble des gènes impliqués dans la défense et la détoxification. Comme cela a été vu précédemment, le développement des analyses transcriptomiques et protéomiques a permis en effet de démontrer que les modifications d'expression génétique et d'activité des protéines jouent un rôle important dans les réponses des plantes aux pesticides, notamment aux herbicides (Délye, 2013 ; Ramel et al., 2007, 2009ab, 2012).

Deux grands types de mécanismes sont impliqués dans la résistance des plantes. D'une part, la résistance du site cible de l'herbicide (Target-site resistance, TSR), qui correspond à des mutations spécifiques dans le gène codant les protéines ciblées, ce qui cause une réduction de l'efficacité de l'action directe de la molécule sur sa cible. Ceci se traduit, au niveau



biochimique, par des modifications de structure et de conformation du site de liaison de l'herbicide, qui aboutissent à une forte réduction des interactions protéine-herbicide, rendant ainsi le composé phytosanitaire inefficace (Délye, 2013 ; Powles et Yu, 2010). Il peut également y avoir une compensation de l'action inhibitrice de l'herbicide par une augmentation de l'expression ou de l'activité intrinsèque de la protéine cible. Ce type de résistance du site cible du xénobiotique a été décrit pour un large spectre de molécules, en particulier les inhibiteurs de la photosynthèse comme les triazines (De Prado et al., 2000 ; Foes et al., 1998, 1999 ; Sajjaphan et al., 2002). Par exemple, la résistance à l'atrazine peut être due à une mutation ponctuelle (Ser-264-Gly) sur le gène chloroplastique *psbA* codant la protéine D1 du thylakoïde impliquée dans le transfert d'énergie du PSII au sein des chloroplastes. La modification de conformation de cette protéine permet d'éviter le blocage du transfert d'électrons (Devine et Shukla, 2000 ; Gronwald, 1994 ; Sulmon et al., 2004 ; Tian et Darmency, 2006). De telles résistances ont également été décrites pour les inhibiteurs de la synthèse des acides aminés (Foes et al., 1998, 1999 ; Lee et al., 2011) ou de la cellulose (Desprez et al., 2002). Par exemple, chez *Amaranthus palmeri*, des mutations peuvent entraîner des changements d'expression ou de propriété (conformation du site de liaison) de l'EPSPS, qui est l'enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques inhibée par le glyphosate (Figure 8). Cao et al. (2012) ont montré que de telles mutations induisaient des résistances au glyphosate. Il a de plus été montré qu'une même espèce pouvait résister à plusieurs herbicides inhibant des cibles différentes, par accumulation de mutations favorables dans son génome (Foes et al., 1998, 1999 ; Powles et Yu, 2010).

Il existe d'autre part des résistances non liées aux sites cibles des molécules (Non-target-site resistance, NTSR). Ce type de résistance reste encore peu connu (Délye, 2013). Contrairement au TSR qui induit une résistance au xénobiotique en ciblant la protéine affectée par le pesticide, le NTSR peut permettre des résistances à de nombreux pesticides à modes d'actions variés (Délye et al., 2010 ; Petit et al., 2010ab). Ces résistances peuvent être dues à des modifications en lien avec divers mécanismes. Elles peuvent permettre une réduction de la pénétration de l'herbicide dans les cellules de la plante par modification des propriétés physiques et chimiques de la cuticule, comme cela a été par exemple mis en évidence dans des cas de résistance au glyphosate (Vila-Aiub et al., 2012). Des mutations de gènes codant des activités du xénome peuvent également générer une augmentation de l'efficacité de dégradation des herbicides, avec des sur-expressions de gènes de détoxification tels que ceux codant des cytochromes P450 (Délye, 2013). Certaines résistances NTSR correspondent à une augmentation des enzymes intervenant dans la protection contre le stress

oxydatif causé par l'herbicide (Cummins et al., 2009). Des cas de résistances non liées à la cible ont ainsi été observés vis-à-vis des triazines, impliquant par exemple la détoxification de l'atrazine par des enzymes à cytochrome P450 ou des GSTs (Anderson et Gronwald, 1991 ; Gray et al., 1996 ; Gressel et al., 1983 ; Gronwald et al., 1994 ; Sulmon et al., 2006).

Plusieurs facteurs induisent une forte pression de sélection sur les gènes codant les cibles potentielles, susceptibles de générer des résistances (Délye, 2013 ; Gressel, 2011 ; Huertas et al., 2010 ; Jasieniuk et al., 1996 ; Lagator et al., 2013). Ces facteurs comprennent le mode d'action de la molécule, notamment si elle a un site d'action unique, mais aussi la dose d'application et le temps ou la fréquence d'exposition, par exemple si la plante est exposée de façon chronique. La vitesse d'apparition des résistances est également liée à la biologie des espèces végétales. Les espèces annuelles, ayant un plus grand nombre de générations, sont généralement soumises à plus de pression de sélection que les espèces bisannuelles ou pérennes (Foes et al., 1998). De même, la polyploïdie, qui permet l'accumulation de mutations génétiques au cours du temps, peut donner aux organismes des potentialités génétiques d'acquisition de résistance (Taylor et Feyereisen, 1996).

Ces résistances et tolérances aux xénobiotiques sont des facteurs clés dans le maintien des plantes sur les sites pollués. De plus, comme décrit précédemment, les plantes peuvent accumuler et dégrader des xénobiotiques. Ce rôle épurateur encore mal connu est prometteur dans les contextes de gestion et de réhabilitation des milieux pollués.

### **3. Rôles des communautés végétales dans la dynamique des pollutions chimiques**

Afin d'éviter les risques sanitaires et écologiques des pollutions issues des activités anthropiques, des stratégies de remédiation (ou décontamination) des sols pollués ou de traitement des eaux ont été développées et mises en place. Ces stratégies sont nombreuses et ont des coûts variés. Parmi elles, certaines font appel aux mécanismes d'accumulation et de dégradation des pesticides que possèdent les plantes. Le choix concret d'une stratégie donnée se base sur divers paramètres comme la nature et la quantité de polluants à remédier, les caractéristiques du substrat, l'accessibilité du site, la place et le temps disponibles, ainsi que l'usage futur du site en lien avec le cadre réglementaire et économique.

### 3.1. Importance des communautés végétales dans la remédiation des milieux pollués

- Techniques de remédiation des sols pollués

Les techniques de traitement des sols peuvent être classées par famille de mécanismes de traitement, ou par type de techniques de gestion du sol (ADEME, 2012a). Les différentes familles correspondent aux traitements physiques, chimiques et biologiques. Les traitements biologiques sont aussi décrits sous le terme générique de bioremédiation. Le classement par type de technique correspond aux actions qui sont directement effectuées *in situ*, aux actions effectuées sur site avec excavation du sol, et à celles effectuées *ex-situ* (hors site) avec évacuation des terres polluées vers un centre de traitement adapté (Figure 15). Il existe également des procédés n'éliminant pas le polluant du substrat contaminé, mais permettant d'éviter sa propagation par diffusion. C'est le cas du confinement, qui sépare physiquement le sol pollué du reste de l'environnement (Henner et al., 1997).

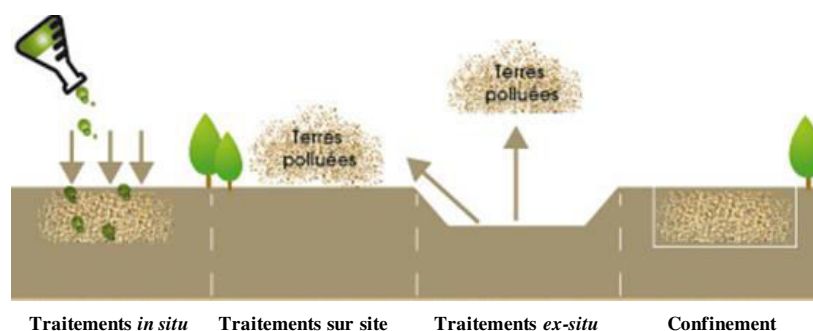


Figure 15. Techniques de traitement des sols pollués (d'après Actu-Environnement.com)

Les techniques sur site et *ex-situ* sont les plus utilisées et requièrent une coûteuse excavation préalable des terres polluées, puis un traitement par des procédés thermiques, physico-chimiques ou biologiques. Les procédés thermiques regroupent l'incinération, la pyrolyse (décomposition chimique induite dans les matériaux organiques par la chaleur) et la désorption thermique (volatilisation de l'eau et du polluant organique). Les procédés physico-chimiques consistent en diverses méthodes, telles que le lavage des terres, les techniques de séparation par gravité, le magnétisme et le tamisage, ou l'oxydoréduction chimique, qui convertit, par ajout d'un agent oxydant, un polluant en une forme moins toxique et plus facilement biodégradable. Les procédés biologiques sur sol excavé, qui nécessitent davantage de temps pour la décontamination du milieu, reposent majoritairement sur la dégradation des polluants par les micro-organismes. Ces dégradations font par exemple intervenir le compostage, qui consiste à mélanger le sol contaminé avec des amendements organiques et

des agents de charge, le landfarming, qui utilise les pratiques agronomiques comme le labour afin de stimuler l'activité microbienne, ou les biopiles où les terres polluées sont mélangées avec des amendements, puis stockées dans des zones de traitement imperméables (ADEME, 2012a ; Al-Awadhi et al., 1996 ; Atagana, 2004 ; FRTR, 2014 ; Maila et Cloete, 2004). Ces techniques sont efficaces, mais ont un impact écologique important. En effet, l'excavation et le transport des substrats affectent fortement la structure et le fonctionnement des communautés du sol. De plus, le fonctionnement des centres de stockage et de traitement, ainsi que les rejets atmosphériques associés à certaines méthodes (incinération ou volatilisation par exemple), engendrent des pollutions (ADEME, 2012a ; BRGM, 2010). Certains de ces procédés physico-chimiques et biologiques peuvent aussi être appliqués *in situ*, c'est-à-dire directement sur la zone polluée. Mais ces techniques peuvent également avoir des impacts environnementaux, comme le lessivage des sols ou l'oxydoréduction chimique, qui peuvent induire un déplacement de la pollution avec transfert des contaminants dans les eaux souterraines. Ces techniques nécessitent de plus l'emploi de solutions qui peuvent être toxiques pour l'environnement et qui peuvent altérer les propriétés chimiques, physiques et biologiques du sol (BRGM, 2010). La bioremédiation *in situ* peut être stimulée par des techniques de bioaugmentation, qui consistent à apporter des micro-organismes endogènes ou exogènes acclimatés aux contaminants. Cette méthode peut être couplée à du bioventing assurant un apport d'oxygène ou la circulation de solutions nutritives dans le sol afin de stimuler la dégradation naturelle par les micro-organismes (ADEME, 2012a ; FRTR, 2014).

- Phytoremédiation

Ces différentes méthodes deviennent difficiles à mettre en œuvre lorsque la surface à décontaminer est étendue (Iimura et al., 2002). Des stratégies alternatives, basées sur les capacités du vivant à se développer en milieux pollués, ont ainsi été développées. En particulier, les phytotechnologies (Fenner et al., 2013), appelées également techniques de phytoremédiation, utilisent des espèces végétales et leur microflore associée pour extraire, contenir ou dégrader des polluants inorganiques ou organiques (Arthur et Coats, 1998 ; Mench et al., 2007 ; Mench et Bes, 2009 ; Pilon-Smits, 2005 ; Salt et al., 1998 ; Schwitzguébel et al., 2011). Emergentes sur les marchés du traitement et de la gestion des sites et sols pollués, ces techniques douces peuvent s'appliquer *in situ* sur une large variété de substrats pollués. Les phytotechnologies sont moins dommageables pour l'environnement par rapport aux techniques conventionnelles de dépollution et sont donc jugées *a priori* plus

conformes aux enjeux du développement durable. De plus, un avantage majeur de la phytoremédiation est son coût, de 100 à 10 000 fois inférieur aux autres méthodes conventionnelles (ADEME, 2012b).

De nombreuses études sont menées depuis les années 1990 pour acquérir les connaissances sur les mécanismes de tolérance, d'accumulation et de dégradation mis en œuvre par les plantes phytoremédiatrices candidates, ainsi que pour optimiser l'utilisation des technologies de phytoremédiation (Bell et al., 2014 ; Bert et al., 2012 ; Mench et al., 2007 ; Mench et Bes, 2009 ; Ouvrard et al., 2011 ; Sulmon et al., 2014). Effectivement, au cours de l'évolution, certaines espèces ont développé des mécanismes complexes pour absorber les substances organiques ou minérales du sol, de l'eau et de l'air à travers leurs racines et leurs feuilles, ces substances pouvant ensuite être transportées dans d'autres parties de la plante et y être utilisées, transformées, dégradées ou stockées (Cunningham et al., 1996 ; Mench et al., 2007 ; Mench et Bes, 2009 ; Ashraf et al., 2010 ; Gerhardt et al., 2009).

La phytoremédiation repose de ce fait sur différents mécanismes cellulaires mis en place par la plante en réponse aux stress chimiques (ADEME 2012a ; Campos et al., 2008 ; Favas et al., 2014 ; Pilon-Smits, 2005 ; Schnoor, 1997 ; Schröder et Collins, 2002), ces mécanismes ayant donné lieu à diverses stratégies de phytoremédiation (Figure 16).

La phytoextraction ou phytoaccumulation utilise des plantes capables de tolérer, d'extraire, et d'accumuler les polluants (souvent des métaux lourds et des composés organiques) à de fortes concentrations dans leurs parties aériennes. Selon les polluants, les espèces préconisées peuvent être des plantes hyperaccumulatrices (*Thlaspi caerulescens*, *Alyssum murale*), des arbres et arbustes à croissance rapide et à forte biomasse (*Salix* sp., *Populus* sp.) ou des herbacées à forte biomasse (*Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Brassica napus*). La rhizofiltration constitue une forme particulière de phytoextraction permettant la remédiation des eaux. Les molécules sont absorbées par les racines ou adsorbées sur les racines de plantes cultivées en milieu aquatique (ADEME 2012a ; Mench et al., 2010 ; Mench et Bes, 2009 ; Favas et al., 2014).

La phytostabilisation réduit la mobilité des polluants du sol (principalement les métaux et métalloïdes) *via* une stabilisation mécanique et biologique. La stabilisation mécanique s'effectue par une limitation de l'érosion éolienne ou hydrique des sols par le couvert végétal, qui permet donc une limitation du transport des polluants. Cette limitation est accentuée par l'évapotranspiration des végétaux, qui diminue le flux hydrique du sol et empêche ainsi le lessivage des molécules. L'action biologique s'effectue par adsorption des polluants sur les parois racinaires ou par absorption et stockage dans les cellules racinaires. De plus, les racines

sont capables de sécréter des composés tels que des acides organiques ou des composés phénoliques qui piègent les polluants dans la rhizosphère. La rétention locale de ces composés réduit leur biodisponibilité, empêchant alors leur dispersion dans les compartiments environnementaux. Les plantes qui peuvent participer à cette phytostabilisation sont par exemple les arbres et arbustes à croissance rapide et à forte biomasse (*Salix* sp., *Populus* sp.), et aussi des herbacées de la famille des poacées (*Miscanthus* sp., *Agrostis* sp., *Lolium perenne*, *Festuca* sp.) (ADEME 2012a ; Favas et al., 2014 ; Mench et al., 2010 ; Mench et Bes, 2009 ; Nsanganwimana et al., 2014).

La phytotransformation ou phytodégradation est basée sur la transformation des polluants accumulés par la plante (principalement des HAPs, des PCBs, des pesticides, des solvants chlorés, des explosifs) en produits moins ou non toxiques, par métabolisation au moins partielle. Les espèces préconisées dépendent des polluants à remédier et sont notamment des arbres ou des herbacées comme *Salix* sp., *Populus* sp., *Medicago sativa*, *Lolium perenne*, *Trifolium pratense* (ADEME 2012a ; Favas et al., 2014).

La phytovolatilisation est le processus par lequel les plantes transforment les polluants du sol ou des eaux en éléments volatiles et les relâchent dans l'atmosphère *via* leur transpiration.

Enfin, la phytostimulation ou rhizodégradation correspond à une induction ou stimulation de la métabolisation microbienne de polluants organiques du sol par des exsudats racinaires et par des interactions biotiques plante-micro-organisme (ADEME 2012a ; Favas et al., 2014).

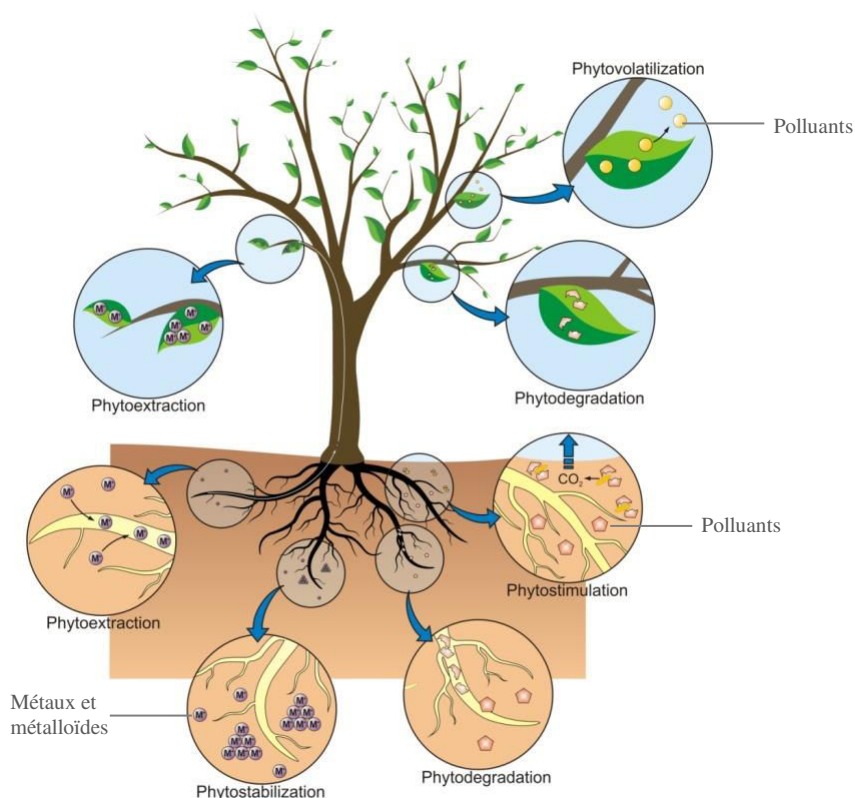


Figure 16. Stratégies de phytoremédiation (d'après Favas et al., 2014)



Un aspect essentiel de ces techniques est donc la capacité de la plante à tolérer les xénobiotiques et à mettre en place des réponses permettant une prise en charge de ces composés. Les plantes candidates sont donc celles qui regroupent un certain nombre de caractéristiques comme une tolérance suffisante à la phytotoxicité des contaminants, un système racinaire développé, notamment en profondeur, favorisant l'adsorption et l'absorption, une croissance rapide, une biomasse importante, et la capacité de translocation et d'accumulation foliaire, voire de transformation des polluants en des produits moins ou non toxiques.

L'utilisation des plantes pour la gestion des pollutions environnementales possède de nombreux avantages qui en font une technologie d'avenir. Elle présente cependant des inconvénients, comme en particulier le fait qu'il s'agisse de procédés lents, qui dépendent de la physiologie de la plante et de son environnement biotique et abiotique. Par exemple, les propriétés du sol et les conditions climatiques influencent le développement végétal, mais également sa transpiration, facteur clé qui détermine l'absorption et la translocation des xénobiotiques (Schnoor, 1997). De plus, la phytoremédiation n'est pas appropriée aux pollutions très profondes, car son efficacité est liée aux capacités de développement racinaire, les racines atteignant généralement 50 à 100 cm de profondeur pour les herbacées et jusqu'à 3 m pour les arbres, avec toutefois certaines espèces des milieux arides pouvant atteindre 15 m ou plus (Negri et al., 2004). En outre, la phytoremédiation est appropriée aux pollutions d'intensité faible, en lien avec le niveau de tolérance de la plante.

### **3.2. Rôles protecteurs et remédiateurs des systèmes de zone tampon et de bande enherbée**

Les zones agricoles sont d'importantes sources de produits phytosanitaires et de nutriments (phosphore et azote) pouvant diffuser dans les écosystèmes (section 1.). Il est important d'éviter ces pollutions afin de maintenir la qualité et le bon fonctionnement des milieux et de développer une agriculture durable et respectueuse de l'environnement et de la santé publique. Les dispositifs de zones tampons sont impliqués dans le contrôle et la prévention de la contamination des écosystèmes (CORPEN, 2007).

Il s'agit d'espaces interstitiels (terrestres ou humides) végétalisés, ayant la capacité d'intercepter les flux d'eau et de piéger les substances en provenance des zones agricoles, et permettant de protéger les milieux aquatiques. Ces zones tampons peuvent avoir différentes formes et localisations (Figure 17) : longilignes pour suivre le bord d'un cours d'eau, en pointe au bas d'une pente, placées sur le trajet du réseau hydrique des champs ou encore



traversant un champ pour couper le ruissellement avant que celui-ci ne devienne trop important. Les zones tampons peuvent aussi être de différents types, comme des prairies permanentes, des friches, des voies d'eau engazonnées, des bandes végétalisées, des haies ou des forêts.

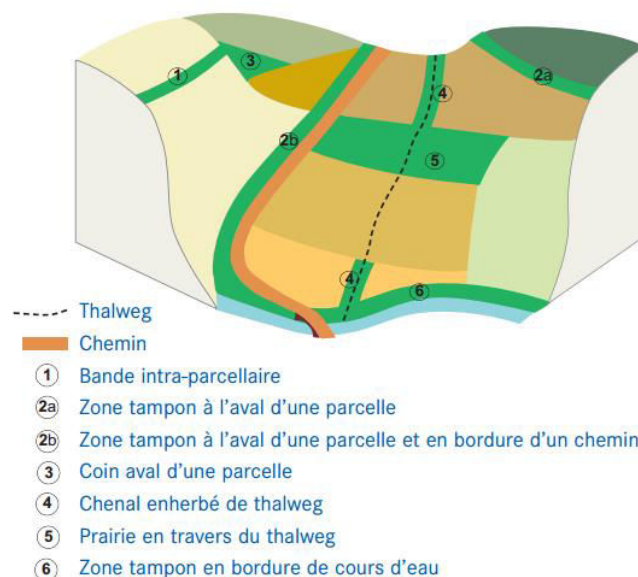


Figure 17. Localisations possibles des zones tampons (CORPEN, 2007)

Un des objectifs de ces zones tampons est de ralentir le ruissellement des eaux contenant, d'une part, les particules de sols (sédiments) auxquelles peuvent être fixés des polluants, et d'autre part, la fraction dissoute de ces mêmes polluants (nitrates, phosphore, pesticides). Ce ralentissement du ruissellement est dû à la résistance à l'écoulement de l'eau produit par la végétation (Dabney et al., 2006 ; Gyssels et al., 2005 ; Reubens et al., 2007), ce qui facilite ainsi l'infiltration de l'eau et des éléments dissous dans le profil de sol, et la sédimentation des particules sur lesquelles les éléments nutritifs et les pesticides peuvent être adsorbés. En augmentant le temps de résidence des polluants dans ces zones tampons, ces mécanismes favorisent les activités de dégradation des compartiments microbiens, telles que la dénitrification ou la décomposition des produits phytosanitaires, et les activités végétales d'absorption des éléments nutritifs et de phytoremédiation vues précédemment (section 3.1. ; AAC, 2013 ; Dosskey et al., 2011). La vitesse de l'eau doit être suffisamment lente et le sol doit être suffisamment poreux pour une bonne efficacité. Une infiltration trop rapide induite par une forte macroporosité du sol peut réduire grandement les possibilités de prise en charge par les compartiments biologiques et résulter en un transfert de polluants vers les nappes et les réseaux de drainage souterrain (AAC, 2013 ; Dosskey et al., 2011). La surface effective de la zone tampon joue de ce fait un rôle important, cette surface étant dépendante des

caractéristiques de la zone contributrice (superficie, pente, texture du sol, couvert végétal et travail du sol), qui conditionnent l'intensité du ruissellement, mais également la quantité et le type de sédiments qui seront transportés (Lin et al., 2011a). Les zones tampons jouent un rôle hydrique dans les agrosystèmes où les écoulements latéraux (ruissellement et écoulement hypodermique ou subsuperficiel) sont significatifs, et non dans ceux où l'infiltration verticale domine largement (AAC, 2013 ; Dosskey et al., 2011). Des préconisations pour l'implantation de ces dispositifs existent, comme les diagrammes proposés par Dosskey et al. (2011), qui permettent d'établir la superficie de la zone tampon, selon un niveau d'efficacité choisi, en fonction du type de nutriment ou polluant à capter et des caractéristiques de la zone contributrice. Il existe également des guides de dimensionnement de ces zones tampons (Carluer et al., 2011) ainsi que des modèles numériques. Par exemple, le modèle VFSSMOD (Vegetative Filter Strip Modelling System), développé par Muñoz-Carpena et al. (1999), permet de déterminer la taille optimale d'une zone tampon grâce à la simulation des processus hydrologiques et des transferts de sédiments. Ce modèle, validé sur de nombreux sites, permet aussi d'estimer l'efficacité de zones tampons (Fox et al., 2010 ; Muñoz-Carpena et al., 2007 ; Sabbagh et al., 2013).

Les zones tampons situées en bordure de cours d'eau possèdent de plus l'intérêt de limiter la contamination directe des eaux de surface en éloignant les activités agricoles (travail du sol, épandages, dérive des pulvérisations de phytosanitaires et d'engrais) du réseau hydrique. Elles favorisent la préservation de la qualité biologique des eaux de surface, ainsi que la diminution de l'érosion des berges et des sols en zone alluviale.

Des études ont révélé une performance significative des zones tampons avec une efficacité de piégeage des sédiments allant de 41% à 100% et une efficacité d'infiltration allant de 9% à 100% (Dorioz et al., 2006). Concernant les nutriments, le rendement d'élimination du nitrate varie entre 7% et 100%, avec des moyennes allant de 48% à 85% dans les eaux souterraines peu profondes. L'efficacité de piégeage du phosphore varie de 27% à 96% (Helmets et al., 2008). En outre, ces zones sont également efficaces pour les pesticides : les études effectuées depuis les années 1990 ont permis de mettre en évidence une limitation du transfert des pesticides par ruissellement. Lin et al. (2011a) ont montré une réduction du transfert des pesticides tels que l'atrazine, le métolachlore et le glyphosate, qu'ils soient sous forme dissoute ou adsorbés au sédiment. Selon les caractéristiques de la zone et les conditions agro-environnementales locales, l'efficacité est généralement supérieure à 50% et dépasse souvent 90% (Borin et al., 2004, 2010 ; Dosskey, 2001 ; Lacas et al., 2005 ; Patty et al., 1997 ; Reichenberger et al., 2007 ; Syversen et Bechman, 2004 ; USDA-NRCS, 2000). Pätzold et al.

(2007) ont montré que 12 m de largeur de zone tampon réduisait de manière significative la diffusion d'eau contenant du métolachlore, de la terbuthylazine et du pendiméthaline. En revanche, il n'existe que très peu d'études sur le devenir des pesticides retenus (ou infiltrés) dans la zone tampon. Un autre avantage de ces zones vient du fait qu'elles peuvent aussi être des lieux qui favorisent la restauration ou le maintien de la diversité biologique terrestre (Smith et al., 2008).

L'utilisation de zones tampons végétalisées, ou bandes enherbées, est apparue dans la réglementation au cours des années 2000. Les bandes enherbées constituent des systèmes prairiaux particuliers comprenant une majorité d'espèces à croissance clonale, qui assurent la pérennité du couvert végétal. Les particularités de ces bandes enherbées résident dans le fait qu'elles sont semées au sein ou en bord de parcelles agricoles (Figure 17) et qu'elles sont donc soumises à des apports récurrents, parfois élevés, de pesticides et fertilisants en provenance des cultures adjacentes (section 1.4. ; Figure 18).

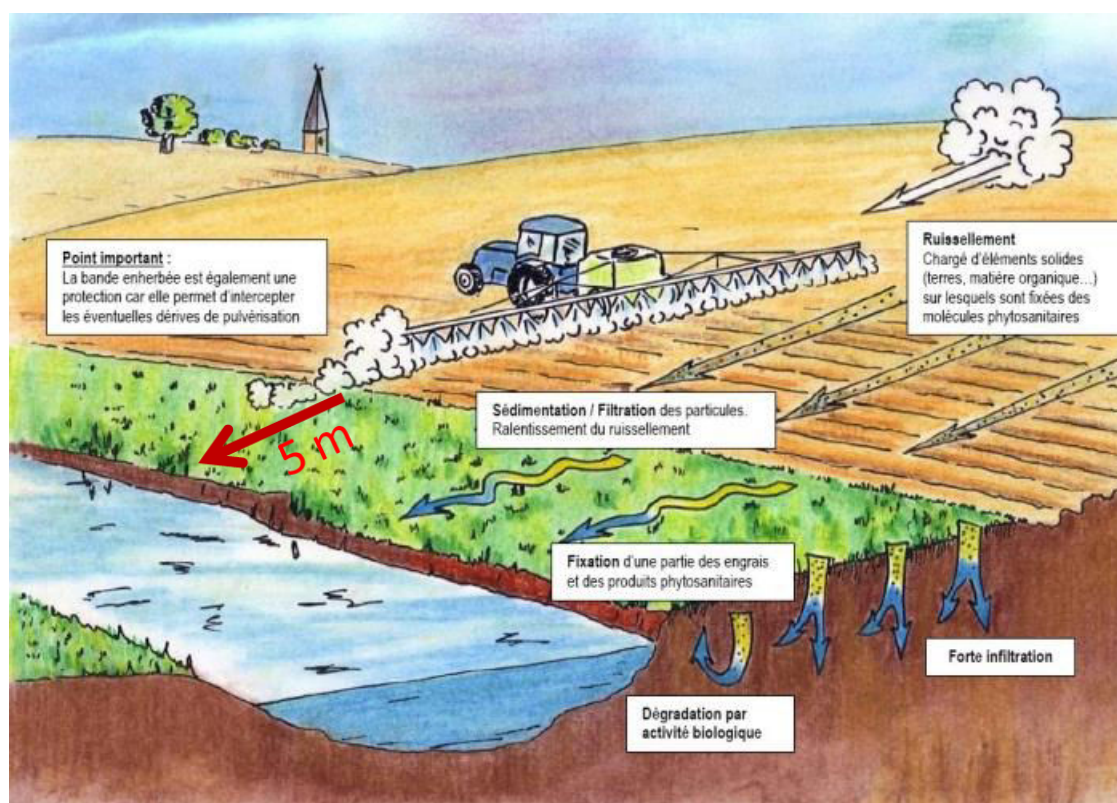


Figure 18. Représentation d'une bande enherbée (d'après : Chambre d'Agriculture de l'Aube)

Les bandes enherbées apparaissent dans plusieurs textes réglementaires européens et nationaux, qui imposent en 2005 leur mise en place en bordure des parcelles agricoles situées le long des cours d'eau.

Elles font partie des mesures de Bonnes Conditions Agro-Environnementales (BCAE) constituant un critère d'attribution des aides financières de la Politique Agricole Commune (PAC, 2005, 2010). La liste des BCAE est définie par chacun des états membres. En France, la BCAE "Bandes Tampons" établit que, pour percevoir les aides, il y a obligation pour tout agriculteur d'implanter une Surface en Couvert Environnemental (SCE). La SCE se traduit surtout par l'installation de bandes enherbées le long de tous les cours d'eau figurant sur la liste définie au niveau préfectoral (application en 2005).

Les cours d'eau classés "BCAE" sont également concernés par la directive européenne "Nitrates" du 12 décembre 1991 qui identifie certaines zones agricoles comme vulnérables. La directive établit que les bandes implantées doivent mesurer 5 m de large au minimum et présenter une superficie de 5 ares minimum répartie sur l'ensemble de l'exploitation, mais en priorité au bord des cours d'eau. Le traitement phytosanitaire et la fertilisation sont interdits et la gestion des bandes enherbées repose généralement sur le labour avant semis, la fauche ou le broyage annuel des végétaux. En 2010, la mise en œuvre du quatrième programme d'action de la directive entraîne l'obligation de border par des bandes enherbées l'ensemble des cours d'eau situés en Zones Vulnérables (zones définies au niveau préfectoral). Cette augmentation du nombre de bandes enherbées est également renforcée par la loi Grenelle II, promulguée le 12 juillet 2010, qui prévoit de compléter ce réseau de bandes enherbées en vue de créer des réseaux de corridors biologiques fonctionnels (trames vertes).

Le rôle premier des bandes enherbées, en tant que zones tampons, est la protection environnementale par le biais de la limitation de la diffusion des polluants (pesticides et métabolites associés, nutriments azotés et phosphorés) en aval des cultures, ce qui favorise aussi leur dégradation, entre autres par les micro-organismes du sol (Patty et al., 1997). Ces fonctions sont également fortement liées au compartiment végétal qui doit pouvoir maintenir une structure fonctionnelle (diversité, productivité, reproduction) en conditions de stress chimique. La nature des espèces végétales, notamment l'utilisation simultanée de plusieurs espèces présentant des morphologies racinaires complémentaires, et la densité du couvert permettent, par leurs actions physiques et chimiques sur le sol, d'augmenter la porosité, la teneur en matière organique et donc la capacité de rétention d'eau (Lambrechts et al., 2014ab ; Vianello et al., 2005). Les phénomènes d'infiltration, de sédimentation, d'adsorption aux particules du sol sont ainsi favorisés et les activités de dégradation microbienne sont stimulées (Lacas et al., 2005 ; Otto et al., 2008, 2012). De ce fait, les caractéristiques du milieu (type de sol, pH, nutriments), les conditions climatiques et les réponses des plantes aux stress

**Tableau 2. Liste des espèces préconisées pour l'implantation de bandes enherbées  
(d'après le Journal Officiel de la République Française, 2005)**

En bord de cours d'eau		En dehors de cours d'eau		
Hors zones vulnérables	En zones vulnérables	Objectif : favoriser les auxiliaires de culture et la biodiversité	Objectif : érosion	Objectif : phytosanitaires et nitrates
Il est recommandé de mélanger les espèces figurant ci-dessous (noms vernaculaires)				
Luzerne (L)	Luzerne (L)	Luzerne (L)	Luzerne (L)	Luzerne (L)
Dactyle (P)	Dactyle (P)	Dactyle (P)	Dactyle (P)	Dactyle (P)
Fétuque des prés (P)	Fétuque des prés (P)	Fétuque des prés (P)	Fétuque des prés (P)	Fétuque des prés (P)
Fétuque élevée (P)	Fétuque élevée (P)	Fétuque élevée (P)	Fétuque élevée (P)	Fétuque élevée (P)
		Fétuque rouge (P) (A)		
Fléole des prés (P)	Fléole des prés (P)	Fléole des prés (P)	Fléole des prés (P)	Fléole des prés (P)
Lotier corniculé (L)		Lotier corniculé (L)	Lotier corniculé (L)	
Minette (L) (A)				
Ray-grass anglais (P)		Ray-grass anglais (P)	Ray-grass anglais (P)	Ray-grass anglais (P)
Ray-grass hybride (P)		Ray-grass hybride (P)	Ray-grass hybride (P)	Ray-grass hybride (P)
Sainfoin (L)		Sainfoin (L)		
Trèfle blanc (L)		Trèfle blanc (L)	Trèfle blanc (L)	Trèfle blanc (L)
		Trèfle de perse (L) (A)		
		Trèfle d'Alexandrie (L) (A)		
		Vesce commune (L) (A)		
		Vesce velue (L) (A)		
		Vesce de Cerdagne (L) (A)		
Brome cathartique (P)	Brome cathartique (P)	Brome cathartique (P)	Brome cathartique (P)	Brome cathartique (P)
Brome sitchensis (P)	Brome sitchensis (P)	Brome sitchensis (P)	Brome sitchensis (P)	Brome sitchensis (P)
		Serradelle (L) (A)		
		Mélilot (L) (A)		
				Pâturin (P)

(P) Poacées, (A) Annuelles, (L) Légumineuses

chimiques jouent un rôle important dans l'efficacité de la zone, en influençant l'implantation et le maintien des communautés végétales.

Les sections précédentes ont mis en évidence les capacités des plantes à absorber, accumuler et dégrader au moins partiellement les polluants, ces capacités pouvant aboutir à des applications de phytoremédiation. Ceci suggère fortement que les plantes peuvent avoir également un rôle direct dans le devenir des contaminants au sein des bandes enherbées. Or peu d'études sur le rôle propre du compartiment végétal dans la fonction épuratrice des bandes ont été menées. Cette absence de prise en compte du compartiment végétal dans le fonctionnement des bandes enherbées se traduit par un manque de travaux sur les effets des espèces et de la diversité spécifique dans l'efficacité de ces systèmes tampons. Il en résulte qu'au niveau réglementaire, si le mélange d'espèces est conseillé, seule une liste des espèces préconisées et interdites dans les semis est définie au niveau préfectoral (Tableau 2).

De même, les protocoles de gestion des bandes enherbées ne prennent pas en compte le potentiel d'accumulation de polluants dans le compartiment végétal. Alors que le broyage ou la fauche avec exportation sont préconisés, l'utilisation ou le traitement de la biomasse fauchée, et potentiellement contaminée, en fin de saison de végétation reste relativement peu réglementés (Borin et al., 2004 ; Paterson et Schnoor, 1992).



## 4. Problématique et objectifs

Les pollutions diffuses générées par les activités agricoles présentent une grande complexité de composition chimique et de dynamique spatio-temporelle. Ces pollutions sont ainsi souvent composées de mélanges de nombreuses molécules de structure variée comme les nutriments azotés et phosphorés, les pesticides, leurs produits de dégradation, les adjuvants ou d'autres composés d'usage agricole ou agro-industriel tels que les métaux lourds ou les hydrocarbures (section 1.). Ces pollutions, selon leur concentration, peuvent être à l'origine de stress chimiques sur des espèces non cibles. Les communautés végétales sont particulièrement exposées du fait de leur immobilité. Ces stress chimiques sont alors susceptibles de provoquer chez les plantes des impacts importants à l'échelle de l'individu, avec des perturbations à différents niveaux de l'organisme (section 2.1.). Mais l'impact de ces pollutions peut aussi avoir lieu à l'échelle plus vaste de l'écosystème avec des bouleversements au niveau populationnel et au niveau des communautés (Allison et al., 2007), par altération de la croissance de certaines espèces par rapport à d'autres, avec des répercussions possibles sur le fonctionnement des milieux (Köhler et Triebkorn, 2013), les services écosystémiques associés (Power, 2010), et *in fine* la santé humaine (Margni et al., 2002).

L'efficacité physico-chimique et microbiologique des bandes enherbées, mises en place pour limiter la diffusion des pollutions hors des zones agricoles (section 3.2.), a été largement étudiée et démontrée. En revanche, les rôles directs du compartiment végétal sont mal connus. La littérature scientifique souffre en effet d'un manque d'information sur la structuration et la dynamique des communautés végétales au sein des bandes enherbées. De même, les niveaux de polluants pris en charge dans la biomasse végétale de ces bandes, en particulier dans les parties aériennes, suite à des processus éventuels d'absorption, de stockage et/ou de dégradation partielle ou totale, n'ont pas été étudiés.

Ma thèse s'inscrit dans cette problématique et vise à déterminer quels rôles le compartiment végétal des bandes enherbées peut jouer dans la dynamique environnementale des pesticides. Pour aborder cette question dans un contexte défini, l'étude a porté sur des bandes enherbées expérimentales, mises en place dans une Zone Atelier d'études environnementales, la Zone Atelier Armorique (ZAA). La ZAA est membre du Réseau Zones Ateliers de l'Institut Écologie et Environnement (INEE) du CNRS, et fait partie d'un vaste réseau d'expertise au niveau européen et international (LTER, Long-term Ecological Research et ILTER, International Long-term Ecological Research). La structure et le fonctionnement d'une telle



zone atelier permettent de suivre des dispositifs expérimentaux en liaison avec les activités agro-écologiques réelles de l'écosystème, et de bénéficier de données de suivi à long terme.

Les rôles des espèces végétales dans la bande enherbée dépendent nécessairement de fonctions cellulaires, moléculaires et régulatrices mises en jeu dans les interactions plante-xénobiotiques. En effet, les réponses cellulaires et moléculaires des plantes exposées à des xénobiotiques peuvent induire, selon la capacité de l'espèce à faire face aux stress chimiques, le maintien des individus sur le milieu pollué et la mise en place de processus de phytoremédiation (sections 2.4. et 3.1.). Les réponses des plantes, en termes de sensibilité ou de tolérance aux pollutions, sont donc déterminantes pour leurs rôles dans les bandes enherbées. Or, ces réponses sont principalement liées à des mécanismes moléculaires (section 2.4.) impliqués dans les interactions plante-xénobiotiques.

Les interactions plante-xénobiotiques sont un sujet d'étude qui s'est récemment beaucoup développé, avec en particulier la caractérisation des modifications d'expression génétique décrites sous le terme de xénome (Edwards et al., 2011 ; Ramel et al., 2012). Cependant, parmi les caractéristiques des pollutions diffuses, le faible niveau des contaminants et les effets de mélange constituent des conditions de contraintes très peu étudiées chez les plantes malgré leur prévalence environnementale réelle (Claeys et al., 2014). Afin de caractériser, dans de telles conditions, les interactions plante-xénobiotiques, j'ai utilisé des approches pluridisciplinaires (écophysiologie, écotoxicologie, chimie, biologie et physiologie végétales, biologie moléculaire, biochimie métabolique). Mon travail a ainsi couplé des expérimentations multi-échelles avec des analyses sur le terrain pour déterminer le rôle du compartiment végétal dans l'efficacité des bandes enherbées, ainsi que des expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire pour étudier les interactions plante-xénobiotiques.

Une première étape des recherches a consisté à déterminer si les caractéristiques du compartiment végétal des bandes enherbées expérimentales de la ZAA contribuaient à la limitation de la diffusion des pesticides utilisés dans la zone d'étude. Les relations entre la densité des couverts végétaux, la composition spécifique et les capacités remédiatrices des bandes enherbées, ont de ce fait été étudiées par un suivi intégratif d'analyses écophysiologiques et d'analyses physico-chimiques.

Parallèlement, la compréhension des mécanismes de réponses des plantes à des pollutions diffuses et complexes d'origine agricole a été étudiée en conditions contrôlées. Du fait du manque de connaissances sur les cibles biologiques ou les modes d'action d'un grand nombre de xénobiotiques, sur les effets des doses résiduelles ou sublétales de polluants et sur les effets de mélanges, il était pertinent de prendre pour cible biologique expérimentale un modèle

végétal clairement défini. C'est pourquoi la crucifère *Arabidopsis thaliana*, dont le contexte biochimique et moléculaire est bien caractérisé, en particulier en termes de mécanismes de réponse aux stress abiotiques, a été choisie comme premier modèle d'étude (Hirayama et Shinozaki, 2010 ; Osakabe et al., 2013).

L'étude a porté de manière intégrative sur les réponses à différentes échelles de complexité, avec l'analyse de la physiologie, du métabolisme et de l'expression génétique en condition de pollutions simples, mais également en présence de mélanges de polluants correspondant à des conditions réalistes de pollution péri-agricole. Les approches métabolomique et moléculaire devaient permettre en effet de détecter sans *a priori* des modifications fines de processus biologiques (Baena-González et al., 2007 ; Obata et Fernie, 2012 ; Ramel et al., 2007 ; Shulaev et al., 2008).

Après la détermination des réponses métabolomiques et moléculaires de l'espèce modèle à des conditions réalistes de faibles pollutions, il était alors pertinent de poursuivre l'analyse par l'étude des réponses d'une espèce caractéristique des bandes enherbées, et de grand intérêt agronomique et économique, *Lolium perenne* (Barbehenn et al., 2004). Cette analyse de *Lolium perenne* pouvait ainsi, par comparaison avec l'étude d'*Arabidopsis*, révéler une éventuelle généricité dans la réponse des plantes aux xénobiotiques ou mettre en évidence des réponses spécifiques, reflétant des différences dans la mise en place des mécanismes moléculaires et biochimiques de réponses aux stress chimiques.

Dans la mesure où les effets de contaminations faibles sont susceptibles d'être discrets et de générer des réponses cryptiques (Claeys et al., 2014 ; Londo et al., 2014), il était important d'envisager une approche à l'échelle des régulations fines. C'est pourquoi, en plus d'une analyse métabolomique, le choix s'est porté sur une analyse transcriptomique de cette espèce non modèle, avec la réalisation d'un transcriptome *de novo* pour ainsi prendre en compte de manière plus globale les régulations à l'échelle moléculaire. La combinaison de ces différentes approches physiologiques et « omiques », dont l'intérêt a d'ores et déjà été démontré pour les études des réponses des plantes aux stress abiotiques (Deshmukh et al., 2014 ; Duke et al., 2012ab ; Hirai et al., 2004), a permis d'obtenir un très vaste ensemble de données complémentaires. Il m'a paru indispensable d'analyser ces données par des études statistiques poussées, dont certaines, comme les analyses de corrélations, permettaient de mettre en relation les différents types de réponses.

L'analyse intégrative de l'ensemble de ces résultats, combinant les différentes échelles, les différentes espèces, les différents polluants et les différents niveaux d'analyse, constituera à terme un outil de choix pour déterminer des biomarqueurs génériques ou spécifiques de

réponse aux stress chimiques ou xénobiotiques, et pour sélectionner des espèces pertinentes pour le fonctionnement des bandes enherbées.

Les travaux de cette thèse se sont inscrits dans le cadre de deux projets scientifiques, le projet « Phytobandes : Rôle(s) biologique(s) du compartiment végétal sur la dynamique des pesticides et des nitrates dans un contexte de bandes enherbées en environnement agricole » financé par le programme inter-organisme IngECOTech CNRS/CEMAGREF, et le projet « ToPoBiov : Tolérance aux polluants au sein de la biodiversité végétale de sites contaminés », financé par la Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB).

## **~ Chapitre II ~**

### **Matériels et méthodes**

## 1. Matériels et analyses à l'échelle environnementale

### 1.1. Sites d'étude et campagnes d'échantillonnage

Les études de terrain ont été réalisées sur des bandes enherbées (BE) expérimentales, dans la Zone Atelier Armorique (ZAA). La ZAA, créée en 1993, est située au nord-est du département d'Ille-et-Vilaine en région Bretagne et au sud de la Baie du Mont-Saint-Michel (Figure 19).

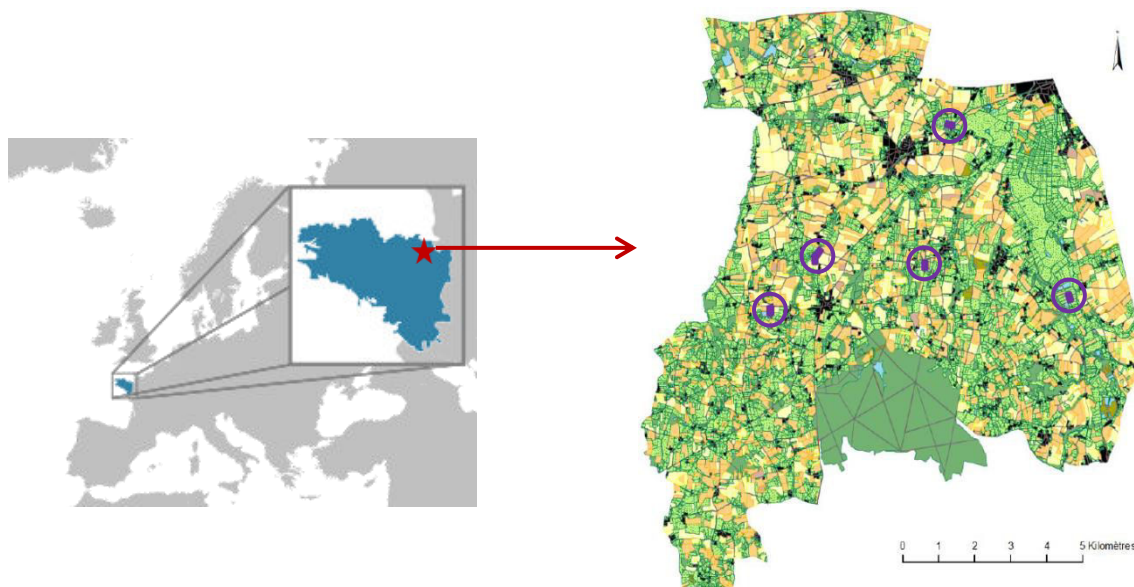


Figure 19. Localisation de la Zone Atelier Armorique et des 6 bandes enherbées expérimentales (en violet) (d'après Yann Rantier, communication personnelle)

La ZAA est membre du «Réseau Zones Ateliers» de l'Institut Écologie et Environnement (INEE) du CNRS. Depuis 2008, un label permet aux 8 Zones Ateliers nationales d'être intégrées et répertoriées dans un vaste réseau d'expertise au niveau européen (Long Term Ecological Research Europe - LTER-Europe) et international (International Long Term Ecological Research - ILTER). Les bandes enherbées expérimentales ont été mises en place en 2010 en bordure de parcelles gérées par des agriculteurs collaborateurs de la ZAA, à partir de semis exogènes (Tableau 3). La composition du semis a été choisie pour favoriser les fonctions écologiques des bandes enherbées (diminution du transfert et épuration des produits phytosanitaires et des nitrates, conservation de la biodiversité), sur la base de données déjà acquises au cours des programmes de recherche menés sur la ZAA (<http://osur.univ-rennes1.fr/za-armorique/>). Ce semis comprenait des graminées présentant des stratégies de croissance clonale contrastées (*Agrostis stolonifera*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne* et *Phleum pratense*), ainsi que des dicotylédones à fleurs favorisant les insectes pollinisateurs (*Lotus*

*corniculatus*, *Trifolium pratense*, *Anthemis tinctoria*, *Centaurea cyanus* et *Fagopyrum esculentum*). Ces bandes étaient gérées par une fauche ou un broyage annuel tardif à la fin de l'été, période à laquelle les plantes ont fini leurs cycles de croissance et de reproduction. Bien qu'une convention entre la ZAA et les agriculteurs spécifiait que la fauche soit réalisée avec exportation, le produit de fauche (quand celle-ci a été réalisée) a été soit exporté soit laissé sur place.

Tableau 3. Caractéristiques des bandes enherbées expérimentales

N° parcelle	Agriculteur responsable	Localisation toponymique	Type de culture et gestion (fauche : F ou broyage : B)				
			2010	2010	2011	2011	2012
113	M. Le François	Chartrain	Maïs	F et B, sur place	Blé	F et B, sur place	Maïs
114	M. Le François	Chartrain	Maïs	F et B, sur place	Blé	F et B, sur place	Maïs
91	M. Blanchet	Le Bas Vilqué	Maïs	F, export	Blé	F, export	Maïs
109	M. Patin	Sougéal	Maïs	F, export	Maïs	Pas de F ou B	Maïs
112	M. Bouvier	Les Fosses	Maïs	F et B, sur place	Maïs	Pas de F ou B	Maïs
43	M. Liesse	Le Villartay	Maïs	F, export	Blé	F et B, sur place	Colza

Sur chacune des bandes enherbées, le plan d'échantillonnage comportait 15 points, correspondant à 3 zones de mesures (A, B et C) localisées le long d'un gradient allant de la parcelle agricole au cours d'eau sur 5 transects différents. Certains échantillonnages ont également été effectués dans la parcelle agricole (points Ch) (Figure 20).

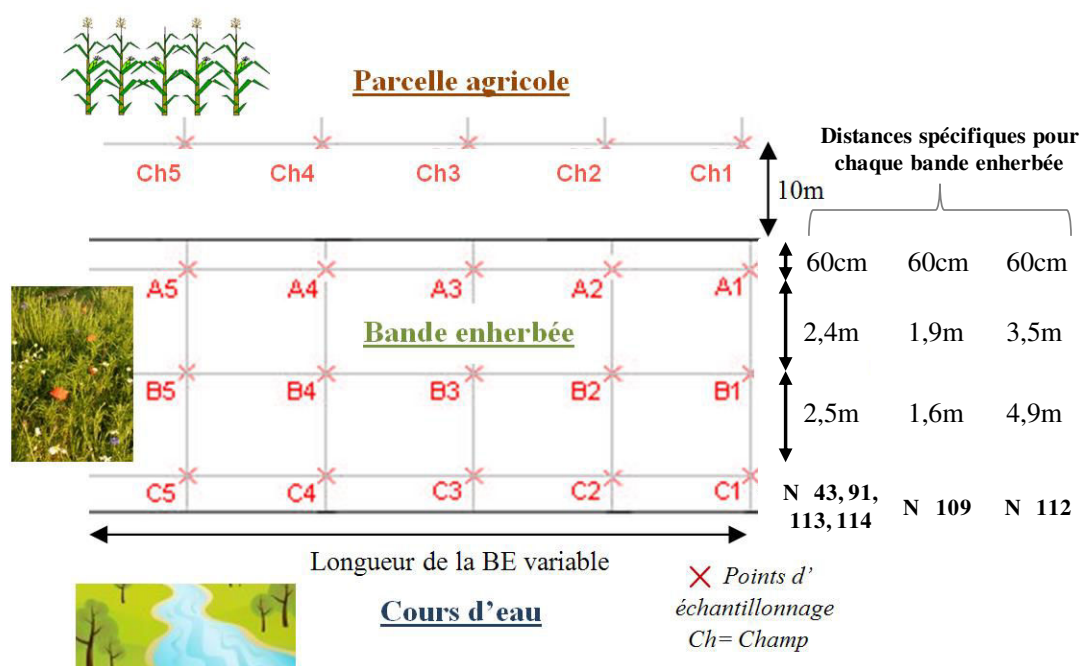


Figure 20. Plan d'échantillonnage des bandes enherbées expérimentales et des parcelles agricoles adjacentes

Quatre campagnes d'échantillonnage ont eu lieu, avant et après épandage des produits phytosanitaires par les agriculteurs (Tableau 4).

Pour les cultures en blé, il y a eu plusieurs dates d'épandages correspondant aux traitements en herbicides et fongicides, tandis que pour les cultures en maïs, seuls des traitements herbicides ont été effectués. La bande enherbée de la parcelle 43 (M. Liesse) n'a pas été étudiée en 2012 car elle a été cultivée en colza, impliquant un mode de culture et des traitements phytosanitaires très différents des autres parcelles.

**Tableau 4. Dates d'épandage des traitements phytosanitaires et dates des campagnes d'échantillonnage**

N° parcelle	2011		2012	
	Traitements phytosanitaires	Campagnes d'échantillonnage	Traitements phytosanitaires	Campagnes d'échantillonnage
113	Début février ; mi-avril ; début et fin mai (04/02 ; 12/04 ; 03 et 24/05)	<b>Après les traitements de l'année :</b> Fin juin (15-20/06)	Fin mai ; mi-juin (25/05 ; 10/06)	<b>Doses résiduelles des traitements (avant traitements 2012) :</b> Fin mars-mi-avril (28/03-12/04)
114	Début février ; mi-avril ; début et fin mai (04/02 ; 12/04 ; 03 et 24/05)		Fin mai ; mi-juin (25/05 ; 10/06)	
91	Début février ; fin avril ; mi-mai ; début juin (07/02 ; 20/04 ; 13/05 ; 01/06)		Début juin ; fin juin (05/06 ; 20/06)	
109	Fin avril ; fin mai (23/04 ; 20/05)	<b>Doses résiduelles des traitements (fin de culture 2011) :</b> Début octobre (3-10/10)	Mi-mai ; mi-juin (15/05 ; 10/06)	<b>Après les traitements de l'année :</b> Fin juin-mi-juillet (21/06 -12/07)
112	Début et fin mai (05 et 20/05)		Fin mai ; mi-juin (25/05 ; 10/06)	
43	Début mars ; fin avril ; fin mai (09/03 ; 27/04 ; 25/05)		-	

## 1.2. Caractérisation du couvert végétal des bandes enherbées

### 1.2.1. Recouvrement spécifique

Les relevés floristiques ont été effectués pour chaque point d'échantillonnage au sein de la bande enherbée (niveaux A, B et C des 5 transects) à l'aide de quadrats de 0,25 m<sup>2</sup>. Dans ce quadrat le pourcentage de recouvrement des 9 espèces semées et du sol nu a été évalué. Les autres espèces présentes ont été regroupées dans une catégorie « végétation spontanée » à laquelle a été assigné un pourcentage global de recouvrement.

### 1.2.2. Biomasse végétale

La biomasse végétale a été évaluée pour chaque zone A, B et C. Le couvert végétal a été récolté sur une surface de 0,25 m<sup>2</sup>, aléatoirement pour deux des cinq transects, afin de ne pas trop perturber le fonctionnement des bandes enherbées. Le couvert végétal a ensuite été trié par espèce, excepté pour les espèces absentes du semis qui ont été poolées en une catégorie « végétation spontanée ». La biomasse a été mise à sécher à l'étuve durant 72 h à 40°C afin d'obtenir la masse sèche.



### 1.2.3. Mesure des niveaux de chlorophylles

Les mesures du niveau global de chlorophylles ont été effectuées *in situ* pour chaque espèce semée sur 3 feuilles de 5 individus différents, pour les niveaux d'échantillonnage A, B et C des bandes enherbées. La mesure a été obtenue à l'aide d'un chlorophylle-mètre (SPAD-502 Plus, Konica Minolta) et les résultats sont donnés en unité arbitraire.

## 1.3. Prélèvements des échantillons pour les analyses de pesticides

### 1.3.1. Parties aériennes de plantes

A chaque point d'échantillonnage au sein des bandes enherbées (niveaux A, B et C des 5 transects), un échantillon de parties aériennes, comprenant un mélange des espèces présentes, a été prélevé et transporté sur glace à 4°C jusqu'au laboratoire. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à analyse.

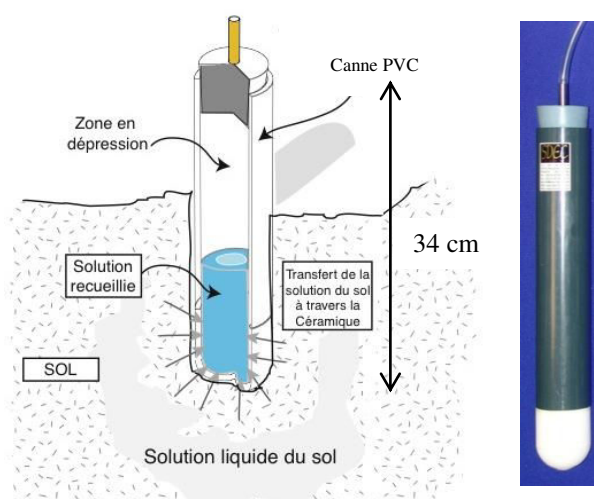
### 1.3.2. Sol

Un échantillon de sol d'environ 200 g a été prélevé par carottage des 30 premiers cm du sol pour chacun des points d'échantillonnage. Pour chaque transect, un point dans le champ, situé à 10 m du bord de la bande enherbée, a également été échantillonné, afin d'évaluer les teneurs en pesticides sur la parcelle. Le sol a été transporté à 4°C, séché 48 h dans une étuve à 40°C, puis tamisé à 2 mm et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

### 1.3.3. Eau du sol

Chaque bande enherbée a été équipée de bougies poreuses implantées à 30 cm de profondeur 6 mois avant le début des prélèvements, et situées à chaque niveau de mesure (niveaux A, B et C des 5 transects). Les bougies poreuses (Figure 21) sont composées d'une céramique fixée à l'extrémité d'une canne PVC creuse permettant, par mise sous dépression, le prélèvement de la solution du sol. L'eau a été prélevée après 24 h de mise sous dépression (- 0,8 bar) et transportée sur glace (4°C) jusqu'au laboratoire. Les échantillons ainsi récoltés ont été filtrés sur filtre d'acétate de cellulose de 0,45 µm, puis conservés à -20°C jusqu'à analyse.

Figure 21. Schéma et photographie d'une bougie poreuse (d'après SDEC France, 2014)



## 2. Détection et quantification des pesticides dans les matrices environnementales

### 2.1. Préparation des échantillons de sol

#### 2.1.1. Extraction des pesticides

L'extraction des pesticides du sol est basée sur les travaux de Vryzas et Papadopoulou-Mourkidou (2002). Cinquante grammes de chaque échantillon de sol séché (section 1.3.2.) ont été extraits avec un mélange acétonitrile/eau (4:1 ; v/v) dans un volume d'extraction de 70 mL. Pour un rendement d'extraction optimal, les tubes ont été mélangés vigoureusement manuellement, puis vortexés avant d'être placés dans un bain à ultrasons durant 30 min sous agitation. Le surnageant récupéré après centrifugation (8 min à 3 000g) a ensuite été séché à l'évaporateur concentrateur (MiVac, Genevac Ltd., Ipswich, England), et les extraits secs ont été repris dans 50 mL d'eau ultra pure, puis conservés à -20°C.

#### 2.1.2. Purification par extraction en phase solide

Les extraits de sol peuvent contenir de nombreux composés matriciels autres que des pesticides. Ces composés (interférents) sont susceptibles d'altérer l'analyse chromatographique (Roba et al., 2011) et doivent être éliminés.

La technique qui a été utilisée est la purification par extraction en phase solide (SPE) à l'aide de cartouches Oasis HLB (Oasis HLB 6 cc, 500 mg sorbent, LP Extraction Cartridge) constituant un support hydrophile-lipophile en phase inverse (Dias et Poole, 2002). La purification se fait sous dépression (- 0,2 bar) en plusieurs étapes, schématisées dans la figure 22. Le conditionnement et l'équilibration ont été réalisés par passages successifs d'acétate d'éthyle/méthanol (80/20 ; v/v), puis de méthanol seul et d'eau ultrapure sur les cartouches. Les échantillons ont ensuite été passés sur les cartouches à une vitesse de 5 mL/min. Lors de ce dépôt, les pesticides sont retenus sur la phase adsorbante de la cartouche. Les impuretés hydrophiles sont en majorité éliminées avec la solution aqueuse. La cartouche a été ensuite lavée avec une solution aqueuse de méthanol 5% (v/v). Après un séchage de 20 min, l'élution par un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80/20 ; v/v) permet de désorber les pesticides et de les remettre en solution. L'éluat a enfin été évaporé à sec à l'évaporateur-concentrateur, puis resuspendu dans 50 µL d'acétate d'éthyle et conservé à -20°C jusqu'à analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (GC-MS).

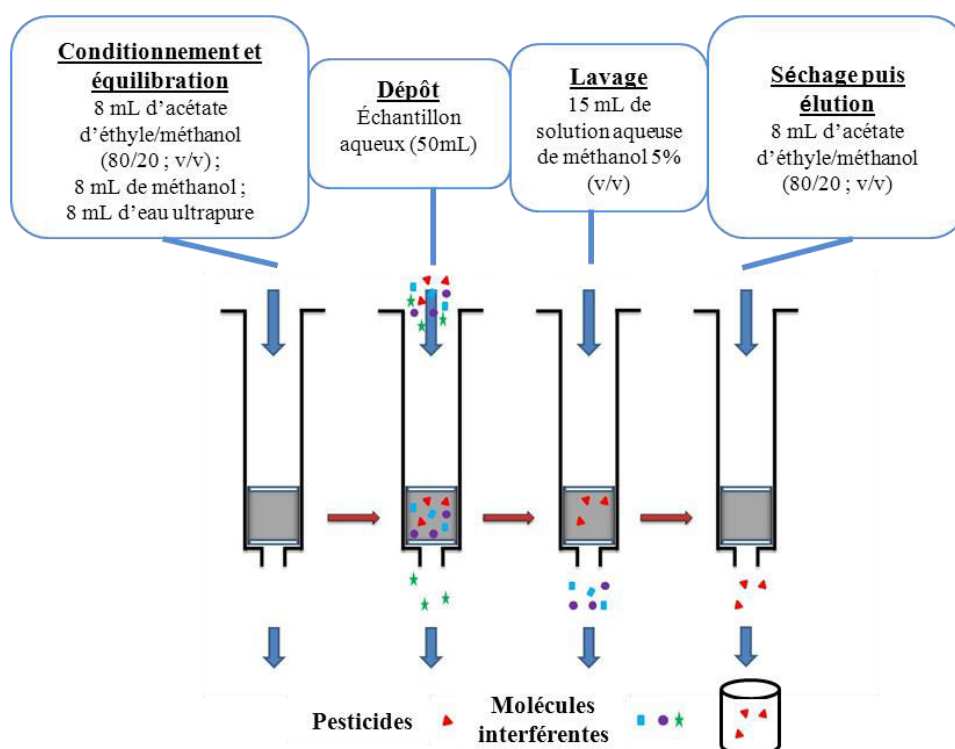


Figure 22. Protocole de purification par extraction en phase solide sur cartouche Oasis HLB

## 2.2. Préparation des échantillons d'eau du sol

L'extraction des pesticides à partir des échantillons d'eau du sol a été faite par extraction en phase solide (SPE) à l'aide de cartouches Oasis HLB, selon la procédure décrite pour la purification des échantillons de sol (section 2.1.2.).

## 2.3. Préparation des échantillons de matrice végétale

Les parties aériennes des plantes ont été broyées manuellement au mortier en présence d'azote liquide, puis l'extraction et la purification des pesticides ont été réalisées sur les broyats obtenus.

Deux méthodes ont été testées. L'extraction liquide (acétonitrile/eau) sous ultrasons suivie de purification par SPE (cartouches Oasis HLB) correspond au protocole appliqué à la matrice sol (section 2.1.). La méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) est basée sur le principe d'une extraction liquide-liquide avec un solvant organique en présence de sels et de tampons (Anastassiades et Lehotav, 2003) suivie d'une purification par SPE dispersive (dSPE).

Cette dernière méthode a été privilégiée et utilisée selon le protocole du kit QuEChERS

(DisQUe, norme AOAC, Waters Corporation). Cinq grammes de broyat de plantes ont été mélangés à 20 mL d'acétonitrile contenant 1% (v/v) d'acide acétique glacial et 10 mL d'eau ultra pure, puis mis en agitation. Un gramme et demi d'acétate de sodium et 6 g de sulfate de magnésium ont ensuite été ajoutés et l'échantillon a été remis en agitation pendant 2 minutes. Le surnageant a ensuite été récupéré après centrifugation (4 min à 3 000g) et purifié par ajout de noir de carbone graphite (graphitized carbon black, GCB, ~ 800 mg/g matière fraîche) pour piéger les pigments amphipolaires, tels que les chlorophylles.

La purification des composés matriciels s'est effectuée par dSPE par mélange de l'extrait à 900 mg de sulfate de magnésium et 150 mg de PSA (primary and secondary amine exchange material, Waters Corporation). Le surnageant récupéré par centrifugation (4 min à 3 000g) a été séché à l'évaporateur-concentrateur et repris dans 50 µL d'acétate d'éthyle et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

#### **2.4. Quantification des pesticides par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (GC-MS)**

Les pesticides contenus dans les échantillons de sol et d'eau ont été quantifiés par GC-MS (les échantillons de matrice végétale seront analysés par la suite). L'analyse GC permet de séparer un mélange de composés volatils ou susceptibles d'être volatilisés initialement transportés par un gaz inerte constituant la phase mobile. La séparation repose sur la différence d'affinité des composés avec une phase stationnaire associée à la colonne. Plus l'affinité du composé avec cette phase stationnaire est importante, plus le temps de rétention ( $T_r$ ) du composé sur cette colonne est grand. Une fois élué, chaque composé subit dans le spectromètre de masse (MS) une ionisation (bombardement électronique à 70 eV), qui fragmente la molécule en plusieurs ions. Ces ions atteignent ensuite un détecteur capable de discriminer leur rapport  $m/z$  ( $m$  : masse,  $z$  : charge de l'ion). L'analyse génère pour chaque composé un spectre de masse dans lequel l'abondance relative de l'ensemble des ions est représentée d'après leur rapport  $m/z$ . Pour chaque molécule, l'ion le plus intense possède une valeur d'abondance équivalente à 100, l'abondance des autres ions étant calculée en pourcentage de cet ion. Ainsi, chaque analyte peut être représenté par un pic caractérisé par un temps de rétention et un spectre de masse représentatif des ions que génère la molécule lorsqu'elle est fragmentée.

L'aire des pics permet de quantifier la concentration de chaque composé dans l'extrait analysé sur la base d'une gamme d'étalonnage des pesticides (7 points de gamme).

L'appareillage GC-MS consiste en un chromatographe Trace GC Ultra et un spectromètre de masse quadripôle Trace DSQII (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Une colonne capillaire en silice fondue TR5-MS de 30 m ( $\varnothing$  intérieur 0,25 mm, couche 0,25  $\mu$ m) à phase non polaire (95% dimethyl-siloxane, 5% phenyl-polysilphenylene-siloxane) est utilisée avec de l'hélium comme gaz vecteur (1 mL/min). Un  $\mu$ L d'échantillon est injecté en mode splitless. Cette méthode correspond à une injection sans division (sans fuite), où la quasi-totalité de l'échantillon vaporisé est transférée sur la colonne. Ce mode est utilisé quand l'échantillon à analyser est très dilué et/ou éventuellement contaminé par des résidus non-volatils. L'injecteur est à une température de 250°C et le gradient de température est le suivant : (i) 10 min à 50°C puis (ii) de 50°C à 200°C à raison de 15°C/min, (iii) 1 min à 200°C et augmentation de 200°C à 280 °C à raison de 8°C/min, (iv) 10 min à 280°C. La ligne de transfert du MS est fixée à 250°C.

La quantification a été faite au moyen du logiciel Xcalibur v2.0.7 software (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Les doses trouvées ont été calculées en  $\mu$ g/kg de la matrice analysée.

### 3. Modèles végétaux et conditions expérimentales

#### 3.1. Matériel végétal

##### 3.1.1. Espèce modèle : *Arabidopsis thaliana*

Des graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype sauvage Columbia (Col-0) issues du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre), ont été propagées et obtenues en conditions contrôlées au laboratoire. Cette espèce de la famille des Brassicacées est un organisme modèle pour les recherches génétique, moléculaire et physiologique. Pour les expérimentations, les graines ont été stérilisées 7 min par une solution d'éthanol/Bayrochlore 3% (50:50 ; v/v), rincées deux fois à l'éthanol, puis mises à sécher une nuit.

##### 3.1.2. Espèces associées aux expérimentations de bandes enherbées

Neuf espèces d'angiospermes ont été utilisées. Ces espèces, 4 graminées, 2 fabacées, 2 asteracées et 1 polygonacée (Tableau 5), correspondent aux espèces composant le semis initial des 6 bandes enherbées expérimentales (section 1.1.). Les graines ont été obtenues auprès du semencier Phytosem (Hautes Alpes, Gap) et n'ont subi aucun traitement pesticide d'enrobage des graines.

**Tableau 5. Liste des espèces végétales étudiées et modalités de stérilisation des semences** (ND : non déterminé)

Espèce	Nom latin	Famille	Variété	% bayrochlore
Agrostis stolonifère	<i>Agrostis stolonifera</i>	Poacée	Penncross	1
Anthémis des teinturiers	<i>Anthemis tinctoria</i>	Asteracée	ND	4
Bleuet	<i>Centaurea cyanus</i>	Asteracée	ND	/
Fétuque rouge traçante	<i>Festuca rubra</i>	Poacée	Herald	1
Fléole des prés	<i>Phleum pratense</i>	Poacée	Kaba	1
Lotier corniculé	<i>Lotus corniculatus</i>	Fabacée	Leo	4
Ray-grass anglais	<i>Lolium perenne</i>	Poacée	Brio	2
Sarrasin	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Polygonacée	ND	5
Trèfle violet	<i>Trifolium pratense</i>	Fabacée	Violetta	4

Les graines ont été stérilisées 1 min dans de l'éthanol, puis 20 min dans une solution de Bayrochlore et de tween 0,05% et rincées à l'eau distillée stérile. Le pourcentage de Bayrochlore (entre 1 et 5%) dans la solution de stérilisation, ainsi que la durée de stérilisation et le temps de levée de dormance, ont été adaptés à chaque espèce et ont été déterminés d'après des expérimentations préliminaires (Tableaux 5 et 6). Le Ray-grass, *Lolium perenne* de variété Brio diploïde, a été utilisé pour les expérimentations impliquant des analyses métabolomique et transcriptomique.

### 3.2. Conditions de cultures

#### 3.2.1. Dispositifs et conditions de culture en milieu gélosé axénique

Les espèces végétales ont été cultivées en boîte de Petri ou en tube sur un milieu de culture gélosé [agar 0,8% (p/v) pour les boîtes de Petri, agar 0,3% (p/v) pour les tubes] en milieu Hoagland 1 X (No. 2 Basalt Salts, Ref : HOP01-1LT, Caisson Labs ; Hoagland et Armon, 1938 ; Chap IV, Table S2), à une concentration de 1,6 g/L (pH 6).

Après sa préparation, ce milieu est autoclavé 20 min à 120°C, puis les traitements chimiques (xénobiotiques ou métaux lourds) sont ajoutés de manière stérile au milieu stérilisé liquide tiédi avant la préparation des boîtes ou tubes de culture.

Les graines ont ensuite été semées soit en boîte de Petri de 12x12 cm (20 - 25 graines par boîte), contenant le milieu de culture, puis fermées avec du film alimentaire, soit en tube (15 ml, 2 - 3 graines par tube). Les boîtes et les tubes fermés ont été placés à l'obscurité à 4°C pour permettre la levée de dormance et l'homogénéisation de la germination (Tableau 6).

Chaque boîte ou chaque tube correspond à un réplicat biologique. Au minimum 5 réplicats biologiques ont été réalisés par traitement sur boîte de Petri. Pour la culture en tube, 30 réplicats ont été réalisés par traitement.

Les boîtes de Petri et les tubes ont ensuite été disposés verticalement dans une enceinte de culture contrôlée (PERCIVAL, modèle CU-41L/4D) avec une photopériode 16 h jour (22°C) – 8 h nuit (20°C), sous une intensité lumineuse de 6000 lux (Figure 23).

Tableau 6. Conditions de culture des espèces végétales étudiées

Espèce	Nom latin	Dispositif de culture	Temps de levée de dormance (jour)	Temps de croissance (jour)
Agrostis stolonifère	<i>Agrostis stolonifera</i>	Boîte de Petri	5	7
Anthémis des teinturiers	<i>Anthemis tinctoria</i>	Boîte de Petri	5	7
Arabette	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Boîte de Petri	3	11/14
Bleuet	<i>Centaurea cyanus</i>	Tube	0	12
Fétuque rouge traçante	<i>Festuca rubra</i>	Boîte de Petri	8	7
Fléole des prés	<i>Phleum pratense</i>	Boîte de Petri	7	7
Lotier corniculé	<i>Lotus corniculatus</i>	Boîte de Petri	5	7
Ray-grass anglais	<i>Lolium perenne</i>	Tube	6	10/11/13
Sarrasin	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Tube	5	10
Trèfle violet	<i>Trifolium pratense</i>	Boîte de Petri	4	7



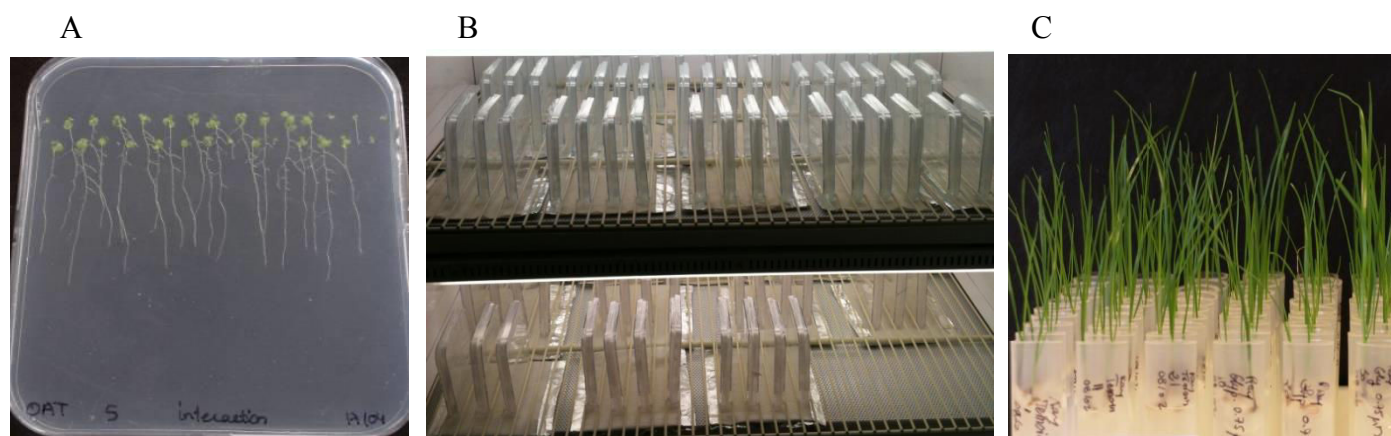


Figure 23. Système de culture d'*Arabidopsis thaliana* en boîte de Petri (A) disposées dans l'enceinte de culture (B), et système de culture de *Lolium perenne* en tube (C)

### 3.2.2. Dispositifs et conditions de culture en milieu liquide axénique

*Lolium perenne* a également été cultivé en milieu liquide sous conditions hydroponiques. Le milieu utilisé est le milieu Hoagland 1 X à une concentration de 1,6 g/L (pH 6), non gélosé. Ce milieu est stérilisé comme précédemment (section 3.2.1.). Les xénobiotiques ou les métaux lourds sont ajoutés ensuite de manière stérile.

Après stérilisation et levée de dormance (section 3.2.1), les graines ont été semées sur des dispositifs de culture hydroponique mis au point au laboratoire. Deux dispositifs, différant par la quantité de milieu de culture liquide et le nombre de graines, et donc par le nombre de plantes pour un même réplicat biologique, ont été utilisés.

Le dispositif 1 comprend un tube stérile de 30 mL (Ø 27 mm) contenant le milieu de culture liquide, sur lequel est inséré un tube conique stérile coupé à son extrémité incurvée, permettant de placer une gaze sur laquelle les graines ont été semées. Les racines des plantules traversent la gaze et atteignent le milieu de culture (Figure 24A). La gaze est continuellement humidifiée à l'aide d'un morceau de gaze trempant dans le milieu de culture pour maintenir l'humidité nécessaire à la germination. Dix graines ont été semées sur chaque dispositif, représentant un réplicat biologique, et au minimum 5 réplicats ont été réalisés par traitement.

Le dispositif 2 comprend une boîte stérile (L : 18,5 cm x l : 13,5 cm x h : 6,8 cm) de 500 mL contenant le milieu de culture liquide. Les graines ont été semées sur un portoir flottant troué recouvert d'une gaze et la boîte a été maintenue fermée jusqu'au développement des feuilles (Figure 24B). Deux graines ont été semées sur chacun des 96 trous du dispositif, et au minimum 8 boîtes ont été semées par condition, représentant chacune un réplicat biologique.

La germination et la croissance hydroponique pour les deux dispositifs ont été réalisées dans une enceinte de culture dans les mêmes conditions que pour la culture gélosée (section 3.2.1.).

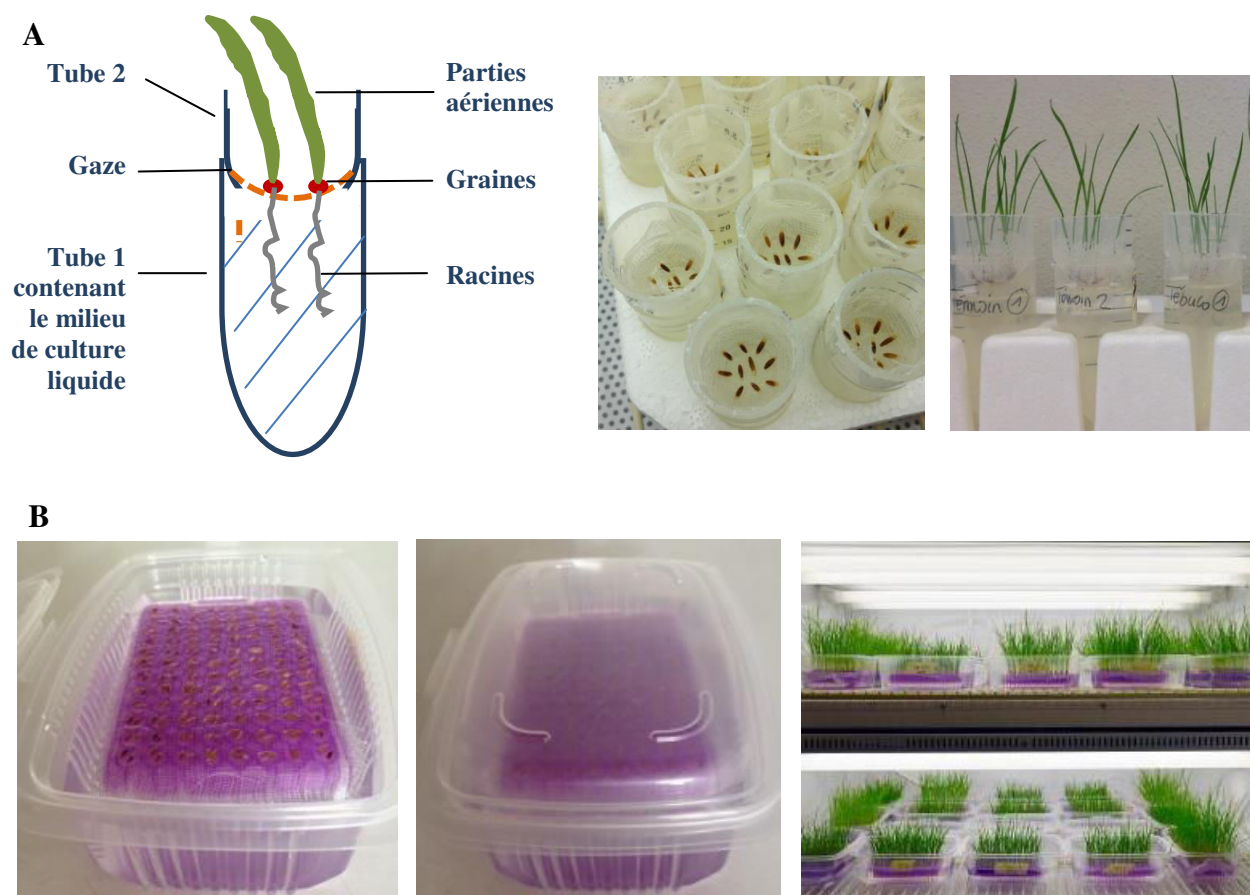


Figure 24. Dispositifs de culture liquide de *Lolium perenne*

### 3.2.3. Conditions d'exposition aux stress chimiques

Deux modalités d'exposition aux xénobiotiques et aux métaux lourds ont été effectuées et sont illustrées en figure 25.

Les expérimentations dites en croissance directe, correspondant à un stress dès la germination, ont consisté à semer les graines sur des milieux de culture gélosés contenant les xénobiotiques ou les métaux lourds. Au terme d'un temps de traitement de 7 à 14 jours (Tableau 6), différents paramètres ont été mesurés.

Le deuxième type d'expérimentation est une exposition en transfert et a consisté à semer initialement les graines sur un milieu de culture gélosé exempt d'agent stressant. Après 7 jours de croissance, les plantules ont été transférées sur du milieu frais contenant les différents xénobiotiques ou métaux lourds.

Le transfert a été conduit durant 3 ou 4 jours au terme desquels différents paramètres ont été mesurés.

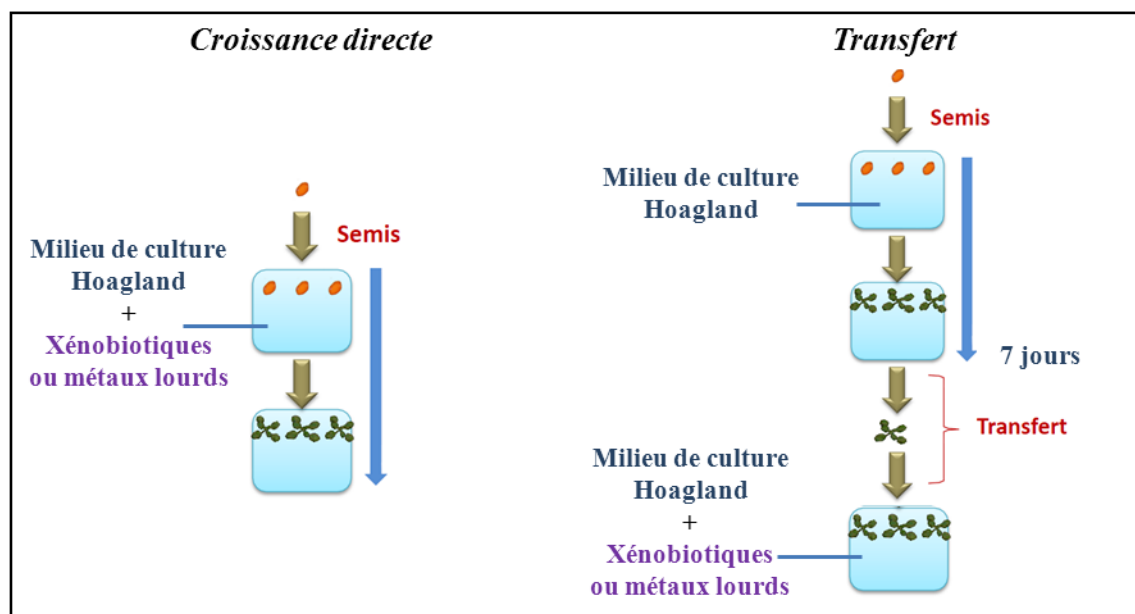


Figure 25. Modalités d'exposition aux stress chimiques

Deux modalités d'exposition ont également été réalisées pour la culture de *Lolium* en conditions hydroponiques (dispositif 1 décrit en Figure 24A). En exposition directe, la croissance a lieu pendant 11 ou 13 jours (selon l'expérimentation), avec exposition aux traitements chimiques dès la germination et le développement précoce. En exposition de transfert, les plantules de 7 jours, étant au même stade de développement et ayant germé et poussé sur milieu liquide contrôle, en absence de stress chimique, ont été transférées sur des milieux liquides frais contenant les xénobiotiques ou les métaux lourds durant 4 jours, par transfert du tube support de la gaze (Tube 2 de la figure 24A).

### 3.3. Conditions de stress xénobiotiques et chimiques

La diversité des pollutions chimiques environnementales est difficile à transcrire en termes de conditions contrôlées de stress chimique. Etant donné le contexte environnemental de la ZAA, un premier choix de stress chimiques s'est basé sur des analyses de sols prélevés en décembre 2007 en bordure de parcelles cultivées ou prairiales de la ZAA. Cinq parcelles ont été prises en compte : deux étaient cultivées en maïs, une en blé et les deux dernières étaient des prairies. Pour chacune d'entre elles, deux prélèvements de sol d'1 kg au niveau du premier horizon (0-30 cm) ont été réalisés à 30 cm d'écart sur le bord de chaque parcelle. Les prélèvements ont été transportés sur glace, homogénéisés, tamisés à 4 mm et stockés à 4°C

jusqu'à analyse. Ces analyses ont été réalisées par chromatographie liquide et gazeuse selon des protocoles d'analyses spécifiques pour différentes familles de polluants potentiels (panel de 41 molécules, Chap IV, Table S1) par un prestataire de service analytique (CGI, « Centre de Génie Industriel », Ploemeur (56)). Ces analyses de sols ont révélé la présence de différents xénobiotiques, tels que l'herbicide glyphosate, son produit de dégradation l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), l'hydroxyatrazine, qui est un produit de dégradation de l'atrazine, et le fongicide tébuconazole (Tableau 7).

D'autres agents stressants couramment retrouvés lors des pollutions environnementales d'origine agricole ont aussi été étudiés (Chap I, 1.1.). Il s'agit de l'herbicide atrazine, des métaux lourds cuivre et zinc et de l'hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) fluoranthène.

Ces molécules ont été utilisées seules ou en mélanges à des doses résiduelles correspondant aux concentrations retrouvées en bordure de champ agricole lors de la période hivernale (analyses CGI présentées ci-dessus), ainsi qu'à des doses sublétales correspondant à l'EC<sub>50</sub> pour le paramètre longueur racinaire chez *Arabidopsis*. Ces doses sublétales ont été obtenues lors d'études de dose-réponse après 14 jours de croissance d'*Arabidopsis* sur une large gamme de concentrations pour chaque xénobiotique et métal lourd. Le tableau 7 détaille les molécules et les concentrations associées qui ont été utilisées pour les expérimentations.

**Tableau 7. Xénobiotiques et métaux lourds utilisés pour les expérimentations**

Molécule	Famille chimique	Utilisation agricole	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Pureté, Fournisseur	Solvant de solubilisation pour la solution stock	Concentrations utilisées pour les expérimentations	
							Doses résiduelles de bordure de champs (mg/L)	Doses sublétales (mg/L)
Atrazine	Triazine	Herbicide	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	215,68	97,5%, Sigma-Aldrich	MeOH	-	0,09
Hydroxy-atrazine	Triazine	Produit de dégradation de l'atrazine	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O	197,24	96%, Riedel-de Haen	MeOH + HCL 1% (v/v)	0,15	4,94
Glyphosate	Organophosphoré	Herbicide	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P	169,07	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P.C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N, 40 % (p/v) dans H <sub>2</sub> O, Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	0,30	0,17
AMPA	Organophosphoré	Produit de dégradation du glyphosate	CH <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> P	111,04	99%, Alfa Aesar	H <sub>2</sub> O	0,30	5,59
Tébuconazole	Triazole	Fongicide	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	307,82	99,6%, Sigma-Aldrich	MeOH	0,30	1,23
Fluoranthène	HAP	Combustion biomasse	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,26	99%, Sigma-Aldrich	MeOH	-	107,5
Cuivre	Métaux lourds	Fongicide et adjuvant	Cu	63,54	CuSO <sub>4</sub> , 99,99%, Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	-	0,38
Zinc	Métaux lourds	Fongicide et adjuvant	Zn	65,37	ZnSO <sub>4</sub> , 99,99%, Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	-	0,98

## 4. Analyses développementales et physiologiques

### 4.1. Paramètres de croissance

Pour les expérimentations en croissance directe en présence de xénobiotiques ou de métaux lourds, la longueur de la racine primaire a été mesurée à l'arrêt du traitement pour toutes les espèces. Selon les expérimentations, les mesures ont été réalisées soit de manière manuelle à la règle, soit en analysant les photographies de plantes avec le logiciel ImageJ (version 1.43u), après avoir repositionné les plantules dans la boîte de Petri ou les avoir disposées sur une plaque de verre dans le cas des cultures en tube.

Pour les expérimentations de transfert en boîte de Petri, la longueur de la racine a été mesurée au moment du transfert ( $L_0$ ), puis toutes les 24 h pendant la durée du traitement (72 h ou 96 h). La croissance racinaire est alors exprimée en pourcentage d'accroissement de la longueur initiale :  $(L_x - L_0)/L_0$  où  $L_x$  est la longueur de la racine au jour  $x$ . Cette formule permet de prendre en compte la taille initiale des racines dans le calcul de leur croissance journalière.

Pour les expérimentations de transfert en tube, les mesures ont été faites à la fin de la période de transfert en disposant les plantules sur une plaque de verre. Dans le cas de *Lolium perenne*, pour les deux types d'exposition, la longueur des parties aériennes a également été mesurée, après étalement des plantules sur une plaque de verre (Figure 26).

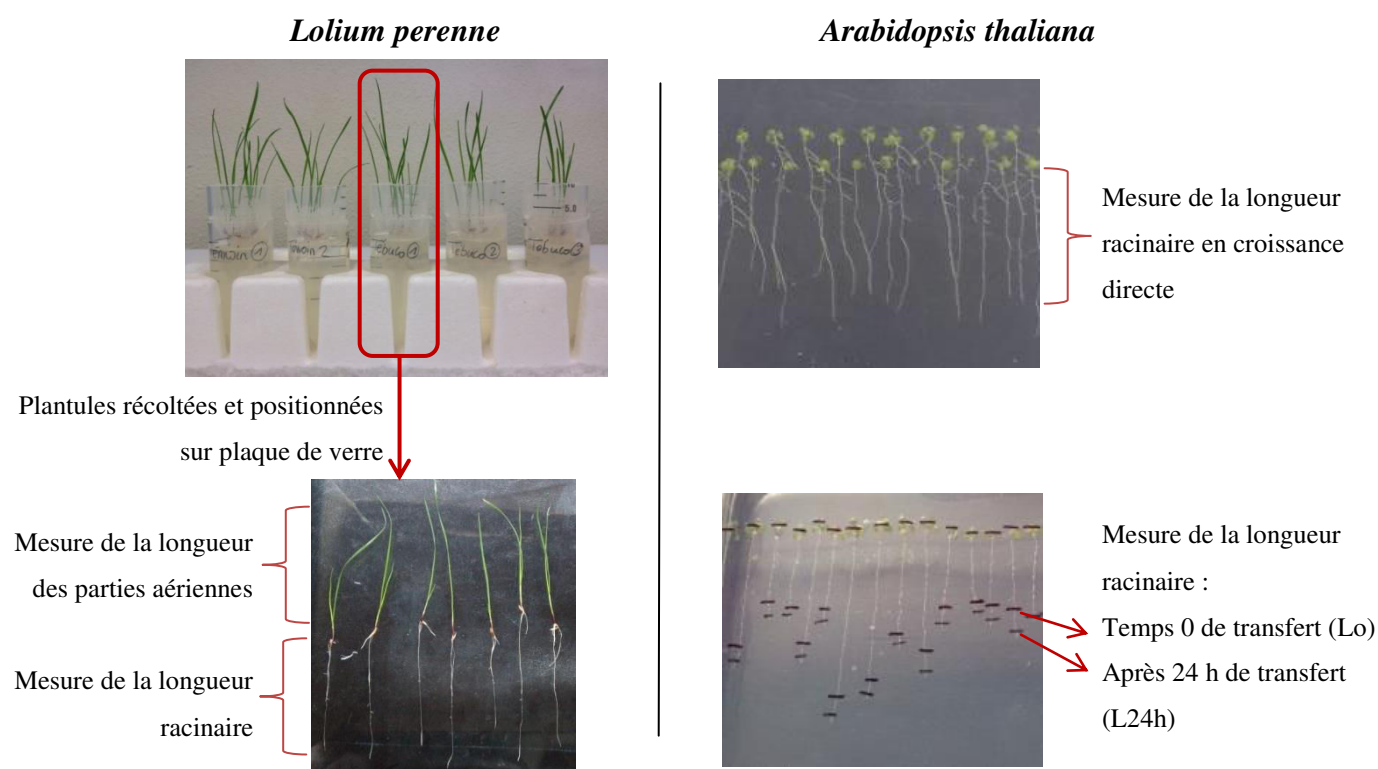


Figure 26. Mesures des paramètres de croissance pour les deux types de culture : en tube (milieu gélifié et liquide) à gauche et en boîte de Petri (milieu gélifié) à droite



## 4.2. Paramètres photosynthétiques

### 4.2.1. Mesure de l'activité photosynthétique

L'activité photosynthétique maximale a été estimée par mesure de la fluorescence des chlorophylles de manière non destructive. A la fin de chaque expérimentation, le rendement photochimique maximal des photosystèmes II (PSII) a été mesuré à l'aide d'un fluorimètre JUNIOR-PAM-210 chlorophyll fluorometer system (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Les mesures ont été effectuées à l'obscurité à la fin de la période nocturne, afin que les photosystèmes soient déchargés de toute énergie photochimique. La fluorescence minimum ( $F_0$ ) est mesurée en faible lumière rouge, puis la fluorescence maximale émise par les PSII ( $F_m$ ) est déterminée après un pulse saturant de lumière rouge. Le rapport  $F_v/F_m$  où  $F_v = F_m - F_0$ , correspond à l'intensité du flux d'électrons dans la chaîne des transporteurs d'électrons du système photosynthétique et traduit le rendement photosynthétique des plantules. Les mesures ont été réalisées sur 5 plantules pour chacun des réplicats biologiques.

### 4.2.2. Extraction et quantification des pigments photosynthétiques

Les parties aériennes des plantules (environ 10 mg) ont été prélevées, pesées, congelées dans l'azote liquide, puis broyées mécaniquement à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch MM400) pendant 1 min à 30 bip/s. Les pigments ont été extraits dans 1 mL d'acétone 80% (v/v). Les échantillons ont ensuite été vortexés, placés 1 h à 4°C et centrifugés 10 min à 11 000g (4°C). Une fois la centrifugation effectuée, 300 µL de chaque échantillon ont été déposés en triplicata sur une plaque 96 puits. La quantification des pigments a été réalisée au spectrophotomètre à trois longueurs d'onde : 470, 646 et 663 nm.

Les concentrations en pigments photosynthétiques ont été obtenues en utilisant les équations de Lichtenthaler et Wellburn (1983) :

- teneur en chlorophylles a (µg/mL d'extrait) :  $C_a = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646}$  ;
- teneur en chlorophylles b (µg/mL d'extrait) :  $C_b = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663}$  ;
- teneur en chlorophylles totales (µg/mL d'extrait) :  $C_t = C_a + C_b$  ;
- teneur en caroténoïdes et xanthophylles (µg/mL d'extrait) :  $C_{x+c} = (1000 A_{470} - 3,27 C_a - 104 C_b) / 229$ .

Les résultats ont été exprimés en µg de pigments par mg de masse fraîche (µg/mg MF).

## 5. Analyses métabolomiques

### 5.1. Méthodologie d'extraction

Les tissus végétaux congelés ont été broyés mécaniquement durant 1 min 30 s à 25 bip/s à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch MM400). Les échantillons broyés ont été suspendus dans 600  $\mu\text{L}$  d'un mélange méthanol/chloroforme (2:1 ; v/v), puis agités mécaniquement grâce au broyeur à bille durant 1 min 30 s à 25 bip/s afin d'extraire les métabolites. Les tubes ont été placés 10 min à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis 400  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure à  $4^{\circ}\text{C}$  ont été ajoutés. Les échantillons ont été agités vigoureusement pendant 1 min afin que les molécules d'intérêt passent dans la phase aqueuse, puis centrifugés deux fois pendant 5 min à 4 000g ( $4^{\circ}\text{C}$ ). La phase aqueuse a été récupérée dans son intégralité. Trois cents  $\mu\text{L}$  de cette phase ont été déposés dans une fiole d'analyse et évaporés à sec à l'évaporateur à  $33^{\circ}\text{C}$  (MiVac, Genevac Ltd., Ipswich, England) et les fioles ont été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Les analyses sur l'espèce *Arabidopsis thaliana* ont été réalisées à partir de tissus frais. Les analyses sur *Lolium perenne* ont été réalisées à partir de tissus lyophilisés. Le nombre minimum de réplicats réalisés a été de 5 par traitement.

### 5.2. Quantification par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse

Les métabolites extraits ont été dérivés, puis analysés par GC-MS conformément à Colinet et al. (2012) et Gravot et al. (2010). La dérivation a été réalisée par ajout de 30  $\mu\text{L}$  d'une solution de méthoxyamine-pyridine (20 mg/L), puis de 30  $\mu\text{L}$  de MSTFA [N-méthyl-N-(triméthysilyl) trifluoroacetamide] aux extraits secs, et les fioles ont été placées sous agitation pendant 1 h à  $40^{\circ}\text{C}$ . Toutes les étapes de la dérivation ont été réalisées grâce à un échantillonneur automatique CTC CombiPal (GERSTEL GmbH and Co.KG, Mülheim an der Ruhr, Germany), qui assure l'homogénéité des traitements sur l'ensemble des échantillons. L'appareillage GC-MS est le même que celui utilisé pour les analyses de pesticides (section 2.4.). L'injecteur est à une température de  $250^{\circ}\text{C}$  et le gradient de température est le suivant : (i) de  $70^{\circ}\text{C}$  à  $170^{\circ}\text{C}$  à raison de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (ii) augmentation à  $280^{\circ}\text{C}$  à raison de  $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (iii) augmentation à  $320^{\circ}\text{C}$  à raison de  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (iv) 4 min à  $320^{\circ}\text{C}$ . Un  $\mu\text{L}$  de chaque extrait a été injecté en mode split (25:1), c'est-à-dire par injection avec division (fuite). L'injection en split est utilisée pour les échantillons concentrés : seule une partie de l'échantillon vaporisé arrive sur la colonne, et l'autre est évacuée. La température de la source du spectromètre de masse a été fixée à  $250^{\circ}\text{C}$  et celle de la ligne de transfert a été fixée à  $300^{\circ}\text{C}$ .



La détection des ions se fait en ionisation positive (EI +). La méthode appliquée au MS impose la quantification d'ions majoritaires spécifiques d'une soixantaine de métabolites. Chaque composé est identifié par deux ions spécifiques dont la quantification à un temps donné génère le tracé d'un pic. Des courbes de calibration (13 points de gamme) ont été réalisées en utilisant les références pures des métabolites recherchés. Le logiciel Xcalibur v2.0.7 est utilisé pour quantifier les différents métabolites. Les doses trouvées ont été rapportées en nmol/mg de la masse fraîche des échantillons pour *Arabidopsis* et en nmol/mg de la masse sèche pour *Lolium*.

## 6. Analyses d'expression génétique

### 6.1. Stratégie de séquençage du transcriptome par RNA-Seq

Une analyse transcriptomique des parties aériennes en réponse aux stress chimiques a été réalisée pour *Lolium*, afin d'étudier les variations moléculaires résultant de l'interaction plante-xénobiotiques. Le transcriptome correspond à l'ensemble des ARN (acides ribonucléiques) issus de la transcription du génome. La caractérisation et la quantification du transcriptome dans un tissu donné et dans des conditions données permettent donc d'identifier les gènes exprimés, mais aussi de déterminer les mécanismes de régulation d'expression des gènes et de définir des réseaux d'expression des gènes.

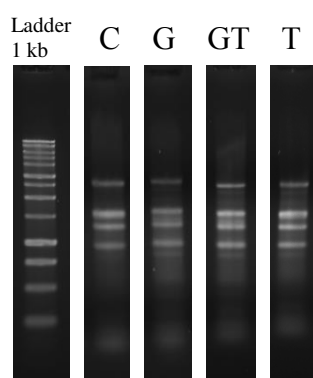
Il n'y avait pas de ressources génomiques ou transcriptomiques exhaustives de *Lolium perenne* au début des travaux de cette thèse. Il était donc nécessaire de constituer au préalable un outil de travail génomique ou transcriptomique adapté à l'étude des stress chimiques et xénobiotiques.

Etant donné la complexité du génome de *Lolium*, il a été choisi de privilégier une approche RNA-Seq permettant la caractérisation *de novo* (sans génome de référence) du transcriptome de *Lolium* (Huang et al., 2012 ; Ward et al., 2012). Cette méthode implique le séquençage en masse de banques d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc), qui correspondent à des brins d'ADN artificiellement synthétisés à partir d'ARN messagers (ARNm). Ces ADNc représentent les parties exprimées des régions du génome ayant été transcrites en ARNm. Le séquençage en masse a été réalisé par la technologie de pyroséquençage 454 (GS FLX Titanium Sequencer, Roche Inc). Le pyroséquençage 454 permet d'obtenir des séquences unitaires de longueur significative (400–900 pb), appelées reads, qui sont assemblées à l'aide d'outils bioinformatiques en séquences continues et ordonnées, appelées contigs. L'ensemble des contigs permet d'obtenir le transcriptome *de novo* et la comparaison par homologie de séquence des données de ce transcriptome avec des bases de données permet l'annotation fonctionnelle des contigs. La comparaison entre les contigs obtenus et leur niveau de représentation selon les différents stress chimiques permet ainsi de déterminer les expressions différentielles.

Les stress chimiques étudiés ont consisté en des traitements sublétaux avec le glyphosate (G, 1  $\mu$ M), le tébuconazole (T, 4  $\mu$ M) et le mélange glyphosate + tébuconazole (GT, 1  $\mu$ M et 4  $\mu$ M, respectivement). Les plantules soumises aux stress chimiques ont été comparées avec des plantules contrôle non soumises au stress chimique (C). Les traitements ont été appliqués en condition de transfert (section 3.2.3.) sur 4 jours.

## 6.2. Extraction des ARN totaux, enrichissement en ARNm et obtention des ADNc

Les échantillons de parties aériennes (50 mg par échantillon, correspondant à environ 5 plantules ; 5 réplicats biologiques par traitement) ont été récoltés et broyés mécaniquement dans de l'azote liquide pendant 1 min 30 s à 25 bips/s. L'ARN total a été extrait par la méthode du TRI Reagent® (Sigma, St. Louis, MO, USA), selon le protocole du fabricant, essentiellement. Chaque échantillon d'ARN total obtenu a subi un traitement DNase [kit DNase I (RNase free) New England Biolabs, M0303S] et a ensuite été quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000). Leur qualité, ainsi que leur intégrité, ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (Figure 27).



**Figure 27. Electrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium de 4 échantillons d'ARN total de *Lolium perenne***

C : Sans traitement = Contrôle, G : Traitement Glyphosate,  
T : Traitement Tébuconazole, GT : mélange Glyphosate + Tébuconazole

Les réplicats biologiques ont été poolés. Le kit Oligotex mRNA (Qiagen Cat. No. 70042) a été utilisé pour obtenir une fraction enrichie en ARN-polyA<sup>+</sup> correspondant aux ARNm d'origine nucléaire. Les brins d'ARNm de petites tailles ont été éliminés par précipitation au LiCl (2M final), puis 250 ng d'ARN ont été fragmentés pendant une durée de 1 min 45 s à 2 min en présence de 100 mM de ZnCl<sub>2</sub> (RNA fragmentation solution, cDNA Rapid Préparation Method, Roche Inc), afin d'obtenir des fragments de 500 à 1000 pb, taille vérifiée par puce ARN Pico Agilent (Agilent RNA 6000 Pico Assay Protocol, 2006). La rétrotranscription en ADNc double brin a été effectuée à l'aide du kit cDNA Synthesis System (Roche, Cat. N° 11117831001) qui utilise des amorces aléatoires. La vérification de la qualité de l'ADNc obtenu a été réalisée par analyse des échantillons sur une puce de type High Sensitivity DNA Assay (Agilent High Sensitivity DNA Assay Protocol). Ceci a permis l'obtention de 4 échantillons d'ADNc de *Lolium*.

### 6.3. Séquençage du transcriptome

Le séquençage en masse des échantillons d'ADNc a été réalisé par pyroséquençage sur un séquenceur 454 GS FLX Titanium Sequencer (Roche Inc.) géré par la plateforme de Génomique Environnementale et Fonctionnelle de Biogenouest (Observatoire des Sciences de l'Univers de Rennes, OSUR). Le pyroséquençage a eu lieu en 4 étapes (Figure 28). Les banques d'ADNc ont été préparées en ajoutant par ligation des adaptateurs spécifiques (Rapid Library Preparation Method, Roche) aux ADNc (Etape 1). Chaque brin d'ADNc a été hybridé sur une bille (Capture bead) et une PCR en émulsion a permis l'amplification des brins (emPCR Lib-L Method, Roche) (Etape 2). Les suspensions de billes chargées ont été étalées sur une plaque PTP (Pico Titer Plate) (Etape 3). Enfin, le séquençage a été réalisé (Etape 4) en utilisant la chimie Titanium (Sequencing XL+ Method, Roche) et le signal de séquençage a été suivi de manière luminométrique. Le séquençage des 4 banques d'ADNc a été réalisé en deux runs (une plaque par run). Chaque plaque était divisée en 4 régions pour réaliser le séquençage des 4 échantillons d'ADNc en parallèle. Les deux runs ont donc permis l'obtention de deux réplicats techniques pour chaque échantillon d'ADNc.

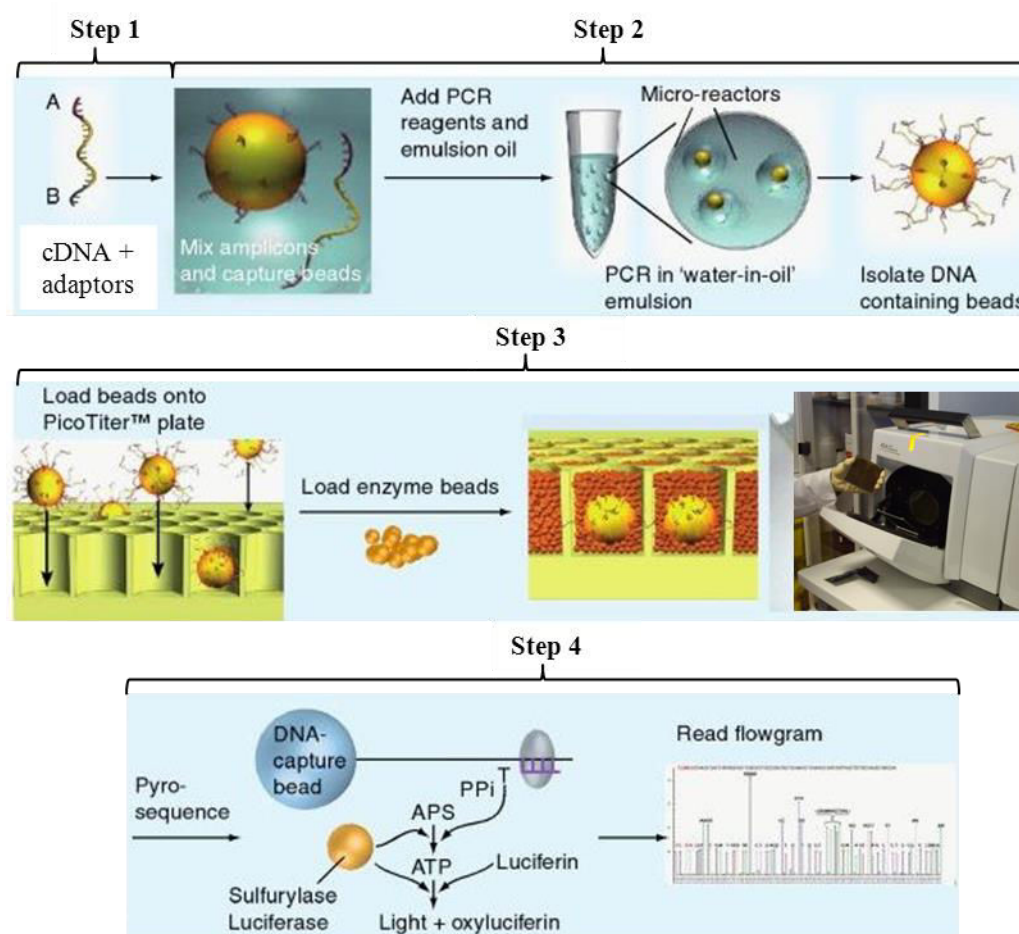


Figure 28. Schématisation des étapes de la technologie de pyroséquençage 454 (Roche)

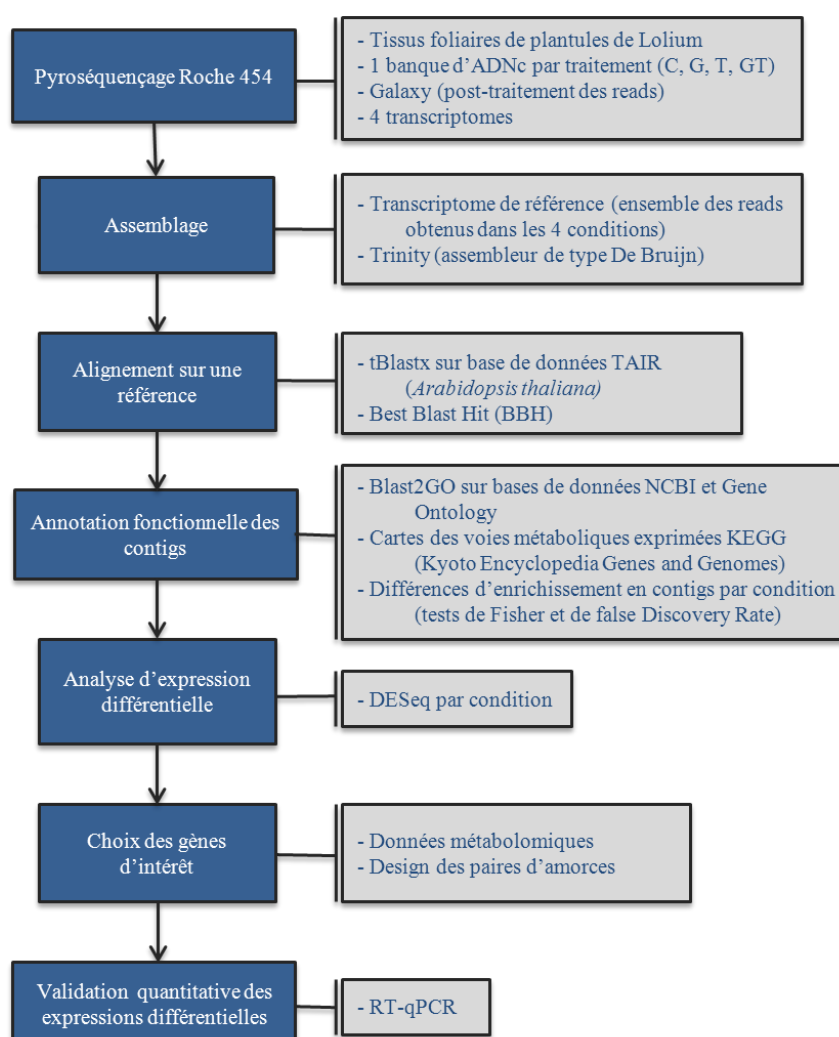
## 6.4. Analyses des données de séquençage

- Ressources informatiques :

Pour pouvoir mener à bien les manipulations de séquences et les calculs d'alignement, les ressources informatiques des plateformes GenOuest (<http://www.genouest.org/>) de l'IRISA (Institut de Recherche en Informatique et Systèmes Aléatoires) de Rennes et ABIMS (Analyses and Bioinformatics for Marine Science ; <http://abims.sb-roscoff.fr/>) de la Station biologique de Roscoff (CNRS-UPMC) ont été utilisées. Les clusters (ou serveurs informatiques) GenOuest et ABIMS mis à disposition sont constitués de 36 machines bi-processeurs fonctionnant au travers du gestionnaire de travaux Sun N1 Grid Engine (SGE). Les 4 jeux de données distincts représentant les 4 transcriptomes, et correspondant aux séquences d'ARNm exprimés dans chaque condition de traitement, ont été analysés avec les outils de bioinformatique résumés en Figure 29. Le traitement des données de séquençage, ainsi que l'assemblage et les différentes analyses bioinformatiques, ont été effectués sur le portail Galaxy (Goecks et al., 2010) où est implémentée la plupart des outils bioinformatiques nécessaires.

**Figure 29. Stratégie d'analyse des données de séquençage du transcriptome de *Lolium perenne***

C : Sans traitement = Contrôle,  
G : Traitement Glyphosate,  
T : Traitement Tébuconazole,  
GT : Traitement par le mélange G+T



- Analyses post-séquençage :

Un filtre a été utilisé afin de conserver uniquement les reads de taille comprise entre 250 et 1000 bases. Les séquences de ces reads ont été « nettoyées » en enlevant les séquences d'adaptateurs de séquençage, et en éliminant les bases indéterminées et les queues poly A/T. Les données de reads des 2 réplicats techniques de séquençage ont ensuite été regroupées pour chaque échantillon d'ADNc d'une même condition.

- Assemblage :

L'assemblage des reads a été réalisé par le logiciel d'assemblage *de novo* Trinity (Grabherr et al., 2011 ; Haas et al., 2013) sur l'ensemble des reads obtenus dans les 4 conditions. Trinity, implémenté dans Galaxy sur le cluster ABIMS, est un assembleur spécialisé Illumina/Solexa. Il a été utilisé pour l'assemblage *de novo* de nos données, car il est adapté aux données non orientées et obtenues sur un brin. Selon Ren et al. (2012), il permet des assemblages comparables à ceux obtenus par le logiciel Newbler (Roche). C'est l'un des meilleurs assembleurs basés sur les graphes de De Bruijn pour l'assemblage de données 454.

L'assemblage permet de générer des contigs correspondant à l'alignement de plusieurs reads d'un même transcrit (Haas et al., 2013). De plus, la mise en commun de l'ensemble des reads des 4 conditions permet d'augmenter la taille moyenne des contigs assemblés et de produire un transcriptome global, qui constitue le transcriptome de référence. L'outil RSEM (Li et Dewey, 2013) a permis d'attribuer les reads à des contigs en évaluant leur abondance, selon un filtre FPKM (fragment per kilobase of transcript per million mapped reads)  $\geq 1$ , c'est-à-dire avec au moins un fragment par kbase de transcrits par millions de reads alignés.

Après le premier assemblage effectué, les reads non assemblés et non utilisés pour le transcriptome de référence ont été de nouveau assemblés par la même méthode. Les reads non assemblés ont alors été considérés comme des singletons.

- Analyse fonctionnelle :

L'analyse des contigs et singletons générés a été réalisée par la recherche d'homologies de séquence par alignements locaux des contigs de *Lolium* avec la base de données « The Arabidopsis Information Ressource » (TAIR : 27 416 gènes d'*Arabidopsis thaliana* ; <http://www.arabidopsis.org/>) par tBlastx (Blast v2.2.26 ; Altschul et al., 1997) qui utilise la traduction dans les six cadres de lecture des séquences nucléiques en séquences protéiques.

La donnée statistique de l'e-value a été utilisée pour indiquer la pertinence d'un résultat d'alignement. Elle a été fixée à  $10^{-5}$  pour la sélection des meilleurs alignements, aussi appelés Best Blast Hits (BBH).

L'annotation fonctionnelle des contigs a été ensuite réalisée avec le logiciel Blast2GO (v2.7.1 ; <http://www.blast2go.com/b2ghome> ; Conesa et al., 2005) qui propose l'annotation de séquences ayant une homologie avec une séquence de référence. Les identifiants de ces séquences de référence ont été soumis aux bases de données publiques en ligne telles que NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Gene Ontology ([www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/)) dans le but de recueillir les informations d'annotations disponibles correspondantes. En fonction de l'annotation obtenue, chaque contig peut être associé à des catégories fonctionnelles. Les paramètres de stringence utilisés pour l'annotation ne retenaient que les résultats présentant une e-value inférieure à  $10^{-6}$ , une longueur d'alignement d'au moins 30 acides aminés et un seuil correspondant au score de fiabilité des annotations (GO score cut-off) de 55 (Götz et al., 2011).

La base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) a été utilisée pour réaliser les cartes des voies métaboliques exprimées. Différents outils implémentés dans Blast2GO ont permis l'enrichissement des données d'annotation (InterProScan). Un test exact de Fisher associé à un test de False Discovery Rate (FDR) ont été réalisés pour étudier les différences d'enrichissement en contigs de chaque catégorie fonctionnelle (Conesa et al., 2005). Chaque traitement a été comparé au témoin et la significativité statistique des différences d'enrichissement est exprimée par la valeur de p-value.

- Analyses d'expression différentielle :

Afin de déterminer *in silico* les gènes différentiellement exprimés entre les 4 traitements, le programme DESeq du package Bioconductor (Anders et al., 2013) implanté dans Galaxy a été utilisé. L'outil DESeq permet de normaliser les données et calcule la significativité statistique de l'expression différentielle pour chaque gène. L'expression différentielle de chaque gène est estimée en utilisant la variance entre les 4 conditions pour ce gène (Anders, 2010). La significativité statistique est établie pour une p-value inférieure à 0,05.

## 6.5. Quantification ciblée de l'expression génétique

Les processus d'expression différentielle ont aussi été étudiés de manière ciblée par RT-qPCR sur un jeu restreint de gènes candidats.



Tableau 8. Gènes de *Lolium perenne* étudiés en RT-qPCR

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille (pb)	Fragment amplifié
GAPDH	TCGATGAGGACCTTGTTCC	GTGCTGTATCCCCACTCGTT	136	901-1036
comp27530_c0_seq1	GTTCCTTGTGGCCATGTGCT	ATTGCACTCCACAATGCATG	119	169-287
comp2769_c0_seq1	TCAGGTGACCCATTAGTCCT	CAGCAGTGGAGAGATTGTGT	84	267-350
comp3660_c0_seq1	GGTGTGGGTACAGTTGGAT	TAGCCTAGCAGCATTCTTGG	174	733-906
comp4085_c0_seq2	TGTCAATGGTGGAGAAGGTG	CTACAAACCTTGAGGCCCTT	126	1526-1651
comp5339_c0_seq1	TGAAGCTTTCCTGGCAGATT	GACAAGCTGGATACCGTCTT	121	402-522
comp6832_c0_seq2	ACATGGCGAAGATGTAGGTC	CATCTACACCTCCCTGTTCG	230	332-561
comp7152_c0_seq1	CAACACCATCCTCTTCGACT	CCGTCACTTGTTCATCAGC	212	382-593
comp7196_c0_seq2	CACCCTTGCAAGTCTAATGT	AAGACCAGTGCTGAAATGT	102	243-344
comp7196_c0_seq5	AAACTGCCAGAGGTTGTAG	TGTCTGCATGGATGGTGAAA	80	655-734
comp7278_c0_seq1	CTATGTACGAGGAAGGTGCC	TGGAGAATGCAACATGGACA	268	711-979
comp7296_c0_seq6	CAAAACCTCCACTGCAGTTG	CTCTTTTCCCTGGCTCAAGT	245	676-920
comp7309_c0_seq3	CACCCAGATGGAGAGTATGC	TGAATCCAGCCTTTTCAGCT	196	351-546
comp7355_c0_seq2	TGCATACTGCTTGTGGAAGT	ATTGGGATCGATAATGCGCT	248	474-721
comp7388_c0_seq1	CGAGCAGTCCCTCAACATCT	ATAATCCGCTTTCCTCGACC	181	278-458
comp7427_c0_seq4	AACTCGATGTAGCCGATCAC	AAGGTGGAGCTGATTGACG	244	336-579
comp7452_c0_seq3	TAGGAGATTTGGCGACCTTA	AAATGTTTCGCTGACTCCTGT	269	30-298
comp7458_c0_seq2	TCGACAGTGTCTTCAGTTGG	TCAGGAAGGACTGCAAGTTC	198	85-282
comp7489_c0_seq2	AGCAGTCTTGAAACCTACG	AAGGGCTCAAACATCGTCAT	91	419-509
comp7493_c0_seq1	ACCAAGTTCGGTGTAGCAAT	CCATGGTACTCAGCATCTCC	92	238-329
comp7497_c0_seq1	AGCACAGCAAGGTGTAGAA	TAGGACCTTCTTCCCATGGT	227	320-546
comp7527_c0_seq1	TGCCTTCCCTCCTTTAGAGA	CAAATGCCGCTATTGCTGAA	176	782-957
comp7591_c1_seq3-4	CTCCATCGCGTCTTCTAC	GTACACGTCCAATGTAGTCCC	118	811-928
comp7682_c1_seq3	TTGCAAGCAGGTGAAATTG	GACTGACAAACATGTAGGCA	283	491-773
comp7682_c0_seq5	TGCTTGAGTTCGTGAATGGA	TCCCAAGATGTTGAGGCAAA	231	399-629
comp7697_c0_seq11-14	GGGCAAGCTCATGATATCGA	AAACTTCTCTCGTGGGTGTC	109	798-906
comp7705_c0_seq3	CCCAGAGGTTTACAGGCTT	CGGGACAACTCTTCTTGAA	92	1047-1138
comp7709_c0_seq1	GACAGGTTGTCTTGTGTTGC	AAGTGTGCTATGTGTGAA	111	1208-1318
comp7722_c0_seq3	ACAGTCTTGACGGCATTCT	CATCTCTTCCAGGAAGACCG	133	538-670
comp7188_c0_seq3	AGCTTTGCCTTGCCATTAC	ATTGCTTCGTTCCAGTCCAG	88	808-895
comp7528_c0_seq1	AGCCGGGTATTTAACAGCAT	CTCGCTCGAATTTGTATCGC	156	53-208

Tableau 9. Gènes d'*Arabidopsis thaliana* étudiés en RT-qPCR

Accession N°	Produit du gène (abréviation)	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille attendue (pb)
At1g05680	UDP-Glucosyltransferase (UGT74E2)	AGTTCTGCAAACGCTTAGCC	AATGGTTCCTCGCCTTCTTG	145
At1g06570	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (PDS1)	AAACCGACAACCACAGCTTC	AATCGCAACGGCTCTAACAC	96
At1g07530	GRAS family transcription factor (SCL14)	TGCAGCAGACATGTTGAAGG	TGCAGTGAAACGCATCATGC	103
At1g11680	14α-demethylase (CYP51A2)	ACGACATGCTGCAGTGTTTC	AGCAGCAATGAGCAAACCAG	89
At2g04050	MATE (multidrug and toxic compound extrusion) efflux protein (MATE)	AGCTCCTGCGACAAGACTC	ACTCCGAAGTGGAAGAACTGC	77
At2g29420	Glutathione S-transferase (GSTU7)	TCCGATTCTTCTCAAGATCCG	ACAACCTTTCATCGCCGTAC	96
At2g46830	Transcription repressor (CCA1)	TAGTCATCCCCACACAGTTGC	ATGATGAGGCGAAAGTTGCG	110
At3g62250	Ubiquitin 5 (UBQ5)	AGCCGTTGCCTCAAAAGATG	TCGCCTTCACATTGTTCGATG	102
At5g13080	WRKY family transcription factor (WRKY75)	TGTTGCAAAAGCGTGGAGTC	TGGCTCCTTGTTTGAAACGC	71
At5g17300	Myb family transcription factor (RVE1)	AACCACTGCAAATGCACCTG	TTGGTTCCTTGATCGAGCTCTC	98
At5g45340	P450 cytochrome family (CYP707A3)	TTACGTGCGCGAAACATTCC	ACGAATTTGCTGCTTCAGG	147

### 6.5.1. Choix des amorces

#### *Lolium perenne*

Pour chaque gène d'intérêt, les séquences du contig correspondant ont été utilisées pour le design de paires d'amorces à l'aide du logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Les paramètres imposés dans Primer3Plus ont été une taille d'amplification comprise entre 70 et 300 paires de bases, une teneur en GC de 50% et une température d'hybridation de 55°C à 60°C (Tableau 8).

Pour chaque contig, la spécificité d'hybridation du couple d'amorces a été testée par comparaison des séquences par alignement avec le transcriptome de référence, avec les logiciels ClustalW (v1.7) et Blast implémentés sous Galaxy. Les amorces ont ensuite été validées par PCR (réaction en chaîne par polymérase) en utilisant un pool d'ADNc de *Lolium* combinant des échantillons des 4 traitements. La spécificité de l'amplification (une seule bande de taille attendue) a été vérifiée. Une PCR quantitative a été réalisée afin de vérifier la température de fusion attendue par une courbe de fusion et la présence d'un seul produit d'amplification (courbe de fusion unique).

Le choix du gène de ménage s'est porté sur le gène codant la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase), dont la stabilité d'expression est reconnue dans la littérature (Duhoux et Délye, 2013), et dont l'expression est la moins fluctuante chez *Lolium* dans les conditions de stress étudiées.

#### *Arabidopsis thaliana*

Les gènes d'intérêt ont été sélectionnés d'après la littérature et correspondent à des gènes caractérisés comme étant impliqués dans les réponses aux stress xénobiotiques (Tableau 9). A partir des séquences des ARNm déposées sur GenBank, des amorces spécifiques pour chaque gène ont été créées en utilisant Primer3Plus. Les amorces ont ensuite été validées par PCR, puis par PCR quantitative afin de s'assurer de sa taille et qu'un seul fragment était amplifié. Le gène de l'ubiquitine 5 (UBQ5) a été utilisé comme gène de ménage (Ramel et al., 2007).

### 6.5.2. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les ARN totaux ont été extraits à partir des plantules correspondant aux différentes conditions par broyage dans de l'azote liquide et extraction à l'aide du TRI Reagent® (Sigma, St. Louis, MO, USA) selon le protocole du fabricant. La qualité et l'intégrité des ARN totaux ont été vérifiées par quantification spectrophotométrique au Nanodrop ND-1000, puis par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium. Un traitement à la DNase [kit DNase I (RNase free) New England Biolabs, M0303S] a permis d'éliminer les potentielles contaminations ADN de chaque échantillon. La qualité, ainsi que l'intégrité des ARN totaux, ont été vérifiées comme précédemment. Les ARN totaux ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit Iscript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Un thermocycleur Chromo 4® (BioRad) a été utilisé pour effectuer les réactions de RT-qPCR dans des plaques 96 puits contenant un mélange de iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) selon les recommandations du fabricant pour un volume réactionnel final de 10 µL. Le programme PCR appliqué a été le suivant : 3 min à 95°C et 40 cycles (15 s à 95°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C). Les courbes de fusion ont été obtenues par application d'un gradient de température (65°C à 95°C) par incrément de 0,5°C toutes les 30 s.

Les résultats des analyses ont été traités à l'aide du logiciel Opticon Monitor 3 et par le logiciel Gene Expression 1.1. L'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée de façon relative par rapport au niveau d'expression du gène de ménage. Pour *Lolium*, l'expression des gènes a été analysée sur 5 réplicats biologiques de feuilles (50 mg chacun, correspondant à environ 5 plantules) de plantules cultivées en condition de transfert (section 6.1.). Pour *Arabidopsis*, 6 réplicats biologiques de plantules entières (60 mg chacun, correspondant à environ 25 plantules) issues d'exposition en transfert ont été utilisés. Les ARN totaux obtenus ont été poolés aléatoirement deux par deux, afin d'avoir au final trois réplicats biologiques par condition. Pour *Lolium* et pour *Arabidopsis*, chaque réplicat biologique a été analysé en 2 réplicats techniques.

## 7. Analyses statistiques

Selon le type de données obtenues, les représentations graphiques et les traitements statistiques ont été adaptés pour permettre les meilleures analyses et interprétations. Les données ont été le plus souvent représentées par les moyennes des réplicats biologiques pour chaque traitement. A chaque moyenne a été associée une valeur d'erreur standard (SEM : Standard Error of Mean). Le SEM correspond à l'écart-type divisé par la racine du nombre d'individus ayant servi à calculer la moyenne. Afin de comparer les variations de réponses selon les traitements pour certains paramètres, les niveaux relatifs des réponses en fonction des conditions contrôles ont été calculés en utilisant le  $\log_2$  du ratio [ $\log_2$  (traitement/témoin)], notamment pour les données métabolomiques. Ces données de variation ont été visualisées et comparées en utilisant une Heatmap réalisée sous EPCLUST (Expression Profile data CLUSTERing and analysis ; <http://www.bioinf.ebc.ee/EP/EP/EPCLUST/>), associée à une classification hiérarchique (lien moyen) utilisant des mesures de distance de corrélation. La Heatmap est habituellement utilisée pour représenter les différences d'expression de gènes, car elle transcrit l'intensité d'une grandeur variable par un nuancier de couleurs sur une matrice à 2D. Dans le cas présent, elle a été utilisée pour comparer visuellement les réponses métaboliques entre les différents traitements.

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 2.11.11). Les données qui ne remplissaient pas les conditions de normalité et/ou d'homoscédasticité ( $N < 30$ ) ont été comparées par le test de comparaison de moyenne non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney. Des analyses multivariées de type analyse en composantes principales (ACP) basées sur la matrice de corrélation des moyennes ont également été réalisées en utilisant la bibliothèque FactoMineR de R, pour l'étude et la représentation graphique des relations existant entre plusieurs paramètres mesurés (variables quantitatives). Associées à ces ACPs, des classifications hiérarchiques des paramètres ont été recherchées. Pour les variables qualitatives, des analyses factorielles des correspondances ont été réalisées (AFC). L'utilisation d'analyses de co-inertie (méthode de couplage entre deux tableaux de données) a permis d'établir si des liens significatifs existaient entre deux jeux de données. Les relations entre les réponses de différents paramètres mesurés ou de différents tissus, comme les relations entre les différents paramètres physiologiques et les concentrations en métabolites, ont été analysées par des études de corrélations basées sur le calcul du coefficient de Pearson. Les analyses statistiques spécifiques aux données de transcriptomique sont détaillées dans la section 6.4. du présent chapitre et dans le chapitre V.

**~ Chapitre III ~**

**Interactions plante-xénobiotiques au  
sein des communautés végétales  
de bandes enherbées**

## 1. Introduction générale

L'intensification des pratiques agricoles s'est accompagnée d'une utilisation massive de produits phytosanitaires et de fertilisants (Chap I, 1.2.). Ces pratiques peuvent aboutir à des pollutions importantes de l'environnement, résultant de la diffusion de ces composés depuis les parcelles agricoles vers les différents compartiments environnementaux. Cette diffusion des pesticides et des engrais s'effectue par différents processus tels que la dérive aérienne lors de l'épandage, ou les transferts au sol par le ruissellement et l'infiltration de l'eau (Arias-Estévez et al., 2008 ; Chap I, 1.4.). Les milieux aquatiques sont particulièrement touchés par ces pollutions. En effet, les phénomènes de ruissellement entraînent les polluants dans les cours d'eau des bassins versants et dans les eaux souterraines. Les analyses chimiques des ressources en eau ont ainsi montré la présence de pesticides, de leurs produits de dégradation, de nitrates, de phosphore et d'autres contaminants sur l'ensemble du territoire français (Chap I, 1.5.).

Ces pollutions peuvent avoir de nombreuses conséquences, comme des impacts sur la flore et la faune sauvages, une érosion de la biodiversité, et des perturbations du fonctionnement des écosystèmes et des services écosystémiques associés (Allison et al., 2007 ; Beketov et al., 2013 ; Geiger et al., 2010 ; Köhler et Triebkorn, 2013 ; Power, 2010). Les conséquences toxicologiques sont également visibles au niveau de la santé humaine, avec des implications de ces pollutions dans l'apparition de cancers, de malformations congénitales, de problèmes d'infertilité, de problèmes neurologiques ou encore immunitaires (Inserm, 2013 ; Margni et al., 2002). Tous les impacts sur les biosystèmes ne sont pas connus, ni les effets potentiels à long terme de ces composés. C'est notamment le cas des nouvelles molécules mises sur le marché, mais aussi de la majorité des produits de dégradation des polluants. Etant souvent considérés comme faiblement actifs et toxiques, les effets des produits de dégradation sur les organismes restent peu étudiés et leur présence est peu prise en considération lors des estimations des risques écotoxicologiques. La difficulté réside également dans l'évaluation des incidences des mélanges de polluants, qui peuvent entraîner des impacts différents de ceux causés par les polluants seuls, par le biais des interactions possibles entre les constituants des mélanges (Chap I, 2.2.). De même, l'effet des faibles concentrations de polluants sur les organismes est un facteur qui n'est pas suffisamment pris en compte en écotoxicologie.

Des législations aux niveaux européen et national ont été établies afin de limiter les pollutions d'origine agricole. Ainsi, la Directive Nitrates, les Bonnes Conditions Agricoles et Environnementales (BCAE), et la loi Grenelle II, centralisées par la Directive Cadre sur l'Eau

(DCE) du 23 octobre 2000, ont instauré depuis 2005 la mise en place de bandes enherbées (Chap I, 3.2.). Ces bandes enherbées, qui peuvent être situées à différents endroits des bassins versants, sont obligatoires le long des parcelles agricoles bordant les cours d'eau continus visibles sur les cartes IGN au 1/25000. Ces bandes doivent répondre à un certain nombre de critères, comme avoir une largeur de 5 m minimum, ne recevoir aucun intrant et produit phytosanitaire, sauf cas particuliers, et être entretenues par fauchage ou broyage, en respectant les périodes autorisées.

Les bandes enherbées ont de nombreux rôles (Borin et al., 2010), dont le principal est d'être des zones tampons entre les parcelles agricoles et les cours d'eau. Ces bandes permettent en effet de limiter la quantité de pesticides et engrais se déversant dans les cours d'eau, en éloignant la rampe du pulvérisateur et l'épandeur à engrais de ces milieux aquatiques, en limitant le ruissellement de surface, et en piégeant et dégradant les ressources nutritives en excès et les produits phytosanitaires (Chap I, 3.2. ; Reichenberger et al., 2007). L'efficacité des bandes enherbées est variable et dépendante de nombreux paramètres tels que la largeur de la bande, les propriétés physico-chimiques du sol et des polluants, les conditions climatiques, notamment la quantité de précipitations, et les caractéristiques de la végétation (Krutz et al., 2005 ; Lin et al., 2011b ; Otto et al., 2008, 2012 ; Reichenberger et al., 2007 ; Schmitt et al., 1999). Le rôle des plantes dans la diminution des pollutions peut ainsi être important. Cependant, alors que leurs rôles physiques et chimiques dans la limitation des flux de polluants sont bien caractérisés (Krutz et al., 2005 ; Lambrechts et al., 2014a ; Otto et al., 2008, 2012), leurs rôles biologiques sont moins étudiés dans ce contexte de bandes enherbées (Krutz et al., 2005). Ainsi, bien que les polluants retenus dans ces zones tampons puissent être dégradés par les micro-organismes du sol (Lacas et al., 2005 ; Patty et al., 1997), les plantes peuvent moduler cette activité microbienne. De plus, ces polluants peuvent également être absorbés, stockés ou dégradés directement par le compartiment végétal (Chap I, 3.1. ; Krutz et al., 2005, Li et al., 2002). L'efficacité de la bande enherbée dépend donc du maintien du couvert végétal, impliquant la nécessité d'études sur les espèces végétales qui la composent.

Il est de ce fait pertinent de caractériser les relations entre les fonctions des bandes enherbées et les communautés végétales s'y développant. Ce type de questionnement nécessite des analyses intégratives physico-chimiques et écophysiologiques dans un contexte de terrain défini. C'est pourquoi cette étude a été réalisée sur des bandes enherbées expérimentales situées le long de parcelles agricoles, dans une Zone Atelier d'études environnementales en Bretagne, la Zone Atelier Armorique (ZAA) (Chap II, 1.1.). Les bandes enherbées expérimentales utilisées dans cette étude sont issues de bandes enherbées existantes qui ont



été détruites par un labourage superficiel du sol, puis semées avec un mélange d'espèces précises (Bittebiere, 2012), en collaboration avec des agriculteurs volontaires. Ces bandes enherbées expérimentales ont été mises en place en 2010, initialement pour travailler sur une problématique de dynamique spatiale et de fonctionnement des communautés végétales en systèmes prairiaux (Bittebiere, 2012). Ces recherches ont été élargies en 2011 à la problématique du rôle du compartiment végétal dans la fonction épuratrice des bandes enherbées. Dans cet objectif, plusieurs analyses de ces bandes enherbées ont été effectuées, sur deux années consécutives, et sont présentées dans les différentes parties de ce chapitre : (i) la dynamique de diffusion des pesticides dans les bandes enherbées selon un gradient de distance parcelle agricole-cours d'eau, (ii) la dynamique de croissance et de l'état physiologique du couvert végétal des bandes enherbées, (iii) la tolérance des espèces végétales des bandes enherbées aux stress chimiques en conditions contrôlées de laboratoire, et (iv) le potentiel de rétention des pesticides du compartiment végétal, à la fois en conditions *in situ* au sein des bandes enherbées, et en conditions de laboratoire.

## 2. Dynamique de diffusion des pesticides dans les bandes enherbées expérimentales

### 2.1. Introduction

Les bandes enherbées ont comme principal rôle la limitation de la diffusion des produits phytosanitaires des parcelles agricoles vers les cours d'eau adjacents. Cette diffusion de pesticides peut s'effectuer par divers processus, tels que le transport des molécules par dérive atmosphérique lors de l'épandage sur les parcelles agricoles, ou par transport édaphique des molécules avec le ruissellement de l'eau (Chap I, 1.4). L'objectif de la présente analyse a été d'étudier les relations entre les bandes enherbées et les diffusions de polluants. Pour ce faire, l'étude a porté sur des bandes enherbées expérimentales de la ZAA, représentatives des bandes enherbées imposées par la législation sur le territoire français (Chap II, 1.1.). La dynamique de diffusion des pesticides est dépendante de nombreux paramètres, comme les caractéristiques physico-chimiques des molécules et du sol, qui influencent la solubilité des polluants dans l'eau et leur capacité d'adsorption aux particules de sol (Chap I, 1.4.). Il était donc pertinent de s'intéresser à la présence éventuelle de pesticides dans ces deux compartiments des bandes enherbées, ce qui a nécessité l'échantillonnage de sol et d'eau du sol. Des prélèvements de 15 échantillons de sol, et 15 échantillons d'eau du sol sur chaque bande enherbée expérimentale ont été réalisés, selon 5 répétitions de transects le long de la bande et selon un gradient de distance (3 points) à la parcelle agricole [A (proximité de la parcelle), B (milieu de la bande) et C (limite de la bande)] (Chap II, 1.1., 1.3. et Figure 30). Des échantillons de sol ont également été prélevés dans le prolongement des 5 transects au sein même des parcelles agricoles. La détection et la quantification des pesticides dans ces matrices environnementales ont nécessité la mise au point de protocoles d'extraction et d'analyses en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), avec le développement d'une méthode d'analyse multirésidus de pesticides. Les résultats présentés dans la suite de cette partie correspondent à l'analyse d'un nombre restreint d'échantillons. En effet, parmi les 6 bandes enherbées étudiées, le choix a été fait d'analyser préférentiellement des bandes ayant présenté des cultures adjacentes similaires (rotation blé-maïs) en 2011-2012, c'est-à-dire les bandes n°113, 114 et 91 (Chap II, 1.1. et Figure 30). Les bandes 113 et 114 appartiennent à la même parcelle agricole, mais elles sont disjointes et éloignées. De plus, compte tenu des conditions climatiques contrastées entre 2011 (année de sécheresse) et 2012 (fortes précipitations) (Annexe 1), seuls les échantillons prélevés en 2012 ont été analysés. Les résultats présentés correspondent donc à la campagne d'échantillonnage

réalisée en juin/juillet 2012, après la saison d'épandage des produits phytosanitaires par les agriculteurs (Chap II, 1.1.) et après une série de précipitations.

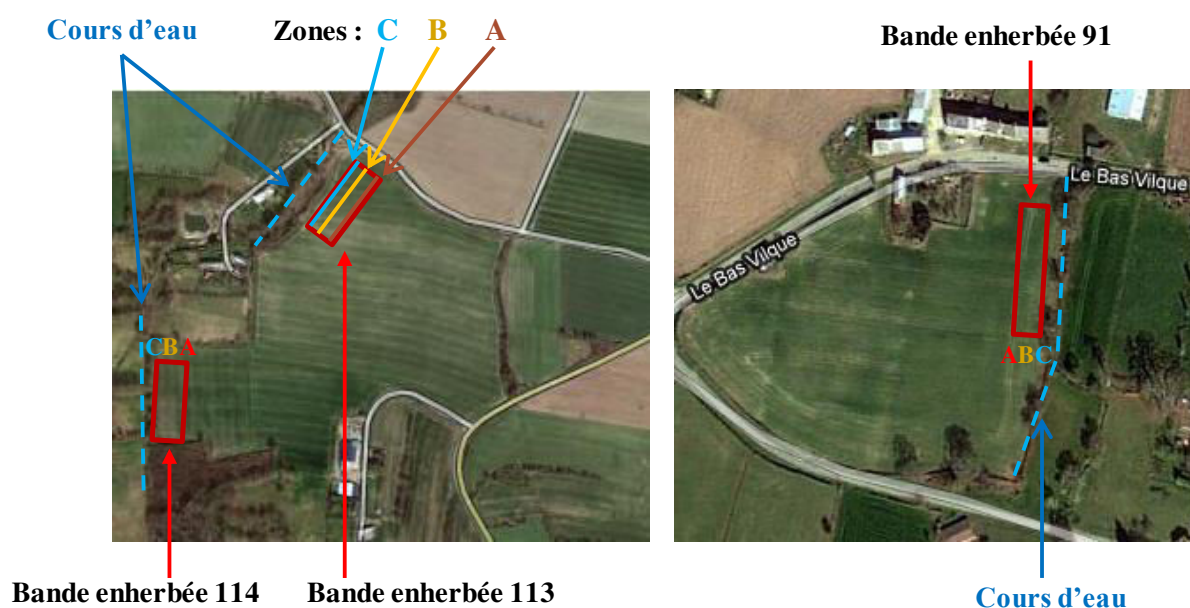


Figure 30. Photographies aériennes localisant les parcelles agricoles et la disposition des bandes enherbées expérimentales étudiées

Pour les 3 bandes enherbées expérimentales sélectionnées, 5 échantillons de sol et d'eau du sol (correspondant aux 5 transects) des zones les plus proches et les plus éloignées des parcelles agricoles (zones A et C, respectivement), ainsi que 5 échantillons de sol prélevés au sein des parcelles ont été analysés.

## 2.2. Résultats

### 2.2.1. Développement de la méthode de quantification de pesticides issus de matrices environnementales

#### A. Méthode analytique par GC-MS

Du fait de l'absence au laboratoire de protocoles permettant le dosage de pesticides, il a été nécessaire de développer une méthodologie d'analyse des pesticides par GC-MS sur la base des caractéristiques des échantillons environnementaux provenant des bandes enherbées expérimentales et des composés d'intérêt recherchés. Ces composés d'intérêt ont été sélectionnés après une enquête auprès des agriculteurs, qui a permis d'identifier les produits phytosanitaires épandus de 2010 à 2012 sur les parcelles jouxtant les bandes enherbées

**Tableau 10. Caractéristiques des pesticides épanchés sur les parcelles agricoles des bandes enherbées expérimentales de la ZAA de 2010 à 2012. Les pesticides en gras sont ceux qui sont analysables par GC-MS (Tableau réalisé d'après : European Commission, UE Pesticides database, 2014 ; Footprint, Pesticide Properties Database, 2014)**

Famille chimique	Généralités		Propriétés physico-chimiques						
	Molécule épanchée	Structure chimique	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK <sub>a</sub> (25°C)	Log(K <sub>ow</sub> )	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol) (25°C)	DT <sub>50</sub> Sol (jour)	DT <sub>50</sub> Terrain (jour)
Acides benzoïques	Dicamba (H)	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	221,04	6600 (pH 1,8) ; > 250000 (pH > 4,1) (25°C)	1,87	-0,55 (pH 5) ; -1,8 (pH 6,8) ; -1,9 (pH 8,9)	1,00.10 <sup>-4</sup>	4	3,9
Carboxamides	<b>Diffutrican (H)</b>	C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	394,29	0,012 (pH 5,8) ; 0,05 (pH 7) (25°C)	9,95	4,2 (pH 7) (20°C)	1,18.10 <sup>-2</sup>	141,8	315
Chloroacétamides	<b>Diméthénamide-P (H)</b>	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	275,79	1449 (pH 6,16) (20°C)	-	1,89 (25°C)	4,80.10 <sup>-4</sup>	23	7
Chloroacétanilides	<b>S-métolachlore (H)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	283,79	480 (pH 7,3) (25°C)	-	3,04 (pH 7) (25°C)	2,20.10 <sup>-3</sup>	15	21
	<b>Acétochlore (H)</b>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	269,77	233 (25°C) ; 282 (20°C)	-	4,14 (pH 6,5) (20°C)	2,10.10 <sup>-3</sup>	10,6	12,1
Dérivés de l'acide pyridyloxyacétique	Fluroxypyr (H)	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	255,03	5700 (pH 5) ; 7300 (pH 9) (20°C)	2,94	0,04 (pH 7) (20°C)	1,69.10 <sup>-10</sup>	13,1	51
Dinitroanilines	<b>Pendiméthaline (H)</b>	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	281,31	0,33 (20°C)	2,80	5,2 (pH 7) (20°C)	2,73.10 <sup>-3</sup>	123	90
Hydroxybenzotriazoles	Bromoxynil (H)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br <sub>2</sub> NO	276,91	90 (20°C) ; 130 (25°C)	3,86	1,31 (pH 2) ; 1,04 (pH 7) (25°C)	5,30.10 <sup>-4</sup>	1	8
	Ioxynil (H)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> I <sub>2</sub> NO	370,91	539 (pH 5) ; 5530 (pH 9) (20°C)	4,10	2,2 (pH 5) ; 0,23 (pH 8,7) (25°C)	1,50.10 <sup>-5</sup>	2	5
Imidazoles	<b>Prochloraze (F)</b>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	376,67	26,5 (20°C) ; 34 (25°C)	3,83	3,5 (pH 7) (20°C)	1,64.10 <sup>-3</sup>	223,6	16,7
Néonicotinoïdes	<b>Thiaméthoxame (I)</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	291,71	4100 (20°C)	-	-0,13 (pH 7) (20°C)	4,70.10 <sup>-10</sup>	121	39
Organophosphorés	Glyphosate (H)	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub> P	169,07	10500 (20°C)	2,34	-3,2 (pH 7) (20°C)	2,10.10 <sup>-7</sup>	49	12
Oxyacétamides	<b>Flufenacet (H)</b>	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	363,33	56 (25°C)	-	3,2 (pH 7) (20°C)	9,00.10 <sup>-4</sup>	32	40
Pyréthrinoides	<b>Cyperméthrine (I)</b>	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	416,30	0,004 (pH 7) (20°C)	8,30	6,6 (20°C)	2,00.10 <sup>-2</sup>	68	69
Strobilurines	Tribloxystrobine (F)	C <sub>29</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	408,37	0,61 (25°C)	-	4,5 (pH 7) (20°C)	2,30.10 <sup>-3</sup>	2	7
Sulfonyles	Nicosulfuron (H)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	410,40	250 (pH 5) ; 7500 (pH 6,5) ; 76400 (pH 9) (20°C)	4,78-7,58	0,61 (pH 7) (20°C)	1,48.10 <sup>-11</sup>	16,4	19,3
	Prosulfuron (H)	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	419,38	4000 (25°C)	3,76	1,5 (pH 7) (20°C)	3,00.10 <sup>-4</sup>	62,1	11,9
	Foramsulfuron (H)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	452,44	37 (pH 5) ; 3293 (pH 7) ; 94577 (pH 8) (20°C)	4,60	-0,78 (pH 7) (20°C)	5,80.10 <sup>-12</sup>	5,5	ND
	Iodosulfuron-méthyl-sodium (H)	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> IN <sub>3</sub> NaO <sub>6</sub> S	529,24	25000 (pH 7) ; 65000 (pH 9) (20 °C)	3,22	1,59 (pH 7) (20°C)	2,29.10 <sup>-11</sup>	2	8
	Mésosulfuron-méthyl-sodium (H)	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	503,51	7,24 (pH 5) ; 483 (pH 7) ; 15390 (pH 9) (20°C)	4,35	1,39 (pH 5) ; -0,48 (pH 7) ; -2,06 (pH 9) (25 °C)	3,65.10 <sup>-12</sup>	45	78
	Tribénuron-méthyl (H)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	395,39	48,9 (pH 5) ; 2040 (pH 7) ; 18300 (pH 9) (20°C)	4,70	2,6 (pH 5) ; 0,78 (pH 7) (25 °C)	1,00.10 <sup>-8</sup>	14	10
Triazines	Metsulfuron méthyl (H)	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	381,36	548 (pH 5) ; 2790 (pH 7) ; 213000 (pH 9) (25 °C)	3,75	-1,7 (pH 7) (20°C)	4,50.10 <sup>-11</sup>	26	10
	<b>Atrazine (H)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	215,68	30 (20°C) ; 34,7 (26°C)	1,70	2,61 (pH 7) (20°C)	1,50.10 <sup>-4</sup>	66	29
Triazoles	<b>Epoxiconazole (F)</b>	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClFN <sub>3</sub> O	329,76	8,4 (pH 3) (20°C)	-	3,3 (pH 7) (20°C)	4,71.10 <sup>-4</sup>	226	120
	<b>Métconazole (F)</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	319,83	30,4 (20°C)	1,06-11,40	3,85 (pH 7) (20°C)	2,21.10 <sup>-7</sup>	84	265
Triazolopyrimidines	<b>Prothioconazole (F)</b>	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	344,26	5 (pH 4) ; 300 (pH 7) ; 2000 (pH 9) (20°C)	6,90	4,16 (pH 4) ; 3,82 (pH 7) ; 2 (pH 9) (20°C)	3,00.10 <sup>-5</sup>	0,5	1,6
	Florasulam (H)	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	359,28	84 (pH 5) ; 636 (pH 7) ; 94200 (pH 9) (20°C)	4,54	1 (pH 4) ; -1,22 (pH 7) ; 2,06 (pH 10) (20°C)	4,35.10 <sup>-7</sup>	1,6	8,5
Tricétones	Sulcotriane (H)	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>3</sub> S	328,77	1670 (pH 4,8) ; > 60 000 (pH 9) (20°C)	3,13	-1,7 (pH 7) ; -2 (pH 9) (20°C)	6,00.10 <sup>-7</sup>	25,3	3,6
	Mésotriane (H)	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S	339,32	160 (20°C)	3,12	0,9 (pH 5) ; 0,11 (pH 7) ; -1 (pH 9) (20°C)	5,10.10 <sup>-7</sup>	17	5
Urées substituées	Isoproturon (H)	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	206,28	65 (22°C)	-	2,5 (20°C)	1,46.10 <sup>-5</sup>	12	23

H : herbicide ; F : fongicide ; I : insecticide DT<sub>50</sub> : temps de dégradation de 50 % de la substance active ND : non déterminé - : absence de dissociation

(Tableau 10) et de connaître les quantités utilisées (Tableau 11). Ainsi, une liste des pesticides pouvant potentiellement diffuser des parcelles agricoles vers les cours d'eau adjacents a été établie. Au sein de cette liste, les pesticides analysables par GC-MS (composés thermostables et volatilisables) ont été identifiés (en gras dans les tableaux 10 et 11). La GC-MS permet en effet l'analyse multirésidus de pesticides du fait de la grande sélectivité et de la sensibilité pouvant être atteintes. Néanmoins, la séparation des molécules par GC ne s'applique qu'aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition et n'est de ce fait applicable qu'à une partie des pesticides (Santos et Galceran, 2002). A cette sélection de pesticides à rechercher a été également ajoutée l'atrazine, molécule d'intérêt fréquemment retrouvée dans les eaux en région Bretagne (Chap I, 1.5.). Le tableau 10 synthétise les propriétés physico-chimiques des pesticides pouvant avoir un effet significatif sur leur dynamique de diffusion en condition *in situ* (Chap I, 1.4.) : (i) la solubilité dans l'eau (mg/L), qui correspond à la masse du composé qui peut se dissoudre dans un volume donné d'eau ; (ii) le pKa, correspondant au logarithme négatif de la constante d'ionisation acide-base (ou constante d'acidité) Ka. Plus cette constante pKa est grande, plus la dissociation de l'espèce acide à pH donné est faible, et donc plus l'acide est faible ; (iii) le log(Kow), coefficient de partage octanol/eau, qui renseigne sur la polarité des pesticides ; (iv) la constante de Henry (Hi) ou tension de vapeur (Pa.m<sup>3</sup>/mol), qui mesure la tendance d'un composé à se répartir entre l'air et l'eau ; (v) le temps de demi-vie des molécules (DT<sub>50</sub>) dans le sol (jour), obtenu en laboratoire ou observé sur le terrain. Selon le type de composé, certains de ces paramètres peuvent varier notamment en fonction de la température et du pH du milieu, des exemples de ces variations étant indiquées dans le tableau 10.

**Tableau 11. Dates et quantités (g de matière active/ha) des pesticides épandus sur les parcelles des bandes enherbées expérimentales de la ZAA. Les quantités épandues en 2010 ne sont pas connues. La bande n°43 n'a pas été étudiée en 2012 du fait de la nature trop divergente de la culture (colza) cette année-là. Les pesticides en gras sont ceux qui sont analysables par GC-MS**

Quantité épandue de pesticides sur les parcelles agricoles de la ZAA (g/ha de matière active) selon les années															
Années		2010					2011					2012			
Parcelles correspondant aux bandes enherbées n°	113 / 114	91	109	112	43	113 / 114	91	109	112	43	113 / 114	91	109	112	
Dicamba (H)				nc					480			480	150		
Diflufénican (H)						178									
Diméthénamide-P (H)		nc	nc										318,75		
S-métolachlore (H)				nc					1000					1200	
Acétochlore (H)								1101					367		
Fluroxypyr (H)													20		
Pendiméthaline (H)		nc						800					375	400	
Bromoxynil (H)	nc		nc			127,4		135			337,5	405	60		
Ioxynil (H)						70,4									
Prochloraze (F)						315	315								
Thiaméthoxame (I)									x		x		x		
Glyphosate (H)													12,3		
Flufénacet (H)															
Cyperméthrine (I)								80							
Trifloxystrobine (F)						350	350			450					
Nicosulfuron (H)	nc	nc		nc					12		12	28	10	12	
Prosulfuron (H)				nc					7,5			7,5	3	7,5	
Foramsulfuron (H)					nc										
Iodosulfuron-méthyl-sodium (H)							4,5			4,5					
Mésosulfuron-méthyl-sodium (H)							4,5			4,5					
Tribénuron-méthyl (H)							3,6								
Metsulfuron méthyl (H)							3,6								
Epoxiconazole (F)						33,3	33,3								
Métconazole (F)						72	72			90					
Prothioconazole (F)						175	175			225					
Florasulam (H)													0,2		
Sulcotrione (H)		nc	nc	nc	nc										
Mésotrione (H)	nc								100		30	110	60	120	
Isoproturon (H)						2200									
Total pesticides						3521,1	961,5	2116	1599,5	774	379,5	1030,5	1376,3	1739,5	
N°113/114 a reçu de l'acétochlore et du S-métolachlore avant 2008, n°91 avant 2010. N°109 et 91 ont reçu du thiaméthoxame avant 2010															

N°113/114 a reçu de l'acétochlore et du S-métolachlore avant 2008, n°91 avant 2010. N°109 et 91 ont reçu du thiaméthoxame avant 2010

H : herbicide, F : fongicide, I : insecticide

nc : épandu mais quantité non communiquée, x : enrobage de semences

Les standards des pesticides sélectionnés ont été dissous dans de l'acétate d'éthyle (à 50 ou 100 µg/mL), puis analysés individuellement en GC-MS en mode « Fullscan » (ou mode TIC, Total Ion Chromatogram). En mode fullscan, le MS balaye une gamme d'ions importante (m/z : 50-550) afin d'obtenir un spectre exhaustif des ions générés pour chaque composé. L'analyse chromatographique a été réalisée sous un gradient de température constant de 6°C/min entre 70°C et 310°C, suivi d'un maintien à 310°C durant 3 min afin de nettoyer la colonne. L'analyse a permis d'obtenir les temps de rétention ( $Tr \pm 0,01$  min) et les ions majoritaires ( $m/z \pm 0,5$ ) des composés (Annexe 2) en excluant certains ions caractéristiques de la colonne et du gaz vecteur (hélium, phtalates).

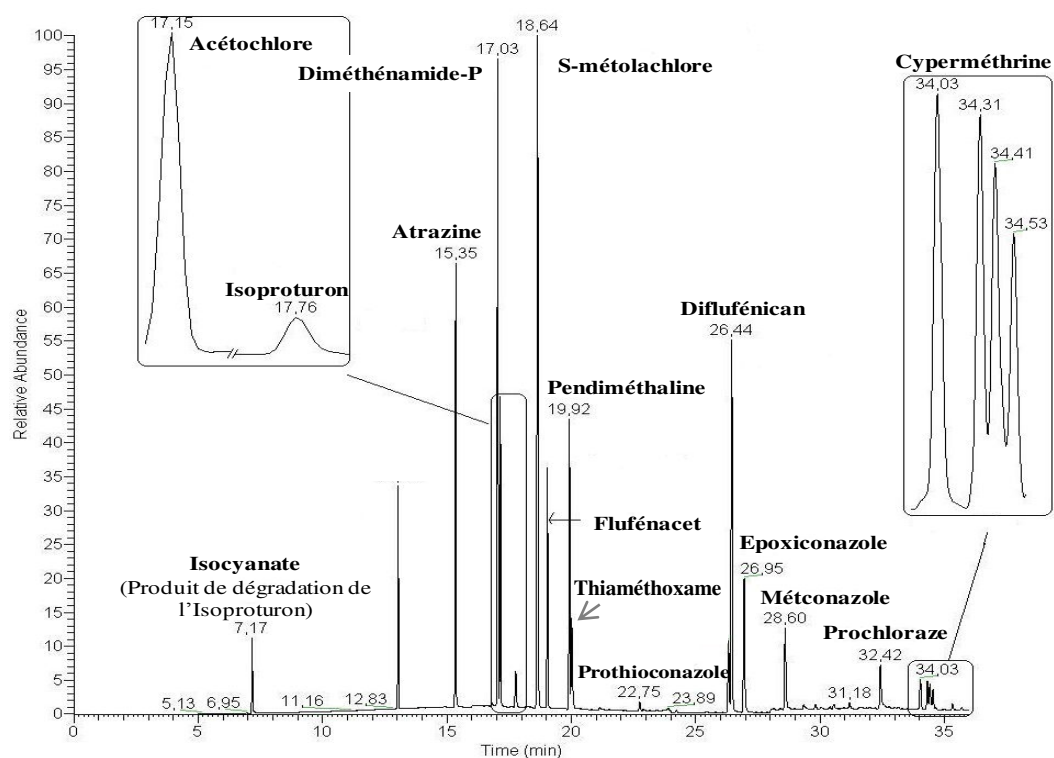


Figure 31. Chromatogramme d'analyse multirésidus en GC-MS des pesticides sélectionnés



La majorité des composés testés présente un seul pic en chromatographie. Par exemple, l'acétochlore donne un seul pic à 17,15 min avec des ions majoritaires de rapport  $m/z$  146, 162, 132, 223, 174, parmi lesquels les ions 162 et 223 sont caractéristiques de la molécule d'intérêt et abondants (Figure 31). Ces critères de sélectivité et d'abondance relative (Bouchonnet, 2009) permettent de sélectionner pour chaque analyte des ions à rechercher lors des analyses multirésidus comprenant un mélange d'analytes. Certaines molécules peuvent générer plusieurs pics en chromatographie. C'est le cas de la cyperméthrine qui révèle quatre pics (Figure 31), représentant les huit isomères de la molécule, chaque pic correspondant à une paire d'énantiomères optiques, en configuration *cis* ou *trans* (Gowland et al., 2002).

Le développement de la méthode multirésidus a ensuite nécessité l'analyse des composés en mode SIM (Selective Ion Monitoring) du MS. En mode SIM, le MS ne détecte que les ions de  $m/z$  donné, qui ont été déterminés pour chaque analyte lors de l'analyse en mode fullscan, permettant ainsi d'accroître la spécificité et la sensibilité de détection. Un mélange des différents standards aux concentrations testées précédemment (50 ou 100  $\mu\text{g/mL}$ ) a été réalisé et la détection a été optimisée par le réglage de la méthode chromatographique de l'appareil, afin de réduire le temps d'acquisition et de séparer au mieux les différents analytes présentant des temps de rétention proches. Le gradient de température du GC a été adapté (10 min à 50°C, 15°C/min de 50°C à 200°C, 1 min à 200°C, 8°C/min de 200°C à 280°C, puis 10 min à 280°C). Des fenêtres de temps regroupant un nombre limité d'ions à analyser ont été créées selon le temps de rétention des pesticides, pour optimiser le temps d'analyse de chaque ion et la sensibilité de détection des analytes correspondant. En effet, plus le nombre d'ions à détecter est important, plus le temps alloué à la quantification de chacun de ces ions est réduit, induisant une perte de sensibilité.

La figure 31 présente un chromatogramme d'analyse multirésidus des pesticides sélectionnés.

Les mélanges de standards ont été injectés à différentes concentrations (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10  $\mu\text{g/mL}$  de chaque composé ; 4 répétitions de gamme) afin d'établir la courbe de calibration de chaque composé, tracée suivant une régression quadratique ( $R^2 > 98\%$ ), par représentation de l'aire des pics en fonction de la concentration testée.

### B. Méthode d'extraction et de purification des pesticides

La détection et la quantification des pesticides d'intérêt par GC-MS peuvent être perturbées par la présence de composés matriciels pouvant présenter des temps de rétention proches et des ions similaires aux composés recherchés. Des extraits de sol non contaminés ont été

purifiés sur différents types de cartouches d'extraction en phase solide (SPE), Oasis HLB (Waters), Envi-Carb (Sigma-Aldrich) et Envi-Florisil (Sigma-Aldrich), selon le même protocole, indiqué dans le Chapitre II section 2.1.2., puis analysés en GC-MS. Les chromatogrammes obtenus présentaient peu de pics parasites, notamment pour les cartouches Oasis HLB, et les temps de rétention de ces différents pics, ainsi que les rapports  $m/z$  des ions associés étaient différents des molécules d'intérêt. La purification d'extraits de sol par SPE avec les cartouches Oasis HLB a donc été choisie pour l'analyse multirésidus de cette matrice environnementale.

De même, des échantillons témoins, correspondant à la purification d'eau ultra pure par le même protocole SPE (cartouches Oasis HLB), ont permis de mettre en évidence des pics sur les chromatogrammes correspondant à des composés libérés par la cartouche SPE, qui n'interfèrent cependant pas avec les molécules d'intérêt.

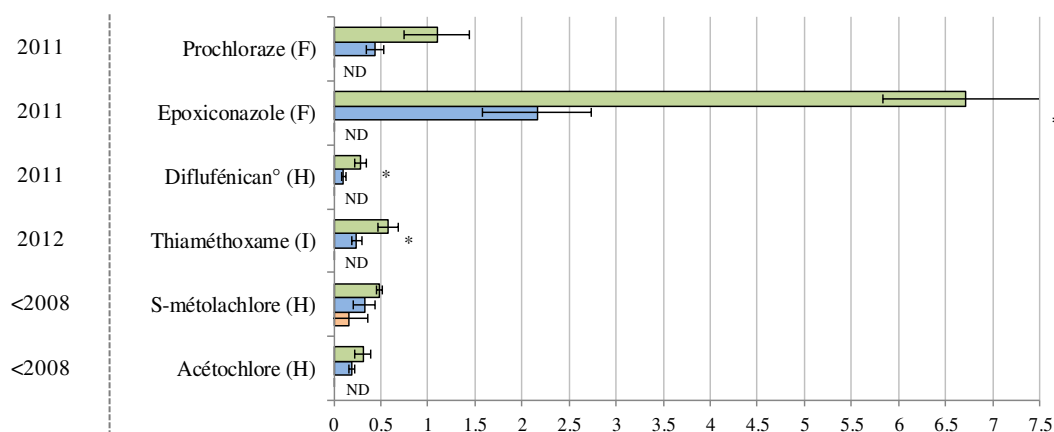
La mise au point des protocoles a également nécessité de caractériser et optimiser les rendements d'extraction et de purification des matrices environnementales. En analyse multirésidus, le solvant utilisé pour l'extraction doit être adapté pour obtenir l'extraction d'un maximum de composés. L'acétonitrile (ACN), solvant polaire aprotique, a été choisi selon la polarité des composés d'intérêt, dont certains présentaient un caractère polaire et d'autres un caractère apolaire [Log(Kow), Tableau 10]. L'ACN possède de plus une polarité proche de l'acétate d'éthyle, utilisé pour solubiliser les standards. Le protocole de purification par SPE a été établi sur la base des données bibliographiques (Barrek et al., 2009 ; Carabias-Martinez et al., 2000 ; Garon et al., 2006 ; Waters Corporation, 2008 ; Zimmerman et al., 2002), et modifié, en termes de nature et d'ordre de dépôt des solvants afin d'obtenir un éluat monophasique. Le protocole final d'extraction et de purification est décrit dans le Chapitre II, section 2.1. et en figure 22. Il présente en particulier un ajout de méthanol aux solvants de conditionnement, de lavage et d'élution, permettant d'obtenir un mélange de solvants de moyenne et forte polarité ayant une grande affinité pour la phase et la plupart des composés d'intérêt (Balnova et al., 2007).

Pour estimer un rendement global d'extraction/purification pour chaque pesticide, des échantillons de sol non contaminés ont été dopés par un mélange de pesticides à des gammes de concentrations connues, puis ont été extraits et purifiés. La concentration en pesticides dans les extraits a été quantifiée par GC-MS et a ainsi permis de déterminer le rendement global de l'analyse par comparaison à une gamme étalon de standards.

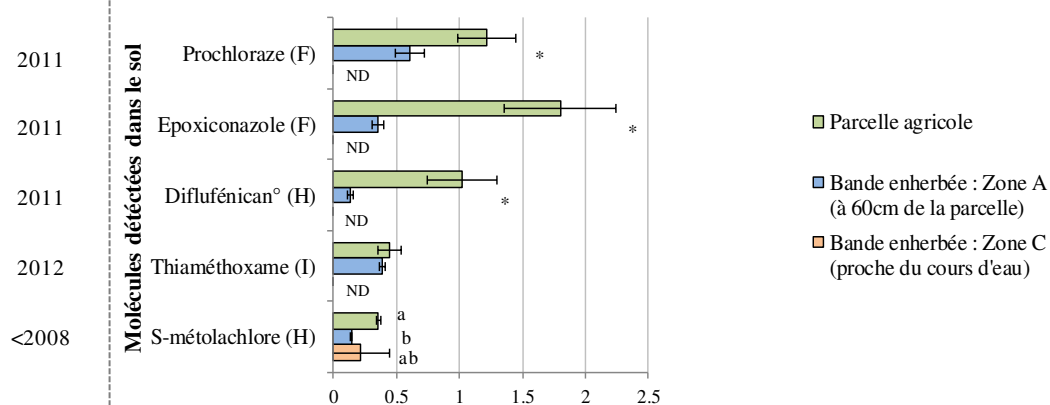
Les résultats de ces tests (Annexe 3) ont indiqué que certains composés ne peuvent pas être quantifiés de manière fiable aux doses testées, car leur présence est trop faible après

## Année d'épandage

## Bande enherbée 113



## Bande enherbée 114



## Bande enherbée 91

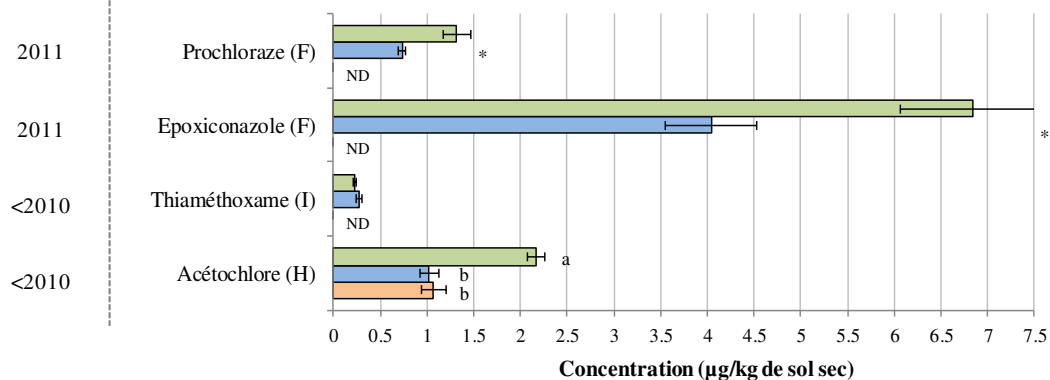


Figure 32. Quantification des pesticides par GC-MS dans la matrice sol de 2012 des parcelles agricoles et des bandes enherbées (ND : non détecté ; ° : concentrations non ajustées avec le rendement d'analyse)  
Test statistique : \* ou a/b = différence significative

extraction et purification. C'est le cas de la pendiméthaline, du prothioconazole, du diflufénican et de la cyperméthrine.

Le rendement obtenu pour les autres composés est hétérogène selon les molécules et selon les doses testées, avec dans la grande majorité des cas une perte de concentration des pesticides. Certaines molécules, comme l'atrazine, le thiaméthoxame, le diméthénamide-P et le flufénacet présentent une perte de concentration entre 2 et 40% avec la concentration attendue. L'acétochlore et le S-métolachlore présentent une différence allant jusqu'à 57%, tandis que l'époxiconazole, le métconazole et le prochloraze présentent un très mauvais rendement d'analyse selon la dose testée, avec des pertes de concentration jusqu'à 87% pour les concentrations les plus élevées.

### ***2.2.2. Gradients d'exposition aux stress chimiques entre les parcelles agricoles et les bandes enherbées***

Les échantillons de sol des bandes enherbées expérimentales sélectionnées en section 2.1. (bandes n° 91, 113 et 114) ont été analysés. La plupart des molécules épandues par les agriculteurs sur les parcelles adjacentes aux bandes enherbées (Tableau 11) et pouvant être détectées par la méthode développée ont été retrouvées dans le sol des parcelles et des bandes (Figure 32). Cela concerne principalement les molécules épandues en 2011, les matières actives utilisées en 2012 n'étant en effet pas quantifiables par la méthode de GC-MS utilisée.

Les bandes enherbées 113 et 114, qui correspondent à la même parcelle agricole, ont reçu les mêmes traitements phytosanitaires (Figure 30). Toutes les molécules quantifiables épandues sur cette parcelle, quelle que soit l'année, ont été détectées dans le sol de la parcelle et des bandes enherbées, excepté le métconazole. Il s'agit des fongicides prochloraze et époxiconazole, des herbicides diflufénican, acétochlore et S-métolachlore, tous appliqués par pulvérisation, et de l'insecticide thiaméthoxame utilisé en enrobage des semences de maïs.

Ainsi, bien que la plupart des pesticides aient été épandus en 2011, leur présence est toujours quantifiable plus d'un an après, et plus de deux ans après utilisation, pour l'acétochlore et le S-métolachlore. Toutefois, contrairement à la bande 113, la bande 114 ne présente pas d'acétochlore.

Le sol de la bande enherbée 91 a montré la présence en 2012 de 4 pesticides sur les 6 épandus et quantifiables, dont 2 molécules, le thiaméthoxame et l'acétochlore, ont été utilisées avant 2010.

Ces résultats mettent en évidence la persistance de certaines molécules dans le sol. Cette caractéristique de rémanence est commune aux trois catégories de pesticides, à savoir les

**Tableau 12. Quantification des pesticides par LC-MS/MS (plateforme scientifique Rovaltain Research Company) dans le sol de 2011 de la parcelle agricole et de la bande enherbée 114. Résultats en µg/kg ou en aire de pic/kg de sol (LD : limite de détection ; LQ : limite de quantification)**

	Parcelle agricole	Bande enherbée : Zone A			
Pesticides	Juin 2011	Juin 2011	Octobre 2011	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
Acétochlore (H)	<LD	<LD	<LD	0,5	1,5
Bromoxynil (H)	<LD	<LD	<LD	0,05	0,2
Cyperméthrine (I)	<LD	<LD	<LD	0,5	1,5
Dicamba (H)	<LD	<LD	<LD	0,55	1,8
Diflufénican (H)	42826	1541	413	<i>résultat putatif en aire</i>	
Diméthénamide-P (H)	0,30	<LQ	<LQ	0,3	0,05
Epoxiconazole (F)	5,45	1,97	2,18	0,05	0,2
Flufenacet (H)	<LD	<LD	<LD	<i>résultat putatif en aire</i>	
Fluroxypyr (H)	<LD	<LD	<LD	0,05	0,2
Ioxynil (H)	<LD	<LD	<LD	0,2	0,75
Isoproturon (H)	1,31	0,55	<LQ	0,05	0,2
Métconazole (F)	0,20	<LD	<LD	0,05	0,2
Pendiméthaline (H)	495	242	229	<i>résultat putatif en aire</i>	
Prochloraze (F)	1,41	0,66	0,58	0,05	0,2
Prothioconazole (F)	2650	764	767	<i>résultat putatif en aire</i>	
S-métolachlore (H)	7112	692	945	<i>résultat putatif en aire</i>	
Thiaméthoxame (I)	1090	80	52	<i>résultat putatif en aire</i>	
Imidaclopride (I)	1,5	0,23	<LQ	0,05	0,2
Alachlore (H)	2682	2096	1522	<i>résultat putatif en aire</i>	
Boscalide (F)	36786	9893	12980	<i>résultat putatif en aire</i>	
Bromuconazole (F)	9337	1251	1279	<i>résultat putatif en aire</i>	
Cadusafos (I)	124087	17458	33810	<i>résultat putatif en aire</i>	

herbicides (S-métolachlore, diflufénican et acétochlore), les fongicides (prochloraze et époxiconazole) et les insecticides (thiaméthoxame), et concerne des familles chimiques variées. La concentration de ces molécules n'est pas similaire dans le sol selon les zones analysées, ces résultats seront traités dans la section suivante (2.2.3.).

Afin d'étudier la dynamique et la persistance dans le temps des pesticides épandus, des échantillons de sol prélevés en 2011 sur la parcelle agricole et la bande enherbée 114 ont été analysés par la plateforme scientifique Rovaltain Research Company (Alixan, 26). Trois sols, prélevés dans (i) la parcelle agricole en juin 2011, après la saison des traitements phytosanitaires, (ii) la zone A de la bande enherbée en juin 2011 et (iii) cette même zone en octobre 2011, ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse quadripôle (LC-MS/MS) (Tableau 12). La méthode de screening de la plateforme n'a pas permis de quantifier certains pesticides recherchés, et seules leurs aires par masse de sol sont données à titre indicatif, en revanche d'autres pesticides n'appartenant pas à la liste des pesticides épandus ont été détectés.

Les résultats montrent que tous les pesticides retrouvés dans le sol en 2012 sont également présents dans le sol de 2011, aussi bien dans la parcelle que dans la bande enherbée (prochloraze, époxiconazole, diflufénican, S-métolachlore). C'est le cas également du thiaméthoxame, pourtant non utilisé en 2011, mais certainement avant 2008. Seules les concentrations de l'époxiconazole et du prochloraze peuvent être comparées entre les analyses du sol de 2011 et de 2012, car seules ces deux molécules ont été quantifiées les deux années. Les résultats par LC-MS/MS sont cohérents avec ceux obtenus par GC-MS en termes d'ordre de grandeur.

En 2012, la concentration retrouvée pour l'époxiconazole est inférieure à celle retrouvée en 2011, après l'épandage des molécules, indiquant une disparition de plus de 60% de la molécule dans la parcelle et de plus de 80% en zone A. La dynamique temporelle observable avec les analyses de sol d'octobre 2011 montre que les concentrations en époxiconazole et prochloraze restent relativement stables à quelques mois d'intervalle. Ce n'est pas le cas pour toutes les molécules, certaines (7 composés) montrant une diminution de leur concentration entre juin et octobre 2011 (Tableau 12).

Cette analyse par LC-MS/MS permet de mettre en évidence la présence d'autres pesticides, initialement non ciblés, car non utilisés ces dernières années par l'agriculteur : l'imidaclopride, l'alachlore, le boscalide, le bromuconazole et le cadusafos (Tableau 12). Ainsi, ces résultats confirment que certaines molécules sont particulièrement persistantes dans

le sol. Le tableau 10 permet en effet de comparer les  $DT_{50}$  (temps de demi-vie de la substance) des pesticides, et de montrer que l'époxiconazole, le prochloraze, le diflufenican et le thiaméthoxame possèdent des  $DT_{50}$  très longs. A l'inverse, certains pesticides sont peu persistants dans le sol, tels que le bromoxynil (épandu en 2010 et 2011) et l'ioxynil (épandu en 2011), qui possèdent des  $DT_{50}$  très courts, expliquant qu'ils ne soient pas retrouvés au sein de la parcelle en 2011.

Ces analyses témoignent de la présence en dehors des zones agricoles de pollutions complexes des sols par les pesticides. Ces pollutions sont en effet caractérisées par de nombreuses molécules à des concentrations variées, certaines pouvant persister plusieurs années. Les organismes localisés à proximité des zones d'utilisation de produits phytosanitaires sont donc potentiellement exposés à cette multiplicité de stress chimiques, notamment les organismes immobiles tels que les plantes.

Cependant, la fraction de pesticides biodisponibles pour les plantes est principalement celle qui est dissoute dans l'eau. C'est pourquoi nous avons cherché à quantifier les molécules dans l'eau du sol des bandes enherbées. L'eau prélevée dans les bandes enherbées en zones A et C ne présente aucun des pesticides recherchés par la méthode GC-MS multirésidus décrite précédemment, les concentrations des molécules étant en dessous des limites de détection avec ce type d'appareillage et d'analyse. Cependant, certaines molécules xénobiotiques semblent être présentes dans ce compartiment environnemental, à très faibles doses, des pics présentant leurs ions caractéristiques ont été détectés au temps de rétention correspondant (résultats non présentés).

### ***2.2.3. Effets des bandes enherbées sur la limitation de la diffusion des pesticides***

La figure 32 montre que la concentration des pesticides retrouvés dans la zone A de chaque bande enherbée est, dans la majorité des cas, significativement inférieure à celle retrouvée dans la parcelle cultivée. C'est le cas notamment pour l'époxiconazole, le diflufenican et le prochloraze (excepté pour la bande 113, où la tendance est cependant importante), mais aussi l'acétochlore pour la bande 91, le S-métolachlore pour la bande 114 et le thiaméthoxame pour la bande 113. Inversement, le thiaméthoxame se retrouve en concentration équivalente dans le sol de la parcelle et de la zone A des bandes 114 et 91.

L'ensemble des résultats indique que les bandes enherbées expérimentales ont assuré leur fonction de zone tampon d'épuration et que leur rôle dans la limitation de la diffusion des pesticides en dehors des zones cultivées est effectif, avec une diminution de la concentration des pesticides dès les 60 premiers centimètres de la bande enherbée (zone A). Les analyses de



sol indiquent que très peu de molécules sont détectées dans les zones C, qui sont les zones les plus éloignées de la parcelle agricole et les plus proches des cours d'eau. Le S-métolachlore est cependant détecté dans la zone C des bandes 113 et 114, mais il est uniquement présent sur 2 des 5 transects et à des doses très variables, ce qui induit une variance importante et une absence de différence significative avec la concentration de la zone A. Seul l'acétochlore est détecté dans les 5 points d'analyse de la zone C de la bande 91, à des concentrations similaires à la zone A. Ainsi, une distance de 5 mètres a permis, dans les conditions des bandes enherbées de la ZAA, une diminution très importante des pollutions de pesticides.

### 2.3. Discussion

Les tests de rendement d'analyse ont révélé que certains pesticides contenus dans le sol n'étaient plus quantifiables après les étapes d'extraction et de purification, et que certains autres analytes présentaient une perte importante et hétérogène de leur concentration selon les doses testées. Ces pertes d'analytes peuvent provenir des protocoles d'extraction et/ou de purification. Concernant l'extraction des pesticides de matrices solides, les méthodes classiques consistent à extraire les composés de la matrice à l'aide d'un solvant, en y associant une action mécanique (mélange et/ou ultrasons). Les difficultés en lien avec l'analyse multirésidus résident dans le fait que, selon les propriétés physico-chimiques des composés d'intérêt, la désorption du composé de la surface de la matrice et sa solubilisation dans le solvant d'extraction sont dépendantes du solvant utilisé et des interactions entre le composé et la matrice. Le choix du solvant pose ainsi problème quand le nombre de composés à extraire simultanément augmente et que leurs caractéristiques, en particulier leur polarité, diffèrent (Anastassiades et Lehotay, 2003 ; Hercegová et al., 2007), comme c'est le cas dans la présente étude [Log(Kow) dans le tableau 10]. L'acétonitrile, pourtant fréquemment utilisé en analyse multirésidus (Gonzales-Rodriguez et al., 2008 ; Pizzutti et al., 2009 ; Waters Corporation, 2012), peut ainsi conduire à une extraction plus ou moins efficace des différents pesticides d'intérêt.

Les cartouches SPE, qui peuvent être utilisées directement pour l'extraction de pesticides d'échantillons d'eau ou pour purifier des extraits obtenus après extraction de matrices solides, bien que couramment employées (Balinova et al., 2007 ; Garon et al., 2006), peuvent également affecter le rendement global d'analyse. La technique supportée par ces cartouches s'apparente à un processus de chromatographie dans lequel les pesticides contenus dans l'échantillon aqueux sont retenus par la phase solide stationnaire de la cartouche qui est un adsorbant. Si les composés d'intérêt présentent une forte affinité avec l'adsorbant, ils seront

fixés au cours de la percolation de l'échantillon. Puis, après élimination des interférents de la matrice par lavage avec un solvant n'altérant pas la rétention du composé d'intérêt sur l'adsorbant, les pesticides sont élués par un solvant permettant de rompre les interactions adsorbant-analyte (Anastassiades et Lehotay, 2003 ; Hennion, 1999 ; Hercegová et al., 2007 ; Sabik et al., 2000). Le choix de la nature de l'adsorbant, des solvants de lavage et d'élution est ainsi très important et dépend des caractéristiques physico-chimiques des composés d'intérêt, ainsi que de la matrice environnementale. Or, comme précédemment, l'analyse multirésidus implique de nombreux pesticides qui ne possèdent pas les mêmes propriétés. Malgré l'utilisation d'une cartouche SPE permettant l'extraction d'un grand nombre de composés chimiques, du fait de ses caractéristiques à la fois hydrophile et lipophile (Oasis HLB), et l'utilisation d'un solvant éluant de large compatibilité, certains pesticides peuvent ne pas être adsorbés lors de la percolation, être désorbés lors du lavage ou encore ne pas être désorbés lors de l'élution. L'utilisation en tandem de cartouches d'adsorbant de nature et de polarité diverses pourrait réduire les pertes à cette étape de l'analyse.

Malgré ces rendements d'extraction hétérogènes, les résultats des analyses de sols indiquent la présence de pesticides. La plupart des pesticides retrouvés ont été épandus sur les parcelles plus d'un an avant les échantillonnages, et quelques-uns plus de deux ans auparavant, ce qui témoigne de la persistance de certaines molécules dans les compartiments environnementaux. Cette persistance est influencée par de nombreux facteurs et par une variété de processus complexes, la rétention des pesticides dans les sols et leur dégradation étant les deux principaux (Chap I, 1.3. ; Arias-Estévez et al., 2008 ; Barriuso et al., 2005 ; Fenner et al., 2013 ; Koskinen et al., 2001). La dégradation, contrôlée par des facteurs abiotiques et biotiques, est en effet fondamentale dans la diminution de la quantité de résidus dans le sol. Les transformations abiotiques sont la résultante de réactions chimiques non-enzymatiques telles que des réactions photochimiques, d'oxydation, de réduction, de conjugaison ou d'hydrolyse (Kookana et al., 1998 ; Marcheterre et al., 1988 ; Van der Werf, 1996). Les dégradations biotiques sont majoritairement dues aux interactions entre les pesticides, les micro-organismes présents dans le sol et les plantes. Ces pesticides subissent alors des altérations chimiques d'origine enzymatique. Ces dégradations sont toutefois dépendantes de la rétention des pesticides dans le sol, qui diminue l'accessibilité ou la biodisponibilité des composés au compartiment biologique (Gevao et al., 2000). En effet, les phénomènes plus ou moins réversibles d'adsorption (transfert d'un composé de la phase liquide ou gazeuse du sol vers la phase solide) ou de désorption influencent la biodisponibilité des polluants, et de ce fait leur possibilité à être dégradés. La rétention des pesticides est dépendante de plusieurs

paramètres comme le pH, la présence d'argiles, d'oxydes, mais surtout la teneur en matières organiques du sol (Ahmad et al., 2006 ; Calvet et al., 2005 ; Passeport et al., 2011 ; Spark et Swift, 2002 ; Wauchope et al., 2002). L'importance relative de ces processus, qui influencent la persistance des pesticides, varie ainsi selon la nature chimique des molécules, les caractéristiques des sols et le climat. Le  $\text{Log}(K_{ow})$  renseigne sur la polarité des pesticides (Tableau 10), le caractère polaire [ $\text{Log}(K_{ow}) < 1,5$ ] ou apolaire [ $\text{Log}(K_{ow}) > 4$ ] influençant la fixation du composé à la matière organique et donc sa biodisponibilité. Le  $\text{pK}_a$  définit la tendance à l'ionisation des composés dans les sols de pH compris entre 5 et 8. Les pesticides acides ( $\text{pK}_a < 3$  ou 4) seront mobiles dans les sols, tandis que les pesticides basiques ( $\text{pK}_a > 10$ ) seront retenus par les sites neutralisables des minéraux des sols, les argiles notamment. Les pesticides épandus sur les parcelles agricoles de la ZAA, présentent une large gamme de polarité et de  $\text{pK}_a$  (Tableau 10), ce qui implique qu'ils ne sont pas retenus de manière identique dans le sol.

Ces phénomènes d'adsorption des pesticides sur les particules du sol peuvent en partie expliquer pourquoi nos analyses n'ont pas détecté de pesticides dans l'eau des bandes enherbées. Par exemple, le fongicide époxiconazole, quantifié dans le sol à des concentrations de 0,40 à 4  $\mu\text{g/kg}$  de sol sec, selon la bande enherbée expérimentale, mais en dessous des limites de détection dans l'eau, est une molécule hydrophobe qui est adsorbée fortement sur les particules de sol et qui se retrouve ainsi peu dans l'eau (Tableau 10 ; Jamet et Eudeline, 1992 ; Passeport et al., 2011). A l'inverse, d'autres pesticides comme le métazachlore sont hautement solubles, et peuvent facilement être désorbés (Beulke et Malkomes, 2001 ; Mamy et Barriuso, 2007 ; Passeport et al., 2011). Les pesticides ainsi dissous dans l'eau ont la capacité d'être transportés plus facilement par ruissellement ou lessivage. Nos analyses montrent que seuls le S-métolachlore et l'acétochlore pour la bande enherbée 91, pesticides de famille chimique proche du métazachlore et de forte solubilité dans l'eau (Tableau 10), sont retrouvés dans la zone de la bande enherbée la plus éloignée de la parcelle (zone C). Ils pourraient avoir été transportés sous forme dissoute dans les bandes enherbées, puis adsorbés sur les particules de sols lors de changements météorologiques ou édaphiques.

La dispersion de la fraction dissoute des pesticides peut aboutir à des concentrations dans l'eau en dessous des limites de détection, les précipitations pouvant de plus diluer les concentrations de pesticides présents. Il serait alors nécessaire d'extraire sur cartouche SPE un volume d'eau plus important afin de concentrer les molécules et de pouvoir les quantifier avec ce type de méthode (Pichon, 2000). Dans cette étude, le prélèvement d'eau du sol a été réalisé à l'aide de bougies poreuses (Chap II, 1.3.3.), qui ont permis de récolter au maximum 500 mL

par point d'échantillonnage. Il serait donc pertinent d'adapter ce matériel pour prélever davantage d'eau. L'absence de détection des composés dans l'eau peut également provenir de leur dégradation en composés de structures chimiques différentes (Schiavon, 1988) non ciblés par l'analyse multirésidus.

Cependant, la fraction solide du sol des bandes enherbées a présenté des concentrations avérées de pesticides, bien que les bandes elles-mêmes n'aient reçu aucun traitement phytosanitaire. Les pesticides épandus sur les parcelles adjacentes ont donc subi des processus de diffusion qui les ont entraînés en dehors des zones agricoles (Chap I, 1.4.). Ces processus peuvent être une dérive atmosphérique ou un transport édaphique des molécules avec le ruissellement de l'eau. La présence de thiaméthoxame au sein des bandes enherbées témoigne du transport de pesticides par ruissellement ou transport édaphique. Cet insecticide est en effet utilisé comme enrobage de semences, et n'est donc pas concerné par la dérive puisqu'il se retrouve au niveau du sol avec les graines. Sa bonne solubilité implique un passage sous forme dissoute dans l'eau et une dispersion facilitée (Tableau 10). La dérive atmosphérique peut également jouer un rôle important dans la dispersion des polluants, la plupart étant épandus par pulvérisation. La dérive dépend de la volatilité des composés. Selon la tension de vapeur (constante de Henry,  $H_i$ ), un pesticide donné aura tendance à diffuser dans l'air ( $H_i > 10^{-4}$ ) ou à se retrouver majoritairement dans l'eau ( $H_i < 10^{-6}$ ) (Davis et al., 2003). Les pesticides retrouvés dans les bandes enherbées ont tous une capacité de volatilité importante, excepté le thiaméthoxame, ce qui signifie que leur transfert vers les milieux extérieurs aux parcelles agricoles peut s'être effectué aussi par dérive (Tableau 10).

Les bandes enherbées expérimentales de la ZAA sont associées à une dynamique de limitation de la diffusion des polluants vérifiée pour la majorité des pesticides, avec, pour les molécules quantifiées en zone A, une absence de détection en zone C, les deux zones étant séparées d'une distance de moins de 5 m. Cette limitation de la diffusion des polluants peut être due à différents paramètres (Chap I, 3.2.), dont la diminution de la vitesse de ruissellement des eaux de surface, attribuable à la végétation qui impose une résistance à l'écoulement et augmente la perméabilité et la rugosité du sol (Dabney et al., 2006 ; Gyssels et al., 2005 ; Lin et al., 2011a ; Otto et al., 2012 ; Reubens et al., 2007). Ce phénomène facilite l'infiltration de l'eau dans le sol, ainsi que la sédimentation des particules sur lesquelles les pesticides peuvent être adsorbés. La biomasse aérienne des plantes permet également d'arrêter la dérive atmosphérique des polluants, en retenant les composés sur les tissus des parties aériennes.

La littérature montre que les zones tampons ont des efficacités variables dans la limitation de la diffusion des polluants, mais qui sont souvent supérieures à 90% (Chap I, 3.2. ; Borin et al., 2004, 2010 ; Dosskey, 2001 ; Lacas et al., 2005 ; Lin et al., 2011ab ; Mersie et al., 1999ab ; Otto et al., 2012 ; Patty et al., 1997 ; Pätzold et al., 2007 ; Reichenberger et al., 2007 ; Seybold et al., 2001 ; Syversen et Bechman, 2004 ; USDA-NRCS, 2000). Les différences d'efficacité des zones tampons sont dues à de nombreux facteurs, tels que la composition en espèces végétales, les propriétés du sol, l'emplacement et la largeur de la bande, le climat et la quantité de précipitation, les propriétés des polluants ou les conditions agro-environnementales locales (Chap I, 3.2. ; Krutz et al., 2005 ; Liu et al., 2008, 2011 ; Reichenberger et al., 2007 ; Sabbagh et al., 2009).

Ainsi, bien que les bandes 113 et 114 jouxtent la même parcelle agricole, les différences de concentrations obtenues pour certaines molécules, comme pour l'époxiconazole, peuvent être expliquées par des différences de transfert du pesticide. En effet, les deux bandes ne possèdent pas les mêmes caractéristiques de composition chimique du sol et d'intensité de pente (Tableau 13, section 3.2.1.). Ce dernier paramètre peut influencer fortement la direction et la vitesse d'écoulement des eaux de ruissellement et de ce fait la capacité de rétention des bandes (Dosskey et al., 2011 ; Otto et al., 2012). La bande 113 est située perpendiculairement à une pente de 8,5%, avec une zone contributrice plus étendue que la bande 114, qui est également perpendiculaire à la pente, mais par contre plus faible (6%).

L'analyse des pesticides dans les sols démontre donc que, dans les conditions de la ZAA, les polluants sont transportés et s'accumulent de manière significative au niveau des zones de développement et d'activité des systèmes racinaires des communautés végétales des bandes enherbées (prélèvements des échantillons de sol sur une profondeur de 30 cm), mais ils pourraient aussi être présents sur la biomasse aérienne par dépôt suite à la dérive atmosphérique. Les communautés végétales de ces zones tampons sont de ce fait confrontées à un environnement contaminé par des mélanges complexes de pesticides. La réponse des espèces végétales à ces stress chimiques peut influencer fortement leur répartition au sein des bandes enherbées selon leur capacité de tolérance, et donc influencer leur efficacité dans la limitation de la pollution. C'est pourquoi nous nous intéressons dans la suite de ce chapitre à la dynamique du compartiment végétal de ces bandes enherbées et à son lien avec les fonctions épuratrices des bandes.

### **3. Dynamique de croissance et état physiologique des espèces végétales au sein des bandes enherbées expérimentales**

#### **3.1. Introduction**

Les précédents résultats montrent que les plantes des bandes enherbées peuvent être soumises à des apports réguliers et hétérogènes en pesticides et en fertilisants, provenant de la diffusion des traitements phytosanitaires à partir des parcelles cultivées. Ces contaminations chimiques peuvent induire chez les espèces végétales des bandes enherbées des effets développementaux et physiologiques variés (Chap I, 2.), qui peuvent affecter les fonctions de zone tampon et les capacités épuratrices. En effet, les plantes jouent un rôle important dans la rétention des pesticides au sein des bandes enherbées, en réduisant physiquement, par leur biomasse et leurs architectures souterraine et aérienne, les flux d'eau de surface. Ce ralentissement du ruissellement réduit le transport du sédiment et des polluants, et augmente la sédimentation et l'infiltration de l'eau, ainsi que l'adsorption des molécules dissoutes aux particules du sol (Krutz et al., 2005 ; Lambrechts et al., 2014ab ; Lee et al., 2000 ; Reichenberger et al., 2007). De plus, les plantes peuvent modifier certains paramètres du sol qui influencent la rétention des pesticides, tels que la teneur en matière organique, et permettent également de stimuler l'activité microbienne, capable de dégrader les polluants. Or, bien que l'efficacité de ces différents processus varie selon l'espèce végétale (Krutz et al., 2005 ; Lambrechts et al., 2014ab), peu d'études ont été menées à l'échelle plurispécifique dans le but de déterminer une association optimale d'espèces. Il en résulte qu'au niveau réglementaire, si le mélange d'espèces est conseillé, seule une liste de plantes préconisées et interdites dans les semis est définie au niveau préfectoral (Chap I, tableau 2).

Dans un contexte d'exposition récurrente aux pesticides, nous avons donc étudié sur 2 ans l'évolution de la communauté végétale et les capacités de maintien des espèces au sein des 6 bandes enherbées expérimentales, en réalisant des relevés floristiques, des mesures de biomasses et des mesures de teneurs en chlorophylles. Cette analyse a également eu pour objectif d'étudier les relations entre les capacités de développement et de maintien des espèces et la distance avec la parcelle agricole qui est en lien avec les niveaux de pollution des bandes (section 2.).

### 3.2. Résultats

#### 3.2.1. Etat initial des bandes enherbées expérimentales

Les 6 bandes enherbées expérimentales, toutes situées au nord-est du département de l'Ille-et-Vilaine (35) (Chap II, Figure 19), présentent des caractéristiques différentes en termes de surface effective, de pente, d'ombrage et de composition physico-chimique du sol. Le Tableau 13 synthétise les principaux caractères de ces bandes enherbées.

**Tableau 13. Caractéristiques des bandes enherbées expérimentales de la ZAA**

Bande enherbée	Pente (%)	Direction de la pente	pH eau du sol (2010)	Matière organique (%) (2010)	Ombrage en zone C (haie à proximité)
113	8,5	vers la bande	5,75	2	non
114	6	vers la bande	6,1	2,4	oui
91	3,51	parallèle à la bande	6	1,85	oui
109	1,08	opposée à la bande	6,45	1,55	non
112	2,69	vers la bande	5,65	3,55	oui
43	3,96	vers la bande	7,45	4	oui

Le choix du semis des bandes enherbées expérimentales s'est porté sur des espèces de bordures de champs et de prairies, afin de satisfaire les exigences des agriculteurs et des chercheurs. Les bandes enherbées expérimentales dans le cadre de la ZAA constituent un objet de recherches coordonnées portant sur diverses problématiques environnementales et écologiques. Le pool d'espèces devait ainsi présenter une disponibilité en espèces à reproduction clonale, en espèces à fleurs et à pollen, posséder comme caractéristiques une capacité d'implantation facile et rapide, une pérennité dans le temps et une facilité d'entretien. De plus, les espèces devaient *a priori* pouvoir se développer et se maintenir sur les bandes enherbées. Les 9 espèces composant le semis initial des bandes enherbées expérimentales sont décrites dans le Tableau 14. Dans la suite du chapitre, afin de faciliter la lecture, seuls les noms vernaculaires seront employés.

**Tableau 14. Espèces végétales semées sur les bandes enherbées expérimentales de la ZAA en 2010 (d'après la base de données e-FLORA-sys, INPL Nancy, INRA)**

Espèce	Nom latin	Famille	Mono-(M) ou dicotylédones (D)	Cycle de vie	Hauteur (m)	Disposition de l'axe aérien (tige)	Profondeur d'enracinement maximale (cm)
Agrostis stolonifère	<i>Agrostis stolonifera</i>	Poacée	M	Pérenne	0,5 à 1	couchée à dressée	20
Anthémis des teinturiers	<i>Anthemis tinctoria</i>	Asteracée	D	Pérenne	nc	dressée	nc
Bleuet	<i>Centaurea cyanus</i>	Asteracée	D	Annuelle	0,3 à 0,6	dressée	100
Fétuque rouge traçante	<i>Festuca rubra</i>	Poacée	M	Pérenne	0,1 à 0,5	dressée	50
Fléole des prés	<i>Phleum pratense</i>	Poacée	M	Pérenne	0,3 à 0,5	dressée	40
Lotier corniculé	<i>Lotus corniculatus</i>	Fabacée	D	Pérenne	0,15 à 0,5	couchée	nc
Ray-grass anglais	<i>Lolium perenne</i>	Poacée	M	Pérenne	0,1 à 0,5	dressée	100
Sarrasin	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Polygonacée	D	Annuelle	0,3 à 0,8	dressée	70
Trèfle violet	<i>Trifolium pratense</i>	Fabacée	D	Annuelle	0,1 à 0,3	couchée	100

nc : non décrit



### 3.2.2. Evolution temporelle du couvert végétal des bandes enherbées expérimentales

Le suivi floristique, effectué en 2011 et 2012, a permis de montrer une évolution temporelle dans la composition spécifique des bandes avec le maintien ou la disparition de certaines espèces (Tableau 15). L'émergence d'espèces non semées (végétation spontanée) a également été relevée sans toutefois mener d'analyse à l'échelle de l'espèce. La bande enherbée 43 n'a pas été étudiée après 2011, car elle a été cultivée en colza, ce qui implique un mode de culture et des traitements phytosanitaires très différents des autres parcelles. Elle ne sera donc pas exploitée dans la suite des résultats.

**Tableau 15. Evolution temporelle de la composition spécifique des bandes enherbées expérimentales**

Bande enherbée	Nombre d'espèces végétales présentes sur les 9 espèces semées sur les bandes enherbées en 2010 (espèces absentes)			
	06/2011	10/2011	03/2012	06/2012
<b>113</b>	8 (Sarrasin)	8 (Sarrasin)	6 (Bleuet, Anthémis, Lotier)	6 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis)
<b>114</b>	8 (Sarrasin)	7 (Sarrasin, Bleuet)	5 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis, Lotier)	6 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis)
<b>91</b>	8 (Sarrasin)	7 (Sarrasin, Bleuet)	6 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis)	6 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis)
<b>109</b>	9	8 (Sarrasin)	5 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis, Lotier)	4 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis, Lotier, Trèfle)
<b>112</b>	7 (Sarrasin, Bleuet)	6 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis)	5 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis, Lotier)	4 (Sarrasin, Bleuet, Anthémis, Lotier, Trèfle)
<b>43</b>	8 (Sarrasin)	7 (Sarrasin, Bleuet)	-	-

- : non mesuré car culture adjacente en colza

Un an après le semis des 9 espèces sélectionnées, toutes se maintiennent sur les bandes enherbées, excepté le Sarrasin qui a disparu totalement de la majorité des bandes. L'absence de cette espèce se confirme au cours de l'année suivante, sa présence étant seulement faiblement détectée sur la bande 113 au début du printemps 2012. La deuxième espèce la moins adaptée aux conditions biotiques et abiotiques des bandes enherbées est le Bleuet, qui disparaît progressivement, de manière hétérogène selon les bandes, et qui est absent totalement sur l'ensemble des bandes en 2012. L'Anthémis suit une évolution similaire mais moins rapide, avec une disparition observée dès l'automne 2011 pour la bande 112 et au printemps suivant pour toutes les autres. Le Lotier ne se retrouve pas au début du printemps 2012, mais arrive à se maintenir sur certaines bandes (113 et 114) et à être présent en été 2012. Enfin, le Trèfle, disparaît de deux des 5 bandes (112 et 109) deux ans après le semis. En parallèle de la disparition de certaines espèces semées, le pourcentage de sol nu présent sur les bandes s'est accentué significativement entre les deux saisons estivales de 2011 et 2012 (Tableau 16). Toutefois, si l'on compare la moyenne de la biomasse sèche totale (espèces semées plus végétation spontanée) des bandes enherbées, il n'y a pas de changement entre 2011 et 2012 pour 3 des 5 bandes, ce qui indique que les espèces recouvrent moins de surface au sol, mais produisent une biomasse équivalente. De même, la végétation spontanée a

présenté une proportion stable de recouvrement et de biomasse sur les bandes entre 2011 et 2012 sur 4 des bandes enherbées. Pour les bandes 114 et 112, la biomasse totale produite par les plantes en 2012 a été plus faible. Cette diminution s'est accompagnée, pour la bande 114, d'une diminution de biomasse produite par la végétation spontanée (Tableau 16).

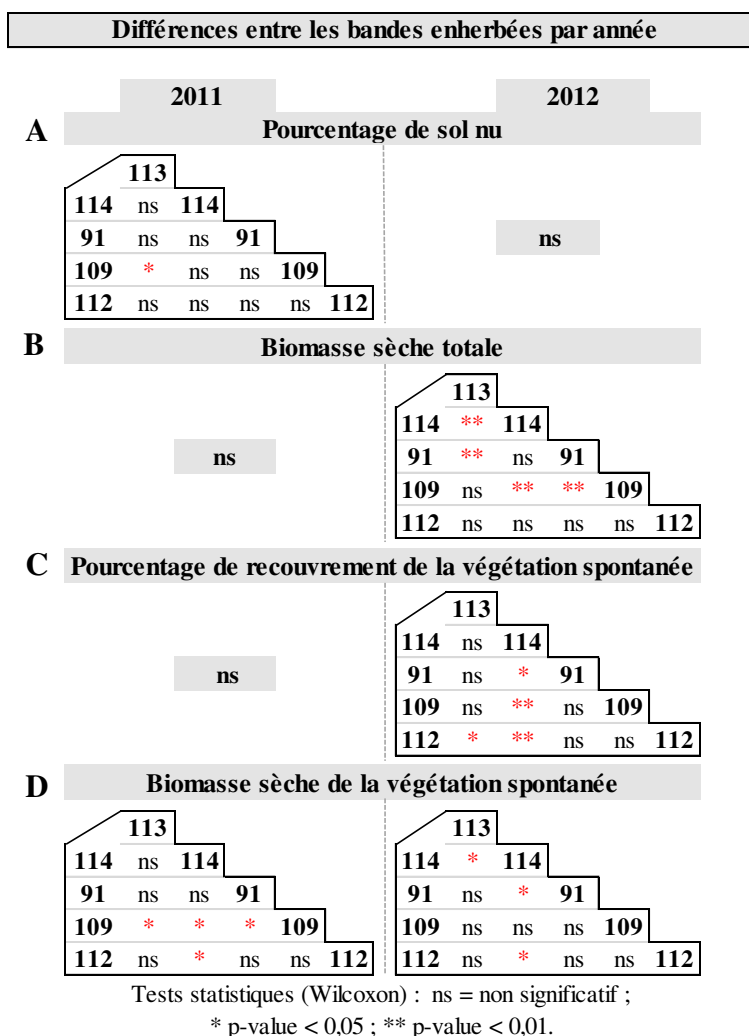
**Tableau 16. Evolution temporelle du pourcentage de sol nu, de la biomasse totale des espèces végétales, du pourcentage de recouvrement et de la biomasse de la végétation spontanée (espèces végétales non présentes dans le semis initial) des bandes enherbées expérimentales entre l'été 2011 et l'été 2012**

Bande enherbée	Pourcentage de sol nu		Différence entre dates	Biomasse sèche totale (g/m <sup>2</sup> )		Différence entre dates	Recouvrement de la végétation spontanée (%)		Différence entre dates	Biomasse sèche de la végétation spontanée (g/m <sup>2</sup> )		Différence entre dates
	06/2011	06/2012		06/2011	06/2012		06/2011	06/2012		06/2011	06/2012	
113	0,7	22,3	***	601,4 ± 60,2	631,2 ± 56,6	ns	24	20	ns	161,9 ± 61,7	175,8 ± 56,8	ns
114	6	31,3	**	475,7 ± 93,6	251,6 ± 49,3	*	20,8	14,6	ns	136 ± 32,5	48,9 ± 9,8	*
91	3,9	16,6	**	518 ± 25,7	378,4 ± 38,6	ns	22,1	27,5	ns	203,9 ± 39,9	223,6 ± 33,9	ns
109	10,7	24	♦	799,7 ± 147,8	824,3 ± 147,9	ns	25,4	32	ns	372,5 ± 72,3	526,1 ± 225,4	ns
112	7,8	24	**	713,2 ± 99,4	468,5 ± 82,1	*	37,4	33,6	ns	335,7 ± 82,6	333,3 ± 80,1	ns

Tests statistiques (Wilcoxon) : ns = non significatif ; ♦ P-value = 0,054 ; \* p-value < 0,05 ; \*\* p-value < 0,01 ; \*\*\* p-value < 0,001. Biomasse : moyenne ± SEM

La comparaison des bandes enherbées entre elles pour une même année indique que la proportion de sol nu n'est pas significativement différente entre les bandes, quelle que soit l'année (sauf en 2011 durant laquelle la bande 113 présentait significativement moins de sol nu que la bande 109) (Figure 33A). En ce qui concerne la biomasse sèche toutes espèces confondues, les bandes n'étaient pas différentes en 2011, tandis qu'une année après les écarts se sont accentués, avec certaines bandes possédant jusqu'à trois fois moins de biomasse que d'autres, comme c'est le cas entre la bande 114 et la bande 109 (Figure 33B). Ce même type d'évolution temporelle, impliquant une différence entre certaines des bandes, est observable pour la proportion de la végétation spontanée. Bien que les proportions de recouvrement de cette végétation ne soient pas différentes entre les bandes pour 2011, la biomasse sèche diffère entre certaines bandes, aussi bien en 2011 que l'année suivante, sans que les différences ne concernent les mêmes bandes (Figure 33C et D). Ainsi, bien que les bandes enherbées soient situées dans une même zone géographique, ce qui implique des conditions climatiques relativement similaires (Annexe 1), les autres paramètres abiotiques et biotiques propres à chaque bande induisent une hétérogénéité entre elles pour ces différents paramètres mesurés, hétérogénéité qui globalement augmente avec le temps.

**Figure 33. Différences statistiques entre les bandes enherbées selon les années pour les paramètres de pourcentage de sol nu (A), de pourcentage de recouvrement des espèces végétales non présentes dans le semis initial (végétation spontanée) (C) et de biomasses (B et D)**



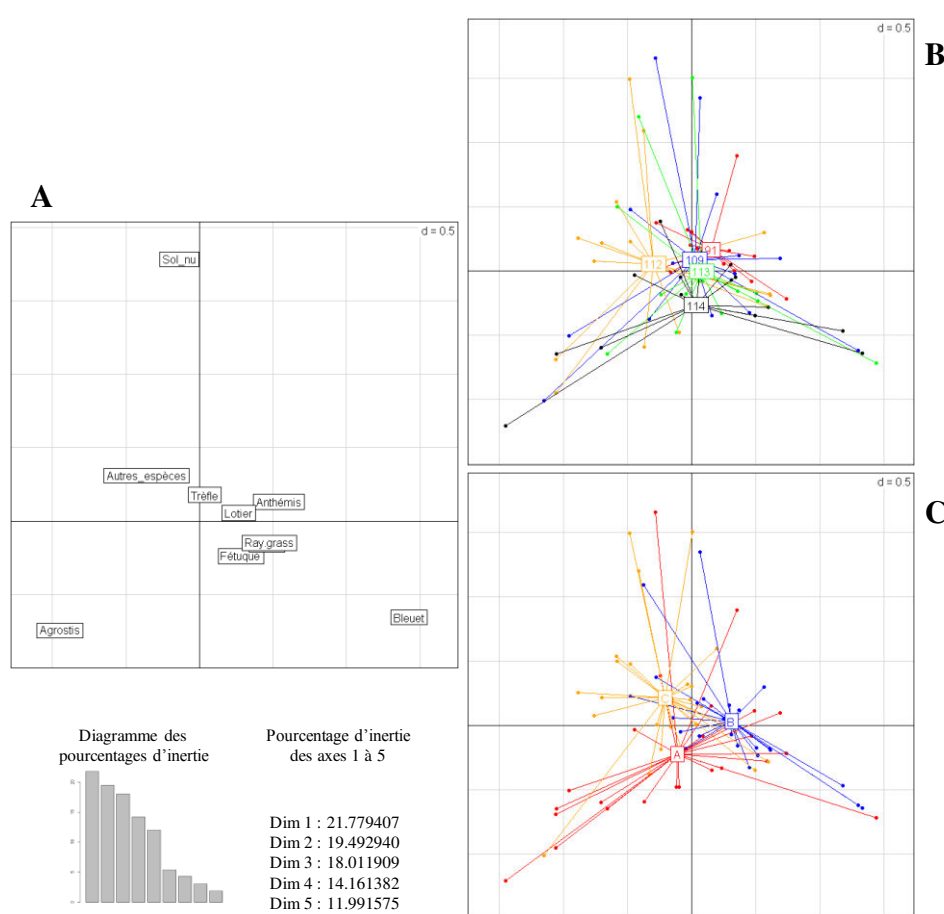
Les mesures de teneur en chlorophylles des feuilles, effectuées pour les deux années, ont permis d'estimer le développement chloroplastique de chaque espèce. Globalement les résultats n'ont pas indiqué de différences entre juin 2011 et juin 2012. Les espèces végétales des bandes enherbées possèdent donc un développement chloroplastique qui reste constant au cours du temps (Annexe 4).

### **3.2.3. Implication de la distance à la parcelle agricole dans le recouvrement spécifique des bandes enherbées expérimentales et dans l'état physiologique des plantes**

L'étude plus précise du pourcentage de recouvrement spécifique montre que les espèces semées ne se retrouvent pas dans les mêmes proportions au sein d'une bande et entre les bandes. Afin de visualiser les résultats de recouvrements spécifiques selon (i) les bandes enherbées et (ii) la distance à la parcelle agricole [zone A, située à 60 cm des cultures, zone B,

située entre 2,5 m et 4 m des cultures selon la bande, zone C située entre 4 m et 9 m des cultures (Chap II, Figure 20)], des statistiques descriptives multidimensionnelles, avec des analyses factorielles des correspondances (AFC), ont été réalisées pour les données de juin 2011 et juin 2012. L'AFC permet d'étudier la dépendance ou les éventuelles relations qui existent entre 2 variables qualitatives (dans le cas présent des proportions de recouvrement). Le but est de réduire la complexité des données, pour obtenir une représentation en 2 dimensions, tout en conservant le plus d'informations possible.

La figure 34 présente l'AFC du recouvrement spécifique selon les bandes enherbées et selon la proximité à la parcelle pour l'ensemble des 5 bandes enherbées pour l'année 2011. Cette représentation montre le lien entre l'abondance des différentes espèces (Figure 34A) et les différents points de mesures, regroupés par bande enherbée (Figure 34B) et par zone du transect (Figure 34C) selon les deux premières dimensions de l'analyse, caractérisées par l'axe 1 (horizontal) et l'axe 2 (vertical), qui expliquent plus de 41% de la variabilité totale des données.

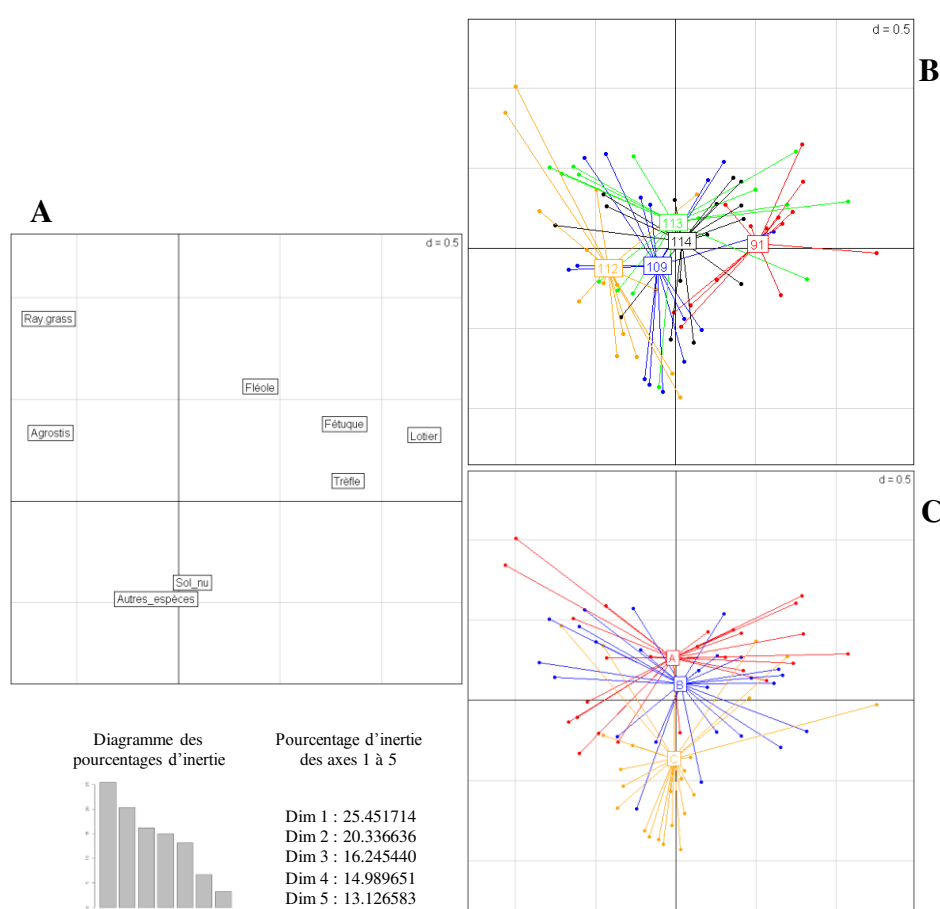


**Figure 34. AFC du recouvrement spécifique (A) selon les bandes enherbées (B) et selon la distance à la parcelle cultivée (C) en juin 2011**

L'AFC montre que les bandes enherbées en 2011 se différencient peu entre elles, les points de mesures se chevauchant pour la plupart. Aucune ne se distingue réellement (Figure 34B). C'est le cas également des différents points de mesures en zones A, B et C (Figure 34C).

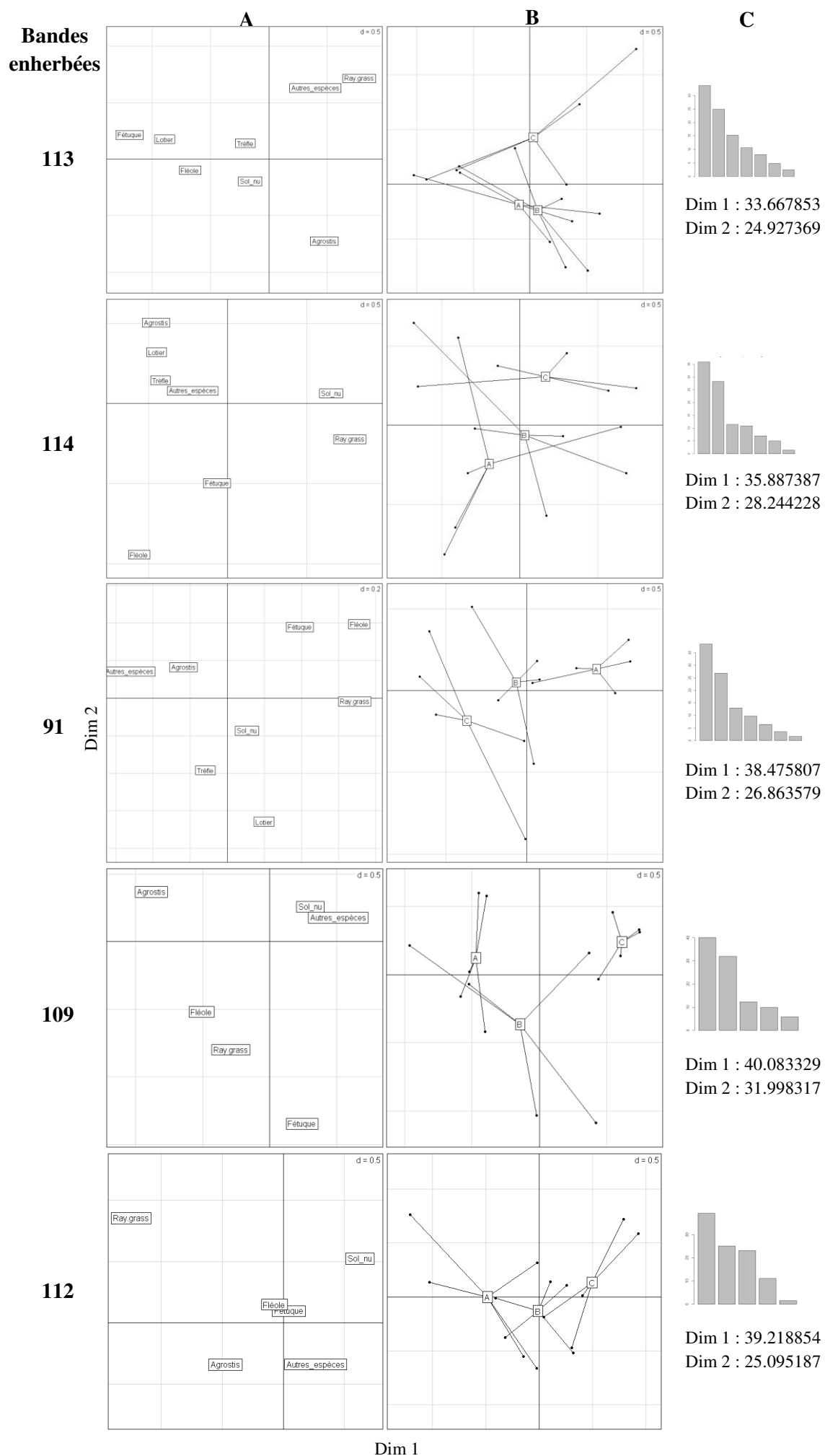
Les espèces végétales sont pour la majorité réparties au centre de l'AFC (Figure 34A), indiquant leur présence sur l'ensemble des bandes, quelle que soit la distance à la parcelle. Le sol nu, l'Agrostis et le Bleuet ont cependant une localisation éloignée, témoignant de leur proportion plus importante dans certaines des bandes et des zones dès 2011.

L'évolution temporelle, observée dans le tableau 16, est également visible avec cette deuxième AFC (Figure 35), représentant le pourcentage de recouvrement des espèces en juin 2012.



**Figure 35. AFC du recouvrement spécifique (A) selon les bandes enherbées (B) et selon la zone de proximité à la parcelle cultivée (C) en juin 2012**

Les points de mesures des différentes bandes enherbées sont davantage espacés, avec notamment une opposition des bandes 112 et 91 sur l'axe 1 (expliquant 25,5% de l'inertie). Les bandes 109, 114 et 113 sont moins différentes et se chevauchent (Figure 35B). Les points de mesures des zones A, B et C sont également plus espacés, l'axe 2 (expliquant 20,3%



**Figure 36. AFCs du recouvrement des espèces (A) selon la distance à la parcelle cultivée (B) pour chaque bande enherbée expérimentale en juin 2012. (C : diagramme des pourcentages d'inertie et pourcentages des 2 premiers axes)**

de l'inertie) définissant un gradient de distance à la parcelle agricole, avec la zone A du côté positif de l'axe, la zone C du côté négatif et la zone B à l'intermédiaire des deux (Figure 35C). Il est donc mis en évidence que des espèces sont davantage présentes en bande 112 qu'en bande 91, comme l'Agrostis et le Ray-grass (Figure 35A). A l'inverse, la bande 91 est caractérisée par une proportion plus importante de Lotier, de Trèfle et de Fétuque. Il est de plus possible d'établir qu'en zone C des bandes se retrouvent en général davantage de sol nu et de végétation spontanée, tandis qu'en zone A sont davantage présents le Ray-grass, la Fléole et la Fétuque.

Afin d'étudier plus finement les liens entre la distance à la parcelle agricole et le type d'espèces rencontrées en 2012, les AFCs ont été réalisées pour chacune des bandes enherbées séparément (Figure 36). Les 2 premières dimensions/axes des AFCs sont alors plus fiables pour expliquer le lien entre ces deux paramètres, car 58% à 72% de la variabilité des données est expliquée par ces 2 axes selon les bandes (Figure 36C).

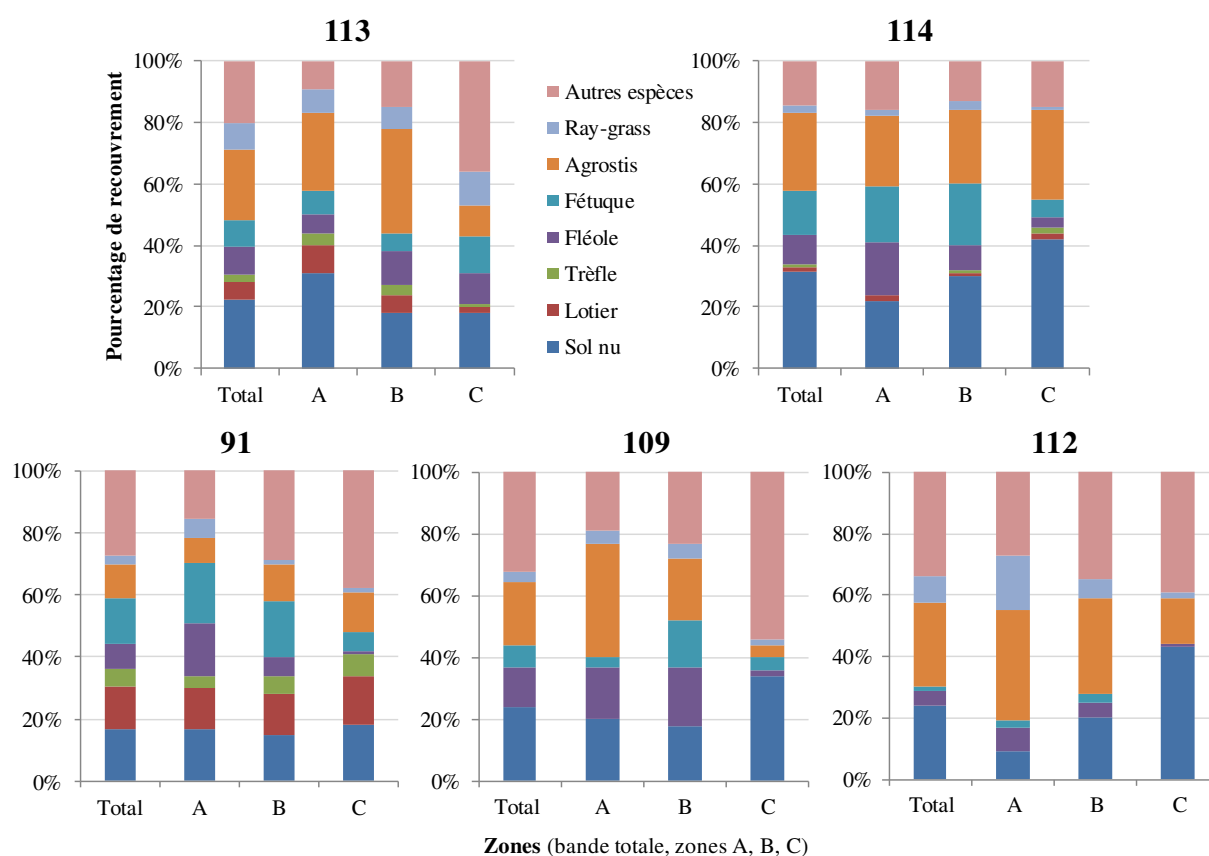
En cohérence avec ce qui avait été observé dans l'AFC globale (Figure 35), les AFCs par bande montrent pour la plupart une séparation entre les points de mesures des zones A et C, avec la zone B à l'intermédiaire des deux (Figure 36B). Plus précisément, les bandes qui présentent les contrastes les plus importants entre ces zones sont les bandes 91, 109 et 112. Ces bandes montrent une opposition des zones A et C selon l'axe 1, indiquant une proportion d'espèces différente entre la zone proche des cultures et la zone la plus éloignée. Ainsi ces trois bandes ont une proportion plus importante en zone A qu'en zone C de Ray-grass, de Fléole et d'Agrostis (Figure 36A). La bande 91 possède également en zone A plus de Fétuque. La zone C présente globalement plus de végétation spontanée et de sol nu. Ces observations sont également visibles pour les deux autres bandes, mais le contraste est moins prononcé entre les zones, et certaines bandes, comme la 113, ne suivent pas le même schéma d'organisation spécifique, avec notamment en zone A la présence de sol nu et en zone C de Ray-grass.

Les communautés végétales des bandes enherbées expérimentales possèdent donc des caractéristiques en commun, mais également des différences dans l'organisation spécifique selon la zone.

L'étude des teneurs en chlorophylles des feuilles des espèces situées en zones A, B et C de chaque bande enherbée a indiqué que ce paramètre n'est pas influencé par la distance à la parcelle agricole, et de ce fait que le développement chloroplastique des espèces est homogène au sein de la bande enherbée (Annexe 4).

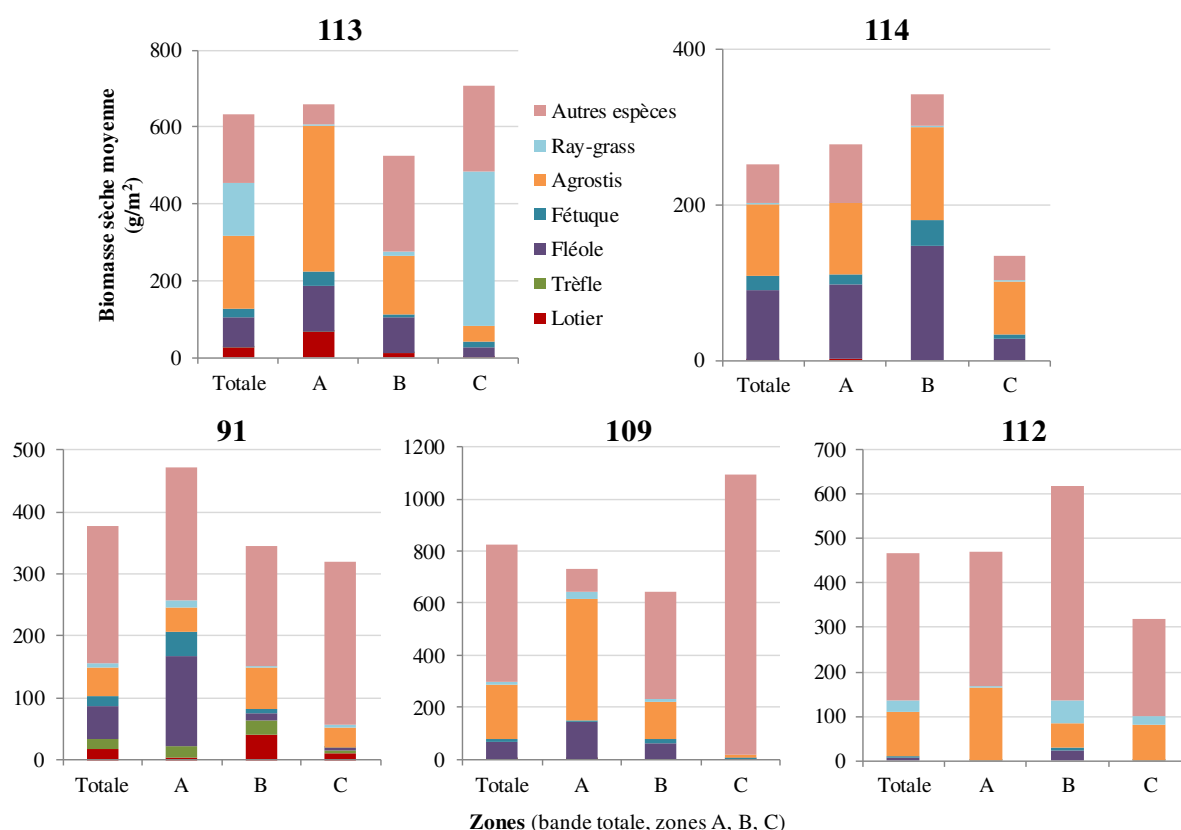


Pour compléter ces observations, la figure 37 donne une représentation graphique simplifiée (ne tenant pas compte des erreurs standards de la moyenne) de la proportion du recouvrement spécifique et du sol nu pour chaque bande en été 2012 selon la distance à la parcelle agricole.



De manière générale et pour l'ensemble des bandes, certaines espèces sont plus présentes que d'autres, telles que l'Agrostis et dans une moindre mesure la Fléole et la Fétuque. Le Ray-grass, bien qu'ayant un pourcentage de recouvrement plus faible, se retrouve sur l'ensemble des bandes enherbées, contrairement au Trèfle et au Lotier. Comme observé sur les AFCs, selon la distance à la parcelle cultivée, la proportion des espèces varie, mais de façon différente entre les bandes. Par exemple, l'Agrostis est moins présent en zone C dans les bandes 113, 109 et 112, mais se retrouve en proportion équivalente quelles que soient les zones dans les bandes 114 et 91. La Fléole est en proportion identique dans toutes les zones de la bande 113, mais pour les 4 autres bandes, cette espèce est davantage présente en zone A qu'en zone C.

Ces différences entre bandes enherbées et entre zones au sein des bandes sont visibles également sur le paramètre de biomasse végétale (Figure 38).



**Figure 38. Moyenne de la biomasse sèche des différentes espèces (g/m²) au sein de chaque bande enherbée expérimentale en juin 2012. Moyenne sur la bande entière (Totale) et par zone de distance à la parcelle cultivée (Zone A : proximité de la parcelle ; B : médiane ; C : proximité du cours d'eau. « Autres espèces » : végétation spontanée)**

Les espèces présentant la plus forte biomasse en règle générale sont l'Agrostis, puis la Fléole, suivies de la Fétuque et du Ray-grass. Ces résultats sont cohérents avec leur pourcentage de recouvrement (Figure 37), sans toutefois que ces deux paramètres ne soient corrélés statistiquement. Les différences observables entre zones sont également souvent cohérentes avec le recouvrement. En effet, l'Agrostis présente une biomasse moins importante en zone C dans les bandes 113, 109 et 112 et la Fléole une biomasse moins importante en zone C dans les bandes 114, 91 et 109. En revanche, bien que la Fléole ait un pourcentage de recouvrement supérieur en zone C qu'en zone A, sa biomasse présente un profil de réponse inversé.

Pour certaines bandes, comme la 91, la 109 et la 112, plus de la moitié de la biomasse de la bande provient de la végétation spontanée, alors que la proportion correspondante de recouvrement de la bande est moins importante. Ces espèces spontanées semblent donc produire davantage de biomasse proportionnellement aux espèces semées.

Seuls 2 points de mesures de biomasse ont été réalisés par zone A, B et C, pour ne pas trop perturber le fonctionnement des bandes enherbées. Ces données peuvent donc être moins représentatives de la réalité de chaque bande enherbée que le pourcentage de recouvrement,

pour lequel 5 points de mesures par zone ont été réalisés. De ce fait, la suite de l'analyse ciblera le paramètre de recouvrement des espèces.

### ***3.2.4. Relations entre les profils de recouvrement spécifique et les pollutions en pesticides en provenance des cultures***

Les bandes enherbées étudiées ont montré en 2012 la présence dans les zones supérieures (30 cm) du sol de mélanges de pesticides d'origine agricole (section 2.). La concentration de ces pesticides était décroissante avec l'éloignement de la parcelle cultivée, avec peu de molécules détectées en zone C. Une analyse de corrélation entre la concentration totale en pesticides et le pourcentage de recouvrement total des espèces végétales n'a pas montré de relation entre ces deux paramètres (résultats non montrés).

Afin de déterminer s'il existe tout de même un lien entre les concentrations en pesticides des sols des bandes enherbées et la répartition des espèces végétales dans ces bandes, une analyse de co-inertie a été réalisée. Cette analyse est une méthode de couplage entre deux tableaux de données, permettant d'établir si un lien significatif existe entre eux. Le tableau 17 présente le coefficient de corrélation vectorielle (RV, Robert et Escoufier, 1973) de la co-inertie et la p-value associée, qui permettent d'établir le lien entre les pesticides détectés dans le sol (Figure 32) et le pourcentage de recouvrement par espèce végétale pour la période de juin 2012 (Figure 37) dans les 3 bandes enherbées où les analyses du sol ont été faites.

**Tableau 17. Résultats des analyses de co-inertie entre les concentrations en pesticides et le recouvrement spécifique**

<b>Co-inertie</b>		
Pourcentage de recouvrement des espèces / Concentrations en pesticides		
Bandes enherbées	Coefficient RV	p-value
113	0.3432912	0.232
114	0.3189489	0.296
<b>91</b>	<b>0.657744</b>	<b>0.006</b>

La co-inertie de la bande enherbée 91 est significative et indique de ce fait que la répartition des espèces est en lien avec les concentrations en pesticides dans le sol. La figure 39 présente les résultats graphiques de ce lien avec l'axe 1 qui explique 94% de la co-inertie. La figure 39A montre la répartition des points de mesures (10 points correspondant au 5 transects de la zone A, proche de la parcelle cultivée et de la zone C, la plus éloignée de la parcelle) entre les données de recouvrement (point de départ des flèches) et de pesticides (point d'arrivée des

flèches). La figure 39B montre la répartition des espèces et la figure 39C montre la concentration des pesticides.

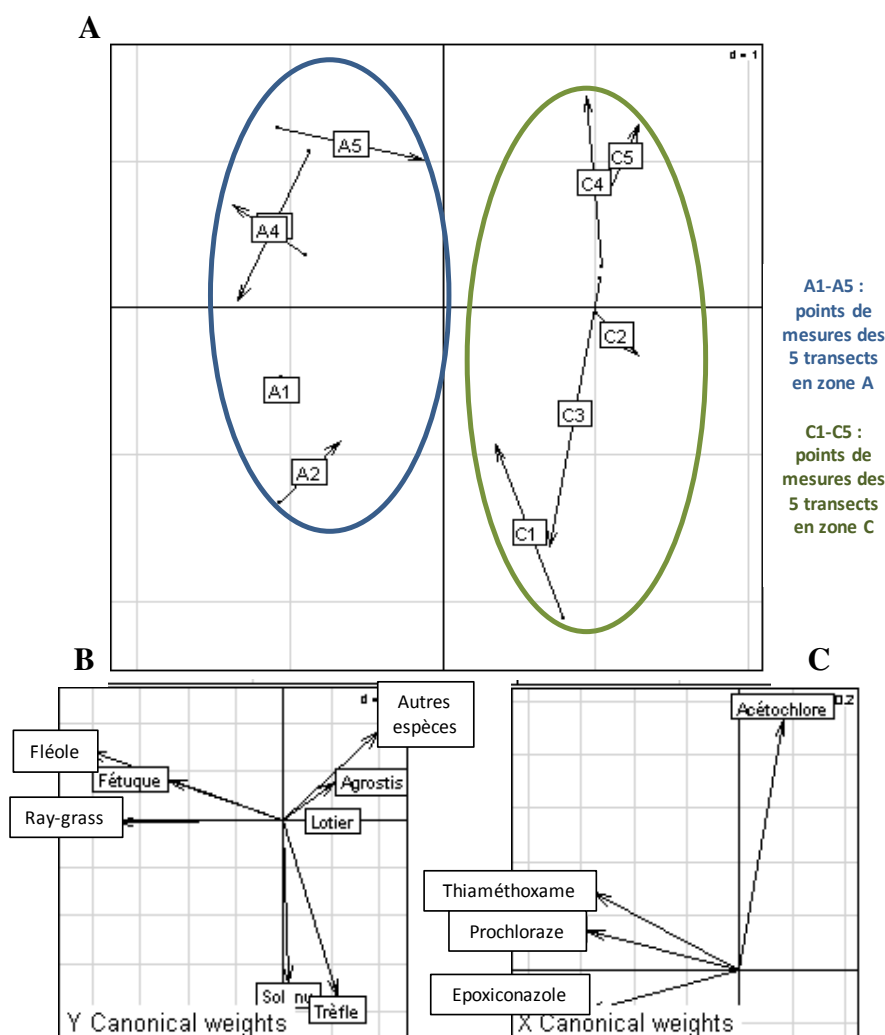


Figure 39. Analyse de co-inertie entre le pourcentage de recouvrement spécifique et les concentrations en pesticides dans la bande enherbée 91. Répartition des points de mesures (A), des espèces (B) et des pesticides (C). « Autres espèces » : végétation spontanée

L'axe 1 est caractérisé principalement par la présence de trois espèces, la Fléole, la Fétuque et le Ray-grass (Figure 39B) en lien avec la présence de thiaméthoxame (insecticide), de prochloraze (fongicide) et d'époxiconazole (fongicide) (Figure 39C). Ainsi, quand les concentrations de ces pesticides sont les plus importantes, la bande enherbée présente en majorité ces trois espèces végétales. A l'inverse lorsque le sol contient moins de polluants, la végétation spontanée, le Trèfle, le Lotier et l'Agrostis sont retrouvés. Cette analyse permet également de montrer que l'axe 1 sépare les points de mesure des 5 transects en deux groupes, correspondant à la zone A et la zone C (Figure 39A). Ceci établit de nouveau le lien entre la zone A, la plus proche de la parcelle cultivée et présentant les plus fortes concentrations en ces trois pesticides dans le sol (section 2.) et la présence de Ray-grass, de Fétuque et de Fléole.

### 3.3. Discussion

Les capacités de développement et de maintien des espèces végétales sur un lieu donné dépendent des conditions environnementales et des compétitions inter- et intra-spécifiques (Gurevitch et al., 2002 ; Mitchell et al., 2006). Les amplitudes écologiques, ou niches, diffèrent selon les espèces considérées. Certaines espèces, spécialistes de conditions environnementales particulières, sont alors incapables d'occuper des environnements contrastés, tandis que d'autres espèces ont les capacités de s'adapter à des gradients environnementaux variés (Levins, 1968). Les espèces semées sur les bandes enherbées expérimentales sont différentes de par leur cycle de vie et leur stratégie compétitive. De plus, elles ne répondent pas de la même façon aux contraintes biotiques et abiotiques particulières des bandes enherbées expérimentales de la ZAA, pour lesquelles la présence de mélanges complexes de pesticides a été mise en évidence (section 2.). Ainsi, le Sarrasin, le Bleuet et l'Anthémis ont totalement disparu des bandes un ou deux ans après leur implantation. D'autres espèces ne se sont maintenues que sur certaines des bandes, comme le Lotier et le Trèfle. Il semble donc que ces espèces dicotylédones soient peu adaptées dans ce contexte de bandes enherbées en région Bretagne. La difficulté à se maintenir d'une année sur l'autre pour le Sarrasin, le Bleuet et le Trèfle a sans doute été accentuée par leur caractéristique de plantes annuelles. Le Sarrasin, du fait de sa germination tardive observée sur le terrain, pourrait avoir subi une forte compétition pour l'espace et la lumière par les espèces se développant plus rapidement. Le Bleuet pourrait avoir disparu à cause de l'infertilité de ses graines.

La littérature témoigne de nombreux cas de perte de diversité végétale dans les milieux adjacents aux parcelles agricoles, due en partie à la diffusion des pesticides des champs vers ces zones (Andreasen et Streibig, 2011 ; De Snoo, 1999 ; Kleijn et Snoeijs, 1997 ; Marrs et Frost, 1997 ; Schmitz et al., 2013).

A l'inverse, certaines espèces ont montré des capacités de maintien dans le temps, comme l'Agrostis, le Ray-grass, la Fléole et la Fétuque, toutes monocotylédones pérennes. Néanmoins, ces espèces ne se retrouvent pas en proportions équivalentes dans les bandes, certaines ayant un pourcentage de recouvrement et une biomasse aérienne nettement plus importants (Agrostis et Fléole) que d'autres (Ray-grass, Fétuque). Ces proportions interspécifiques sont toutefois variables selon les bandes et n'évoluent pas dans le temps de la même façon.

Ces différences entre espèces peuvent être expliquées par les caractéristiques de développement et les stratégies de compétition, notamment la clonalité (Bittebiere, 2012), qui

influencent la structuration et le fonctionnement des communautés végétales.

Les espèces ont montré une teneur en chlorophylles homogène au sein de chaque bande et stable dans le temps, ce qui peut refléter un état physiologique homogène. Ce caractère n'est donc pas un marqueur sensible pour mesurer l'impact des pollutions résiduelles sur les plantes. L'apparition d'espèces qui n'étaient pas dans le semis initial, et qui peuvent provenir de la banque de graines du sol, ou d'un apport extérieur, indique que ces dernières sont particulièrement adaptées à ce type de milieu. Il serait intéressant d'étudier ces espèces, qui s'implantent et se maintiennent, et qui pourraient être favorables aux fonctions des bandes enherbées. L'évolution temporelle des bandes a montré qu'en parallèle de la disparition de certaines espèces, la proportion de sol nul a augmenté, et que les proportions des différentes espèces ont évolué selon la distance à la parcelle cultivée. Or, cette distance à la parcelle cultivée est en lien avec la concentration en pesticides contenus dans les sols, le maximum de pollution édaphique étant retrouvé à proximité de la parcelle, avec une quasi-absence de pesticides à proximité des cours d'eau. Bien que la proportion de recouvrement total des espèces ne soit pas corrélée avec la concentration en pesticides, la bande enherbée 91 a présenté un lien significatif entre la présence de certaines espèces et la quantité de polluants. Ainsi, dans les zones les plus polluées, se retrouvent en majorité le Ray-grass, la Fléole et la Fétuque.

Ces répartitions différentielles d'espèces pourraient donc être en partie expliquées par des impacts différentiels des pollutions chimiques, dépendant de la sensibilité et de la tolérance des espèces aux stress chimiques et des effets positifs ou négatifs liés à l'activité phytosanitaire des polluants. Cependant, le lien est difficile à établir en condition de terrain du fait de multiples paramètres qui influencent la dynamique des communautés. Par exemple, l'ombrage en zone C de certaines bandes peut participer à la disparition des espèces ayant besoin d'une forte luminosité, et permettre l'implantation d'espèces moins sensibles. La zone C'est notamment celle où l'on retrouve la plus forte proportion de sol nu. De plus, la zone à proximité des parcelles cultivées reçoit davantage de pesticides, mais également davantage de fertilisants, qui se dispersent par les mêmes processus de diffusion. Or, la bande enherbée ne recevant pas d'amendement et la biomasse des espèces devant être exportées, la bande peut manquer de ressources nutritives. La zone A peut ainsi favoriser l'implantation et le maintien des espèces tolérantes aux pesticides en fournissant davantage de nutriments. A l'inverse, ces apports de fertilisants ont montré dans certains cas des effets négatifs sur les plantes de bord de champ (Schmitz et al., 2013).

Afin de confirmer la tolérance de ces espèces de bandes enherbées aux pollutions agricoles suggérée par cette étude de terrain, et ainsi d'établir leur rôle possible dans la fonction épuratrice des bandes, la suite de ce chapitre a pour objectif d'étudier, en conditions contrôlées, les réponses de ces espèces aux stress chimiques.



## **4. Analyse en conditions contrôlées des effets de polluants organiques et métalliques sur la croissance des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales**

### **4.1. Introduction**

Les résultats présentés en section 3.2. ont mis en évidence une évolution des communautés végétales de bandes enherbées caractérisée par le maintien ou la disparition de certaines espèces. La dynamique des espèces végétales au sein des bandes enherbées dépend de leurs capacités de réponses aux paramètres de leur environnement, et notamment aux stress abiotiques (stress chimique, thermique, hydrique) et biotiques (comme la compétition) associés à cet environnement. En particulier, leur capacité à se développer et à se maintenir sur un milieu soumis à des flux récurrents de polluants peut dépendre de leur aptitude à faire face aux stress chimiques, les niveaux de tolérance ou de résistance aux xénobiotiques étant spécifiques de chaque espèce végétale (Chap I, 2.4.). Il était ainsi pertinent d'étudier les réponses aux polluants des différentes espèces végétales implantées dans les bandes enherbées expérimentales afin de déterminer leurs caractéristiques en termes de sensibilité et de tolérance aux stress chimiques. Une étude comparative a ainsi été réalisée en laboratoire pour mettre en évidence les réponses individuelles de ces espèces à une gamme de stress chimiques. Cette analyse a été menée en conditions contrôlées axéniques afin de s'affranchir des conditions biotiques et abiotiques du terrain, qui peuvent significativement moduler les réponses des plantes à un stress donné. La confrontation des résultats obtenus à ceux de la section 3., mettant en évidence les capacités de maintien des espèces sur le terrain, pouvait ensuite éclaircir le rôle éventuel des pollutions dans la dynamique des espèces.

### **4.2. Résultats**

Les réponses à 8 polluants organiques ou métalliques de chacune des 9 espèces semées sur les bandes enherbées de la ZAA ont été étudiées en conditions contrôlées de laboratoire (Chap II, 3.). Le choix des xénobiotiques utilisés pour ces expérimentations s'est basé sur leur implication dans des pollutions réalistes, notamment résiduelles, issues d'activités agricoles. Ainsi, l'herbicide glyphosate, son produit de dégradation l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), le produit de dégradation de l'herbicide atrazine, l'hydroxy-atrazine, et le fongicide tébuconazole ont été quantifiés au sein des paysages agricoles dans différentes études (Aronsson et al., 2011 ; Berenzen et al., 2005 ; Jablonowski et al., 2009, 2010 ; Székács et Darvas, 2012) et ont été également détectés comme polluants édaphiques résiduels en

périphérie de parcelles agricoles de la ZAA (Tableau 7 du Chap II, 3.3. et Tableau 2 du Chap IV). L'herbicide atrazine, les métaux lourds, zinc et cuivre, et le HAP fluoranthène ont aussi été détectés dans différentes pollutions péri-agricoles (Cox, 2001 ; He et al., 2005 ; Hildebrandt et al., 2009 ; Shipitalo et al., 2008).

Cette étude comparative a été réalisée en analysant les réponses des espèces à une concentration fixée pour chacun des polluants. La concentration pour chaque polluant a été déterminée par des expérimentations préliminaires sur l'accession de référence Col0 de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, caractérisée comme sensible aux xénobiotiques (Ramel et al., 2009) et aux métaux lourds (Murphy et Taiz, 1995). Le choix a été fait d'utiliser des doses entraînant un même effet sur *Arabidopsis*, à savoir une réduction de 50% de sa croissance racinaire (EC<sub>50</sub>). En effet, l'utilisation de doses entraînant une même toxicité entre polluants sur une espèce de référence, connue pour sa sensibilité, permet de comparer les réponses d'autres espèces à une concentration donnée. La détermination de l'EC<sub>50</sub> pour *Arabidopsis* a été réalisée pour chaque molécule, à l'aide de courbes dose-réponse sur une large gamme de concentrations, en mesurant la longueur des racines après 14 jours de croissance sur milieu contaminé.

#### 4.2.1. Toxicités différentielles des polluants organiques et métalliques chez *Arabidopsis thaliana*

Les résultats des EC<sub>50</sub> d'*Arabidopsis* en réponse aux différents polluants sont présentés dans le tableau 7 (Chap II, 3.3.) et dans la suite de ce paragraphe. La figure 40 illustre l'obtention de l'EC<sub>50</sub> pour le glyphosate, avec la longueur racinaire d'*Arabidopsis* en fonction de la concentration de l'herbicide. La concentration impliquant une inhibition de 50% de la croissance racinaire de la plante est ainsi sélectionnée pour la suite des expérimentations.

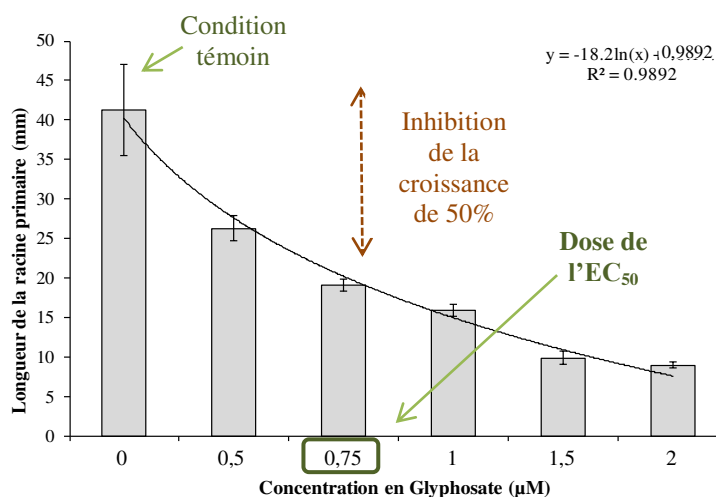


Figure 40. Détermination de l'EC<sub>50</sub> du glyphosate pour la croissance de la racine primaire chez *Arabidopsis thaliana*

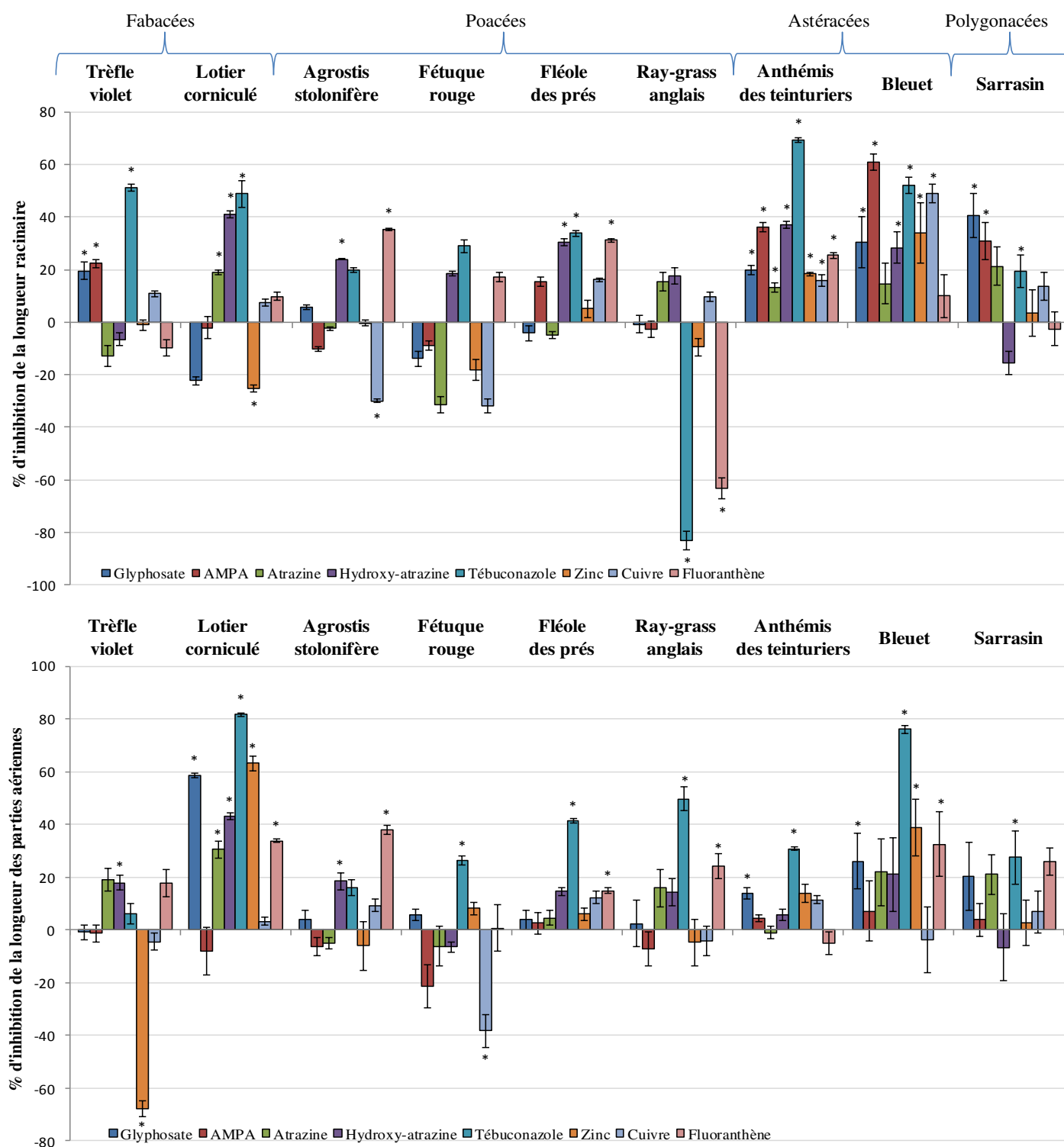


Figure 41. Inhibition de la croissance racinaire (A) et de la croissance des parties aériennes (B) des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales en présence de xénobiotiques et de métaux lourds en conditions contrôlées.

Calcul du pourcentage d'inhibition :  $\%I = \frac{L_t - L_x}{L_t} \times 100$  avec  $L_t$  : longueur du témoin et  $L_x$  : longueur de la plante exposée au stress chimique. Les longueurs statistiquement différentes du témoin sont représentées par un astérisque

Sur la base des doses nécessaires pour induire un même effet, ces  $EC_{50}$  mettent en évidence la différence de toxicité entre les composés. D'après ces  $EC_{50}$  (Tableau 7 du Chap II, 3.3), il est ainsi possible de réaliser un classement des molécules selon un ordre de toxicité décroissant : atrazine ( $0,4 \mu\text{M}$ ) > glyphosate ( $0,75 \mu\text{M}$ ) >> tébuconazole ( $4 \mu\text{M}$ ) > cuivre ( $6 \mu\text{M}$ ) > zinc ( $15 \mu\text{M}$ ) > hydroxy-atrazine ( $25 \mu\text{M}$ ) > AMPA ( $30 \mu\text{M}$ ) >> fluoranthène ( $500 \mu\text{M}$ ). Les molécules mères des pesticides, atrazine, glyphosate et tébuconazole sont les molécules ayant le plus d'impact sur la croissance racinaire, agissant à de faibles concentrations. Parmi elles, les herbicides présentent une toxicité 5 à 10 fois plus importante que le fongicide. Les produits de dégradation des herbicides, hydroxy-atrazine et AMPA, sont respectivement 62 et 40 fois moins toxiques que leur molécule mère. Les polluants métalliques ont des  $EC_{50}$  intermédiaires, le cuivre présentant une toxicité deux fois supérieure à celle du zinc. Le fluoranthène est le polluant le moins toxique pour ce qui est des effets sur la croissance racinaire.

#### ***4.2.2. Perturbations de la croissance des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales exposées aux polluants en conditions contrôlées***

Les réponses des 9 espèces végétales des bandes enherbées expérimentales à ces xénobiotiques et métaux lourds ont été étudiées par la mesure de paramètres de croissance, à savoir la croissance racinaire et la croissance des parties aériennes. Les conditions de culture, en exposition directe des graines sur les milieux pollués (croissance directe), sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes (Chap II, section 3.2.). La figure 41 représente les résultats en pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin. Le témoin correspond, pour chaque espèce, à des plantes qui se sont développées sur un milieu exempt de polluants. Des tests statistiques non-paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney ont été effectués sur les valeurs brutes pour comparer les différences de croissance entre les conditions témoin et les conditions de stress chimique. Toutes les espèces étudiées montrent des perturbations significatives de leur croissance racinaire ou aérienne pour au moins un des polluants (Figure 41).

Le tableau 18 synthétise l'ensemble des tolérances et des sensibilités des espèces de bandes enherbées aux différents polluants, à partir de la figure 41. Les tolérances, qui correspondent aux longueurs non significativement différentes du témoin, et à celles qui sont significativement supérieures en réponse au traitement chimique (pourcentage d'inhibition négatif), sont représentées par le symbole + (Tableau 18). Les sensibilités, qui correspondent aux longueurs significativement inférieures au témoin (pourcentage d'inhibition positif), sont

représentées par le symbole - (Tableau 18). Chaque symbole unitaire représente un pas de 40% de tolérance ou de sensibilité.

**Tableau 18. Tolérance (+) et sensibilité (-) des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales aux xénobiotiques et aux métaux lourds en conditions contrôlées. Quand la différence observée n'est pas significativement différente du témoin, l'espèce est considérée comme tolérante (+). La tolérance est également considérée lorsque les paramètres de croissance augmentent avec le traitement. La présence de plusieurs (+) ou (-), correspondant à un pas de 40%, indique que la différence par rapport au témoin est importante**

Espèces	Organes	Pesticides et produits de dégradation					Métaux lourds		HAP
		Glyphosate	AMPA	Atrazine	Hydroxy-atrazine	Tébuconazole	Zinc	Cuivre	Fluoranthène
<b>Trèfle violet</b>	Racines	-	-	+	+	--	+	+	+
	Parties aériennes	+	+	+	-	+	++	+	+
<b>Lotier corniculé</b>	Racines	+	+	-	--	--	+	+	+
	Parties aériennes	--	+	-	--	---	--	+	-
<b>Agrostis stolonifère</b>	Racines	+	+	+	-	+	+	+	-
	Parties aériennes	+	+	+	-	+	+	+	-
<b>Fétuque rouge</b>	Racines	+	+	+	+	+	+	+	+
	Parties aériennes	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Fléole des prés</b>	Racines	+	+	+	-	-	+	+	-
	Parties aériennes	+	+	+	+	--	+	+	-
<b>Ray-grass anglais</b>	Racines	+	+	+	+	+++	+	+	++
	Parties aériennes	+	+	+	+	--	+	+	-
<b>Anthémis des teinturiers</b>	Racines	-	-	-	-	--	-	-	-
	Parties aériennes	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>Bleuet</b>	Racines	-	--	+	-	-	-	-	+
	Parties aériennes	-	+	+	+	--	-	+	-
<b>Sarrasin</b>	Racines	-	-	+	+	-	+	+	+
	Parties aériennes	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Effets des polluants</b>	<b>Nombre de cas d'inhibition (-) sur 18</b>	7	4	3	8	13	4	2	8
	<b>Nombre d'espèces sensibles sur 9</b>	5	4	2	6	8	3	2	6

A partir de ces résultats, un potentiel de tolérance et de sensibilité de chaque espèce végétale aux polluants peut être obtenu (Tableau 19) par l'addition du nombre de cas de tolérance et de sensibilité présenté dans le tableau 18.

**Tableau 19. Potentiel de tolérance (+) et de sensibilité (-) des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales aux xénobiotiques et aux métaux lourds en conditions contrôlées. Ces potentiels sont obtenus par l'addition du nombre de cas de tolérance et de sensibilité présentés dans le tableau 18**

Espèces	Potentiel de tolérance (+)	Potentiel de sensibilité (-)	Différentiel tolérance - sensibilité
<b>Trèfle violet</b>	12	4	+8
<b>Lotier corniculé</b>	7	9	-2
<b>Agrostis stolonifère</b>	12	4	+8
<b>Fétuque rouge</b>	15	1	+14
<b>Fléole des prés</b>	11	5	+6
<b>Ray-grass anglais</b>	14	2	+12
<b>Anthémis des teinturiers</b>	6	10	-4
<b>Bleuet</b>	6	10	-4
<b>Sarrasin</b>	12	4	+8

Plus les espèces végétales possèdent un différentiel tolérance-sensibilité élevé, plus elles présentent des capacités de tolérance élevées.

#### **4.2.3. Effets polluant- et organe-dépendants des stress chimiques sur les espèces végétales des bandes enherbées**

Alors que les concentrations de polluants utilisées induisent toutes une inhibition identique de la croissance racinaire chez *Arabidopsis thaliana* (50%), l'intensité de leurs effets sur les paramètres de croissance d'une même espèce végétale de bande enherbée varie. Ainsi, si l'on prend l'exemple du Lotier, sa croissance racinaire n'est pas significativement affectée par 4 des 8 polluants testés (glyphosate, AMPA, cuivre et fluoranthène), tandis que 3 des polluants entraînent une inhibition de la longueur racinaire d'intensité différente (inhibition d'environ 20% par l'atrazine, 40% par l'hydroxy-atrazine et 50% par le tébuconazole), et, qu'à l'inverse, le zinc influence de manière positive (25%) la croissance racinaire. De plus, pour une même espèce végétale, les réponses aux polluants peuvent être différentes selon l'organe étudié. La perturbation de la croissance de la plante par le stress chimique causé par les xénobiotiques ne s'effectue donc pas de manière similaire entre la racine et la pousse. Le glyphosate entraîne, par exemple, une inhibition significative de la croissance racinaire chez le Trèfle et le Sarrasin, tandis qu'il n'affecte pas la longueur des parties aériennes. Ces effets sont inversés pour le Lotier. L'AMPA inhibe la croissance racinaire du Trèfle, de l'Anthémis,

du Bleuet et du Sarrasin, mais sans affecter leur croissance foliaire, et c'est également le cas pour l'hydroxy-atrazine chez la Fléole, l'Anthémis et le Bleuet. Le tébuconazole et le fluoranthène, à l'inverse, augmentent la longueur racinaire du Ray-grass, tandis qu'ils induisent une inhibition de la croissance foliaire chez cette même espèce. Ce type de résultat s'observe aussi avec l'effet du zinc sur le Lotier. Pour certaines espèces, les polluants entraînent des inhibitions de la croissance des deux paramètres simultanément. C'est le cas, par exemple, du glyphosate vis-à-vis de l'Anthémis et du Bleuet, de l'atrazine vis-à-vis du Lotier, de l'hydroxy-atrazine vis-à-vis du Lotier et de l'Agrostis, du tébuconazole vis-à-vis du Lotier, de la Fléole, de l'Anthémis, du Bleuet et du Sarrasin, ou du fluoranthène vis-à-vis de l'Agrostis et de la Fléole. La comparaison, pour l'ensemble des espèces, du nombre de paramètres significativement affectés par les polluants permet de mettre en évidence que les racines sont plus sensibles au stress chimique (32 effets), comparativement aux parties aériennes (23 effets).

Le tableau comparatif des effets des xénobiotiques (Tableau 18) permet de classer les polluants selon leur toxicité pour les espèces des bandes enherbées, en prenant en compte le nombre d'espèces qu'ils inhibent et le nombre d'effets négatifs sur les paramètres de croissance mesurés. Ainsi, le tébuconazole, l'hydroxy-atrazine et le fluoranthène ont des effets inhibiteurs de large spectre. Le cuivre et, de manière inattendue, l'atrazine ont les effets inhibiteurs les plus réduits. Le glyphosate, l'AMPA et le zinc ont des effets intermédiaires.

#### ***4.2.4. Réponses différentielles des espèces végétales des bandes enherbées aux polluants***

Le plus souvent, les doses utilisées n'induisent pas une inhibition de la croissance racinaire de 50%, contrairement à ce qui est observé chez *Arabidopsis*, excepté pour le tébuconazole sur le Trèfle, le Lotier, l'Anthémis et le Bleuet, et pour l'AMPA et le cuivre sur le Bleuet. Les espèces des bandes enherbées expérimentales semblent de ce fait être globalement plus tolérantes qu'*Arabidopsis* à la majorité des polluants dans nos conditions expérimentales.

Les espèces des bandes enherbées expérimentales présentent cependant des sensibilités différentes aux pesticides, même au sein d'une même famille. C'est le cas pour les Fabacées, où les parties racinaires sont fortement inhibées de manière comparable par le tébuconazole, mais où le Trèfle est plus sensible aux molécules de la famille des organophosphorés (glyphosate et AMPA), alors que le Lotier est plus sensible aux triazines (atrazine et hydroxy-atrazine). Pour les parties aériennes, le Trèfle est uniquement sensible à l'hydroxy-atrazine et très tolérant au zinc, alors que le Lotier est sensible à presque tous les polluants, excepté l'AMPA et le cuivre. Parmi les Poacées étudiées, toutes sont tolérantes au glyphosate, à



l'AMPA et à l'atrazine pour l'ensemble de la plante. D'autres réponses communes sont observables, comme l'inhibition de la croissance par l'hydroxy-atrazine et le fluoranthène chez l'Agrostis et la Fléole. Néanmoins, la croissance des racines de l'Agrostis est augmentée de 29,9% en réponse au cuivre, tandis que la fléole n'est pas significativement influencée par cette molécule. Le fluoranthène induit chez une autre Poacée, le Ray-grass, une importante augmentation des longueurs racinaires. Cette espèce est également la seule à montrer une forte augmentation (82,9%) de croissance racinaire en présence de tébuconazole.

Les deux espèces de la famille des Astéracées présentent des tendances similaires dans leurs réponses, avec une inhibition de la croissance racinaire pour presque tous les polluants, mais avec toutefois des intensités d'inhibition pour un même polluant qui diffèrent selon l'espèce. Leur croissance aérienne n'est pas affectée de la même manière. Le glyphosate et le tébuconazole perturbent la croissance de l'Anthémis et du Bleuet, mais ce dernier est également sensible au zinc et au fluoranthène. Le Sarrasin montre quant à lui une sensibilité au glyphosate, à l'AMPA et au tébuconazole et contrairement à la plupart des autres espèces, il n'est pas affecté par l'hydroxy-atrazine.

Il est intéressant de souligner que les espèces des bandes enherbées tolèrent plus souvent la molécule mère atrazine que son produit de dégradation, l'hydroxy-atrazine. Une grande majorité des espèces présente de plus une tolérance aux métaux lourds.

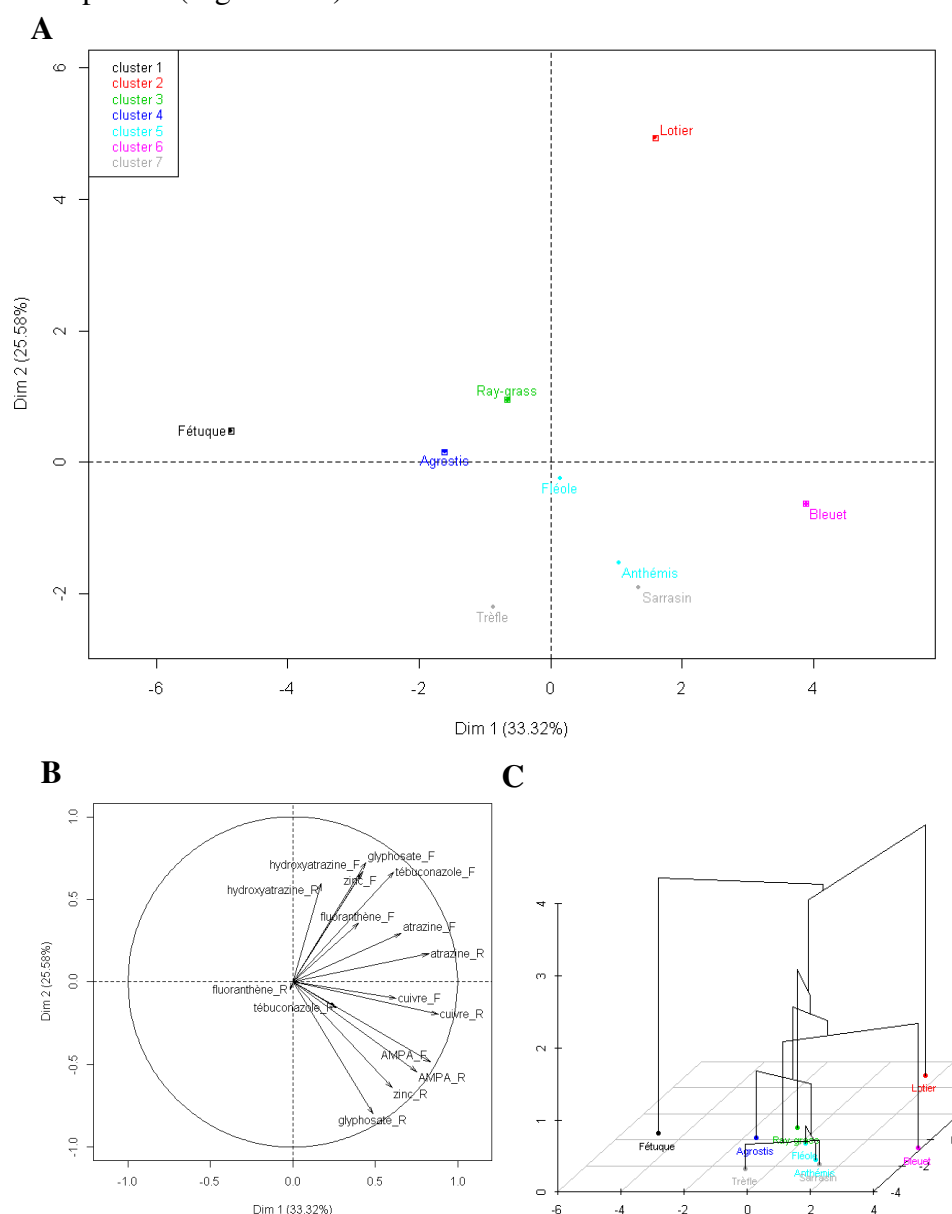
Les gammes de tolérance et de sensibilité (Tableau 19), permettent d'effectuer un classement des espèces de bandes enherbées de la plus tolérante à la plus sensible (Tableau 20).

**Tableau 20. Classement des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales selon leur potentiel de tolérance (organe-spécifique) aux 8 polluants (Figure 41 et Tableau 19) en conditions contrôlées**

Classement	Espèce	Famille	Potentiel de tolérance	
			Racines	Parties aériennes
1	Fétuque rouge	Poacées	8/8	7/8
2	Ray-grass anglais		8/8	6/8
3	Agrostis stolonifère		6/8	6/8
3	Trèfle violet	Fabacée	5/8	7/8
3	Sarrasin	Polygonacée	5/8	7/8
4	Fléole des prés	Poacée	5/8	6/8
5	Lotier corniculé	Fabacée	5/8	2/8
6	Anthémis des teinturiers	Astéracées	0/8	6/8
6	Bleuet		2/8	4/8

Certaines espèces se distinguent par des tolérances à un nombre important de polluants, tels que la Fétuque et le Ray-grass. Trois espèces présentent des niveaux similaires de tolérance, le Trèfle, l'Agrostis et le Sarrasin. La fléole a une tolérance légèrement inférieure et le Lotier présente une sensibilité plus marquée aux polluants au niveau de sa croissance aérienne. Enfin, l'Anthémis et le Bleuet sont les espèces dont la croissance est négativement influencée par le plus grand nombre de xénobiotiques et métaux lourds, et sont donc les espèces les moins tolérantes dans ces conditions expérimentales.

Une analyse en composantes principales (ACP) montre la répartition des espèces selon leurs réponses aux polluants (Figure 42A et B). L'effet de chaque traitement sur la croissance des racines (R) et des parties aériennes (F) est, dans l'ACP, indiqué par l'orientation des flèches. La classification hiérarchique associée permet de regrouper les espèces selon leur proximité en termes de réponses (Figure 42C).



**Figure 42.** Analyse en composantes principales (A et B) et classification hiérarchique (C) des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales en fonction de la réponse de leurs paramètres de croissance (R: racines, F: parties aériennes) aux polluants. Les axes indiquent les effets d'inhibition de la croissance causés par les polluants

Ces analyses confirment l'hétérogénéité des réponses interspécifiques. Les espèces les plus sensibles sont positionnées du côté positif de l'axe 1 (Dim1), caractérisé par les flèches indiquant l'effet négatif des traitements, et les espèces les plus tolérantes du côté négatif de cet axe, à l'opposé de ces flèches. Ainsi, comme cela a été établi précédemment, la Fétuque, le Ray-grass et l'Agrostis présentent une bonne tolérance aux stress chimiques. Le Trèfle, le Sarrasin, l'Anthémis, la Fléole et le Lotier ont des réponses intermédiaires et le Bleuet, positionné à l'extrémité de la partie positive de l'axe 1, est l'espèce la plus sensible. Certaines espèces apparaissent donc comme des bioindicateurs intéressants de par leurs caractéristiques de tolérance ou de sensibilité aux stress chimiques. Ces tolérances peuvent être générales ou spécifiques de certains polluants. La Fétuque semble, par exemple, être un bon bioindicateur (espèce tolérante) pour l'ensemble des stress chimiques testés. Le Lotier, au niveau des réponses de ses parties aériennes, pourrait être un bioindicateur pour sa sensibilité à l'hydroxy-atrazine, au glyphosate et au zinc principalement, et le Bleuet un bioindicateur pertinent pour sa sensibilité au cuivre.

#### 4.3. Discussion

La diversité des structures chimiques et donc des cibles biologiques, connues ou potentielles, des polluants peut expliquer les différences de réponses observées en termes d'organe affecté et d'intensité des effets. Les herbicides utilisés ont en effet des actions directes différentes sur le métabolisme végétal : l'atrazine inhibe la photosynthèse en bloquant le transport des électrons au niveau du PSII, ce qui entraîne aussi la production de ROS et donc la génération de stress oxydatif (Chap I, 2.1.), et le glyphosate inhibe la synthèse des acides aminés aromatiques (Chap I, 2.1.). Leur produit de dégradation (hydroxy-atrazine et AMPA) n'ont quant à eux pas de mode d'action clairement identifié. Le tébuconazole, en tant que fongicide, n'a pas pour cible directe les plantes. Toutefois, il a été montré qu'il peut interagir avec des cytochromes P450 dans la voie de biosynthèse des phytostérols et réduire les niveaux de gibbérellines, phytohormones agissant sur l'élongation des tiges et des feuilles (Child et al., 1993 ; Lamb et al., 2001). La cible biologique du fluoranthène reste méconnue chez les plantes. Néanmoins, le fluoranthène et plus largement les HAPs, génèrent des ROS, particulièrement dans les zones des méristèmes (Kreslavski et al., 2014 ; Zezulka et al., 2013), ce qui pourrait expliquer son large spectre d'action. Les métaux lourds, notamment le cuivre et le zinc, peuvent aussi générer un stress oxydatif qui peut perturber la croissance végétale (He et al., 2005). La génération d'un stress oxydatif peut aussi résulter des effets de tous les xénobiotiques.

Les différences de sensibilité et de tolérance observées selon l'espèce considérée mettent en évidence l'importance des différences de réponses interspécifiques au sein des bandes enherbées. Dans le cas présent, toutes les espèces possèdent des capacités de croissance en milieux contaminés supérieures à *Arabidopsis*, et l'espèce la plus tolérante est la Fétuque. Elle est en effet tolérante à tous les polluants testés au laboratoire, excepté au tébuconazole pour sa croissance aérienne. Sa tolérance, notamment aux métaux lourds et au fluoranthène, a également été montrée *in situ* par Dazy et al. (2008).

La deuxième espèce la plus tolérante est le Ray-grass. Cette espèce a déjà montré des caractéristiques intéressantes en contexte de pollutions, notamment des tolérances aux pesticides (Boucard et al., 2005 ; Carpenter et Boutin, 2010 ; Del Buono et al., 2011), à une multipollution industrielle comprenant entre autres du fluoranthène, du cuivre et du zinc (Dazy et al., 2008), et des capacités de remédiation de sols pollués en HAPs (D'orazio et al., 2013 ; Hu et al., 2012 ; Rezek et al., 2008) et en métaux lourds (Arienzo et al., 2004 ; Bidar et al., 2009 ; Pichtel et Salt, 1998). L'Agrostis, le Trèfle et le Sarrasin présentent une tolérance similaire et se situent en troisième position dans la tolérance aux xénobiotiques. Leur tolérance aux métaux lourds est confirmée par la littérature, ainsi que la sensibilité d'Agrostis aux HAPs (Dazy et al., 2009 ; Tani et al., 2005). Le Trèfle est en outre préconisé pour la phyto- et rhizodégradation des pesticides (Shaw et Burns, 2004). La Fléole est un peu moins tolérante. Les espèces plus sensibles sont le Lotier, puis l'Anthémis et le Bleuet. Ainsi les espèces de la famille des Poacées semblent posséder des caractéristiques de tolérances supérieures aux autres familles. D'autres exemples de la littérature illustrent les tolérances de certaines Poacées aux stress chimiques. Ainsi Lin et al. (2004) ont montré que *Panicum virgatum* (le Panic érigé), *Festuca arundinacea* (la Fétuque faux roseau) et *Bromus inermis* (le Brome inerme) sont tolérants aux herbicides et sont pertinents pour la bioremédiation des milieux pollués, notamment dans le cadre des zones tampons. D'après nos résultats, les Astéracées semblent être les plus sensibles aux stress chimiques, mais ce n'est pas une généralité, car, bien que le Bleuet soit considéré comme une espèce sensible aux herbicides (Jursik et al., 2009), certaines autres espèces d'Astéracées, telles que le Solidage (*Solidago canadensis*) ou la Camomille (*Matricaria recutita*), sont tolérantes aux stress chimiques (dont les métaux lourds) (Pavlovic et al., 2006 ; Yang et al., 2007). Le tournesol (*Helianthus annuus*) est par exemple souvent utilisé en phytoremédiation (Kolbas et al., 2009 ; Kötschau et al., 2014).

La communauté végétale des espèces des bandes enherbées expérimentales présente ainsi une gamme de tolérance aux polluants organiques et métalliques étendue, avec pour chaque

polluant entre 1 et 7 espèces tolérantes, théoriquement aptes à se maintenir et se développer sur le terrain. La sensibilité générale la plus forte a été observée pour le fongicide tébuconazole, appartenant à la famille des triazoles. Les espèces sensibles peuvent être pertinentes en tant que bioindicateurs de milieux pollués, le Lotier montrant une hyper-sensibilité de ses parties aériennes à l'hydroxy-atrazine, au glyphosate et au zinc notamment, et le Bleuet une hyper-sensibilité de ses racines, en particulier au cuivre. Néanmoins, pour l'utilité et la praticité d'un bioindicateur dans un contexte d'étude de pollutions *in situ*, il serait plus approprié d'utiliser un paramètre de croissance aérienne, plus directement observable. Toutefois, il est aussi possible que la sensibilité du système racinaire entraîne des effets nutritionnels à plus long terme se traduisant au niveau de la croissance aérienne. Les espèces tolérantes aux stress chimiques peuvent ainsi être favorisées et se maintenir au sein des milieux pollués, comme c'est le cas pour les bandes enherbées. Dans ce contexte, ces communautés végétales peuvent jouer un rôle prépondérant dans les processus de limitation de la diffusion des polluants, mais aussi dans des processus de phytoremédiation.

## 5. Implication des communautés végétales des bandes enherbées expérimentales dans la dynamique des pesticides

### 5.1. Introduction

Nous avons montré dans les précédents résultats de ce chapitre que les espèces végétales présentes sur les bandes enherbées expérimentales étaient soumises à des contraintes biotiques et abiotiques, et notamment à la présence d'une pollution des sols en pesticides, qui influencent leur maintien et leur dynamique temporelle. Ce maintien joue un rôle fondamental dans l'efficacité tampon de ces zones, d'un point de vue physico-chimique d'une part (He et al., 2005 ; Krutz et al., 2005), mais également d'un point de vue biologique, les plantes étant capables de réaliser des processus de phytoremédiation qui peuvent augmenter les fonctions épuratrices des bandes enherbées (Pilon-Smits, 2005). Or, peu d'études sur le rôle biologique du compartiment végétal dans la fonction épuratrice des bandes enherbées ont été menées (Krutz et al., 2005). Les niveaux de polluants pris en charge dans la biomasse végétale de ces bandes, en particulier dans les parties aériennes, suite à des processus éventuels d'absorption, de stockage et/ou de dégradation partielle ou totale, n'ont pas été étudiés. L'objectif de cette section a ainsi été d'analyser ces processus d'absorption en contexte de terrain, mais aussi en conditions contrôlées de laboratoire, afin de s'affranchir des paramètres fluctuants du terrain.

### 5.2. Résultats

#### 5.2.1. Absorption de pesticides par les communautés végétales des bandes enherbées

Les échantillons de biomasse aérienne (biomasse fraîche) récoltés en juin 2012 en zones A et C de la bande enherbée 113 ont été analysés par le laboratoire d'analyse phytosanitaire Phytocontrol (Nîmes) afin de déterminer la présence de pesticides dans les tissus. Ces échantillons, 5 par zone, correspondaient à un mélange de la biomasse aérienne des espèces retrouvées en juin 2012 sur cette bande 113. Quatre de ces échantillons par zone ont été analysés de manière ciblée en recherchant spécifiquement les pesticides ayant été épandus sur la parcelle agricole en 2011 et 2012 (Tableau 21), et dont certains ont été quantifiés dans le sol de la bande enherbée (section 3.). Pour un des transects, l'échantillon de la zone A et celui de la zone C ont été analysés en recherchant une gamme de 500 pesticides, permettant d'obtenir une vision élargie et sans *a priori* du niveau potentiel de contamination de la biomasse végétale *in situ* (Annexe 5). Ces analyses ont utilisé des méthodes GC-MS/MS ou LC-MS/MS selon les pesticides.

Tableau 21. Liste des pesticides recherchés dans la biomasse aérienne du compartiment végétal de la bande enherbée 113

Pesticides recherchés	
Herbicides	Fongicides / Insecticides (I)
Bromoxynil	<b>Epoxiconazole</b>
<b>Diflufénican</b>	<b>Prochloraze</b>
Ioxynil	Métconazole
Isoproturon	Prothioconazole
Mésotrione	<b>Thiaméthoxame (I)</b>
Nicosulfuron	

En gras : quantifié dans le sol de la bande

Seul un échantillon végétal de la zone A, la plus proche de la parcelle cultivée, a présenté une concentration en herbicide détectable et quantifiable. Il s'agissait de nicosulfuron à une concentration de  $0,017 \pm 0,01$  mg/kg de plante (MF). Ainsi, bien que des pesticides aient été quantifiés dans le sol où se développaient les plantes, ils n'ont pas été retrouvés dans la biomasse végétale. Ceci suggère que ces pesticides ont pu ne pas être absorbés par les systèmes racinaires, ou bien ne pas être transférés dans les tissus aériens ou encore ont pu subir des processus de dégradation qui ont modifié leur structure chimique et donc leur détection.

L'absorption des pesticides dépend de leur biodisponibilité et des caractéristiques de la plante telles que le type de système racinaire (Pilon-Smits, 2005 ; Trapp et al., 1994). La biodisponibilité d'un composé est liée à un ensemble de caractéristiques physico-chimiques de la molécule et d'interactions complexes de celle-ci avec le milieu. Ces paramètres influencent la capacité du sol à fixer le composé et de ce fait sa fraction disponible dans la phase aqueuse du sol. Comme pour les processus de diffusion des pesticides, les propriétés physico-chimiques du composé, qui influencent la biodisponibilité, sont notamment sa solubilité, sa tension de vapeur (constante de Henry), son poids moléculaire et son coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ , qui permet d'appréhender son caractère hydrophile ou lipophile), en lien avec le coefficient de partition avec la matière organique ( $K_{oc}$ ). Le sol de la bande enherbée 113 contenait, en 2010, 2% de matière organique (Tableau 13), impliquant ainsi que les composés non ionisés lipophiles [ $\log(K_{ow}) > 4$ ] aient pu être fortement adsorbés et piégés sur la matière organique du sol ou sur les parois racinaires, et que les composés modérément lipophiles [ $\log(K_{ow})$  entre 2 et 4] aient été les plus biodisponibles (Briggs et al., 1982). L'hydrophobicité influence également le passage du composé dans les tissus racinaires, à travers la bande de Caspari (structure subérifiée) et leur transfert vers les différents organes *via* le xylème (Mc Farlane, 1995). Un  $\log(K_{ow})$  entre 0,5 et 3 est favorable



à ces processus (Burken et Schnoor, 1998 ; Briggs et al., 1982). Selon la température et le pH du milieu, ce  $\log(Kow)$  varie. Le pH de la bande enherbée 113, autour de 6 en 2010 (Tableau 13), indique que dans la liste des pesticides épandus sur les parcelles, seuls l'isoproturon, le bromoxynil et le nicosulfuron possèdent les caractéristiques les plus adéquates pour l'absorption et le transport dans la plante. Or, nos analyses ont uniquement détecté la présence de nicosulfuron, l'herbicide le plus soluble des trois et ayant le plus faible  $\log(Kow)$  (Tableau 10), ce qui explique peut-être qu'il ait été transporté davantage dans la bande enherbée et ainsi été en contact avec les plantes. Cet herbicide n'a pas été détecté dans les plantes en zone C, très certainement du fait de la limitation de sa diffusion dans la bande enherbée (section 2.). Néanmoins le pH et les autres conditions physico-chimiques peuvent évoluer avec le temps, montrant ainsi la complexité et la difficulté de prédire les interactions entre les polluants et les organismes. Afin de s'affranchir des conditions abiotiques complexes et fluctuantes du terrain, nous avons étudié les capacités d'absorption et de dégradation des pesticides par les plantes en conditions contrôlées de laboratoire.

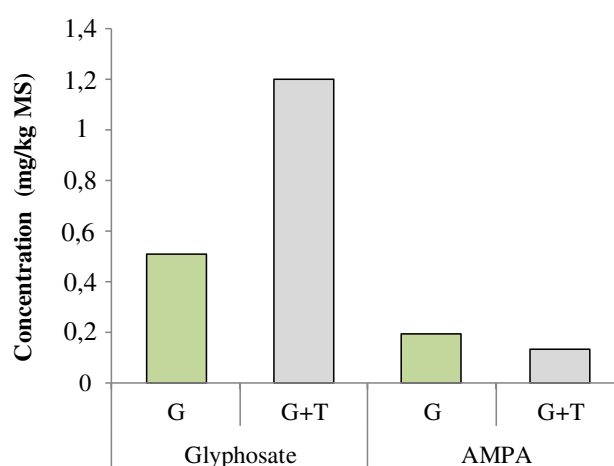
#### **5.2.2. Absorption et dégradation des pesticides en conditions contrôlées par une espèce végétale majeure des bandes enherbées (*Lolium perenne*)**

Toutes les espèces ne possédant pas les mêmes capacités d'absorption, de transfert et de dégradation des polluants, nous avons étudié une seule espèce, *Lolium perenne* (le Ray-grass anglais), qui présente une dynamique active dans les bandes enherbées (section 3.) et qui présente une tolérance intéressante aux pesticides (section 4.). Les graines de Ray-grass ont été cultivées sur du milieu liquide contenant soit un herbicide, le glyphosate (G, 0,17 mg/L = 0,75  $\mu$ M), soit un fongicide, le tébuconazole (T, 1,23 mg/L = 4  $\mu$ M), soit le mélange des deux pesticides aux mêmes concentrations que les conditions de mono-pollutions (G+T) (Chap II, 3.2.2., Figure 24B et 3.3.). Les concentrations utilisées, qui sont subtoxiques pour le Ray-grass, correspondent aux  $EC_{50}$  obtenues pour l'espèce sensible *Arabidopsis thaliana* (section 4.). Bien que l'application de ces pesticides en agriculture se fasse par pulvérisation sur les feuilles des plantes, la contamination du milieu de culture permet aux racines d'être exposées aux composés, simulant ainsi une pollution édaphique résiduelle, comme cela est souvent le cas en contexte de bandes enherbées (section 1.). Après 13 jours de croissance, ces deux pesticides et certains de leurs produits de dégradation ont été recherchés dans les plantules entières. Les analyses ont été réalisées par le laboratoire d'analyse phytosanitaire Phytocontrol (Nîmes) pour la recherche du glyphosate et d'un de ses métabolites, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) (1 seul échantillon, pool de 5 réplicats), et par la

plateforme scientifique Rovaltain Research Company (Alixan, 26) pour la recherche du tébuconazole et de ses métabolites (5 réplicats). Une liste de 15 métabolites potentiels a été établie sur la base des données de métabolisation issues de la littérature (Marie-Laure Bayle, Rovaltain Research Company, communication personnelle). Cette liste comprend des métabolites de phase I (réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse) et de phase II (conjugaisons glucose ester, sulfate et glutathion).

#### A. Absorption et dégradation du glyphosate par les plantules de *Lolium perenne*

Après 13 jours de croissance sur milieu pollué, les plantules de Ray-grass montrent dans leurs tissus la présence de l'herbicide glyphosate et de l'un de ses produits de dégradation, l'AMPA (Figure 43). La concentration en AMPA est respectivement 2 fois et 6 fois inférieure à la concentration en glyphosate pour les plantes cultivées en G et en G+T. Les plantules-témoin, qui ont poussé en milieu non pollué, ne présentent aucune trace de glyphosate ou d'AMPA.



**Glyphosate et son métabolite AMPA selon les traitements**

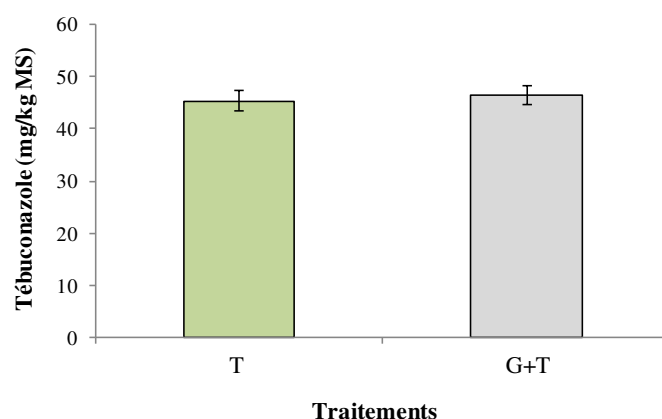
**Figure 43. Concentration en glyphosate et en AMPA dans les plantules entières (racines et pousses) de *Lolium perenne* s'étant développées sur un milieu pollué en glyphosate + tébuconazole ou glyphosate seul**

*Lolium perenne* possède donc des capacités d'absorption pour cet herbicide au niveau de ses racines. Bien que les deux types de milieu de culture aient contenu la même concentration en glyphosate (0,17 mg/L), les plantes ayant poussé sur du milieu contaminé simultanément avec du glyphosate et du tébuconazole (G+T) présentent dans leurs tissus plus de 2 fois plus d'herbicide que les plantes ayant poussé sur le milieu ne contenant que du glyphosate (G). L'absorption racinaire de l'herbicide aurait donc été stimulée par la présence du fongicide, ou alors, la dégradation du glyphosate *in planta* aurait été plus efficace en monopollution. Ceci montre dans tous les cas qu'il y a des processus d'interférence entre les dynamiques du

glyphosate et du tébuconazole au sein des plantules de *Lolium*. Cependant les deux types de milieu de culture ont abouti à une concentration relativement similaire en AMPA dans la plante. Toutefois, l'AMPA n'est pas le seul produit de dégradation possible du glyphosate, et il peut à son tour subir des transformations. Une quantification du pesticide restant dans le milieu de culture pourrait permettre d'estimer la part absorbée par les plantes de la molécule mère, et donc la part dégradée correspondante.

#### B. Absorption et dégradation du tébuconazole par les plantules de *Lolium perenne*

La présence de tébuconazole dans la plante indique que le fongicide est également absorbé, à une concentration importante (environ 46 mg/kg MS), et équivalente selon que la croissance ait eu lieu sur du tébuconazole seul ou un mélange avec du glyphosate (Figure 44). Les plantules-témoin, qui ont poussé en milieu non pollué, ne présentent aucune trace de tébuconazole.



**Figure 44.** Concentration en tébuconazole dans les plantules entières (racines et pousses) de *Lolium perenne* s'étant développées sur un milieu pollué en glyphosate + tébuconazole ou tébuconazole seul

Les métabolites du tébuconazole ont été recherchés par un traitement des données ciblant les masses exactes des structures. Cinq métabolites, correspondant à une hydroxylation du tébuconazole (mécanisme de phase I), ont été détectés (Figure 45). Au contraire, aucun métabolite de phase II n'a été identifié. Le métabolite nommé M3' provient de la rupture du groupement triazole. Sa production par métabolisation bactérienne ayant déjà été observée (Marie-Laure Bayle, Rovaltain Research Company, communication personnelle), sa présence et sa production dans la plante restent donc à confirmer par des analyses ciblées. Quatre pics de masse exacte correspondant au métabolite M2 ont été détectés. Ces pics, notés M2a, b, c et d, pourraient correspondre à des isomères de la molécule, chaque pic pouvant être associé à une paire d'énantiomères optiques, en configuration cis ou trans. La masse de ce métabolite,

correspond également au composé M5 (Figure 45), la différence étant une hydroxylation sur des positions différentes. La confirmation de la structure détectée nécessitera des analyses de fragmentation.

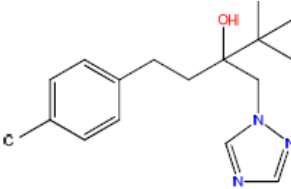
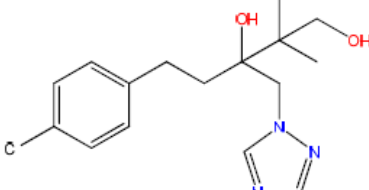
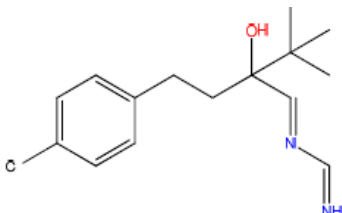
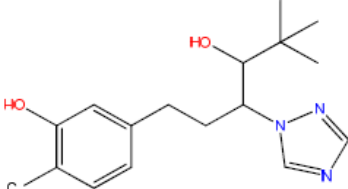
Nom	Formule chimique	Structure
Tébuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	
M2 a, b, c, d	$C_{16}H_{22}ClN_3O_2$	
M3'	$C_{15}H_{21}ClN_2O$	
M5	$C_{16}H_{22}ClN_3O_2$	

Figure 45. Formule et structure chimique du tébuconazole et de ses métabolites putatifs retrouvés dans les plantules entières de *Lolium perenne*

L'aire de chacun des 5 métabolites putatifs selon le traitement (T ou G+T) est représentée en Figure 46. Ces résultats sont préliminaires et la quantification réelle de ces métabolites nécessite le passage de standards de référence pour chacun. Les valeurs d'aires de ces métabolites sont de 10 à 100 fois moins élevées que celle de la molécule mère.

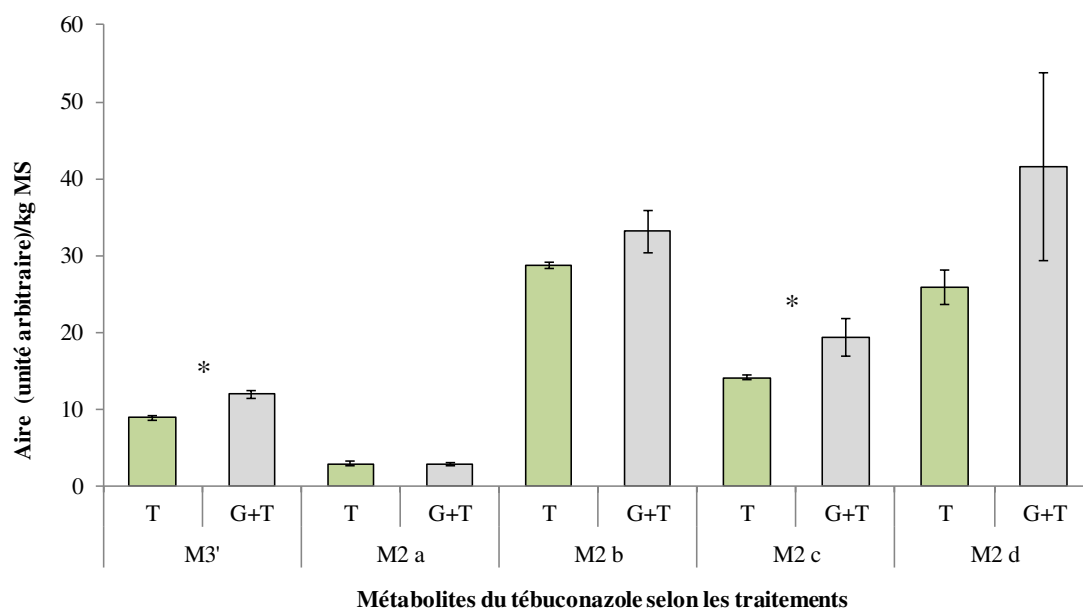


Figure 46. Abondance des métabolites du tébuconazole dans les plantules entières de *Lolium perenne* s'étant développées sur un milieu pollué en glyphosate + tébuconazole ou tébuconazole seul

Ces différents métabolites sont retrouvés en plus grande concentration dans les plantes ayant poussé sur le mélange du fongicide et de l'herbicide (différences significatives ou tendances), ce qui confirme l'existence d'interférences entre les dynamiques des xénobiotiques au sein des plantules de *Lolium perenne*.

### 5.3. Discussion

L'absorption par les plantes des produits phytosanitaires retenus dans les bandes enherbées est peu étudiée, mais les travaux de recherches dans le domaine de la phytoremédiation de sols contaminés ont montré que certains pesticides pouvaient être extraits du sol par le compartiment végétal, puis accumulés, stockés et/ou dégradés (Pilon-Smits, 2005 ; Sulmon et al., 2007b). Dans le contexte des bandes enherbées expérimentales de la ZAA, les plantes présentes ont montré l'absorption *in situ* d'un herbicide, le nicosulfuron, dans la zone la plus proche de la parcelle cultivée, et aucune présence de pesticides n'a été détectée dans les tissus aériens issus de la zone la plus éloignée. Comme des pesticides sont présents dans les sols de la bande en zone A, l'absence de pesticides dans les parties aériennes des plantes peut être due à plusieurs facteurs : (i) la faible biodisponibilité des composés pour les racines, qui est cohérente avec les analyses de l'eau du sol indiquant que les pesticides n'étaient pas détectables dans l'eau ; (ii) une absorption racinaire sans transport vers les parties aériennes ; ou (iii) une absorption par les plantes et une dégradation des composés en métabolites non recherchés par l'analyse. La recherche des métabolites des différents pesticides dans les tissus permettrait de vérifier cette hypothèse. Ces dernières hypothèses pourraient d'ailleurs être corrélées avec le fait que les pesticides ne soient pas détectables dans l'eau, s'ils ont été absorbés par les plantes.

On peut toutefois considérer que la présence du nicosulfuron dans les tissus végétaux permet de ne pas exclure que l'absorption des pesticides est réellement réalisée par les plantes des bandes enherbées. D'une certaine manière, ceci est confirmé par les capacités d'absorption mises en évidence dans les plantules de *Lolium perenne* cultivées en conditions contrôlées. Des estimations de quantification par rapport aux doses épandues en champ montrent que la capacité d'absorption mesurée en conditions contrôlées est très significative et pourrait conduire à l'absorption par la bande enherbée de 10 à 100% du glyphosate ou du tébuconazole épandus. En effet, on peut prendre l'exemple du glyphosate, épandu à 12 g/ha (Tableau 11), et considérer une parcelle agricole d'un hectare bordée par une bande enherbée de 500 m<sup>2</sup>, qui contient de ce fait environ 500 kg de biomasse sèche aérienne (Tableau 16) et environ 500 kg de biomasse sèche racinaire (extrapolation simplifiée). D'après les expérimentations en conditions contrôlées (Figure 43), la végétation de la bande enherbée serait alors capable d'absorber 10% de la totalité du glyphosate épandu (1,2 g). Cette capacité pourrait être de plus bien plus grande, dans la mesure où il est peu probable que la totalité des épandages au champ soit transportée en dehors de la parcelle agricole et se retrouve au contact

des plantes des bandes enherbées. Le faible signal d'absorption mesurée réellement sur le terrain montre cependant que d'autres facteurs, comme ceux qui sont discutés ci-dessus, peuvent causer une très forte modulation négative de cette potentialité d'épuration directe.

Le Ray-grass anglais, *Lolium perenne*, présent sur les bandes enherbées et notamment en zone A (section 1.), est donc capable d'absorber par son système racinaire des pesticides variés, dans le cas présent un herbicide, le glyphosate, et un fongicide, le tébuconazole. Les capacités d'absorption de pesticides de *Lolium* sp. ont déjà été démontrées, notamment envers la trifluraline et le lindane (Li et al., 2002). Le glyphosate est un herbicide très utilisé et bien étudié dans la littérature (Duke et Powles, 2008 ; Helander et al., 2012). Il est épandu par pulvérisation sur les feuilles des plantes et les études portent surtout sur les processus d'absorption foliaire de cet herbicide et de transport dans la plante entière par le phloème vers les tissus puits (Grangeot et al., 2006 ; McAllister et Haderlie, 1985). Ces processus dépendent de l'espèce, de son stade de développement, de la quantité appliquée et des conditions environnementales (Ahmadi et al., 1980 ; Duke et Powles, 2008 ; Hetherington et al., 1999 ; Leaper et Holloway, 2000 ; Reddy et al., 2008 ; Sandberg et al., 1980). Notre analyse montre que l'absorption du glyphosate peut également avoir lieu par le système racinaire, les plantes ayant été soumises à cet herbicide *via* le milieu de culture hydroponique. Néanmoins, l'analyse de la plante entière (racines et feuilles) implique que nous ne pouvons pas déterminer si le composé a été transféré des racines vers les parties aériennes. La prochaine étape de cette étude nécessitera une analyse des deux organes séparément. Dans un contexte de terrain, le glyphosate est peu biodisponible pour la plante une fois au sol, car ses caractéristiques physico-chimiques entraînent une adsorption forte aux particules du sol (Duke et Powles, 2008). Les conditions hydroponiques de l'étude pourraient donc avoir favoriser sa biodisponibilité.

Une fois accumulé dans les tissus des plantes, le glyphosate se décompose généralement lentement, mais cela dépend de l'espèce considérée (Caseley et Coupland, 1985 ; Lorraine-Colwill et al., 2002 ; Marshall et al., 1987 ; Reddy et al., 2008 ; Sandberg et al., 1980). Cette dégradation *in planta* reste peu étudiée et sujette à controverse, certaines hypothèses proposant que les dégradations observées seraient l'objet d'actions microbiennes (Duke, 2011 ; Franz et al., 1997 ; Helander et al., 2012). Dans l'expérience réalisée ici, l'herbicide pourrait avoir été dégradé dans le milieu hydroponique par des activités microbiennes, puis les produits de dégradation absorbés par la plante. La dégradation non biologique du glyphosate ne peut expliquer son éventuelle présence dans le milieu car, de par la liaison C-P, il est chimiquement et thermiquement stable (Hayes et al., 2000 ; Lipok et al., 2010 ; Singh et



Walker, 2006). Cependant, il faut noter que le milieu hydroponique après stérilisation est peu sujet à une contamination microbienne. Notre étude en conditions axéniques tend à valider l'hypothèse d'une action directe du métabolisme de la plante. Les voies de métabolisation possibles du glyphosate dans la plante seraient similaires à celles existant chez les micro-organismes (Franz et al., 1997). Un clivage oxydatif de la liaison C-N, par des enzymes glyphosate oxydoréductases, entraîne la production d'AMPA et de glyoxylate (Duke, 2011 ; Schuette, 1998), et un clivage des liaisons C-P, par des C-P lyases, génère de la sarcosine (Dick et Quinn, 1995 ; Kafarski et al., 2000 ; Schuette, 1998). L'AMPA est le métabolite le plus fréquemment retrouvé dans les plantes (Ding et al., 2011 ; Reddy et al., 2004, 2008), mais il serait pertinent de doser la sarcosine pour déterminer la part de dégradation liée à cette voie de métabolisation. Le glyoxylate représente également un métabolite endogène chez les plantes, issu du cycle du glyoxylate et de la photorespiration (Rojano-Delgado et al., 2010). Les métabolites du glyphosate peuvent subir des dégradations ultérieures, aboutissant à la production, pour l'AMPA, de formaldéhyde (transformé ensuite rapidement en méthanol), de phosphate ou d'acides aminés, et à la production, pour le glyoxylate et la sarcosine, d'acides aminés tels que la glycine, la sérine, la cystéine, la méthionine et l'histidine (Araujo et al., 2003 ; Lerbs et al., 1990 ; Rueppel et al., 1977). Rojano-Delgado et al. (2010) ont montré que *Lolium multiflorum*, cultivé sur sol et contaminé par pulvérisation de glyphosate, présentait la molécule mère et les 4 produits de dégradation (AMPA, glyoxylate, sarcosine et formaldéhyde) 96h après exposition. Tous les métabolites ont été détectés à une concentration similaire, en moyenne 14 fois inférieure à celle du glyphosate. Nos résultats montrent une concentration de l'AMPA dans *Lolium perenne* de 2 à 6 fois inférieure à celle du glyphosate, ce qui indiquerait donc une plus grande activité de métabolisation.

Le Ray-grass possède également un fort potentiel d'absorption du fongicide tébuconazole par ses racines, qui n'est pas influencé par la présence du glyphosate dans le milieu de culture. La présence de 5 métabolites putatifs indique que *Lolium* présente des capacités de dégradation de ce triazole. La voie métabolique du tébuconazole *in planta* commencerait par l'hydroxylation de la molécule mère, formant les métabolites nommés M2 et M5, de même masse moléculaire. Puis, ces composés pourraient à leur tour être dégradés et perdre des groupes chlore, butyle et méthyle. Il peut également y avoir d'autres dégradations en résidus polaires plus petits après clivage de la liaison au niveau des noyaux phényles et triazoles. Cela aboutit à la formation de 1,2,4-Triazole, qui est dégradé dans les plantes en triazole-alanine, acide-lactique-triazole et acide-acétique-triazole. Ces composés sont communs à la dégradation des fongicides de la famille des triazoles, et sont connus sous le terme

« métabolites dérivés du triazole » (Jasak et al., 2012 ; Note réglementaire, 2006 ; Shah et Tasheva, 2008). La littérature décrit l'absorption du tébuconazole par les plantes, le plus souvent après des expérimentations de pulvérisation du fongicide à de fortes doses sur les feuilles (Note réglementaire, 2006 ; Rapport d'évaluation FAO, 2011). Cette absorption est accompagnée d'une dégradation de la molécule mère, qui, selon les organes de la plante, ne s'effectue pas de façon similaire. Le Blé et l'Arachide présentent par exemple dans leur tissu foliaire la molécule mère et son métabolite M2, à une concentration environ 4 fois inférieure, et le métabolite M5 en très faible proportion. Les métabolites 1,2,4-Triazole, triazole-alanine, acide-lactique-triazole et acide-acétique-triazole ont été quantifiés dans les graines de ces espèces (Note réglementaire, 2006 ; Rapport d'évaluation FAO, 2011). Ces métabolites ne sont pas non plus détectés dans les racines et les feuilles de *Lolium*. Nos résultats indiquent que la métabolisation du tébuconazole est accentuée lorsque le glyphosate est également présent dans le milieu de culture, ce qui met en évidence des processus d'interactions entre les dynamiques du glyphosate et du tébuconazole au sein des plantules de *Lolium*.

## 6. Discussion générale

Les produits phytosanitaires appliqués au champ possèdent, selon leurs caractéristiques physico-chimiques, des propriétés leur permettant de diffuser de leur lieu d'épandage vers les milieux alentours. Différents processus, dont les transports édaphiques ou les dérives par voie atmosphérique, entraînent des pollutions complexes et difficilement prévisibles (Arias-Estévez et al., 2008 ; Chap I, 1.4.), mises en évidence dans les bandes enherbées expérimentales de la ZAA (section 1.). Les analyses des bandes enherbées ont en effet montré la présence de mélanges complexes de pesticides à des concentrations variables dans le sol situé à proximité des parcelles agricoles. Ainsi, bien que les bandes enherbées 113 et 114 soient associées à la même parcelle cultivée, sur laquelle a été épandue durant les deux années d'études une quantité de pesticides quantifiables de 773,3 g/ha (Tableau 11), les niveaux de ces pesticides retrouvés dans le sol des bandes varient du simple au double selon la bande considérée (2,7 µg/kg de sol pour la bande 113 et 1,1 µg/kg de sol pour la bande 114).

Les mélanges de pesticides retrouvés contenaient des herbicides, des fongicides et un insecticide, épandus une année ou plusieurs années auparavant. Cette multipollution résiduelle témoigne de la persistance de certaines molécules, qui, de par leur structure chimique, sont peu ou pas dégradées, et peuvent être à l'origine d'une pollution à long terme des milieux naturels.

Les concentrations totales de pesticides détectables dans les bandes enherbées expérimentales, entre 1,6 et 6 µg/kg de sol sec selon la bande (Figure 32), indiquent que ces pollutions sont représentées par des faibles teneurs en xénobiotiques, du même ordre de grandeur que certaines autres pollutions d'origine agricole quantifiées dans l'eau, les sédiments ou encore le sol de parcelles cultivées (Bereswill et al., 2012 ; Komárek et al., 2010 ; Rathore et Nollet, 2012). Toutefois, les méthodes analytiques mises en œuvre ne pouvaient détecter qu'un nombre réduit de pesticides, la diversité chimique de ces composés nécessitant l'adaptation au cas par cas des protocoles, et complexifiant les analyses multirésidus. Ainsi, il est probable que les bandes enherbées de la ZAA contiennent d'autres pesticides, tels que ceux mis en évidence lors des analyses de sol de 2011 de la bande 114 (Tableau 12), augmentant le niveau et la complexité des pollutions rencontrées. Le développement en cours de méthodes d'analyse par LC-MS/MS au laboratoire doit permettre prochainement d'étendre la gamme de molécules détectables avec un seuil de détection beaucoup plus faible. Il sera de ce fait envisageable de quantifier, dans les échantillons d'eau du sol des bandes enherbées, des pesticides pouvant se trouver en solution, l'analyse effectuée n'ayant pas permis de

caractériser de manière avérée les composés. Les dynamiques d'adsorption-désorption des pesticides aux particules du sol sont variables et complexes (Krutz et al., 2005 ; Reichenberger et al., 2007). Le fait de détecter des structures potentiellement reliées aux pesticides recherchés indique l'existence de processus de désorption. Etant donné la présence de niveaux significatifs de pesticides dans le sol, il serait important de déterminer si le flux de désorption peut être activé sous certaines conditions de température, de pH ou de force ionique dans le contexte des bandes enherbées de la ZAA.

Les pesticides quantifiés dans les sols des bandes enherbées expérimentales ne sont pas, pour la majorité d'entre eux, détectés à une distance de 5 m de la parcelle (section 2.), ce qui est en accord avec la capacité de ces dispositifs tampons à interagir avec les molécules et à empêcher une plus large diffusion environnementale. Un tel rôle épurateur a été montré dans différentes études de bandes enherbées, en conditions de terrain et en conditions expérimentales, dans différents contextes climatiques, paysagers et agricoles (Krutz et al., 2005 ; Reichenberger et al., 2007). Selon le type de pesticide et la bande enherbée considérés, les xénobiotiques contaminants ne sont pas immobilisés ou transformés de manière similaire. L'efficacité de piégeage des xénobiotiques contaminants dépend en effet de combinaisons entre les propriétés physico-chimiques du composé, la disposition spatiale de la bande enherbée et de la surface contributrice, les paramètres environnementaux, le type de sol et le couvert végétal. La variabilité de ces critères entraîne une difficulté pour l'estimation de l'efficacité des bandes enherbées (Fox et al., 2010 ; Lacas et al., 2005 ; Otto et al., 2012 ; Pätzold et al., 2007 ; Reichenberger et al., 2007 ; Sabbagh et al., 2009). L'état hydrique du sol joue notamment un rôle prépondérant. Plus le sol est sec, meilleure sera sa capacité d'infiltration de l'eau de surface, tandis que, s'il est très humide l'eau ne pénétrera pas, et l'écoulement de surface pourra transporter les polluants sur une plus grande distance (Muñoz-Carpena et al., 1999 ; White et Arnold, 2009).

Plusieurs études ont montré qu'une zone tampon avec un couvert végétal était plus efficace pour réduire la diffusion des pesticides (Schmitt et al., 1999). Notre étude *in situ*, ne comportant pas de bande non enherbée, ne nous permet pas dans le cas présent d'estimer l'efficacité de la bande due à la présence des plantes. Le couvert végétal d'une bande enherbée peut jouer des rôles multiples. Il peut en effet limiter les diffusions par dérive atmosphérique grâce à la barrière physique créée par la biomasse aérienne des plantes. Mais les plantes permettent aussi une diminution de la vitesse de ruissellement des eaux de surface, une stabilisation des agrégats grâce aux exsudats racinaires, une stimulation des activités microbiennes dans la rhizosphère, et de ce fait une augmentation de la dégradation biologique

des polluants (Craine et al., 2002 ; De Baets et al., 2006 ; Haby et Crowley, 1996 ; He et al., 2005 ; Otto et al., 2012). De plus, les plantes présentes sur ces milieux pollués peuvent aussi contribuer à la remédiation des polluants *via* leur absorption directe par leurs racines ou leurs feuilles, et leur stockage et/ou dégradation. Les abattements observés dans les bandes enherbées de la ZAA concernaient des pesticides épandus par pulvérisation aérienne ou par application au sol. De plus, la relation entre les propriétés physico-chimiques des xénobiotiques contaminants et leurs profils d'abattement (section 2.) était en accord avec l'existence de transferts par le sol. En outre, la détection des xénobiotiques dans les 30 premiers centimètres de profondeur a montré que ces transferts avaient lieu dans les zones de développement racinaire. Autrement dit, l'ensemble des résultats montre que les plantes des bandes enherbées sont réellement exposées aux pesticides contaminants non seulement par dérive aérienne, mais aussi par les systèmes racinaires.

Le choix des espèces implantées sur des bandes enherbées peut être important pour optimiser les différents rôles des plantes dans ces zones tampons. Nos analyses ont montré que toutes les espèces végétales ne parvenaient pas à se maintenir sur le milieu multi-contaminé des bandes enherbées. Les communautés végétales soumises à des expositions de pesticides font en effet l'objet de processus de sélection, aboutissant à la conservation des espèces les plus aptes à survivre sur le milieu pollué, c'est-à-dire des espèces les plus tolérantes, au détriment des espèces sensibles. Les communautés végétales montrent alors des modifications de composition spécifique, avec une altération de l'abondance de certaines espèces par rapport à d'autres (Allison et al., 2007), ce qui entraîne une simplification des communautés (Stoate et al., 2001). Les espèces végétales des bandes enherbées expérimentales qui ont montré des aptitudes de maintien *in situ* et de tolérance face à différents stress chimiques en conditions contrôlées sont principalement la Fétuque rouge traçante (*Festuca rubra*), le Ray-grass anglais (*Lolium perenne*), l'Agrostis stolonifère (*Agrostis stolonifera*) et la Fléole des prés (*Phleum pratense*) (section 4.). Ces Poacées sont d'autant plus préconisées en remédiation qu'elles produisent des systèmes racinaires plus denses que les Fabacées et les Asteracées (Roumet et al., 2008). Le Ray-grass anglais, déjà connu pour ses capacités phytoremédiatrices (Bidar et al., 2009 ; D'orazio et al., 2013 ; Hu et al., 2012 ; Krutz et al., 2005), est particulièrement intéressant, car il présente une dynamique associée aux gradients de pesticides (section 3.)

Nos travaux confirment que les espèces plus sensibles au stress chimique, comme le Bleuet (*Centaurea cyanus*) et l'Anthémis (*Anthemis tinctoria*), ne parviennent pas à se maintenir dans la bande enherbée. Cette dynamique différentielle des espèces végétales de bandes

enherbées dépend aussi bien sûr des traits d'histoire de vie et des stratégies de développement et de colonisation (Grime, 2006). Cependant, l'ensemble de nos résultats tend à montrer que les interactions avec les pesticides contaminants sont un facteur potentiel non-négligeable.

L'étude de l'absorption *in situ* des pesticides par les plantes des bandes enherbées a montré que très peu de composés étaient détectables dans les tissus aériens des plantes, mais que l'absorption directe était une possibilité réelle (section 4.). Les analyses en conditions hydroponiques avec une forte biodisponibilité ont montré que *Lolium perenne* pouvait absorber et métaboliser l'herbicide glyphosate et le fongicide tébuconazole. Les capacités de phytoremédiation de certaines espèces en contexte de bandes enherbées existent et sont à prendre en considération dans le rôle remédiateur des bandes enherbées. L'estimation approximative d'une accumulation de 10% du glyphosate épandu sur un hectare dans la biomasse totale d'une bande enherbée suggère de plus que cette accumulation pourrait être quantitativement importante relativement à la fraction de pesticides réellement impliquée dans les transferts hors de la parcelle cultivée.

Un des résultats sans équivoque de cette étude est que les communautés végétales des bandes enherbées expérimentales de la ZAA sont directement confrontées à un environnement édaphique contaminé par un cocktail complexe de xénobiotiques organiques. Les interactions primaires entre la plante et ce milieu complexe ont lieu en particulier au niveau des cellules superficielles, des poils absorbants et des cellules endodermiques des racines (Mc Farlane, 1995). L'intensité de ces interactions est dépendante du niveau de désorption des pesticides dans l'eau du sol, qui est apparemment très faible dans les conditions testées. Les niveaux détectés suggèrent donc fortement que les interactions plante-xénobiotiques dans les bandes enherbées sont avant tout des interactions sublétales ou subtoxiques. La suite de ce travail s'attache à déterminer les effets de telles interactions, et les mécanismes de réponses des plantes à de tels stress chimiques, complexes et subtoxiques.

**~ Chapitre IV ~**

**Mécanismes biochimiques et  
moléculaires des réponses des plantes  
aux stress chimiques résiduels  
et complexes**



## 1. Introduction

Les espèces végétales présentes sur les bandes enherbées sont confrontées à des pollutions chimiques complexes où interviennent des mélanges de pesticides, de produits de dégradation de pesticides, d'adjuvants utilisés en parallèle des produits phytosanitaires ou d'autres composés d'origine agricole ou agro-industrielle, tels que des métaux lourds ou des hydrocarbures (Chap I, 1. ; Chap III ; Conway et Pretty, 2013). Ces pollutions péri-agricoles sont cycliques et répétitives, diffuses compte tenu de la dispersion des pesticides épandus, et souvent de faibles concentrations (Chap I, 1.4.). Elles peuvent être au moins partiellement cumulatives et aboutir à des situations de contamination rémanente et de faible concentration que l'on peut qualifier de résiduelle. Le développement et le maintien des plantes dans ces conditions de pollutions résiduelles doivent impliquer des mécanismes d'interactions entre la plante et les polluants. Néanmoins, les réponses des plantes dans ce contexte de pollutions diffuses et complexes ont été peu étudiées, en particulier dans le cas des pollutions impliquant des xénobiotiques.

La compréhension de ces interactions nécessite l'étude des réponses de plantes soumises à des pollutions chimiques en conditions contrôlées, afin de mettre en évidence des effets qui ne soient pas dus à d'autres perturbations biotiques ou abiotiques (Suzuki et al., 2014). Il est aussi nécessaire de déterminer des conditions de traitement qui soient réalistes par rapport aux polluants et aux concentrations trouvés sur le terrain. Il est également essentiel de prendre en considération la présence de mélanges de molécules, qui peuvent impliquer des interactions entre les impacts des différents composés et induire des effets spécifiques des mélanges (Chap I, 2.2.). La mise au point de telles conditions réalistes est compliquée à plusieurs égards compte tenu de la diversité des composés polluants, de la diversité de leurs combinaisons, de la diversité des niveaux de pollution, ainsi que de la diversité des matrices et des conditions environnementales (Chap I, 1. ; Merrington et al., 2002).

Etant donné ces conditions très vastes de traitements potentiels, il peut être intéressant de prendre pour cible expérimentale de ces interactions un modèle biologique extrêmement bien défini. C'est le cas de la crucifère *Arabidopsis thaliana*, qui présente beaucoup d'avantages expérimentaux et dont le contexte génétique, biochimique et moléculaire est bien caractérisé (Arabidopsis Genome Initiative, 2000 ; Meinke et al., 1998). Cette plante est ainsi un modèle de choix pour l'analyse des relations entre l'expression des gènes, leurs fonctions, les réponses physiologiques et les mécanismes de régulation dans une très large panoplie de conditions de stress abiotiques (Kant et al., 2008 ; Ramel et al., 2007, 2013 ; Sulmon et al.,

2007a, 2011 ; Taylor et al., 2009). Dans l'hypothèse que de faibles doses de polluants provoquent des changements discrets, il est aussi important de prendre comme modèle une espèce végétale pour laquelle le corpus de bases de données et d'articles permet la meilleure compréhension possible des résultats expérimentaux. L'approche métabolomique est ainsi l'une des approches intéressantes pour pouvoir détecter sans *a priori* des modifications métaboliques et physiologiques fines (Obata et Fernie, 2012 ; Shulaev et al., 2008). De plus, sur une espèce modèle telle qu'*Arabidopsis thaliana*, il est facilement envisageable de combiner les analyses biochimiques et métaboliques avec des analyses moléculaires d'expression génétique dans une démarche intégrative.

L'article de recherche présenté dans ce chapitre a donc pour objectif de caractériser les réponses physiologiques, métaboliques et moléculaires des plantes, et de comprendre les mécanismes associés face à des stress chimiques et xénobiotiques complexes et de faible intensité. La mise en évidence de réponses associées à des processus potentiels de signalisation et de réponse hormonale est ensuite discutée de manière plus approfondie dans le cadre d'une synthèse bibliographique.

**2. Article n°1 : Low environmentally-relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana***

Anne-Antonella Serra, Andréina Nuttens, Vanessa Larvor, David Renault, Ivan Couée, Cécile Sulmon and Gwenola Gouesbet

**Journal of Experimental Botany**, 2013, 64(10): 2753–2766

RESEARCH PAPER

# Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*

Anne-Antonella Serra, Andréina Nuttens, Vanessa Larvor, David Renault, Ivan Couée, Cécile Sulmon\* and Gwenola Gouesbet\*,<sup>†</sup>

Université de Rennes 1, UMR CNRS 6553 ECOBIO, Campus de Beaulieu, bâtiment 14A, 263 avenue du Général Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France

\*These authors contributed equally to this work.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: [gwenola.gouesbet@univ-rennes1.fr](mailto:gwenola.gouesbet@univ-rennes1.fr)

Received 25 January 2013; Revised 20 March 2013; Accepted 8 April 2013

## Abstract

Anthropic changes and chemical pollution confront wild plant communities with xenobiotic combinations of bioactive molecules, degradation products, and adjuvants that constitute chemical challenges potentially affecting plant growth and fitness. Such complex challenges involving residual contamination and mixtures of pollutants are difficult to assess. The model plant *Arabidopsis thaliana* was confronted by combinations consisting of the herbicide glyphosate, the fungicide tebuconazole, the glyphosate degradation product aminomethylphosphonic acid (AMPA), and the atrazine degradation product hydroxyatrazine, which had been detected and quantified in soils of field margins in an agriculturally intensive region. Integrative analysis of physiological, metabolic, and gene expression responses was carried out in dose–response experiments and in comparative experiments of varying pesticide combinations. Field margin contamination levels had significant effects on plant growth and metabolism despite low levels of individual components and the presence of pesticide degradation products. Biochemical and molecular analysis demonstrated that these less toxic degradation products, AMPA and hydroxyatrazine, by themselves elicited significant plant responses, thus indicating underlying mechanisms of perception and transduction into metabolic and gene expression changes. These mechanisms may explain observed interactions, whether positive or negative, between the effects of pesticide products (AMPA and hydroxyatrazine) and the effects of bioactive xenobiotics (glyphosate and tebuconazole). Finally, the metabolic and molecular perturbations induced by low levels of xenobiotics and associated degradation products were shown to affect processes (carbon balance, hormone balance, antioxidant defence, and detoxification) that are likely to determine environmental stress sensitivity.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, gene expression, metabolite profiling, pesticides, pollutants, signalling pathways, stress responses, toxicants, transcript profiling, xenobiotic interactions.

## Introduction

Phytochemical crop protection leads to the release of xenobiotic molecules into the environment by volatilization, spray drift, runoff, leaching, and absorption. The resulting pollution of soil and water frequently consists of mixtures of

pesticides (fungicides, insecticides, and herbicides) associated with related degradation products and adjuvants. This anthropogenic and chemical pollution can affect growth and fitness of non-target organisms, with varying toxicity that depends

on biodisponibility and surrounding physico-chemical factors. Living organisms are thus more often exposed to cocktails of chemical compounds rather than individual substances. Combinations of chemical pollution have complex biological effects that are difficult to predict from the effects of single contaminants (Dévier *et al.*, 2011). Whereas a given chemical can have negligible biological effects, its presence within a complex mixture can result in additive and deleterious effects or antagonistic effects relative to other contaminants. Triazine herbicides can increase the toxicity of organophosphate insecticides or decrease the toxicity of the fungicide prochloraz on human health (Hernández *et al.*, 2012). The toxicity of a mixture of pesticides also involves the effects of derived degradation products. The broad-spectrum non-selective herbicide glyphosate and its main degradation product, aminomethylphosphonic acid (AMPA), are often found in freshwater ecosystems (Székács and Darvas, 2012). Glyphosate affects plants by blocking the shikimate pathway of synthesis of aromatic amino acids (Steinrücken and Amrhein, 1980), which does not exist in animal cells. Nevertheless, glyphosate at very low sub-agricultural concentrations elicits apoptosis in human cells, and the presence of AMPA dramatically enhances these toxic effects (Benachour and Séralini, 2009). Although described as less toxic, AMPA has been reported to be phytotoxic for soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) through unknown mechanisms (Reddy *et al.*, 2004; Nandula *et al.* 2007).

In the context of combinations of agricultural pollution, the implantation of vegetated filter strips at the edge of agricultural fields is used to attenuate the potential environmental risk of diffuse complex mixtures of pesticides by decreasing their concentration in the surface water and groundwater (Marshall and Moonen, 2002; Reichenberger *et al.*, 2007). As sessile organisms, plant communities are the direct targets of residual agricultural pollution, whether air-borne, water-borne, or accumulated in soils. However, few studies have dealt with plant responses to complex runoff pollution and plant buffering capacity. Most studies have determined the properties of the vegetated filter strips in terms of physical barriers, and very few consider plant communities as an active and purifying compartment (Zhang *et al.*, 2010). Lin *et al.* (2011) have demonstrated that the presence of vegetated filter strips reduces soil transport of pesticides such as atrazine, metolachlor, and glyphosate, whether in dissolved form or sediment bound. Pätzold *et al.* (2007) showed that a 12 m wide grassed strip was highly effective for watercourse protection against metolachlor, terbuthylazine, and pendimethalin pollution. The study of plant behaviour toward pollutants in situations of environmental residual and complex contamination is therefore an important step to evaluate pesticide toxicity at low concentration and a plant's impact on pesticide levels. Elsaesser *et al.* (2011) have used a toxic unit approach to assess the ability of plants to reduce the toxic effects of pollutant mixtures. The presence of vegetation in wetlands was shown to be a dominant factor in the reduction of the calculated toxicity of substances (Elsaesser *et al.*, 2011). However, as mentioned above, this approach could not assess the impact of complex toxicant mixtures.

It is thus essential to understand the mechanisms involved in plant responses to environmentally relevant complex

mixtures of contaminants. In the present work, the characterization of these mechanisms was carried out in the model plant *Arabidopsis thaliana* whose genome has several hundred protein-encoding genes involved in pesticide responses (Cobbett and Meagher, 2002; Ramel *et al.*, 2007, 2009b). *Arabidopsis thaliana* seedlings were confronted with levels of residual complex contamination that were shown to be characteristic of field margins. The integrative analysis of the physiological, biochemical, and molecular responses revealed cryptic effects of residual pollutant levels and of their combination. The identification of cryptic effects indicates that modelling and prediction of environmental impacts of residual contamination must be undertaken with caution and that further experimental studies on the effects of contaminant mixtures and residual contamination must be carried out.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

Seeds of *A. thaliana* (Columbia ecotype, Col-0) were surfaced sterilized in bayrochlor:ethanol (1:1, v/v), rinsed in absolute ethanol, and dried overnight. Germination and growth were carried out under axenic conditions in square Petri dishes. After seeds were sown, Petri dishes were placed in the dark at 4 °C for 72 h in order to break dormancy and homogenize germination, and were then transferred to a control growth chamber at 22 °C/20 °C under a 16 h light (6000 lux)/8 h dark regime. Growth medium consisted of 0.8% (w/v) agar in Hoagland basal salt mix (H2395, Sigma-Aldrich) adjusted to pH 6. Direct exposure to pesticides during early development was carried out by seed sowing on pesticide-containing growth medium. Developmental and physiological parameters were measured after 14 d of growth. Transfer experiments were also carried out in order to mimic conditions of exposure of seedlings to shock at the same stage of photosynthetic development. After 11 d of growth under optimal conditions, seedlings were transferred to fresh growth medium containing pesticides. Developmental and physiological parameters were measured every 24 h for up to 96 h. For the analysis of gene expression and metabolite profiling, seedlings were harvested 72 h after transfer. Different pesticide treatments were tested: the broad-spectrum herbicide glyphosate (G), its degradation product aminomethylphosphonic acid (AMPA; A), the atrazine-derived degradation product hydroxyatrazine (H), the fungicide tebuconazole (T), and combinations thereof.

### Soil sampling and pesticide analysis

Soil samples were collected in December 2007 from the top 30 cm layer in field margins in the long-term ecological research site 'Zone Atelier Armorique' (ZAA) (48°36'N, 1°32'W, Brittany, France). After collection, samples were transported on ice to the laboratory, homogenized, sieved at 4 mm, and sent on ice to the CGI (Centre de Génie Industriel) analytical platform (Ploemeur, Brittany, France) for analysis. Each soil sample was analysed for the presence and quantification of a 41 molecule panel of pesticides and pesticide degradation products using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS), gas chromatography/MS (GC/MS), or HPLC/fluorescence quantification methods (Supplementary Table S1 available at JXB online).

### Analysis of growth and photosynthetic parameters

The length of the primary root was measured on vertical plates. Pigments were extracted by grinding shoots of seedlings in 80% (v/v) acetone, and the absorbance of the resulting extracts was measured at three wavelengths: 663, 646, and 470 nm. Levels of chlorophylls and total carotenoids (xanthophylls and carotenes) in these extracts were



determined from the equations given by Lichtenthaler and Wellburn (1983). Chlorophyll fluorescence and maximum photosystem II (PSII) efficiency ( $F_v/F_m$ ) were measured using a PAM chlorophyll fluorometer system (Heinz Walz, Effeltrich, Germany) in saturating pulse mode. After dark adaptation, the maximum fluorescence of leaves ( $F_m$ ) was measured under a subsequent saturating pulse of light. Minimum fluorescence ( $F_0$ ) was determined under weak light before a pulse, and variable fluorescence ( $F_v = F_m - F_0$ ) was determined.

#### Metabolite profiling

After transfer, whole seedlings were ground in liquid nitrogen to extract metabolites. The powder obtained was suspended in 600 µl of methanol:chloroform solution (2:1, v/v) and mixed for 1 min 30 s. Extracts were placed for 10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and then 400 µl of cold water were added. Samples were mixed vigorously for 1 min, and centrifuged twice for 5 min at 4000 g ( $4^{\circ}\text{C}$ ). A 300 µl aliquot of the upper aqueous phase containing polar metabolites was transferred to new chromatographic glass vials, and vacuum-dried. Dry extracts were re-suspended in 30 µl of 20 mg l $^{-1}$  methoxyamine–pyridine solution, and placed under automatic orbital shaking at  $40^{\circ}\text{C}$  for 1 h. A 30 µl aliquot of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl trifluoroacetamide was added and derivatization was conducted at  $40^{\circ}\text{C}$  for 1 h under agitation. All the derivatization process was automatized using a CTC CombiPal autosampler (GERSTEL GmbH and Co.KG, Mülheim an der Ruhr), ensuring an identical derivatization time and process for all samples. Extracts were analysed using a GC/MS method. The GC/MS system consisted of a Trace GC Ultra chromatograph and a Trace DSQII quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The injector temperature was held at  $250^{\circ}\text{C}$ . The oven temperature ranged from  $70^{\circ}\text{C}$  to  $170^{\circ}\text{C}$  at  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , from  $170^{\circ}\text{C}$  to  $280^{\circ}\text{C}$  at  $7^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , and from  $280^{\circ}\text{C}$  to  $320^{\circ}\text{C}$  at  $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . The oven then remained at  $320^{\circ}\text{C}$  for 4 min. A 30 m fused silica column (95% dimethyl siloxane, 5% phenyl polysilphenylene-siloxane, v/v) was used with helium as the carrier gas at a rate of 1 ml min $^{-1}$ . A 1 µl aliquot of each sample was injected using the split mode (25:1). The temperature of the ion source was set at  $250^{\circ}\text{C}$  and the MS transfer line at  $300^{\circ}\text{C}$ . Detection was achieved using electron impact ionization. Peaks were accurately annotated using both mass spectra (two specific ions) and retention times. Calibration curves were established by using samples made up of 60 pure reference compounds at levels of 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500, and 2000 µM. The levels of each metabolite were measured according to the corresponding calibration curve. Metabolite levels were quantified using XCalibur v2.0.7 software (Thermo Fisher Scientific Inc.).

#### Gene expression quantification

After transfer, control and treated seedlings were ground in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using TRI Reagent® (Sigma,

St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's protocol and quantified by Nanodrop ND-100 fluorospectrometer. Synthesis of cDNAs was carried out using an Iscript™ cDNA Synthesis kit (BioRad, Hercules, CA, USA). Quantitative PCR was performed using iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Conditions were as follows:  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, and 40 ( $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s) cycles, with a melting curve from  $65^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$ . For each gene selected for analysis, specific primers were designed using Primer3Plus software (Table 1). Quantitative PCR was carried out in a Chromo 4® system (BioRad) real-time cycler, and fluorescence curves were analysed by Gene Expression version 1.1. software. Candidate gene expression was quantified relative to the level of expression of the housekeeping gene *UBQ5* (Ramel *et al.*, 2007).

#### Statistical analysis

Physiological and metabolic parameters were measured on at least five independent biological replicates of 20 pooled plantlets. Gene expression quantification was carried out on at least three independent biological replicates of 50 pooled plantlets. Statistical analyses were carried out with the R version 2.11.11 software. Pairwise comparisons of means used the non-parametric Mann–Whitney–Wilcoxon test. In order to test and visualize relationships between treatments and response parameters, principal component analyses (PCAs) based on the correlation matrix (Ramel *et al.*, 2009a) were carried out using the FactoMineR package of R.

## Results

### Characterization of residual pesticide contamination in the soil of field margins

The level of residual pesticide contamination was quantified, in the context of a long-term ecological research area, in field margins affected by agricultural practices, and thus strongly susceptible to receive recurrent pesticide runoffs. The research area (ZAA) is located in an agriculturally intensive region in the south of the Mont-Saint-Michel Bay (Brittany, France). Agricultural landscape biodiversity and plant functional group composition in this area are significantly influenced by land-use practices and especially application rates of fertilizers and pesticides (Billetter *et al.*, 2008; Liira *et al.*, 2008). Plant communities of several field margins, associated with cereal crops or meadows, have been under study since 1994 in the ZAA. Five field margins, exhibiting significant

**Table 1.** Genes selected for qRT–PCR analysis and corresponding primer sequences.

Accession no.	Gene product (gene abbreviation)	Forward primer	Reverse primer
At1g05680	UDP-Glucosyltransferase ( <i>UGT74E2</i> )	AGTTCGCAAACGCTTAGCC	AATGGTTCCTCGCCTTCTTG
At1g06570	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase ( <i>PDS1</i> )	AAACGACAACACAGCTTC	AATCGCAACGGCTCTAACAC
At1g07530	GRAS family transcription factor ( <i>SCL14</i> )	TGCAGCAGACATGTTGAAGG	TGCAGTGAACGCATCATGC
At1g11680	14α-demethylase ( <i>CYP51A2</i> )	ACGACATGCTGCAGTGTTC	AGCAGCAATGAGCAAACAG
At2g04050	MATE (multidrug and toxic compound extrusion) efflux protein ( <i>MATE</i> )	AGCTCCTGCGACAAGACTC	ACTCCGAAGTGGAAGAACTGC
At2g29420	Glutathione S-transferase ( <i>GSTU7</i> )	TCCGATTCTTCTCAAGATCCG	ACAACTTTTCATCGCCGTCAC
At2g46830	Transcription repressor ( <i>CCA1</i> )	TAGTCATCCCCACACAGTTGC	ATGATGAGGCGAAAGTTGCG
At3g62250	Ubiquitin 5 ( <i>UBQ5</i> )	AGCCGTTGCCTCAAAAGATG	TCCCTTCACATTGTGCGATG
At5g13080	WRKY family transcription factor ( <i>WRKY75</i> )	TGTTGCGAAAGCGTGGAGTC	TGGCTCCTTGTGTTGAAACGC
At5g17300	Myb family transcription factor ( <i>RVE1</i> )	AACCACTGCAATGCACCTG	TTGGTTCCTTGATCGAGCTCTC
At5g45340	P450 cytochrome family ( <i>CYP707A3</i> )	TTACGTCGGCGAAACATTCC	ACGAATTCGCTGCTTCAGG

**Table 2.** Quantification of residual pesticide levels in soils of field margins located in the ZAA long-term ecological research area. Data are expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  of fresh soil. The composition of the pesticide mixture model is given in the last line, where the data in parentheses correspond to pesticide levels expressed in  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . The pesticide mixture model consisted of AMPA and hydroxyatrazine at the average concentration of all soil samples and of glyphosate and tebuconazole at the maximum concentration in single occurrences.

Site	Adjacent field	Field code	Glyphosate	AMPA	2-Hydroxyatrazine	Tebuconazole
A	Meadow	11a	0	0.20	0.15	0
A	Meadow	11a	0	0.34	0.15	0
A	Meadow	7b	0	0.42	0.14	0
A	Meadow	7 b	0	0.16	0.14	0.36
B	Wheat	11b	0.31	1	0.15	0
B	Wheat	11b	0	0.33	0.15	0
B	Maize	33b	0	0.48	0.15	0
B	Maize	33b	0	0.16	0.14	0
B	Maize	1865b	0	0.35	0.16	0
B	Maize	1865b	0	0.28	0.16	0
Pesticide mixture model			0.3	0.3	0.15	0.3
C concentration			(1.77 $\mu\text{M}$ )	(2.7 $\mu\text{M}$ )	(0.76 $\mu\text{M}$ )	(0.97 $\mu\text{M}$ )

modification of plant community structure and dynamics (D. Le Coeur, personal communication), in comparison with non-agriculture-related vegetated plots, were chosen. Plots were located in two network landscapes exhibiting a gradient of agriculture intensification, and, thus, a gradient in field size, land use (grassland and woods versus crops), and hedge network density (Ouina et al., 2008). Two field margins, adjacent to meadows, were located in site A, which mainly consists of meadows and woods. The three other margins were in site B, which mainly consists of crop fields and meadows with a few hedgerows, and were adjacent to wheat and maize cultures (Table 2). Soils of field margins were sampled during the intercultural period where the levels of pesticides were likely to correspond to residual contamination. A panel of 41 pesticides and degradation products widely detected in surface waters in Brittany [Brittany CORPEP (Council of regional orientation for water protection against pesticides)] were analysed. Among these, only four compounds were detected and quantified. The herbicide glyphosate and the fungicide tebuconazole were found once in, respectively, the wheat-related and one of the meadow-related field margins. In contrast, AMPA and 2-hydroxyatrazine, respective degradation products of the herbicides glyphosate and atrazine, were quantified in all of the samples whatever the type of adjacent culture, thus indicating the prior presence of their related active compounds in soils (Table 2). Soil samples were thus found to exhibit a mixture of at least two residual pesticide compounds.

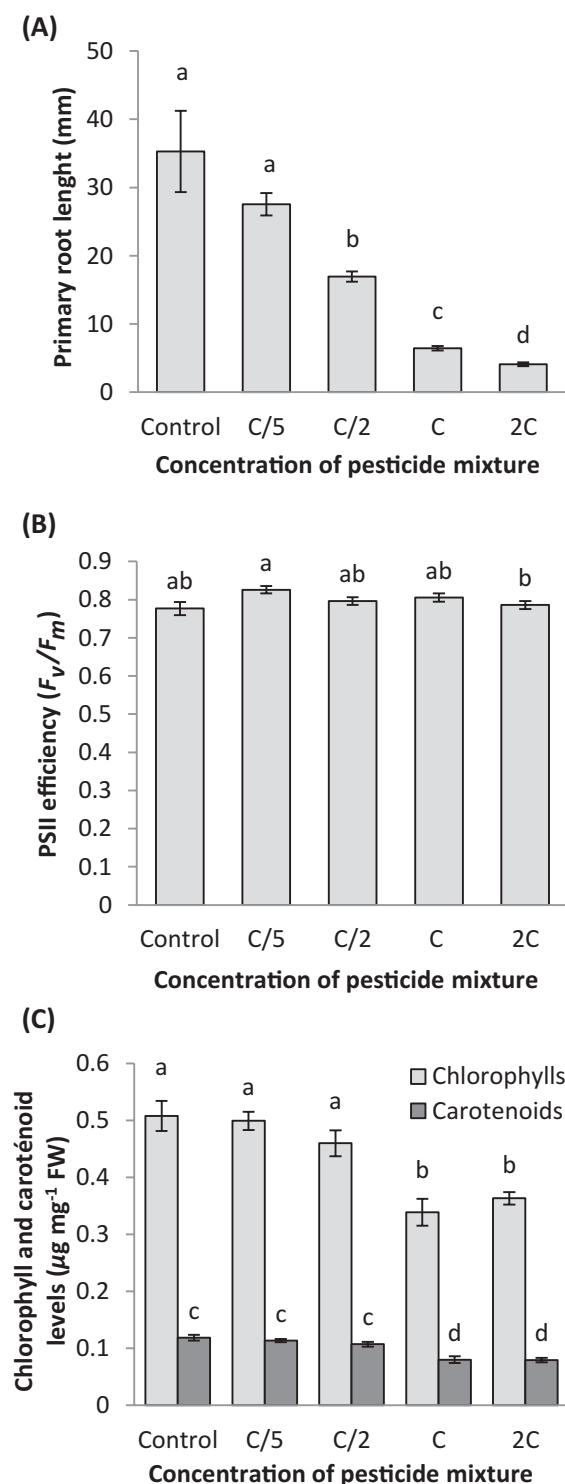
In order to study the effects of residual agricultural multicontamination on plants under *in vitro* conditions, soil quantifications were used to define a model of pesticide mixture, composed of glyphosate, AMPA, 2-hydroxyatrazine, and tebuconazole in the proportions found in soil of field margins (1/1/0.5/1, w/w/w/w). The concentration of pesticide mixture corresponding to the level of field margin contamination was called C (Table 2). Given the method of extraction (Supplementary Table S1 at JXB online), pesticide

measurements in soil samples concerned total pesticide levels. The exact proportion of bioavailable pesticides in soil samples was not estimated. Given that the salt composition of Hoagland growth medium (Supplementary Table S2 at JXB online) can greatly restrict pesticide bioavailability (Borggaard and Gimsing, 2008), the model of environmentally relevant pesticide mixture was based on total concentrations found in soil samples.

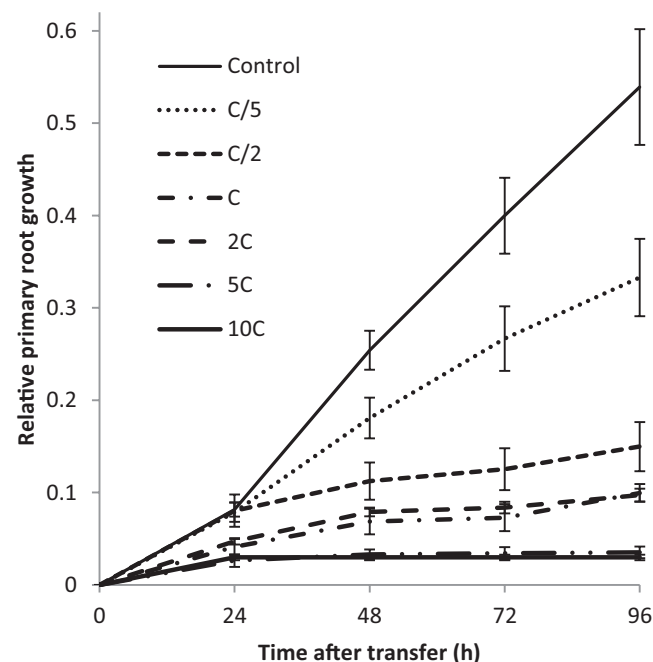
Effects of residual pesticide multicontamination on plant growth and development

The pesticide mixture at field margin concentration (C) significantly affected the growth and development of *Arabidopsis* seedlings, either by direct exposure at the start of germination (Fig. 1) or by secondary exposure of photosynthetic plants (Fig. 2). Thus, this level of residual pollution resulted in >80% inhibition of root growth (Figs 1A, 2). Dose–response analysis, using concentrations ranging from C/5 to 2C or 10C, confirmed that *Arabidopsis* seedlings were highly sensitive to the pesticide mixture (Figs 1, 2). C/2 concentration affected root growth of directly treated (Fig. 1) and of transferred (Fig. 2) plants. While C/5 concentration inhibited root growth of transferred plants (Fig. 2), direct exposure had no significant effects on root growth (Fig. 1). The effect on biomass (data not shown) showed the same trend. It was noteworthy, especially in the context of the edaphic localization of residual pollution, that these strong effects on root growth occurred prior to any major change in photosynthetic parameters (Fig. 1B, C), even though the archetypal effects of glyphosate on plants are related to photosynthesis inhibition (Vivancos et al., 2011). Moreover, transfer experiments (Fig. 2) showed rapid effects of pesticide exposure, with a sharp decrease of root growth within 24 h of treatment for C to 10C concentrations and within 48 h of treatment for C/5 and C/2 concentrations. C and 2C concentrations also affected chlorophyll and carotenoid levels (Fig. 1C). However, the maintenance of





**Fig. 1.** Effects of multiple hydroxyatrazine, AMPA, glyphosate, and tebuconazole treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings germinated and grown in the presence of varying concentrations of the pesticide mixture. The concentration of reference (C) is as described in Table 2. Values (mean  $\pm$  SEM) of root length (A), PSII efficiency ( $F_v/F_m$ ) (B), and chlorophyll and carotenoid levels (C) after 14 d of growth are shown. Statistical analysis between means was carried out using the Mann–Whitney–Wilcoxon test. Statistical significance of differences ( $P \leq 0.05$ ) between treatments is indicated by different letters above bars.



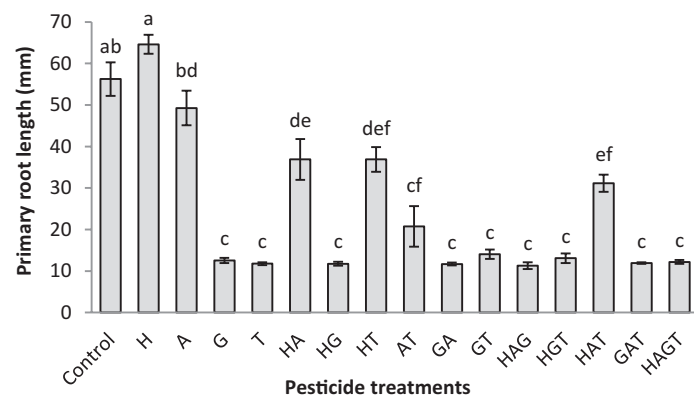
**Fig. 2.** Effects of multiple hydroxyatrazine, AMPA, glyphosate, and tebuconazole treatment on the relative root growth rate of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown for 11 d in the absence of pesticide and transferred to fresh growth medium in the presence of varying concentrations of the pesticide mixture. Primary root length was measured every 24 h. Relative root growth is given as the percentage (mean  $\pm$  SEM) of the primary root increase relative to the initial root length at the time of transfer.

PSII efficiency at the control level indicated that photosynthesis remained active over this range of multipesticide mixture. It therefore appeared that low levels of residual runoff pesticide and degradation product mixtures affected specific plant physiological parameters in a dose-dependent manner.

#### Characterization of interactive effects between pesticides

In order to analyse the effects of pesticides in a mixture, single molecules and their various combinations were tested at their concentration in the C mixture (Figs 3, 4). The experimental set-ups for direct exposure and measurement of root growth were used to carry out a complete parallel analysis of all the combinations of AMPA (A), glyphosate (G), hydroxyatrazine (H), and tebuconazole (T) (Fig. 3).

Unlike degradation products A and H, active molecules G and T significantly affected root growth. Most combinations where G and T were present also showed significant effects. The combinations HG, GA, GT, AT, HAG, HGT, GAT, and HGAT resulted in similar root inhibition to that of G and T alone. In contrast, HA, HT, and HAT treatments gave intermediate inhibition responses that could not be ascribed to the effect of single molecules. Thus, the significant inhibition effect of HA contrasted with the absence of an effect of H or A alone (Fig. 3). For HT and HAT, plant root growth was significantly less inhibited than in the case of single T

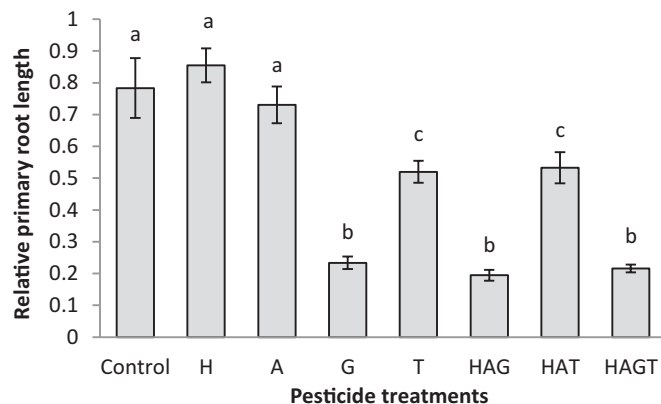


**Fig. 3.** Effects of hydroxyatrazine (H), AMPA (A), glyphosate (G), and tebuconazole (T) combinations on root growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings germinated and grown in the presence of varying associations of the four pesticides. In all treatments, whether single pesticide or multiple pesticide, each pesticide was at the concentration corresponding to the reference concentration (C) of the pesticide mixture described in Table 2. Values (mean  $\pm$  SEM) of final root length after 14 d of growth are shown. Statistical analysis between means was carried out using the Mann–Whitney–Wilcoxon test. Statistical significance of differences ( $P \leq 0.05$ ) between treatments is indicated by different letters above bars.

treatment (Fig. 3). A similar trend was observed for AT treatment, which was statistically equivalent to both T and HT treatments. Moreover, this lifting of T-dependent inhibition by H or A was not observed in the case of G-dependent inhibition (Fig. 3). The main active component leading to inhibition by the HAGT mixture thus seemed to be glyphosate. Transfer experiments (Fig. 4) confirmed the effects of active molecules, G and T, relative to degradation products, with, however, a weaker effect of tebuconazole. The effects of HAG, HAT, and HAGT thus appeared to be related to the effects of active G and/or T molecules. In the transfer experiment, no lifting of T inhibition by H or A was observed during HAT treatment. The results in Figs 3 and 4 clearly showed that there was no additive effect when active molecules were combined. This comparative analysis therefore revealed that seedlings were affected not only by low levels of the herbicide glyphosate, but also by low levels of the fungicide tebuconazole. Moreover, an unexpected synergy between degradation products that were individually inactive (Fig. 3) and an unexpected antagonism between degradation products and tebuconazole (Fig. 3) were observed.

#### *Integrative analysis reveals cryptic effects of residual pesticides and of pesticide degradation products*

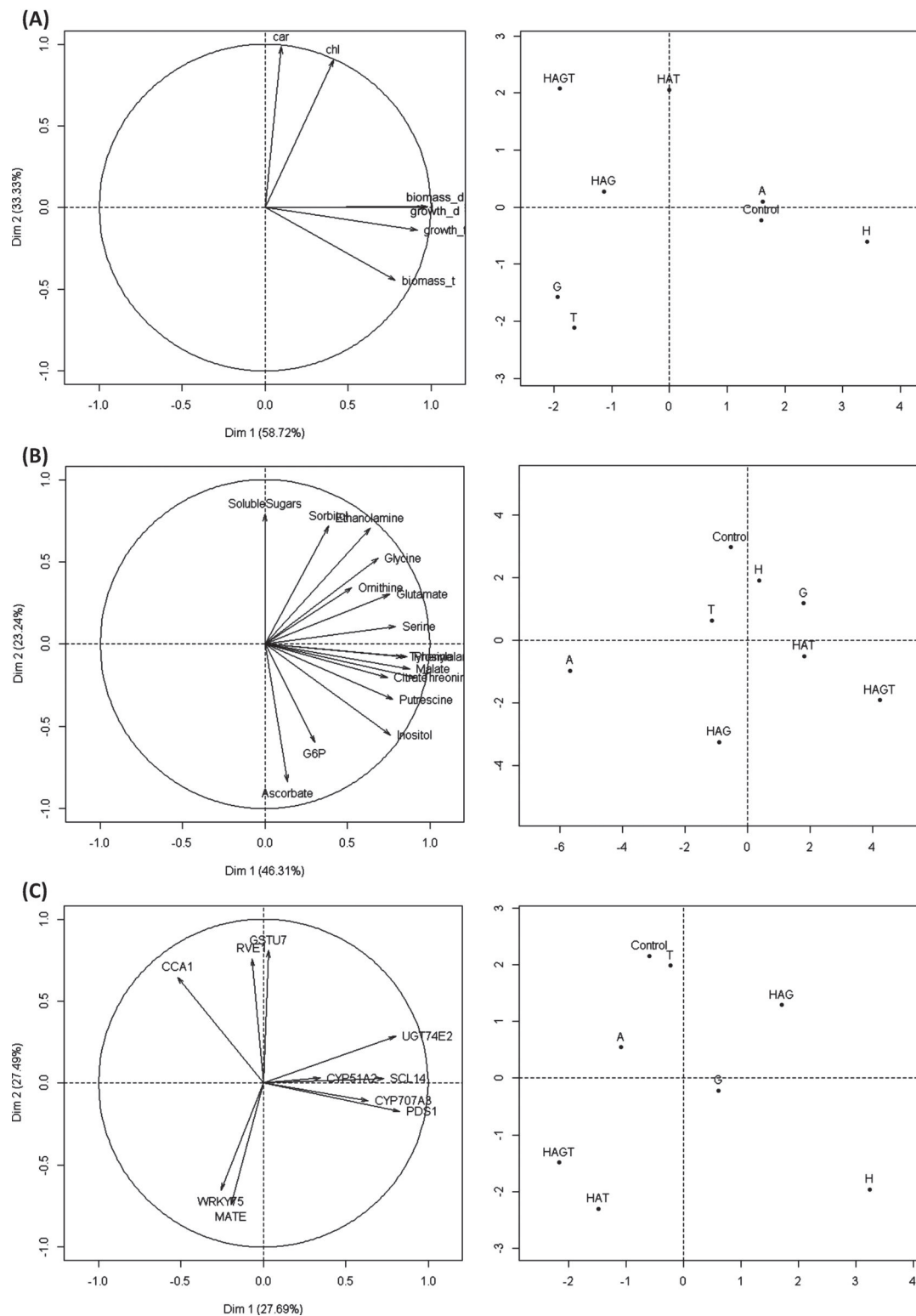
Integrative analyses of physiological, metabolic, and gene expression responses were carried out using comparative experiments of varying pesticide combinations (Fig. 5). The interactions between pesticides were first analysed in terms of growth, seedling biomass, chlorophyll levels, and carotenoid levels by PCA (Fig. 5A). Three major clusters were identified:



**Fig. 4.** Effects of hydroxyatrazine (H), AMPA (A), glyphosate (G), and tebuconazole (T) combinations on the relative root growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown for 11 d in the absence of pesticide and transferred to fresh growth medium in the presence of varying associations of the four pesticides. In all treatments, whether single pesticide or multiple pesticide, each pesticide was at the concentration corresponding to the reference concentration (C) of the pesticide mixture described in Table 2. Relative root growth, corresponding to the percentage of primary root increase relative to initial length, is given at 72 h after transfer. Statistical analysis between means was carried out using the Mann–Whitney–Wilcoxon test. Statistical significance of differences ( $P \leq 0.05$ ) between treatments is indicated by different letters above bars.

(i) the control associated with AMPA and hydroxyatrazine treatments; (ii) the active pesticides glyphosate and tebuconazole; and (iii) pesticide mixtures. Responses of seedlings treated with pesticide mixtures (HAG, HAT, and HAGT) were specific and clearly distinct from the responses to single-pesticide treatments. These specificities and the absence of major physiological effects from single degradation product treatments therefore suggested the existence of, on one hand, significant interactions between active pesticides and less active degradation products, and, on the other hand, different response mechanisms to pesticide mixtures and single pesticides.

Based on the detection and quantification of metabolites (Supplementary Table S3 at JXB online) across the various treatments, metabolic profiling was characterized by PCA (Fig. 5B). Major changes of metabolic patterns were observed between control seedlings and pesticide treatments. Pesticide mixture treatments (HAG, HAT, and HAGT) induced a set of metabolic patterns that were distinct from those of single pesticide treatments (Fig. 5B), in accordance with the clustering of their physiological effects (Fig. 5A), with, however, a rather specific pattern for HAG relative to HAT and HAGT. The metabolic patterns of glyphosate, tebuconazole, and hydroxyatrazine were very similar, the latter being the closest to the control. AMPA treatment was characterized by a metabolic pattern that was clearly distinct from other patterns and by a strong impact on a wide range of metabolites, which contrasted with its absence of physiological impact (Figs 3, 4, 5A). AMPA induced major metabolic changes, revealing cryptic effects that had not been identified by morphological



**Fig. 5.** Principal component analysis of the physiological, metabolic, and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* seedlings to varying combinations of hydroxyatrazine (H), AMPA (A), glyphosate (G), and tebuconazole (T). Principal component analysis was carried out on the correlation matrix of averages of physiological parameters [root growth after 14 d direct exposure (growth\_d), seedling biomass after 14 d direct exposure (biomass\_d), chlorophyll levels after 14 d direct exposure (chl), carotenoid levels after 14 d direct exposure (car), root growth after 72 h secondary exposure (growth\_t), and seedling biomass after 72 h secondary exposure (biomass\_t)] (A), metabolite levels (B), and transcript levels (C). The metabolites and the transcripts that were analysed are described in [Supplementary Table S3](#) at JXB online and in [Table 1](#), respectively. Metabolites and transcript levels were quantified after 72 h secondary exposure. The position of the different pesticide treatments and the distribution of physiological, metabolic, and molecular parameters on the first plane (Dim1 and Dim2) are shown.

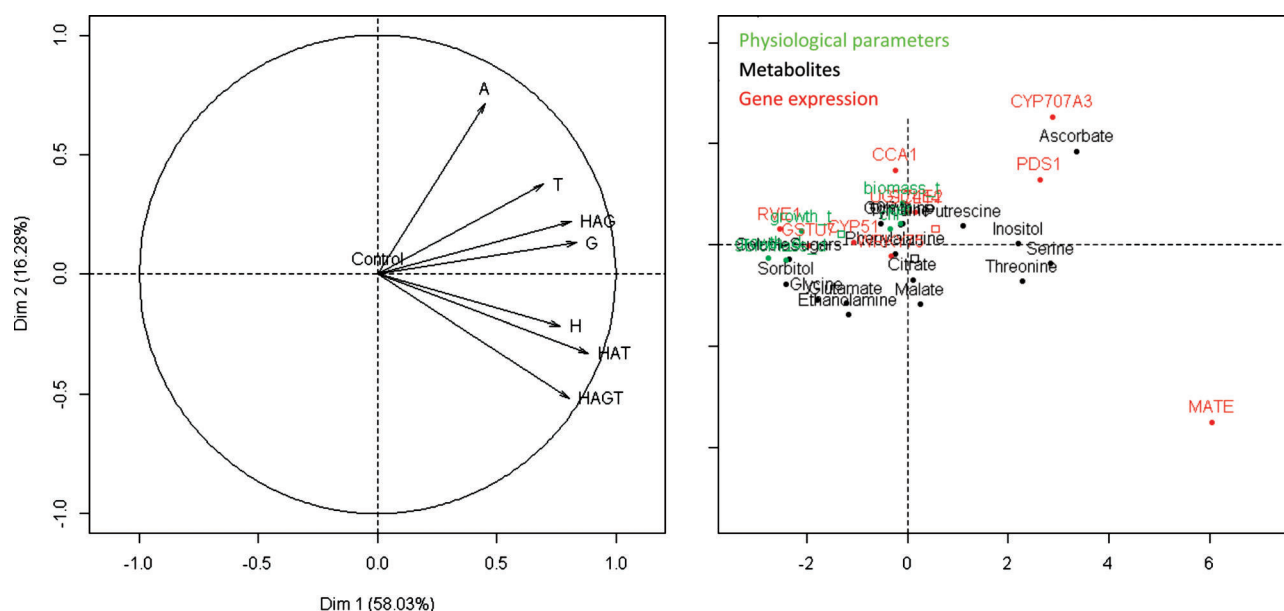
and physiological traits, and thus suggesting that AMPA acted on distinct and specific biochemical pathways. Finally, all treatments were found to be discriminated from control in an axis involving soluble sugars, which are related to both carbon metabolism and stress responses (Couée et al., 2006), and ascorbate, which plays an important role in abiotic stress responses (Foyer and Noctor, 2011).

Interactions between pesticides were then studied through their effects on gene expression. *UGT74E2*, *PDS1*, *SCL14*, *MATE*, *GSTU7*, *WRKY75*, and *RVE1* (Table 1) were chosen according to their regulation of expression in the presence of pesticides in *Arabidopsis* (Ramel et al., 2007, 2012; Fode et al., 2008; Das et al., 2010). *CYP51A2* was selected for its implication in *Arabidopsis* during development and plant growth (Kim et al., 2005) and for the involvement of a fungal homologue in azole fungicide sensitivity (Cools et al., 2006). Similarly, the *CYP707A3* gene was chosen for the inhibitory effect of the plant growth retardant uniconazole on its expression (Todoroki et al., 2012). Integrative analysis of expression responses by PCA showed that these molecular markers responded to most treatments (Fig. 5C), whether as single pesticide treatment or as mixture treatment, except in the case of tebuconazole treatment, which was very similar to the control. The HAT and HAGT mixtures showed a similar expression pattern that was significantly distinct from that of the HAG mixture, as was the case for their metabolic patterns. Hydroxyatrazine was found to induce major changes in gene expression, although this degradation product did not have a large impact on morphological and physiological traits and metabolic profiles.

The major difference between these three PCA results was the distribution of single pesticide treatments, which showed a discrepancy between physiological parameter distribution and metabolic and molecular distributions. Pesticide mixtures showed some correlation of physiological effects, and important differences in molecular and metabolic profiles, thus suggesting the involvement of distinct signalling pathways. This parallel analysis of multiple physiological, metabolic, and molecular traits was therefore essential to highlight cryptic and interactive effects of residual runoff pesticides, which would not have been detected by single parameter studies. Moreover, metabolic and molecular responses emphasized the importance of signalling networks.

#### Metabolic and transcript variations reflect novel mechanisms and signalling pathways of pesticide impact

In order to examine the relationships between the effects of pesticides on physiological traits, metabolism, and gene expression, a PCA centred on physiological, biochemical, and molecular parameters using the same data set as in Fig. 5 was carried out (Fig. 6). This representation confirmed the fact that each pesticide and each mixture had specific effects on one or more of the traits. Physiological traits, metabolites, and transcripts were found to be significantly regulated by various treatments, whether through a decreased or increased level, as shown by the distribution of the different parameters in the PCA. Metabolites such as ascorbate, inositol, and serine, and gene expression of *MATE*, *CYP707A3*, and *PDS1*



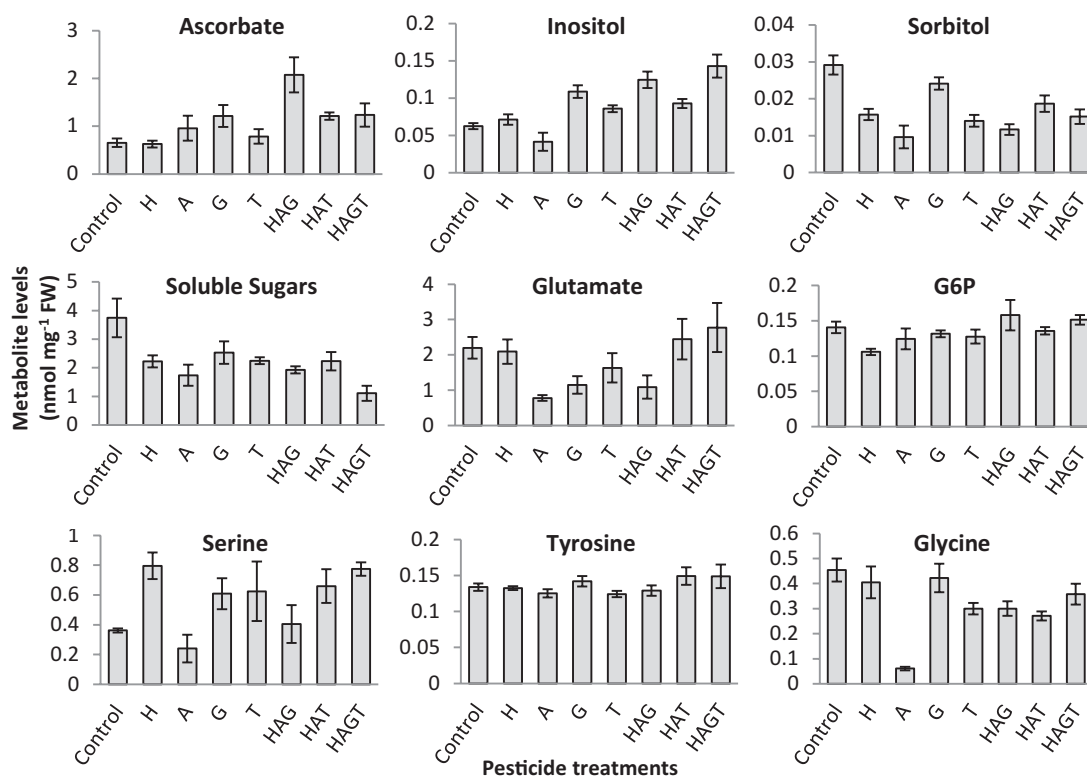
**Fig. 6.** Principal component analysis of the physiological, metabolic, and molecular markers of responses of *Arabidopsis thaliana* seedlings to varying combinations of hydroxyatrazine (H), AMPA (A), glyphosate (G), and tebuconazole (T). Principal component analysis was carried out on the correlation matrix of averages of physiological parameters, metabolite levels, and transcript levels. The various parameters and their symbols are as described in Fig. 5. The position of physiological, metabolic, and molecular markers and the distribution of pesticide treatments on the first plane (Dim1 and Dim2) are shown. For clarity of the figure, the descriptors of physiological parameters have been omitted. (This figure is available in colour at JXB online.)

increased in response to treatments, whereas the levels of sorbitol, soluble sugars, and glutamate, and gene expression of *RVE1* and *GSTU7* decreased (Fig. 6). In contrast, other metabolic or gene pathways, such as phenylalanine, tyrosine, and *WRKY75*, were not significantly affected. Figures 7 and 8 summarize, respectively, the metabolite levels and gene expression that were most affected by pesticide treatments.

Glyphosate was the only compound with a well-described mode of action *in planta*. However, although it is expected to inhibit synthesis of aromatic amino acids as a result of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) inhibition (Steinrücken and Amrhein, 1980), glyphosate did not modify the levels of tyrosine (Fig. 7) and phenylalanine (data not shown). It thus appeared that glyphosate effects in the present treatments could not be ascribed to EPSPS inhibition. Glyphosate had a negative impact on general metabolism, with a decrease of intermediate carbon (soluble sugars) and amino acid (glutamate) metabolites. It also increased stress-related compounds, such as inositol and ascorbate (Foyer and Noctor, 2011; Valluru and Van den Ende, 2011), and such as serine, which, as a cysteine precursor, is involved in glutathione metabolism (Foyer and Noctor, 2011). In contrast, its less active degradation product AMPA strongly decreased inositol, serine, glutamate, and glycine. Simultaneous depletion in glycine and serine levels agreed with the close metabolic links between serine and glycine.

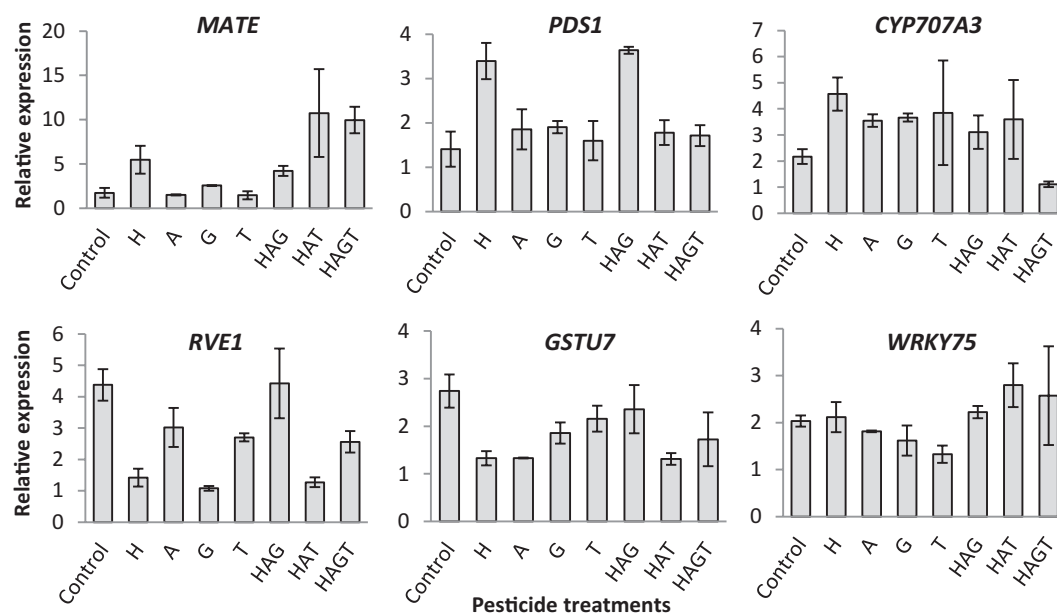
The glycine/serine ratio is known to be positively correlated to the flux of C through the photorespiratory pathway (Foyer *et al.*, 2003). The glyphosate treatment slightly reduced this ratio, whereas AMPA sharply decreased it, thus suggesting a strong effect on C photorespiratory flux. These drastic effects of AMPA on amino acid levels were not found after treatments by AMPA-containing mixtures. All of the treatments, with single pesticides or pesticide mixtures, resulted in a significant decrease of sorbitol and soluble sugars. This decrease of C compounds could be related to stress sensitivity and to a shift in carbon use. These variations in levels are therefore interesting to highlight responses to low-level pesticide contamination. In some cases, pesticide mixtures showed distinct effects relative to single pesticide treatments. It is noteworthy that the HAG mixture induced an increase in the ascorbate level, whereas each compound used separately had no effect or induced a much smaller increase. The HAGT treatment had little effect on the glutamate level despite the decreasing effects of A, G, and T alone.

Transcript levels (Fig. 8) also showed significant patterns of responses to the different pesticide treatments. The genes showing greater variation corresponded to three major functional classes, pesticide metabolism (*GSTU7* and *MATE*), metabolic stress responses (*PDS1*), and developmental stress signalling (*CYP707A3*, *RVE1*, and *WRKY75*). These three functional classes did not show coordinated expression under



**Fig. 7.** Effects of hydroxyatrazine (H), AMPA (A), glyphosate (G), and tebuconazole (T) combinations on metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings grown for 11 d in the absence of pesticide and transferred to fresh growth medium in the presence of varying associations of the four pesticides. In all treatments, whether single pesticide or multiple pesticide, each pesticide was at the concentration corresponding to the reference concentration (C) of the pesticide mixture described in Table 2. Values of metabolite levels (mean  $\pm$  SEM) at 72 h after transfer are shown.





**Fig. 8.** Effects of hydroxyatrazine (H), AMPA (A), glyphosate (G), and tebuconazole (T) combinations on the transcript levels of pesticide-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* seedlings grown for 11 d in the absence of pesticide and transferred to fresh growth medium in the presence of varying associations of the four pesticides. In all treatments, whether single pesticide or multiple pesticide, each pesticide was at the concentration corresponding to the reference concentration (C) of the pesticide mixture described in Table 2. Values of transcript levels (mean  $\pm$  SEM) at 72 h after transfer are shown.

any of the pesticide treatments. Thus, the active molecule glyphosate induced expression of *CYP707A3*, but repressed expression of *GSTU7* and *RVE1*. The degradation products AMPA and hydroxyatrazine and HAT and HAGT mixtures induced similar repression effects on *RVE1* and *GSTU7* expression. Significant effects of degradation products also affected expression of *CYP707A3*, which was induced by both AMPA and hydroxyatrazine, and of *MATE* and *PDS1*, which were induced by hydroxyatrazine. These unexpected molecular effects of theoretically inactive components were particularly highlighted by hydroxyatrazine treatment, which resulted in greater repression or induction than other single pesticide treatments in the case of *MATE*, *PDS1*, and *GSTU7* regulation. Finally, in contrast to its significant metabolic effects (Fig. 7), the fungicide tebuconazole showed only slight repression of *WRKY75* and *RVE1* transcript levels.

Pesticide mixtures showed significant effects on transcript levels, which were, at least in some cases, distinct from the effects of single molecule treatments. Indeed, field mixture HAGT treatment induced expression of *MATE*, whereas the compounds taken separately induced a much smaller response or none. Moreover, HAGT repressed *CYP707A3* expression, whereas the compounds taken separately induced an increase in expression. It is also noteworthy that HAG treatment had no effect on *RVE1* expression, whereas compounds taken separately repressed its expression. Moreover, gene expression analysis showed that the three pesticide mixtures differed in their molecular effects, for instance in the case of *PDS1*, which was greatly induced by HAG in contrast to the absence of the effect of HAT and HAGT treatments. Thus, variations of *PDS1* and *MATE* expression may give useful information

on the impact of hydroxyatrazine and hydroxyatrazine-containing mixtures.

All of these effects, on metabolites and gene expression, strongly suggested that low levels of pesticides, whether as single molecule treatment or as mixtures, and whether as active molecules or as degradation products, interact with plant cell signalling and functioning.

## Discussion

### Impact of persistent residual pesticide contamination

Analysis of soil samples from field margins detected four pesticides and degradation products: glyphosate, AMPA, tebuconazole, and hydroxyatrazine. Surface water contamination in Brittany is followed monthly by the CORPEP and the RCS (Network for water control and surveillance). The first four substances most frequently quantified in 2009–2010 were AMPA, desethyl-atrazine, hydroxyatrazine, and glyphosate. The fungicide tebuconazole is frequently found in surface waters (Komárek et al., 2010). From 2007 to 2010, peak concentrations for glyphosate, AMPA, hydroxyatrazine, and tebuconazole in surface waters of Brittany varied from 2.4 to 5.42  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 0.9 to 3.99  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 0.04 to 0.08  $\mu\text{g l}^{-1}$ , and 0.15 to 11.42  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectively (CORPEP). Surface water analysis in the ZAA long-term research area, where soil sampling was done (Table 2), showed that in 2009 average concentrations of glyphosate, AMPA, and hydroxyatrazine, respectively, reached 0.11, 1.1, and 0.08  $\mu\text{g l}^{-1}$ . The nature of pesticides and degradation products found in soils of field margins of the ZAA (Table 2) was therefore in accordance with regional

surface water contamination data. Bioavailable pesticides in the field fluctuate according to pesticide- and environment-related characteristics and leaching events. In order to gain deeper understanding of pollutant bioavailability, additional studies would be required concerning soluble and active fractions of pollutant mixtures in soil and experimental media.

The present results confirmed that pesticide degradation products were still found in the environment, even several years after the prohibition and disuse of parent molecules (i.e. atrazine). Experimental approaches using outdoor lysimeters have shown that atrazine and hydroxyatrazine were detected 22 years after application (Jablonowski *et al.*, 2011). The present study demonstrates that low environmentally relevant levels of pesticides and their degradation products, whether as single molecules or as mixtures, can have a significant impact on plant functioning. The sensitivity of root growth and development to residual pesticides could have important consequences for mineral nutrition of plant communities and for seed bank dynamics. Atrazine acts on photosynthetic organisms by binding and inhibitory effects on the D1 protein of PSII and by signalling effects (Rutherford and Krieger-Liszka, 2001; Ramel *et al.*, 2007, 2009b). It can thus substantially affect development of *A. thaliana* seedlings at concentrations as low as 100 nM (Sulmon *et al.*, 2004). Low concentrations of atrazine also affect non-photosynthetic organisms. Specific binding to the growth hormone-releasing hormone receptor at environmentally relevant concentrations (Fakhouri *et al.*, 2010) thus links atrazine effects to endocrine disruptor activity and development of reproductive cancers in humans (Fan *et al.*, 2007). In contrast, atrazine degradation products, and particularly hydroxyatrazine, have generally been considered to be non-phytotoxic (Shimabukuro, 1967). The present results show that this by-product did not cause any major physiological damage (Figs 3, 4). However, the results also show that gene expression was significantly affected by the presence of hydroxyatrazine (Fig. 8), thus suggesting that it could act at the molecular level on unknown targets. It has been shown, in a non-target organism such as the rat, that hydroxyatrazine delayed the onset of puberty (Laws *et al.*, 2003), thus indicating possible endocrine disrupting-activity like atrazine. Single tebuconazole or glyphosate treatments had strong effects on root growth (Figs 3, 4). Tebuconazole is a fungicide belonging to the triazole family, which inhibits the synthesis of sterols in fungi. It has also been shown to inhibit the plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase enzyme from Sorghum (Lamb *et al.*, 2001). Child *et al.* (1993) have shown that tebuconazole induced inhibition of stem extension and a decrease of gibberellic acid levels in oilseed rape. This inhibition was lifted by exogenous gibberellic acid, suggesting therefore that the inhibitory effects of tebuconazole could be related to interference with growth-promoting hormones. The significant effect of glyphosate (Figs 3, 4) seemed to be independent of its expected effects on aromatic amino acid levels (Vivancos *et al.*, 2011), which remained constant upon glyphosate treatment (Fig. 7). Single AMPA treatment did not have any effect on root growth (Figs 3, 4). However, the combination of the two degradation products, hydroxyatrazine and AMPA, was found to affect root growth

negatively. The effects of low environmentally relevant levels of pesticides and degradation products could not therefore be restricted to active molecules, nor ascribed to currently known mechanisms.

*Integrative analysis of physiological, metabolic, and molecular responses highlights the signalling effects of pesticide environmental levels on plants*

The residual pesticide mixture found in field margins had very strong effects on root growth and development, even in the absence of significant effects on photosynthesis and photosynthetic pigments (Fig. 1). These effects on root growth and development occurred in parallel with extensive metabolic changes outlined by an increase of stress metabolites (ascorbate, inositol) and a decrease of carbon metabolites (soluble sugars). However, the mechanisms of action underlying these developmental and metabolic effects remained unclear: (i) glyphosate treatment did not modify the levels of aromatic amino acids, thus suggesting that the EPSPS target of glyphosate was not affected (Vivancos *et al.*, 2011); (ii) whereas tebuconazole had significant effects on *Arabidopsis*, and although triazole molecules generally act as cytochrome P450 inhibitors (Hartwig *et al.*, 2012), no specific target of tebuconazole has been identified to date in higher plants (Child *et al.*, 1993); (iii) whereas hydroxyatrazine had significant metabolic effects on *Arabidopsis*, no specific metabolic target of hydroxyatrazine has yet been identified to date in higher plants.

AMPA showed striking and specific effects on glycine levels (Fig. 7), which could result from its structural similarity to glycine (Benbrahim *et al.*, 2008), and subsequent interactions with enzymes of glycine metabolism, such as glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase, or glutamate-glyoxylate aminotransferase (Bauwe and Kolukisaoglu, 2003; Verslues *et al.*, 2007). However, the effects of the HGAT mixture did not result in depletion of glycine levels as occurred under conditions of AMPA treatment, thus showing the involvement of mechanisms of action other than interference with glycine metabolism enzymes.

More generally, as discussed above, the physiological, metabolic, and molecular effects of the various pesticide mixtures were distinct from the effects of single pesticide treatments, thus suggesting complex mechanisms of interaction. Despite the lack of action on well-defined metabolic targets, pesticide treatments were generally shown to act on gene expression patterns related to hormone balance and transcription, in agreement with genome-wide transcriptomic analysis of pesticide effects in plants (Ramel *et al.*, 2007) and with previous studies on hormone-xenobiotic cross-talk (Sulmon *et al.*, 2007; Weisman *et al.*, 2010; Ramel *et al.*, 2012). Thus, the *CYP707A3* gene, which encodes an abscisic acid (ABA) 8'-hydroxylase that controls ABA catabolism and regulation of ABA levels (Kitahata *et al.*, 2005), was affected by all pesticide treatments, with significant and opposite effects of hydroxyatrazine and of the HGAT mixture. The genes encoding the Myb transcription factor RVE1 (Rawat *et al.*, 2009) and the WRKY75 transcription factor (Devaiah *et al.*, 2007) were also regulated under conditions of pesticide treatment, in particular



as a result of hydroxyatrazine, glyphosate, or tebuconazole treatments. Control of *RVE1* expression and involvement of *RVE1* have been related to control of auxin production (Rawat *et al.*, 2009) and to light/carbohydrate dynamics (Usadel *et al.*, 2008). Control of *WRKY75* expression and involvement of *WRKY75* have been related to root development (Devaiah *et al.*, 2007) and  $H_2O_2$  dynamics (Inzé *et al.*, 2012). Pesticide effects on expression of regulatory genes such as *CYP707A3*, *RVE1*, or *WRKY75* were therefore consistent with modifications of growth and development (Figs 3, 4), carbon metabolism (Fig. 7), and reactive oxygen species dynamics (Ramel *et al.*, 2009b). Thus, the negative impact of a HGAT mixture on *CYP707A3* and *RVE1* expression may result in changes in hormonal balance (Kitahata *et al.*, 2005; Rawat *et al.*, 2009) leading to inhibition of primary root growth (Figs 1–4).

Such effects on hormone balance and transcription regulation genes strongly suggest pesticide interactions with mechanisms other than action on metabolic targets, thus implying that glyphosate, AMPA, tebuconazole, and hydroxyatrazine must act on unknown targets leading to gene regulation, probably through signalling processes. In the case of glyphosate, EPSPS-independent regulatory effects have been described (Vivancos *et al.*, 2011), in agreement with the present study, but signalling targets for glyphosate interaction remain to be identified. In the case of AMPA, novel mechanisms of toxicity can be hypothesized from the present analysis of glycine levels in response to AMPA treatment (Fig. 7). However, structural analogy with glycine may also provide non-enzymatic sites of binding that remain to be identified. Tebuconazole, as a member of the triazole family, may interact through structural analogy with steroid signalling (Hartwig *et al.*, 2012). Finally, the parent molecule of hydroxyatrazine, atrazine, has been shown to cause major gene expression reprogramming in *Arabidopsis* (Ramel *et al.*, 2007, 2013) through the involvement of signalling processes (Ramel *et al.*, 2012). Preliminary analysis indicated that hydroxyatrazine elicited hydrogen peroxide accumulation (data not shown), as was shown to be the case for atrazine (Ramel *et al.*, 2009b). Moreover, characterization of the involvement of the AP2/ERF CRF6 transcription factor in atrazine responses (Ramel *et al.*, 2007, 2012) demonstrates cross-talk between atrazine effects and cytokinin pathways (Cutcliffe *et al.*, 2011), which had been previously hypothesized in studies of growth-promoting action of triazines (Nadar *et al.*, 1975). Since these effects of triazines probably depend on the N-heterocycle (Nadar *et al.*, 1975), it can be speculated that such cross-talk with cytokinin pathways may also be induced by hydroxyatrazine. To the authors' knowledge, the present study presents the first evidence to date on the induction of major metabolic and molecular perturbations by pesticide degradation products. Further work is therefore required to examine these potential signalling mechanisms, which may be particularly important for the study of sublethal pesticide levels and for deciphering the interactive effects of pesticide mixtures. Characterization of such signalling and hormone cross-talk effects, which is a major field of research in animal toxicology (Frye *et al.*, 2011), should provide novel insights into the environmental impact of runoff pesticides on plant communities.

Better insight into the signalling processes should improve mathematical models predicting the joint effect of interacting mixtures. Environmental regulations specify methods for assessing the toxicity of pollutant mixtures. The frequently used concentration addition model, or toxic units approach, adds the toxicities of individual molecules with a similar mode of action (Loewe and Muischnek, 1926), whereas the independent action model (Bliss, 1939) takes into account the toxicities of molecules that differ in their mode of action. These models have focused on 'no-interaction' scenarios, but the toxicity of mixtures is not always equal to the sum of single toxicities (additivity) as estimated by these approaches. There may be synergism or antagonism, as demonstrated in the present work. In order to take into account complex interactions, computational toxicology develops novel approaches taking into account molecular descriptors and computational techniques (Kim *et al.*, 2012). However, these approaches do not readily estimate the specific involvement of all possible parameters in the resulting risk assessment. Moreover, as described by Isensee *et al.* (1998), variation in pollutant combination influences the availability of toxic molecules and interactions with the plant compartment. Toxicant mixtures in natural environments are complex. The quality and quantity of toxicants vary greatly and the physicochemical conditions fluctuate. The evaluation of all the necessary parameters to predict the toxicity of a residual pollutant in a natural environment is a real challenge. As highlighted in the present work, detailed knowledge of biological mechanisms, under single or multiple pollution conditions, is necessary to improve assessment and predicting tools in order to estimate environmental risks associated with residual contamination.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

**Table S1.** List of the pesticides analysed in soil samples (CGI analytical platform, Ploemeur, Brittany, France).

**Table S2.** Hoagland medium composition

**Table S3.** Plant metabolites analysed by GC/MS methods

## Acknowledgements

This work was supported, in part, by the interdisciplinary program 'Ingénierie écologique' from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and by the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, France). We are grateful to D. Lecœur (INRA, France) for his help with the field margin study, and to H. Duruflé for his assistance in molecular analysis. AAS is supported by a doctoral scholarship from the Brittany regional council (France).

## References

- Bauwe H, Kolukisaoglu O. 2003. Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1523–1536.

- Benbrahim N, Rahmouni A, Ruiz-López MF.** 2008. A theoretical study of medium effects on the structure of the glycine analogue aminomethylphosphonic acid. *Physical Chemistry Chemical Physics* **10**, 5624–5632.
- Benachour N, Séralini GE.** 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology* **22**, 97–105.
- Billeter R, Liira J, Bailey D, et al.** 2008. Indicators for biodiversity in agricultural landscapes: a pan-European study. *Journal of Applied Ecology* **45**, 141–150.
- Bliss CI.** 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* **26**, 585–615.
- Borggaard OK, Gimsing AL.** 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* **64**, 441–456.
- Child RD, Evans DE, Allen J, Arnold GM.** 1993. Growth responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.) to combined applications of the triazole chemicals triapenthenol and tebuconazole and interactions with gibberellin. *Plant Growth Regulation* **13**, 203–212.
- Cobbett CS, Meagher BR.** 2002. Arabidopsis and the genetic potential for the phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. In: Meyerowitz EM, Somerville CR, eds. *The Arabidopsis Book*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–23.
- Cools HJ, Fraaije BA, Kim SH, Lucas JA.** 2006. Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. *Biochemical Society Transactions* **34**, 1219–1222.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 449–459.
- Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM.** 2011. CRFs form protein–protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in Arabidopsis via the CRF domain. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4995–5002.
- Das M, Reichman JR, Haberer G, et al.** 2010. A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **72**, 545–556.
- Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG.** 2007. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**, 1789–1801.
- Dévier MH, Mazellier P, Ait-Aissa S, Budzinski H.** 2011. New challenges in environmental analytical chemistry: identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie* **14**, 766–779.
- Elsaesser D, Blankenberg AGB, Geist A, Mæhlum T, Schulz R.** 2011. Assessing the influence of vegetation on reduction of pesticide concentration in experimental surface flow constructed wetlands: application of the toxic units approach. *Ecological Engineering* **37**, 955–962.
- Fakhouri WD, Nuñez JL, Trail F.** 2010. Atrazine binds to the growth hormone-releasing hormone receptor and affects growth hormone gene expression. *Environmental Health Perspectives* **118**, 1400–1405.
- Fan W, Yanase T, Morinaga H, et al.** 2007. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives* **115**, 720–727.
- Fode B, Siemsen T, Thurow C, Weigel R, Gatz C.** 2008. The Arabidopsis GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *The Plant Cell* **20**, 3122–3135.
- Foyer CH, Noctor G.** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2–18.
- Foyer CH, Parry M, Noctor G.** 2003. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **54**, 585–593.
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, et al.** 2011. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 144–159.
- Hartwig T, Corvalan C, Best NB, Budka JS, Zhu JY, Choe S, Schulz B.** 2012. Propiconazole is a specific and accessible brassinosteroid (BR) biosynthesis inhibitor for Arabidopsis and maize. *PLoS One* **7**, e16625.
- Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O.** 2012. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* (in press).
- Inzé A, Vanderauwera S, Hoesberichts FA, Vandenorpe M, Van Gaeve T, Van Breusegem F.** 2012. A subcellular localization compendium of hydrogen peroxide-induced proteins. *Plant, Cell and Environment* **35**, 308–320.
- Isensee AR, Sadeghi AM, Mylavarapu RS.** 1998. Impact of burn-down herbicides on atrazine washoff from vegetation. *Chemosphere* **36**, 13–19.
- Jablonowski ND, Schäffer A, Buraue P.** 2011. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental Science and Pollution Research International* **18**, 328–331.
- Kim J, Kim S, Schaumann GE.** 2012. Reliable predictive computational toxicology methods for mixture toxicity: toward the development of innovative integrated models for environmental risk assessment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (in press).
- Kim HB, Schaller H, Goh CH, Kwon M, Choe S, An CS, Durst F, Feldmann KA, Feyereisen R.** 2005. Arabidopsis *cyp51* mutant shows postembryonic seedling lethality associated with lack of membrane integrity. *Plant Physiology* **138**, 2033–2047.
- Kitahata N, Saito S, Miyazawa Y, et al.** 2005. Chemical regulation of abscisic acid catabolism in plants by cytochrome P450 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **13**, 4491–4498.
- Komárek M, Cadková E, Chrastný V, Bordas F, Bollinger JC.** 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* **36**, 138–151.
- Lamb DC, Cannieux M, Warrilow AG, Bak S, Kahn RA, Manning NJ, Kelly DE, Kelly SL.** 2001. Plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase affinity for azole fungicides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**, 845–849.
- Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Cooper RL.** 2003. Pubertal development in female Wistar rats following exposure to propazine

and atrazine biotransformation by-products, diamino-S-chlorotriazine and hydroxyatrazine. *Toxicology Sciences* **76**, 190–200.

**Lichtenthaler HK, Wellburn AR.** 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **11**, 591–592.

**Liira J, Schmidt T, Aavik T, et al.** 2008. Plant functional group composition and large-scale species richness in European agricultural landscapes. *Journal of Vegetation Science* **1**, 3–14.

**Lin CH, Lerch RN, Goyne KW, Garrett HE.** 2011. Reducing herbicides and veterinary antibiotics losses from agroecosystems using vegetative buffers. *Journal of Environmental Quality* **40**, 791–799.

**Loewe S, Muischnek H.** 1926. Über Kombinationswirkungen. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naryn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologische Pharmakologie* **114**, 313–326.

**Marshall EJR, Moonen AC.** 2002. Field margins in northern Europe: their functions and interactions with agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **89**, 5–21.

**Nadar HM, Clegg MD, Maranville JW.** 1975. Promotion of Sorghum callus growth by the s-triazine herbicides. *Plant Physiology* **56**, 747–751.

**Nandula VK, Reddy KN, Rimando AM, Duke SO, Poston DH.** 2007. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3540–3545.

**Ouina A, Martin M, Burel F.** 2008. Agricultural landscape connectivity for the meadow brown butterfly (*Maniola jurtina*). *Agriculture, Ecosystems and Environment* **124**, 193–199.

**Pätzold S, Klein C, Brümmer GW.** 2007. Run-off transport of herbicides during natural and simulated rainfall and its reduction by vegetated filter strips. *Soil Use and Management* **23**, 294–305.

**Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G.** 2009b. Differential dynamics of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *BMC Plant Biology* **9**, 28.

**Ramel F, Sulmon C, Cabello-Hurtado F, Taconnat L, Martin-Magniette ML, Renou JP, El Amrani A, Couée I, Gouesbet G.** 2007. Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in *Arabidopsis thaliana*: novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance. *BMC Genomics* **8**, 450.

**Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I.** 2009a. Natural variation reveals significant integration of carbohydrate nutritional status and acclimation to xenobiotic stress in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *Annals of Botany* **104**, 1323–1337.

**Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I.** 2013. Regulatory effects of atrazine differentially override sucrose repression of amino acid catabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* (in press).

**Ramel F, Sulmon C, Serra AA, Gouesbet G, Couée I.** 2012. Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3999–4014.

**Rawat R, Schwartz J, Jones MA, Sairanen I, Cheng Y, Andersson CR, Zhao Y, Ljung K, Harmer SL.** 2009. REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 16883–16888.

**Reddy KN, Rimando AM, Duke SO.** 2004. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5139–5143.

**Reichenberger S, Bach M, Skitschak A, Frede HG.** 2007. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; a review. *Science of the Total Environment* **384**, 1–35.

**Rutherford AW, Krieger-Liszak A.** 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 648–653.

**Shimabukuro RH.** 1967. Atrazine metabolism and herbicidal selectivity. *Plant Physiology* **42**, 1269–1276.

**Steinrücken HC, Amrhein N.** 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **94**, 1207–1212.

**Sulmon C, Gouesbet G, Couée I, El Amrani A.** 2004. Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. *Plant Science* **167**, 913–923.

**Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A, Couée I.** 2007. Involvement of the ethylene-signalling pathway in sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1083–1092.

**Székács A, Darvas B.** 2012. Forty years with glyphosate. In: Hasaneen MNAE-G, ed. *Herbicides—properties, synthesis and control of weeds*. Rijeka, Croatia: InTech, 247–284.

**Todoroki Y, Naiki K, Muramatsu T, Ohnishi T, Ueno K, Mizutani M, Hirai N.** 2012. A conformationally restricted uniconazole analogue as a specific inhibitor of rice *ent*-kaurene oxidase, CYP701A6. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **22**, 3240–3243.

**Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Höhne M, Günther M, Stitt M.** 2008. Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **146**, 1834–1861.

**Valluru R, Van den Ende W.** 2011. Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress. *Plant Science* **181**, 387–400.

**Verslues PE, Kim YS, Zhu JK.** 2007. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in a *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology* **64**, 205–217.

**Vivancos P, Driscoll SP, Bulman CA, Ying L, Emami K, Treumann A, Mauve C, Noctor G, Foyer CH.** 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiology* **157**, 256–268.

**Weisman D, Alkio M, Colón-Carmona A.** 2010. Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signaling pathways. *BMC Plant Biology* **10**, 59.

**Zhang X, Liu X, Zhang M, Dahlgren RA, Eitzel M.** 2010. A review of vegetated buffers and a meta-analysis of their mitigation efficacy in reducing nonpoint source pollution. *Journal of Environmental Quality* **39**, 76–84.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1. List of the pesticides analysed in soil samples (CGI analytical platform, Ploemeur, Brittany, France).** Soil samples were subjected to an accelerated solvent extraction (50 bars at 50°C with acetonitrile-water solution as a solvent) (ASE 200; Dionex, USA) and analysed for the presence and quantification of a 41-molecule panel of pesticides and pesticide degradation products using HPLC/MS/MS, GC/MS or HPLC/fluorescence quantification methods.

Type of pesticide	Name	Chemical family	Quantification method
Herbicides and Herbicide-derived compounds	2,4 D	Aryloxy acid	HPLC/MS/MS
	2,4 MPCA	Aryloxy acid	HPLC/MS/MS
	Ethofumesate	Benzofuran	HPLC/MS/MS
	Dicamba	Benzoic acid	HPLC/MS/MS
	Diflufenican	Carboxamid	GC/MS
	Acetochlor	Chloroacetamide	HPLC/MS/MS
	Alachlor	Chloroacetamide	HPLC/MS/MS
	Dimetachlor	Chloroacetamide	HPLC/MS/MS
	Dimethenamide	Chloroacetamide	HPLC/MS/MS
	Metazachlor	Chloroacetamide	HPLC/MS/MS
	Imazamethabenz	Imidazolinone	HPLC/MS/MS
	Oxadiazon	Oxadiazole	GC/MS
	Dichlorprop	Phenoxy	HPLC/MS/MS
	Mecoprop	Phenoxy	HPLC/MS/MS
	1-(4-isopropylphenyl)urea	Phenylurea	HPLC/MS/MS
	Diuron	Phenylurea	HPLC/MS/MS
	Isoproturon	Phenylurea	HPLC/MS/MS
	Linuron	Phenylurea	HPLC/MS/MS
	Metabenzthiazuron	Phenylurea	HPLC/MS/MS
	AMPA	Phosphonic acid	HPLC/Fluorescence
	Glyphosate	Phosphonic acid	HPLC/Fluorescence
	Fluroxypyr	Picolinic acid	HPLC/MS/MS
	Triclopyr	Picolinic acid	HPLC/MS/MS
	Clopyralide	Pyridine	HPLC/MS/MS
	Flazasulfuron	Sulfonylurea	HPLC/MS/MS
	Nicosulfuron	Sulfonylurea	HPLC/MS/MS
	2-hydroxyatrazine	Triazine	HPLC/MS/MS
	Atrazine	Triazine	HPLC/MS/MS
	Simazine	Triazine	HPLC/MS/MS
	Aminotriazole	Triazole	HPLC/Fluorescence
	Mesotrione	Triketone	HPLC/MS/MS
	Sulcotrione	Triketone	HPLC/MS/MS

Fungicides	Cyprodinil	Anilinopyrimidine	HPLC/MS/MS
	Carbendazime	Carbamate	HPLC/MS/MS
	Chlorothalonil	Chlorinated benzonitrile	GC/MS
	Fenpropidin	Piperidine	HPLC/MS/MS
	Epoxyconazole	Triazole	HPLC/MS/MS
	Tebuconazole	Triazole	HPLC/MS/MS
Insecticides	Carbofuran	Carbamate	HPLC/MS/MS
	Parathion methyl	Organophosphorous	GC/MS
	Pendimethaline	Toluidine	GC/MS

**Table S2. Hoagland medium (H2395, Sigma-Aldrich) composition**

<b>Component</b>	<b>mg/L</b>
Ammonium Phosphate	115.03
Boric Acid	2.86
Calcium Nitrate	656.4
Cupric Sulfate-5H <sub>2</sub> O	0.08
Ferric Tartrate-2H <sub>2</sub> O	5.32
Magnesium Sulfate	240.76
Manganese Chloride-4H <sub>2</sub> O	1.81
Molybdenum Trioxide	0.016
Potassium Nitrate	606.6
Zinc Sulfate-7H <sub>2</sub> O	0.22

**Table S3. Plant metabolites analysed by GC/MS methods**

<b><i>Amino acids</i></b>	<b><i>Soluble sugars and associated compounds</i></b>
Alanine	Soluble sugars [Saccharose + Glucose + Fructose]
Aspartic acid	Glucose-6-phosphate (G6P)
Glutamic acid	Glucono-delta-lactone
Glycine	Ribose
Isoleucine	<b><i>Glycerol and associated compounds</i></b>
Leucine	Glycerol
Lysine	Glycerol-phosphate
Methionine	<b><i>Organic acids</i></b>
Ornithine	Citrate
Phenylalanine	Succinate
Proline	Fumarate
Serine	Malate
Threonine	<b><i>Polyols</i></b>
Tyrosine	Erythritol
Valine	Sorbitol
<b><i>Polyamine</i></b>	Inositol
Putrescine	Adonitol
<b><i>Primary amine</i></b>	<b><i>Antioxidant compound</i></b>
Ethanolamine	Ascorbate
<b><i>Secondary metabolites</i></b>	<b><i>Cell wall compounds</i></b>
Lactate	Galacturonate
GABA	Xylose



### **3. Article n°2 : Physiology and toxicology of hormone-disrupting chemicals in higher plants**

Ivan Couée, Anne-Antonella Serra, Fanny Ramel, Gwenola Gouesbet and Cécile Sulmon

**Plant Cell Reports**, 2013, 32: 933-941

# Physiology and toxicology of hormone-disrupting chemicals in higher plants

Ivan Couée · Anne-Antonella Serra · Fanny Ramel ·  
Gwenola Gouesbet · Cécile Sulmon

Received: 27 December 2012 / Revised: 15 March 2013 / Accepted: 19 March 2013 / Published online: 4 April 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Higher plants are exposed to natural environmental organic chemicals, associated with plant–environment interactions, and xenobiotic environmental organic chemicals, associated with anthropogenic activities. The effects of these chemicals result not only from interaction with metabolic targets, but also from interaction with the complex regulatory networks of hormone signaling. Purpose-designed plant hormone analogues thus show extensive signaling effects on gene regulation and are as such important for understanding plant hormone mechanisms and for manipulating plant growth and development. Some natural environmental chemicals also act on plants through interference with the perception and transduction of endogenous hormone signals. In a number of cases, bioactive xenobiotics, including herbicides that have been designed to affect specific metabolic targets, show extensive gene regulation effects, which are more in accordance with signaling effects than with consequences of metabolic effects. Some of these effects could be due to structural analogies with plant hormones or to interference with hormone metabolism, thus resulting in situations of hormone disruption similar to animal cell endocrine disruption by xenobiotics. These hormone-disrupting effects can be superimposed on parallel metabolic effects, thus indicating that toxicological characterisation of xenobiotics must take

into consideration the whole range of signaling and metabolic effects. Hormone-disruptive signaling effects probably predominate when xenobiotic concentrations are low, as occurs in situations of residual low-level pollutions. These hormone-disruptive effects in plants may thus be of importance for understanding cryptic effects of low-dosage xenobiotics, as well as the interactive effects of mixtures of xenobiotic pollutants.

**Keywords** Chemical stress · Ecotoxicology · Hormone disruption · Small molecules · Stress signaling · Xenobiotic stress

## Abbreviations

ABA	Abscisic acid
AHL	<i>N</i> -acyl-L-homoserine lactone
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AP2	APETALA 2
CRF	Cytokinin response factor
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
ERF	Ethylene-responsive element binding factor
IAA	Indole-3-acetic acid
NAA	Naphthalene-1-acetic acid
PAH	Polycyclic aryl hydrocarbon
PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
PSII	Photosystem II
ROS	Reactive oxygen species
SCL	SCARECROW-like
TF	Transcription factor

Communicated by P. Kumar.

A contribution to the Special Issue: Plant Hormone Signaling.

I. Couée (✉) · A.-A. Serra · F. Ramel · G. Gouesbet ·  
C. Sulmon  
Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6553  
ECOBIO, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu,  
bâtiment 14A, 35042 Rennes Cedex, France  
e-mail: Ivan.Couee@univ-rennes1.fr

## Introduction

Higher plants are exposed to myriads of natural environmental organic chemicals, associated with plant–environment

interactions, and of xenobiotic environmental organic chemicals, associated with anthropogenic activities and pollutions. The physiological and developmental effects of these chemicals frequently involve interactions with metabolic targets (Fufezan et al. 2002; Liu et al. 2009; Ramel et al. 2009; Xie et al. 2010), with resulting effects on metabolism, reactive oxygen species (ROS) dynamics, membrane functioning, and maintenance of macromolecular structures. However, naturally occurring and anthropogenic chemicals can also act on plants through various interactions with the complex regulatory networks of plant hormone signaling. Purpose-designed plant hormone analogues, such as auxin analogues (Grossmann 2010), or inhibitors of hormone-metabolizing enzymes, such as triazole derivatives (Kaschani and van der Hoorn 2007; Yamada et al. 2012), show extensive signaling effects on gene regulation and are as such important for understanding plant hormone mechanisms (Kaschani and van der Hoorn 2007) and for manipulating plant growth and development (Raghavan et al. 2005; Grossmann 2010).

Some natural environmental chemicals have been shown to act on plants through interference with perception and transduction of endogenous hormone signals (Nelson et al. 2012). In a number of cases, bioactive xenobiotics, including herbicides that have been designed to affect specific metabolic targets, show extensive gene regulation effects that are more in accordance with signaling effects than with direct consequences of metabolic effects (Ramel et al. 2007, 2012b, 2013; Unver et al. 2010; Weisman et al. 2010) and such signaling effects could be ascribed to secondary messengers that derive from metabolic effects. Thus, singlet oxygen, which is generated by various herbicides inhibiting photosystem II (PSII) (Fufezan et al. 2002; Ramel et al. 2009), has been characterised as a cellular signal inducing stress responses and cell death in plant cells (op den Camp et al. 2003). However, the variety of structures shown by naturally occurring and anthropogenic chemicals encompasses potential analogies with plant hormone structures and may therefore develop interference with hormone metabolism and signaling.

Such cases of hormone interference in higher plants may suggest similarities with the situations of endocrine disruption which certain classes of xenobiotics induce in animals (Blumberg et al. 2011; Frye et al. 2011; Ulrich 2003). Endocrine disrupting chemicals have been defined as substances that interfere with hormone biosynthesis, metabolism or action and that lead to deviations from homeostatic controls (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Their characterization has been controversial, particularly in relation with environmentally occurring levels and in vivo dose–response dynamics (Blumberg et al. 2011). However, it has been demonstrated that, in animal cells, a range of environmental contaminants, including pesticides,

herbicides, chemical catalysts, industrial solvents and their by-products, plasticizers or pharmaceutical compounds, showed molecular actions on hormone receptors, especially, but not exclusively, steroid receptors, on signal transduction pathways, or on enzymes of hormone metabolism (Blumberg et al. 2011; Frye et al. 2011). A major aspect of endocrine disruption is the concomitant recruitment by xenobiotics of hormone receptors, such as estrogen receptors, and non-hormone receptors, such as the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which can be activated by diverse exogenous compounds, such as benzo-[a]-pyrene (Diamanti-Kandarakis et al. 2009; Ulrich 2003). This multiple recruitment of several receptors results in complex cellular and physiological outcomes (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). These different types of action, whether agonistic or antagonistic, are the putative mechanisms for the major effects of endocrine disrupting chemicals on animal development, physiology and behaviour (Frye et al. 2011; Hayes et al. 2002, 2011).

This review aims in highlighting the range of plant–environment interactions, where the idea of plant hormone disruption is of great potential interest. Hormone-disrupting effects can be superimposed on parallel metabolic and signaling effects. Aspects of this assessment concerning plant–xenobiotic interactions will therefore take into consideration the difficulty to distinguish between direct hormone-interference effects and indirect sensing of xenobiotic-related modifications and damages, and discuss whether hormone-disruptive signaling effects predominate when xenobiotic concentrations are low, as occurs in situations of residual low-level pollutions. Hormone-disruptive effects in plants may thus be of importance for understanding cryptic (whether negative or hormetic) effects of low-dosage xenobiotics, thus suggesting that toxicological characterisation of xenobiotics must take into consideration the whole range of signaling and metabolic effects. It will therefore be argued that plant hormone disruption should receive greater attention in the field of plant ecotoxicology.

### **Involvement of plant hormone interfering compounds in environmental signaling**

Plants produce an array of volatile compounds that are released in the environment. Some of these compounds are by themselves plant hormones (ethylene, methyljasmonate, methylsalicylate) that can directly act on the corresponding hormone perception and transduction systems of conspecific or heterospecific plants, thus inducing physiological and developmental responses (Holopainen and Blande 2012). Diverse plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) and fungal species also directly synthesize various forms of auxins, such as indole-3-acetic acid (IAA), indole-

3-butyric acid (or their precursors), cytokinins, and gibberellins, which are released in the environment and are thought to interact with endogenous plant hormone signaling and thus play a major role in the acclimation of plant development to the environment (Ortiz-Castro et al. 2009).

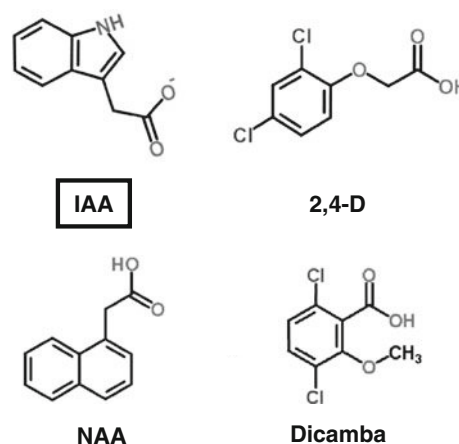
These possibilities of interspecies or interkingdom signaling can be extended by other compounds that are not considered to be endogenous plant hormones, but that are suspected to act on endogenous plant hormone perception, signaling or metabolism (Table 1). Thus, burning vegetation signals that were known to break dormancy and stimulate seed germination have been chemically characterised as a highly active class of compounds named karrikins (Nelson et al. 2012). The analysis of their structure–activity properties and utilization of *Arabidopsis* signaling mutants strongly link karrikins to the recently characterized strigolactone family of plant hormones (Nelson et al. 2012). *Bacillus subtilis* GB03 generates volatile organic compounds, devoid of traditional auxin structures, which trigger in *Arabidopsis* signaling networks involving cytokinins, brassinosteroids, auxin, salicylate and gibberellins (Ortiz-Castro et al. 2009; Zhang et al. 2007). Cyclodipeptides and derived diketopiperazines from *Pseudomonas aeruginosa* have been found to show different aspects of auxin-like activity in *Arabidopsis* seedlings, such as modulation of root development, activation of auxin-regulated gene expression, and interaction with components of auxin signaling (Ortiz-Castro et al. 2011). *N*-Acyl-L-homoserine lactones (AHLs) from various plant-growth promoting rhizospheric bacteria are perceived by plants and induce transcriptome- and proteome-wide modifications (Ortiz-Castro et al. 2009; von Rad et al. 2008). Moreover, AHL-mediated transcriptome changes involve plant-hormone-related genes and AHL treatment is correlated with changes of auxin–cytokinin balance (von Rad et al. 2008). Finally, complex herbivore-associated cues at the plant–insect interface also involve plant hormone processes, especially jasmonate-dependent processes in association with jasmonate-modulating hormones, such as ethylene and salicylate (Erb et al. 2012).

Most of these interactions seem to be related to adaptive changes involving growth and development stimulation or stress responses, and therefore hormone enhancement rather than hormone disruption. However, the effects of some allelochemicals are related with direct or indirect

interactions with plant hormone systems. Thus, the transcriptome response of *Arabidopsis* to the allelochemical benzoxazolin-2(3*H*)-one involves genes showing overrepresentation of ethylene-responsive elements (Baerson et al. 2005). More directly, flavonoid allelochemicals can negatively regulate auxin transport, which may result in auxin imbalance (Taylor and Grotewold 2005), thus reflecting a broader definition of hormone disruption that encompasses transport and turnover (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

### Purpose-designed or purpose-selected compounds interfering with plant hormone metabolism and signaling

The use of synthetic compounds designed or screened to interfere with plant hormone processes is well established whether for signaling research or for the development of phytochemicals (Kaschani and van der Hoorn 2007; Grossmann 2010). Phytochemicals thus include plant hormone analogues (Figs. 1, 2) and hormone synthesis inhibitors (Fig. 3) used either as growth regulators or as herbicides. The classical example of auxinic compounds (Fig. 1) illustrates both the strong impact of these compounds on physiological and developmental processes and the complexity of their mechanisms of action (Grossmann

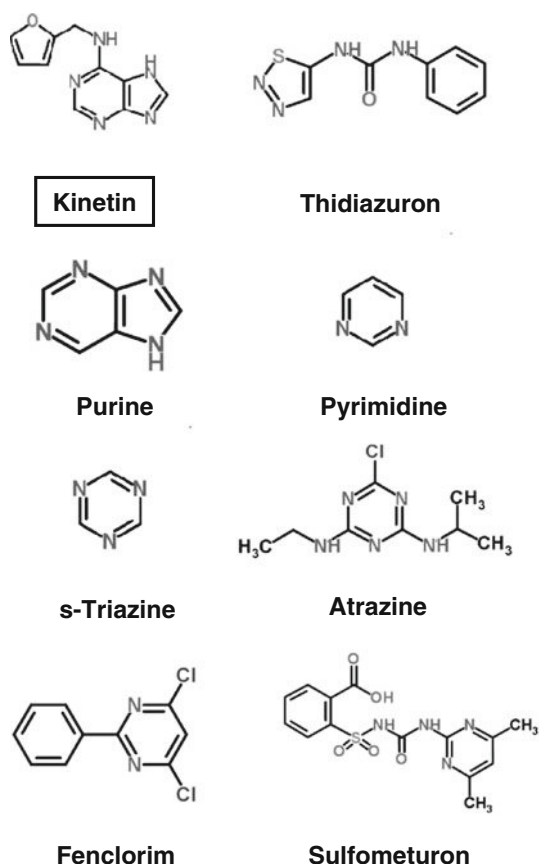


**Fig. 1** Comparative scheme of auxin (3-indole acetate) and auxin analogues. 2,4-D 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, IAA indole-3-acetate, NAA naphthalene-1-acetic acid

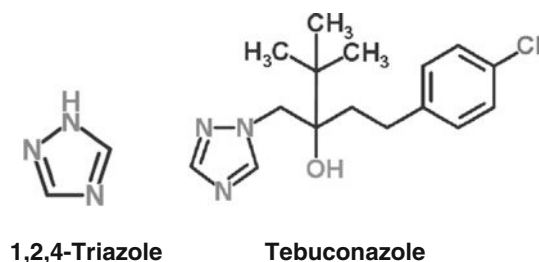
**Table 1** Naturally occurring non-plant compounds with plant hormone or plant hormone-like activity

AHL *N*-acyl-L-homoserine lactone, PGPR plant growth-promoting rhizobacteria

Compound	Source	Plant hormone activity	Reference
AHLs	PGPR	Alkamides	Ortiz-Castro et al. (2009)
Diketopiperazines	PGPR	Auxin	Ortiz-Castro et al. (2011)
Karrikins	Burning vegetation	Strigolactones	Nelson et al. (2012)
Volatile organics	<i>Bacillus</i> sp.	Auxin	Zhang et al. (2007)



**Fig. 2** Comparative scheme of various xenobiotics (atrazine, fencloirim, s-triazine, sulfometuron, thidiazuron) with cytokinin (kinetin), purine and pyrimidine structures



**Fig. 3** Structure of triazole compounds

2010). The common features of synthetic auxins are reflected in their overall action on auxin signaling, with the ability of the IAA receptor TIR1 to bind 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and naphthalene-1-acetic acid (NAA) (Grossmann 2010; Gleason et al. 2011). However, synthetic auxins also differ in terms of aromatic rings and position of carboxylic acid moieties, and higher plants present multiple IAA-binding F-box proteins (Grossmann 2010; Gleason et al. 2011). The differences of effects of synthetic auxins are thus likely to result from fine

interactions of specific chemical structures with the different types of F-box receptors. Moreover, interestingly, it has been shown that 2,4-D had significant toxic effects on yeast through distinct mechanisms involving membrane perturbation, cytosolic acidification, pro-oxidant action and transcriptomic changes (Teixeira et al. 2006, 2007). It thus seems that synthetic analogues of plant hormones can act on eukaryotic cells through interference with signaling pathways of the corresponding endogenous hormone combined with idiosyncratic xenobiotic effects. Analogues of other plant hormones, such as cytokinins (thidiazuron, Heyl et al. 2012, Fig. 2), abscisic acid (ABA) (pyrabactin, Puli and Raghavendra 2012), or salicylate (benzothiadiazole, Cooper et al. 2004), have been characterised, with important research and agronomical applications for the analysis of hormone sensing mechanisms and for crop management.

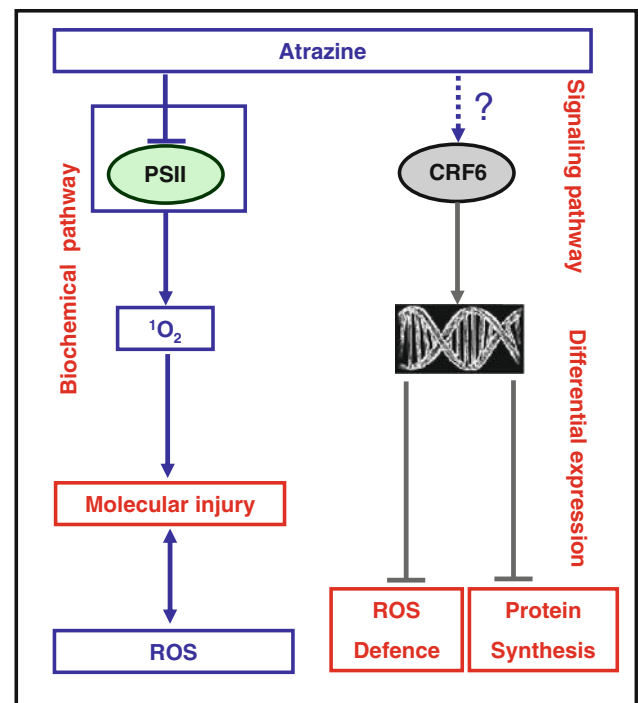
Chemical approaches have also resulted in the development of hormone metabolism inhibitors. Triazole-type molecules (Fig. 3) have thus been found to be effective inhibitors of cytochrome P450s involved in steroid synthesis, whether in fungi or in plants; hence, their initial development as fungicides (Kaschani and van der Hoorn 2007). However, they were also found to be effective inhibitors of plant gibberellin biosynthesis, thus resulting in lowered contents of bioactive gibberellins in the plant (Izumi et al. 1984; Child et al. 1993; Rademacher 2000). These compounds, such as tebuconazole (Fig. 3), are thus used both as fungicide and as plant growth retardant, particularly in oilseed rape (Child et al. 1993; Lamb et al. 2001; Rademacher 2000). Subsequent research on these triazoles demonstrated their inhibitory effects on brassinosteroid synthesis and ABA catabolism (Saito et al. 2006; Kaschani and van der Hoorn 2007), with subsequent development as pharmacological agents for analyzing brassinosteroid and ABA dynamics. Most of these hormone-related synthetic compounds are being released in the environment through current horticulture and agriculture management activities (Billeter et al. 2008) or through various practices (storage) or accidents (spillage) leading to further environmental contamination (Felsot 1998). These compounds can constitute air, soil or water contaminants affecting non-target organisms (Teixeira et al. 2007; Wu et al. 2013). The fungicides and plant growth retardants tebuconazole and epoxiconazole have thus been characterised as endocrine disruptors in mammals, acting through multiple mechanisms (Taxvig et al. 2007). Non-target plant communities can therefore also be affected by such environmentally occurring synthetic compounds whose design entails direct interaction with various endogenous plant hormone systems, in particular auxins, cytokinins, gibberellins, ABA and brassinosteroids.

## Disrupting effects of xenobiotics on plant hormone processes

Toxicogenomics approaches have demonstrated that most xenobiotic chemicals, despite their structural variety, have strong and large-scale regulatory effects on gene expression in plants (Behringer et al. 2011; Das et al. 2010; Peng et al. 2011; Ramel et al. 2007; Unver et al. 2010; Weisman et al. 2010), thus resulting in xenobiotic-response gene networks involving induction and repression of hundreds of genes. These xenobiotic-regulated effects can affect genes involved in plant hormone metabolism. Thus, herbicides (Ramel et al. 2007), herbicide safeners (Riechers et al. 2010; Skipsey et al. 2011) and polycyclic aryl hydrocarbons (PAHs) (Weisman et al. 2010) affect the expression of genes involved in jasmonate, salicylate and ethylene metabolic pathways. The analysis of hormone-signalling mutants (Sulmon et al. 2007; Weisman et al. 2010) has confirmed that interactions of xenobiotics with hormone metabolism and hormone action are involved in plant responses to xenobiotics. However, there is not much information about the mechanisms linking perception of xenobiotics and environmental contaminants and gene regulation in higher plants (Ramel et al. 2012b), and especially about the binding to regulatory proteins. A safener-binding protein has been identified in maize (Walton and Casida 1995), but its role in safener-mediated signaling has not yet been established. The endogenous and environmental toxic compound cyanide (Ebbs et al. 2003) acts as a potent metabolic inhibitor and as an agonist of ETR1 ethylene sensor kinase (Bisson and Groth 2012), but its potential effects on gene regulation remain to be studied.

At any rate, large-scale transcriptomic effects provide a more complex picture of xenobiotic effects than the mere disrupting action of a bioactive molecule on a specific metabolic target. Although the herbicide atrazine interacts with the D1 protein of PSII and elicit singlet oxygen production (Fufezan et al. 2002; Ramel et al. 2009; Fig. 4), a number of atrazine effects do not seem to depend on singlet oxygen mediation and major gene-regulation effects, such as the repression of ROS defence and protein synthesis (Ramel et al. 2007; Fig. 4), are likely to determine or to enhance atrazine toxicity (Ramel et al. 2007, 2009), thus suggesting that atrazine acts on plants both through a biochemical pathway and through a signaling pathway (Fig. 4).

Baerson et al. (2005) and Fode et al. (2008) have emphasised the central role of TGA transcription factors (TFs) in the development of molecular responses to xenobiotic treatment. These TGA factors that are involved in biotic interactions (Rochon et al. 2006) respond not only to the auxin analogue 2,4-D, but also to allelochemicals, herbicide safeners and pharmacological agents (Johnson et al. 2001; Baerson et al. 2005; Fode et al. 2008; Behringer



**Fig. 4** The biochemical and signaling pathways of atrazine effects on higher plants. Atrazine acts on plant cells through a biochemical pathway involving PSII inhibition and singlet oxygen production (Fufezan et al. 2002) and through a signaling pathway probably involving cytokinin response factor 6 (CRF6) and cytokinin transduction (Nadar et al. 1975; Polya and Bowman 1979; Ramel et al. 2012b) and resulting in repression of plant cell defence functions (Ramel et al. 2007, 2009). The blue box integrating the inhibitory arrow and PSII illustrates the fact that singlet oxygen production proceeds from atrazine inhibition of PSII

et al. 2011), through the action of a TGA-interacting protein, SCARECROW-like 14 (SCL14), a member of the GRAS family of regulatory proteins. Ramel et al. (2007) also identified the potential involvement of several TFs in the different types of atrazine responses in *Arabidopsis thaliana*. For the *At3g61630* and *At3g56710* genes, respectively encoding an AP2/ERF family TF and a sigma factor binding protein, characterization of corresponding insertional mutants (Ramel et al. 2012b) showed that, although these genes were not differentially expressed in response to atrazine treatment, the *ap2* and *sib1* mutant lines exhibited lower atrazine inhibition than wildtype, thus suggesting the involvement of *At3g61630* AP2/ERF and *At3g56710* SIB1 TFs in atrazine sensitivity through post-transcriptional mechanisms. All of these results involving post-transcriptional effects of xenobiotics on TFs (Fode et al. 2008; Johnson et al. 2001) strongly suggest mechanisms that include direct action on TFs.

The AP2/ERF family is a large group of plant-specific transcription factors (Mizoi et al. 2012). The B-5 subgroup



of AP2/ERF factors include cytokinin response factor (CRF) TFs that have been shown to be regulated by cytokinins, to be involved in leaf and cotyledon development, and to form protein–protein interactions with each other and with cytokinin-signaling intermediates (Cutcliffe et al. 2011). The AP2/ERF TF involved in the response to atrazine (Ramel et al. 2012b) corresponds to CRF6, which can engage in direct interactions with various histidine phosphotransfer proteins and with type-B response regulators (Cutcliffe et al. 2011), thus strongly suggesting a relationship between cytokinin-signaling pathways and the signaling pathway of atrazine effects (Fig. 4).

This is particularly striking in the light of earlier studies (Nadar et al. 1975) that had described the growth-promoting role, at sub-lethal concentrations, of triazine compounds such as atrazine, in relation with cytokinin-like activity which was ascribed to the structure of the *N*-heterocycle of triazines (Fig. 2). Moreover, triazine compounds were found to act in a competitive manner on kinetin binding to a soluble high-affinity cytokinin-binding protein from wheat (Polya and Bowman 1979). Other PSII-inhibiting herbicides, such as the phenylurea compounds 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (CMU) and (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), which also show weak cytokinin activity (Bruce and Zwar 1966), were reported to interact with this cytokinin-binding protein (Polya and Bowman 1979).

Further work would, therefore, be required to elucidate triazine–cytokinin and phenylurea–cytokinin relationships in the context of CRF (Cutcliffe et al. 2011) and cytokinin receptor (Heyl et al. 2012) functioning, to verify whether this interaction mediates signaling and gene expression effects (Fig. 4). This may turn out to be relevant for other *N*-heterocycle compounds (Fig. 2), such as the herbicide safener fenclorim (Skipsey et al. 2011) or the sulfonylurea herbicide sulfometuron (Das et al. 2010). In bacteria, two-component sensor kinases are involved in various aspects of chemical sensing, including sensing of benzene contaminants (Krell et al. 2010). It would thus be of great interest to investigate the possible involvement of plant two-component systems (Grefen and Harter 2004), whether hormone- or stress-related, in plant xenobiotic sensing.

Aromatic compounds, such as benzene, PAHs, or chlorinated aromatic pesticides, are widespread and persistent environmental contaminants with potentially toxic effects on living organisms (Cao et al. 2009). Meta-analysis of phenanthrene impact on *Arabidopsis* transcriptome (Weisman et al. 2010) did not reveal major correlations with the transcriptomic effects of plant hormones (IAA, methyljasmonate, gibberellic acid, ABA, cytokinin) or hormone modulator treatments. The major correlation that was found linked phenanthrene effects with plant-microorganism interactions with *Pseudomonas syringae* and with the

pathogenic fungus *Botrytis cinerea* (Weisman et al. 2010). Thus, despite the presence of aryl rings, phenanthrene effects did not directly relate with auxin interference, and its complex effects were indirectly related to salicylate and ethylene pathways through xenobiotic-mediated upregulation or downregulation of hormone biosynthesis genes (Weisman et al. 2010). Similarly, the transcriptomic effects of naphthalene did not seem to be directly related to auxin interference (Peng et al. 2011). In contrast, the aromatic contaminant phenylacetic acid (Cao et al. 2009), which is in itself an auxinic compound that is endogenously present in plant tissues (Simon and Petrasek 2011), is bound to act on non-target plant communities through auxin-interfering processes. Chemical genetics approaches (Kaschani and van der Hoorn 2007) will, therefore, be required to characterize the targets and modes of action of environmental aryl compounds in higher plants.

### Conclusion: chemical pollution and plant hormone disruption

Chemical pollution (Sander mann 2004) in air, soil, sediment and water involves numerous structural and functional families of organic xenobiotics, such as pesticides, associated adjuvants, solvents, antibiotics, drugs, petroleum derivatives, plasticizers, that can be present over great ranges of concentration, from residual to acute levels, and in a great variety of combinations.

In some cases, such as the widely used herbicides 2,4-D (Morré et al. 1984; Raghavan et al. 2005; Teixeira et al. 2006) or atrazine (Ramel et al. 2007, 2009, 2013), it has been established that xenobiotic action involved multiple mechanisms, both biochemical or signaling-dependent. Further toxicogenomics research on the regulatory effects of a wider range of toxicants on plants is therefore necessary to understand fully the ecotoxicological impact of xenobiotics. This will provide a first line of evidence for investigating the mechanisms of these signaling effects and whether they can be ascribed to interference or disruption of endogenous plant hormone systems, as is the case for environmentally contaminating phytochemicals that are plant hormone analogues or plant hormone synthesis inhibitors, and as may be the case for triazine herbicides.

A more complete view of biochemical and signaling effects may provide novel insights into high-concentration effects, with major impact on metabolic and biochemical targets, and low-concentration effects, with major impact through signaling effects. Signaling effects at low concentrations, as described for endocrine disruptors of vertebrate systems (Blumberg et al. 2011; Diamanti-Kandarakis et al. 2009), are likely to be important for understanding the impact of residual contamination.



Finally, the mechanisms of xenobiotic-mediated plant hormone disruption will be useful to understand the interactive effects of multi-toxicant combinations, which are frequently encountered in situations of pollutions in the field. Similarly, the analysis of endocrine disruptor mixtures is an important field of research in vertebrate toxicology because of complex interactions between nuclear receptors and between components of transduction pathways (Frye et al. 2011; Ulrich 2003). In parallel, the complete range of hormone-like signals and of their corresponding receptors is far from being elucidated in higher plants. Thus, plant hormone metabolism and signaling is much more complex than initially thought, with the continuous discovery of signaling molecules, especially within the terpenoid class of compounds (Bouvier et al. 2005; Ramel et al. 2012a). The potentialities for xenobiotic disruption of endogenous plant signals may therefore be greater than the current scope of plant hormone characterization.

**Acknowledgments** Our research on xenobiotic stress and on plant-pesticide interactions is funded, in part, by the “Ecosphère continentale et côtière” funding programme and the “Ingénierie écologique” interdisciplinary programme from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and by the Fondation pour la recherche sur la biodiversité (FRB, France). AAS is supported by a doctoral scholarship from the Brittany regional council (France).

## References

- Baerson SR, Sanchez-Moreiras A, Pedrol-Bonjoch N, Schulz M, Kagan IA, Agarwal AK, Reigosa MJ, Duke SO (2005) Detoxification and transcriptome response in *Arabidopsis* seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2(3H)-one. *J Biol Chem* 280:21867–21881
- Behringer C, Bartsch K, Schaller A (2011) Safeners recruit multiple signalling pathways for the orchestrated induction of the cellular xenobiotic detoxification machinery in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ* 34:1970–1985
- Billé R, Liira J, Bailey D, Bugter R, Arens P, Augenstein I, Aviron S, Baudry J, Bukacek R, Burel F, Cerny M, De Blust G, De Cock R, Diekötter T, Dietz H et al (2008) Indicators for biodiversity in agricultural landscapes: a pan-European study. *J Appl Ecol* 45:141–150
- Bisson MM, Groth G (2012) Cyanide is an adequate agonist of the plant hormone ethylene for studying signalling of sensor kinase ETR1 at the molecular level. *Biochem J* 444:261–267
- Blumberg B, Iguchi T, Odermatt A (2011) Endocrine disrupting chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:1–3
- Bouvier F, Isner JC, Dogbo O, Camara B (2005) Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* 10:187–194
- Bruce MI, Zwar JA (1966) Cytokinin activity of some substituted ureas and thioureas. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 165:245–265
- Cao B, Nagarajan K, Loh KC (2009) Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:207–228
- Child RD, Evans DE, Allen J, Arnold GM (1993) Growth responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.) to combined applications of the triazole chemicals triapenthenol and tebuconazole and interactions with gibberellin. *Plant Growth Regul* 13:203–212
- Cooper WC, Jia L, Goggin FL (2004) Acquired and R-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *J Chem Ecol* 30:2527–2542
- Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM (2011) CRFs form protein–protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. *J Exp Bot* 14:4995–5002
- Das M, Reichman JR, Haberer G, Welzl G, Aceituno FF, Mader MT, Watrud LS, Pflieger TG, Gutiérrez RA, Schäffner AR, Olszyk DM (2010) A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 72:545–556
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev* 30:293–342
- Ebbs S, Bushey J, Poston S, Kosma D, Samiotakis M, Dzombak D (2003) Transport and metabolism of free cyanide and iron cyanide complexes by willow. *Plant Cell Environ* 26:1467–1478
- Erb M, Meldau S, Howe GA (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci* 17:250–259
- Felsot AS (1998) User sites and the generation of pesticide waste. In: Kearney PC, Roberts T (eds) *Pesticide remediation in soils and water*. Wiley, Chichester, pp 1–19
- Fode B, Siemsen T, Thürow C, Weigel R, Gatz C (2008) The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *Plant Cell* 20:3122–3135
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC (2011) Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol* 24:144–159
- Fufezan C, Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Lett* 532:407–410
- Gleason C, Foley RC, Singh KB (2011) Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of auxinic herbicide dicamba. *PLoS ONE* 6:e17245
- Grefen C, Harter K (2004) Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* 219:733–742
- Grossmann K (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag Sci* 66:113–120
- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A (2002) Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419:895–896
- Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR, de Solla SR, Iguchi T, Ingraham H, Kestemont P, Kniewald J, Kniewald Z, Langlois VS, Luque EH, McCoy KA, Muñoz-de-Toro M, Oka T, Oliveira CA, Orton F, Ruby S, Suzawa M, Tavera-Mendoza LE, Trudeau VL, Victor-Costa AB, Willingham E (2011) Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:64–73
- Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmölling T (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *Eur J Cell Biol* 91:246–256
- Holopainen JK, Blande JD (2012) Molecular plant volatile communication. *Adv Exp Med Biol* 739:17–31
- Izumi K, Yamaguchi I, Wada A, Oshio H, Takahashi N (1984) Effects of a new plant growth retardant (E)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)-1-penten-3-ol (S-3307) on the growth and gibberellin content of rice plants. *Plant Cell Physiol* 25:611–617
- Johnson C, Boden E, Desai M, Pascuzzi P, Arias J (2001) In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J* 28:237–243

- Kaschani F, van der Hoorn R (2007) Small molecule approaches in plants. *Curr Opin Chem Biol* 11:88–98
- Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni ME, Ramos JL (2010) Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64:539–559
- Lamb DC, Cannieux M, Warrilow AG, Bak S, Kahn RA, Manning NJ, Kelly DE, Kelly SL (2001) Plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase affinity for azole fungicides. *Biochem Biophys Res Commun* 284:845–849
- Liu H, Weisman D, Ye YB, Cui B, Huang YH, Colón-Carmona A, Wang ZH (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 176:375–382
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* 1819:86–96
- Morré DJ, Griphover B, Monroe A, Morré JT (1984) Phosphatidylinositol turnover in isolated soybean membranes stimulated by the synthetic growth hormone 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J Biol Chem* 259:15364–15368
- Nadar HM, Clegg MD, Maranville JW (1975) Promotion of sorghum callus growth by the s-triazine herbicides. *Plant Physiol* 56:747–751
- Nelson DC, Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM (2012) Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annu Rev Plant Biol* 63:107–130
- op den Camp RGL, Przybilla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I, Nater M, Apel K (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:2320–2332
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Lopez-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4:701–712
- Ortiz-Castro R, Diaz-Perez C, Martinez-Trujillo M, del Rio RE, Campos-Garcia J, Lopez-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7253–7258
- Peng RH, Xu RR, Fu XY, Xiong AS, Zhao W, Tian YS, Zhu B, Jin XF, Chen C, Han HJ, Yao QH (2011) Microarray analysis of the phytoremediation and phytosensing of occupational toxicant naphthalene. *J Hazard Mater* 189:19–26
- Polya GM, Bowman JA (1979) Ligand specificity of a high affinity cytokinin-binding protein. *Plant Physiol* 64:387–392
- Puli MR, Raghavendra AS (2012) Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* 63:1349–1356
- Rademacher W (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:501–531
- Raghavan C, Ong EK, Dalling MJ, Stevenson TW (2005) Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct Integr Genomics* 5:4–17
- Ramel F, Sulmon C, Cabello-Hurtado F, Taconnat L, Martin-Magniette ML, Renou JP, El Amrani A, Couée I, Gouesbet G (2007) Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in *Arabidopsis thaliana*: novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance. *BMC Genomics* 8:450
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G (2009) Differential dynamics of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol* 9:28
- Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylidès C, Havaux M (2012a) Carotenoid oxidative products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:5535–5540
- Ramel F, Sulmon C, Serra AA, Gouesbet G, Couée I (2012b) Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *J Exp Bot* 63:3999–4014
- Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I (2013) Regulatory effects of atrazine differentially override sucrose repression of amino acid catabolism. *Acta Physiol Plant*. doi:10.1007/s11738-013-1246-5
- Riechers DE, Kreuz K, Zhang Q (2010) Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. *Plant Physiol* 153:3–13
- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Despres C (2006) The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 18:3670–3685
- Saito S, Okamoto M, Shinoda S, Kushiro T, Koshiba T, Kamiya Y, Hirai N, Todoroki Y, Sakata K, Nambara E, Mizutani M (2006) A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1731–1739
- Sandermann H (2004) Molecular ecotoxicology of plants. *Trends Plant Sci* 9:406–413
- Simon S, Petrask J (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* 180:454–460
- Skipsey M, Knight KM, Brazier-Hicks M, Dixon DP, Steel PG, Edwards R (2011) Xenobiotic responsiveness of *Arabidopsis thaliana* to a chemical series derived from a herbicide safener. *J Biol Chem* 286:32268–32276
- Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A, Couée I (2007) Involvement of the ethylene-signalling pathway in sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Plant Physiol* 164:1083–1092
- Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andeasen HR, Vinggaard AM (2007) Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci* 100:464–473
- Taylor LP, Grotewold E (2005) Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol* 8:317–323
- Teixeira MC, Fernandes AR, Mira NP, Becker JD, Sá-Correia I (2006) Early transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress imposed by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Yeast Res* 6:230–248
- Teixeira MC, Duque P, Sá-Correia I (2007) Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends Biotechnol* 25:363–370
- Ulrich RG (2003) The toxicogenomics of nuclear receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 7:505–510
- Unver T, Bakar M, Shearman RC, Budak H (2010) Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. *Mol Genet Genomics* 283:397–413
- von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, Durner J (2008) Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* 229:73–85
- Walton JD, Casida JE (1995) Specific binding of a dichloroacetamide herbicide safener in maize at a site that also binds thiocarbamate and chloroacetanilide herbicides. *Plant Physiol* 109:213–219
- Weisman D, Alkio M, Colón-Carmona A (2010) Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signalling pathways. *BMC Plant Biol* 10:59

- Wu C, Sun J, Zhang A, Liu W (2013) Dissipation and enantioselective degradation of plant growth retardants paclobutrazol and uniconazole in open field, greenhouse, and laboratory soils. *Environ Sci Technol* 47:843–849
- Xie X, Zhou Q, He Z, Bao Y (2010) Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Toxicol Chem* 29:922–928
- Yamada K, Yoshizawa Y, Oh K (2012) Synthesis of 2RS,4RS-1-[2-phenyl-4-[2-(2-trifluoromethoxy-phenoxy)-ethyl]-1,3-dioxolan-2-yl-methyl]-1H-1,2,4-triazole derivatives as potent inhibitors of brassinosteroid biosynthesis. *Molecules* 17:4460–4473
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Faruq MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS, Paré PW (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839–851

## 4. Discussion

L'étude de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* a permis de démontrer l'importance inattendue de l'impact de pollutions chimiques de faibles concentrations (Serra et al., 2013). Les pollutions prises en considération dans notre étude correspondaient à des xénobiotiques et à des niveaux réellement détectés en bordure de champs agricoles (Chapitre III, 2.2.2.). La détection de pesticides autorisés (Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire, 2014), mais aussi d'un produit de dégradation de pesticide interdit depuis de nombreuses années (Jablonowski et al., 2011) et d'un produit de dégradation d'un pesticide réputé comme biodégradable (Duke et Powles, 2008), soulignait la rémanence de telles molécules et le caractère durable et complexe de certaines pollutions. Le fait que de telles contaminations périphériques résiduelles et rémanentes aient des effets biologiques non-négligeables met ainsi en relief l'impact environnemental potentiel des interactions mises en évidence.

Les résultats obtenus mettent en lumière qu'*Arabidopsis* présente une sensibilité marquée aux xénobiotiques à faibles doses, avec des perturbations importantes de son fonctionnement par des classes très différentes de composés. Ces polluants, seuls et en mélange, entraînent des perturbations dans la croissance et le développement, en parallèle avec d'importants changements métaboliques et moléculaires, qui affectent des processus biologiques centraux comme la dynamique du carbone, la balance hormonale, les défenses antioxydantes et la détoxification. Par ailleurs, certains xénobiotiques à faibles doses semblent affecter la plante indépendamment de toute action sur les cibles biochimiques connues, ce qui suggère l'existence de mécanismes d'action cryptiques. De plus, certains produits de dégradation, considérés comme des molécules peu ou non actives et qui n'ont pas d'effet sur les paramètres physiologiques, entraînent des effets majeurs imprévus, révélés par des perturbations métaboliques et moléculaires significatives. C'est le cas en particulier du produit de dégradation du glyphosate, l'AMPA. La rémanence environnementale de ce produit de dégradation et sa phytotoxicité potentielle (Nandula et al., 2007 ; Reddy et al., 2004) ont suscité un regain d'intérêt sur sa dynamique environnementale et son impact sur les plantes. Dans un article récent, Gomes et al. (2014) mettent ainsi en relief l'originalité de nos travaux (Serra et al., 2013) en termes d'analyse des effets de faibles doses de glyphosate et d'AMPA. Notre étude montre clairement que, lorsqu'ils sont présents en mélange, les xénobiotiques peuvent provoquer des effets négatifs, soulignant ainsi des mécanismes complexes d'interactions. Ces interactions, révélées par les effets physiologiques, sont également observés aux niveaux métabolique et moléculaire. Ces réponses, qui sont significativement

différentes de l'additivité, peuvent être de la synergie ou de l'antagonisme, et confirment la difficulté de prédiction des effets des mélanges. Nos résultats suggèrent donc que les approches classiques d'additivité (modèle d'addition des concentrations, Chap I, 2.2.) ne sont pas utilisables pour ce type de pollutions résiduelles, et que la compréhension des mécanismes sous-jacents d'interaction est absolument nécessaire. C'est particulièrement le cas avec les mélanges des produits de dégradation (AMPA et hydroxy-atrazine) qui provoquent de fortes réponses synergiques. Ces produits de dégradation sont donc à prendre également en considération dans l'étude des risques des pollutions, et la compréhension de leurs modes d'action nécessite de plus amples recherches.

L'analyse intégrative des réponses physiologiques, métaboliques et moléculaires à des pesticides et à leurs produits de dégradation à des niveaux environnementaux, démontre, dans le cas présent, la présence d'effets signalétiques qui laissent supposer que des mécanismes de perception et de transduction interviennent (Foyer et Noctor, 2005, 2013 ; Ramel et al., 2012 ; Serra et al., 2013 ). Ces effets signalétiques sont difficiles à expliquer à l'heure actuelle. Cependant, nos résultats d'expression génétique sur la balance hormonale (Serra et al., 2013) suggèrent que les faibles doses de polluants pourraient interférer avec la synthèse, la perception ou la transduction de signaux hormonaux (Couée et al., 2013).

La caractérisation écotoxicologique des xénobiotiques doit donc prendre en considération non seulement les effets physiologiques et métaboliques, mais aussi l'ensemble des réponses signalétiques. Des approches complémentaires comme la protéomique et la transcriptomique, en liaison avec l'utilisation de mutants pour analyser la fonction de gènes candidats liés à des voies de signalisation, devraient permettre d'étudier d'un point de vue global et intégré ces mécanismes fonctionnels et signalétiques *in planta* (Deshmukh et al., 2014 ; Duke et al., 2012ab ; Ramel et al., 2012 ; Sulmon et al., 2004, 2006, 2011 ; Hirai et al., 2004).

Les réponses des plantes aux stress chimiques sont dépendantes de nombreux facteurs, directs, comme les types de contaminant et leurs doses (Calabrese et Blain, 2011), ou indirects, comme les paramètres physico-chimiques du milieu. Les contraintes environnementales peuvent ainsi influencer les voies de détoxification des pesticides chez les plantes, en perturbant la formation d'acides aminés et de ce fait la synthèse et la teneur du glutathion dans les cellules (Chap I, 2.3. ; Noctor et al., 1998ab ; Noctor et Foyer, 1998 ; Penninckx, 2000). La littérature montre également que toutes les espèces végétales ne sont pas égales dans leur réponse face au stress chimique, avec des capacités variables de tolérance ou de sensibilité (Patzold et al., 2002 ; Ramel et al., 2009ab ; Sulmon et al., 2004). Effectivement, selon les caractéristiques du xénome de la plante (Chap I, 2.4. ; Cummins et

al., 2013 ; Edwards et al., 2005 ; Ramel et al., 2007), les réponses adaptatives et l'intensité des effets du stress peuvent varier significativement. Il était de ce fait pertinent de poursuivre ces recherches par l'étude des réponses d'autres espèces végétales, afin de mettre en évidence une éventuelle généricité dans la réponse des plantes aux faibles niveaux de pollutions ou bien des réponses spécifiques, qui reflètent la complexité de la biodiversité fonctionnelle végétale.

Notre étude de la dynamique des réponses des espèces présentes dans les bandes enherbées (Chap III, sections 3. et 4.) indiquait que certaines espèces possédaient des capacités intéressantes de tolérance aux stress chimiques. C'était le cas de la graminée *Lolium perenne*, le Ray-grass anglais, qui est un modèle d'étude pertinent souvent utilisé pour les travaux sur les écosystèmes prairiaux tempérés. Cette espèce présente en effet une grande importance écologique, agronomique et économique (Barbehenn et al., 2004). De plus, elle a été souvent employée dans des protocoles de phytoremédiation, en raison de ses caractéristiques de tolérance face aux pollutions et aux stress abiotiques (ADEME, 2012a ; Bidar et al., 2009 ; D'orazio et al., 2013 ; Hannaway et al., 1999 ; Hu et al., 2012 ; Krutz et al., 2005). Il était donc pertinent de caractériser les réponses de cette espèce prairiale aux stress chimiques, d'autant plus qu'elle présente des caractéristiques génétiques, développementales et fonctionnelles (Farrell et al., 2014 ; Lothier et al., 2014 ; Studer et al., 2012) qui diffèrent significativement de celles d'*Arabidopsis*.

**~ Chapitre V ~**

**Caractérisation métabolomique et  
transcriptomique des réponses aux stress  
chimiques résiduels et complexes chez  
une espèce prairiale de bandes  
enherbées**



## 1. Introduction

Les xénobiotiques et leurs produits de dégradation entraînent, à des doses représentatives de pollutions environnementales résiduelles, des perturbations à différents niveaux chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Chap IV). Ces perturbations de la croissance et du développement, accompagnées de changements majeurs dans les réponses métaboliques et moléculaires, mettent en évidence, chez *Arabidopsis*, les effets complexes, parfois cryptiques et difficilement prévisibles, de ces concentrations résiduelles de polluants. Des processus biologiques centraux, comme la dynamique du carbone, la balance hormonale, les défenses antioxydantes et la détoxification, sont ainsi modifiés, et témoignent de la sensibilité d'*Arabidopsis* face aux stress chimiques. Toutefois, en milieu naturel, la diversité végétale et l'histoire évolutive propre à chaque espèce ont entraîné des adaptations génotypiques, permettant à certaines plantes d'avoir des capacités de tolérance vis-à-vis des stress chimiques (Chap I, 2.4.). Nos précédents résultats ont en effet montré l'hétérogénéité des réponses des plantes à ces stress, à la fois *in situ* sur des bandes enherbées expérimentales, mais également en milieu contrôlé de laboratoire (Chap III, 3. et 4.). En contexte de bandes enherbées, les espèces ont montré des dynamiques de croissance et de maintien variées, témoignant de différences de réponse et de tolérance aux contraintes complexes biotiques et abiotiques (Chap III, 3.). En milieu contrôlé de laboratoire, l'intensité de l'effet des polluants sur la croissance des plantes était significativement différente selon l'espèce (Chap III, 4.). Ces observations témoignent de capacités spécifiques différentes à faire face aux polluants. Cette analyse comparative interspécifique a aussi mis en lumière que les espèces végétales des bandes enherbées expérimentales possèdent une tolérance plus marquée qu'*Arabidopsis* au stress chimique. Ces résultats laissent supposer des mécanismes de réponses qui diffèrent selon l'espèce, que ce soit en termes de perception et/ou de transport des polluants, ou de coordinations des réponses métaboliques et moléculaires (Chap I, 2.4 ; Couée et al., 2013 ; Edwards et al., 2005 ; Cummins et al., 2013 ; Patzold et al., 2002 ; Ramel et al., 2007, 2009ab, 2012 ; Sulmon et al., 2004).

Il est de ce fait pertinent de s'intéresser à ces mécanismes de réponses chez une espèce présente sur le terrain, afin de déterminer les éventuelles différences ou similitudes dans les réponses des plantes aux polluants. Les analyses précédentes ont permis de déterminer des espèces possédant des caractéristiques intéressantes de tolérance vis-à-vis des pollutions résiduelles (Chap. III, 3. et 4.). Le Ray-grass anglais, *Lolium perenne*, s'est notamment distingué des autres espèces par des croissances racinaire et aérienne qui sont peu affectées

par les différentes classes de polluants organiques et métalliques, et par son maintien sur les bandes enherbées expérimentales. En outre, cette espèce possède un grand intérêt agronomique et économique, en tant qu'herbacée la plus cultivée en région tempérée, et que source d'alimentation importante pour les ruminants (Barbehenn et al., 2004). Cette espèce est également décrite comme étant tolérante à divers stress chimiques (Bidar et al., 2007, 2009 ; Dear et al., 2006 ; D'Orazio et al., 2013), et ses capacités dans les processus de remédiation et de phytoremédiation des milieux pollués sont avérées (Bidar et al., 2007, 2009 ; D'Orazio et al., 2013 ; Hu et al., 2012 ; Krutz et al., 2005). Néanmoins, les mécanismes impliqués dans les réponses du Ray-grass aux stress chimiques ne sont pas élucidés. La littérature et notre précédente analyse des réponses d'*Arabidopsis* aux xénobiotiques ayant montré que les faibles contaminations sont susceptibles de générer des réponses discrètes et cryptiques (Chap IV ; Claeys et al., 2014 ; Londo et al., 2014), il était nécessaire d'étudier les mécanismes de réponses du Ray-grass par des approches sans *a priori*, à l'échelle des régulations fines. C'est pourquoi deux approches complémentaires ont été réalisées, présentées dans les deux articles de ce chapitre : (i) une analyse physiologique et métabolomique détaillée de *Lolium perenne* face aux faibles doses de xénobiotiques et de métaux lourds, afin de mettre en évidence les changements dans les profils métaboliques induits par le stress chimique, et (ii) une analyse transcriptomique de cette espèce non modèle, avec la réalisation d'un transcriptome *de novo*, pour ainsi prendre en compte de manière plus globale les régulations à l'échelle moléculaire.

La combinaison de ces différentes approches physiologiques et « omiques », dont l'intérêt a été démontré pour les études des réponses des plantes aux stress abiotiques (Deshmukh et al., 2014 ; Duke et al., 2012ab ; Hirai et al., 2004 ; Obata et Fernie, 2012), peut permettre d'obtenir un très vaste ensemble de données complémentaires et de mettre en lumière des biomarqueurs de réponses aux stress, spécifiques ou génériques.

**2. Article n°3 : Metabolic profiling of *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of chemical stress**

Anne-Antonella Serra, Ivan Couée, David Renault, Gwenola Gouesbet and Cécile Sulmon

**Journal of Experimental Botany**, 2015, 66(7): 1801–1816

*Les tables supplémentaires (S2, S3 et S4) sont en ligne sur le site de Journal of Experimental Botany*



RESEARCH PAPER

# Metabolic profiling of *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of chemical stress

Anne-Antonella Serra, Ivan Couée, David Renault, Gwenola Gouesbet\* and Cécile Sulmon\*<sup>†</sup>

Université de Rennes 1, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR CNRS 6553 ECOBIO, Campus de Beaulieu, Bâtiment 14A, 263 Avenue du Général Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France

\* These authors contributed equally to the direction of this study.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: [cecile.sulmon-maisonneuve@univ-rennes1.fr](mailto:cecile.sulmon-maisonneuve@univ-rennes1.fr)

Received 28 August 2014; Revised 2 December 2014; Accepted 4 December 2014

## Abstract

Plant communities are confronted with a great variety of environmental chemical stresses. Characterization of chemical stress in higher plants has often been focused on single or closely related stressors under acute exposure, or restricted to a selective number of molecular targets. In order to understand plant functioning under chemical stress conditions close to environmental pollution conditions, the C<sub>3</sub> grass *Lolium perenne* was subjected to a panel of different chemical stressors (pesticide, pesticide degradation compound, polycyclic aromatic hydrocarbon, and heavy metal) under conditions of seed-level or root-level subtoxic exposure. Physiological and metabolic profiling analysis on roots and shoots revealed that all of these subtoxic chemical stresses resulted in discrete physiological perturbations and complex metabolic shifts. These metabolic shifts involved stressor-specific effects, indicating multilevel mechanisms of action, such as the effects of glyphosate and its degradation product aminomethylphosphonic acid on quinate levels. They also involved major generic effects that linked all of the subtoxic chemical stresses with major modifications of nitrogen metabolism, especially affecting asparagine, and of photorespiration, especially affecting alanine and glycerate. Stress-related physiological effects and metabolic adjustments were shown to be integrated through a complex network of metabolic correlations converging on Asn, Leu, Ser, and glucose-6-phosphate, which could potentially be modulated by differential dynamics and interconversion of soluble sugars (sucrose, trehalose, fructose, and glucose). Underlying metabolic, regulatory, and signalling mechanisms linking these subtoxic chemical stresses with a generic impact on nitrogen metabolism and photorespiration are discussed in relation to carbohydrate and low-energy sensing.

**Key words:** AMPA, carbon–nitrogen balance, copper, glyphosate, phytoremediation, polycyclic aromatic hydrocarbon, residual pollution, perennial ryegrass, tebuconazole, xenobiotics.

## Introduction

Modern agriculture uses large amounts of numerous pesticides in order to control pests and weeds, and to get around resistance mechanisms of target organisms (Helander

*et al.*, 2012). Various processes (e.g. drift, run-off, leaching) lead to contamination of terrestrial and aquatic environments by mixtures of chemicals, mainly pesticides, pesticide

Abbreviations: AMPA, aminomethylphosphonic acid; BCAA, branched-chain amino acid; Fru, fructose; Fru-6-P, fructose-6-phosphate; GC/MS, gas chromatography mass spectrometry; Glc, glucose; Glc-6-P, glucose-6-phosphate; GT, combination of glyphosate and tebuconazole; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; PCA, principal component analysis; PSII, photosystem II; SEM, standard error of the mean; Suc, sucrose; TCA, tricarboxylic acid; Tre, trehalose; Tre-6-P, trehalose-6-phosphate.

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology. All rights reserved.  
For permissions, please email: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

degradation products, and adjuvants (Dévier *et al.*, 2011; Helander *et al.*, 2012) but also metals (Bidar *et al.*, 2009) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Kreslavski *et al.*, 2014). Non-target plants can suffer direct damage by chemicals because of their sessile lifestyle. However, the overall effects of these complex, diffuse, and chronic chemical pollutions are difficult to predict (Dévier *et al.*, 2011). Most studies focus on the effects of a restricted number of pollutants, mainly heavy metals and plant-targeting chemicals such as herbicides, whereas a better understanding of chemical stress effects requires that a much greater number of chemical stressors, and their corresponding degradation products, be studied. Moreover, exposure protocols do not necessarily reflect conditions of environmental pollution. For most compounds, the mode of action and biological effects of low-level and multiple-stress exposure may differ from the effects of toxic or lethal contamination, and remain poorly understood. Serra *et al.* (2013) showed that, under environmentally relevant contamination levels, xenobiotics and associated degradation products induced cryptic metabolic perturbations in *Arabidopsis thaliana*, in relation to non-target and signalling effects. These perturbations highlighted complex interactive effects, whether positive or negative, between structurally different xenobiotics.

Chemical stress induces different responses according to the ability of the plant species or ecotypes to integrate stress signals and develop coordinated molecular responses (Ramel *et al.*, 2012; Couée *et al.*, 2013). Perennial ryegrass, *Lolium perenne*, which is the most widely grown grass in temperate regions and a primary food source for grazing ruminants (Barbehenn *et al.*, 2004), has been reported to be tolerant to diverse chemical stressors (Dear *et al.*, 2006; Bidar *et al.*, 2009; D'Orazio *et al.*, 2013). It also accelerates the degradation of contaminants in soils (Krutz *et al.*, 2005; D'Orazio *et al.*, 2013) and plays important roles in improving remediation of heavy-metal-contaminated soils (Bidar *et al.*, 2009). *L. perenne* has been commonly used in revegetation and phytoremediation projects (Bidar *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012), and in vegetative filter strips (Krutz *et al.*, 2005). However, mechanisms involved in *Lolium* tolerance to chemical stressors have not been elucidated, thus highlighting the need for untargeted approaches such as metabolomics.

In order to characterize chemical stress responses, *L. perenne* was subjected to subtoxic levels of contrasted chemical stressors: (i) the widely used broad-spectrum herbicide glyphosate (Helander *et al.*, 2012), which inhibits aromatic amino acid production through inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in the shikimate pathway; (ii) its degradation product, aminomethylphosphonic acid (AMPA), which may interact with glycine metabolism (Serra *et al.*, 2013); (iii) the triazole fungicide tebuconazole, whether alone or in association with glyphosate; (iv) the PAH molecule fluoranthene; and (v) the heavy metal copper. Exposure of germinating seeds and root systems, and different modalities of treatment, were used to reflect realistic conditions of environmental exposure (Serra *et al.*, 2013). Plant responses were dissected by physiological and metabolomic analysis (Obata and Fernie, 2012) in order to highlight significant

stress-induced shifts in *Lolium* metabolic profiles and to identify chemical stressor-specific and generic responses to chemical stress.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

Seeds of *L. perenne* (Brio cultivar) were washed in ethanol and surface sterilized in Bayrochlore (20 g l<sup>-1</sup> in water) containing 0.05% Tween (v/v) for 20 min and rinsed five times in sterilized water. Moistened seeds were placed in Petri dishes in the dark at 4 °C for 7 d in order to break dormancy and homogenize germination. Imbibed seeds were sown on pieces of gauze and placed at the top of sterile tubes containing liquid growth medium. Gauze pieces were moistened by soaking the gauze edges in culture medium. Germination and hydroponic growth were carried out under axenic conditions in a control growth chamber at 22/20 °C under a 16 h light (6000 lux)/8 h dark regime. The growth solution consisted of Hoagland basal salt mix (No. 2; Caisson Laboratories, North Logan, UT, USA) adjusted to pH 6. Direct exposure to chemicals was carried out by sowing seeds on chemical-stressor-containing growth medium. Developmental and physiological parameters were measured after 11 d of growth. Transfer experiments consisted of root-level shock exposure of young plants at the same stage of photosynthetic development. After 7 d of growth under control conditions, gauze pieces supporting seedlings were transferred to a fresh growth solution containing chemical stressors. Developmental and physiological parameters were measured 4 d later, thus corresponding to 11 d of total growth. Metabolite profiling of seedlings was carried out after direct and transfer exposures. Different chemical treatments were applied: the broad-spectrum herbicide glyphosate (G; 1 µM), its degradation product AMPA (50 µM), the fungicide tebuconazole (4 µM), the PAH fluoranthene (500 µM), copper (6 µM), and a combination of glyphosate and tebuconazole (GT; 1 and 4 µM, respectively). In order to characterize long-term effects, developmental and physiological parameters were also measured after 30 d of growth under direct exposure to chemical stress. For these experiments, control and contaminated growth solutions were renewed every 11 d. All of these experiments were carried out with at least five independent replicates, each consisting of at least 10 plantlets.

### Analysis of growth and photosynthetic parameters

Seedlings were aligned on glass plates and photographed. Lengths of main root and elongating leaf were measured using ImageJ software. Pigment contents (chlorophylls and total carotenoids) and maximum photosystem II (PSII) efficiency ( $F_v/F_m$ ) were quantified as described by Serra *et al.* (2013).

### Metabolic profiling

Roots and leaves of seedlings were collected just before the start of the daylight period, freeze dried, ground in liquid nitrogen and stored at -20 °C until use. For each sample, 5 mg of powder was suspended in 600 µl of methanol:chloroform solution (2:1, v/v) and mixed for 1.5 min. Samples were transferred to -20 °C for 10 min before adding 400 µl of cold (4 °C) water. Samples were mixed vigorously for 1 min and centrifuged twice for 5 min at 4000g (4 °C). One hundred and twenty microlitres of the upper aqueous phase, containing polar metabolites, was transferred to chromatographic glass vials and vacuum dried (MiVac; Genevac, Ipswich, UK). Derivatization of extracts was conducted as described previously (Serra *et al.*, 2013; Supplementary Method S1 at JXB online), using a CTC CombiPal autosampler (Gerstel GmbH and Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Germany), ensuring an identical derivatization time and process for all samples. Extracts were analysed using gas chromatography mass



spectrometry (GC/MS). The GC/MS system consisted of a Trace GC Ultra chromatograph and a Trace DSQII quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The parameters of injection and chromatography were similar to those described by Serra *et al.* (2013) (Supplementary Method S1). Detection was achieved using electron impact ionization. The temperature of the ion source was set at 250 °C and the MS transfer line at 300 °C. Peaks were annotated accurately using mass spectra (two specific ions) and retention times. Calibration curves were established with 61 pure reference compounds (Supplementary Table S1 at JXB online) at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500, and 2000 µM. Each metabolite was quantified according to its corresponding calibration curve, using XCalibur v2.0.7 software (Thermo Fisher Scientific) and expressed in nmol mg<sup>-1</sup> of dry weight.

#### Statistical analysis

Physiological and metabolic parameters were measured on at least five independent replicates of at least 10 individual plantlets. Statistical analyses were carried out with version 3.0.1 of R software. Pair-wise comparisons of means used the non-parametric Mann–Whitney–Wilcoxon test. In order to characterize relationships between treatments and responses, principal component analyses (PCAs), based on correlation matrix of averages (Ramel *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2013) and hierarchical classifications were carried out using the FactoMineR package of R. In order to compare variations between treatments, relative levels of responses against control conditions were calculated using the log<sub>2</sub>(ratio). Metabolic responses between treatments were compared by performing heatmap and hierarchical clustering with EPCLUST software using correlation measure-based distances and average linkage. Pair-wise physiological trait–physiological trait, physiological trait–metabolite, and metabolite–metabolite correlations were determined by Pearson correlation analysis.

## Results

### *Effects of subtoxic levels of environmental pollutants on growth and development*

The experimental set-up involved root application of chemical stressors and parallel analysis of root growth and leaf growth, which, in *L. perenne*, respectively rely on the root apex (Gonthier and Francis, 1989) and on the base of the growing leaf (Kavanová *et al.*, 2008). Chemical stressors were applied to germinating seeds and root systems at no-observed-adverse-effect levels (Dorato and Engelhardt, 2005) for PSII efficiency, chlorophyll levels, carotenoid levels, and root growth under conditions of transfer exposure, where seedlings grown for 7 d in control medium were subjected to root-level application of chemical stressors for 4 d (Fig. 1A–D). These levels of chemical stressors were at least 20-fold lower than the 50% effect concentration values for these parameters under conditions of transfer exposure. Such levels also corresponded to no-observed-adverse-effect levels for PSII efficiency under direct exposure (Fig. 1H), where germination and seedling growth occurred in the presence of chemical stressors. However, direct exposure conditions had a much greater impact on root length (Fig. 1E), leaf length (Fig. 1F), and photosynthetic pigments (Fig. 1G). Leaf length responses under direct exposure showed the same trend as those observed under transfer exposure, thus indicating that transfer and direct exposures reflected different intensities of

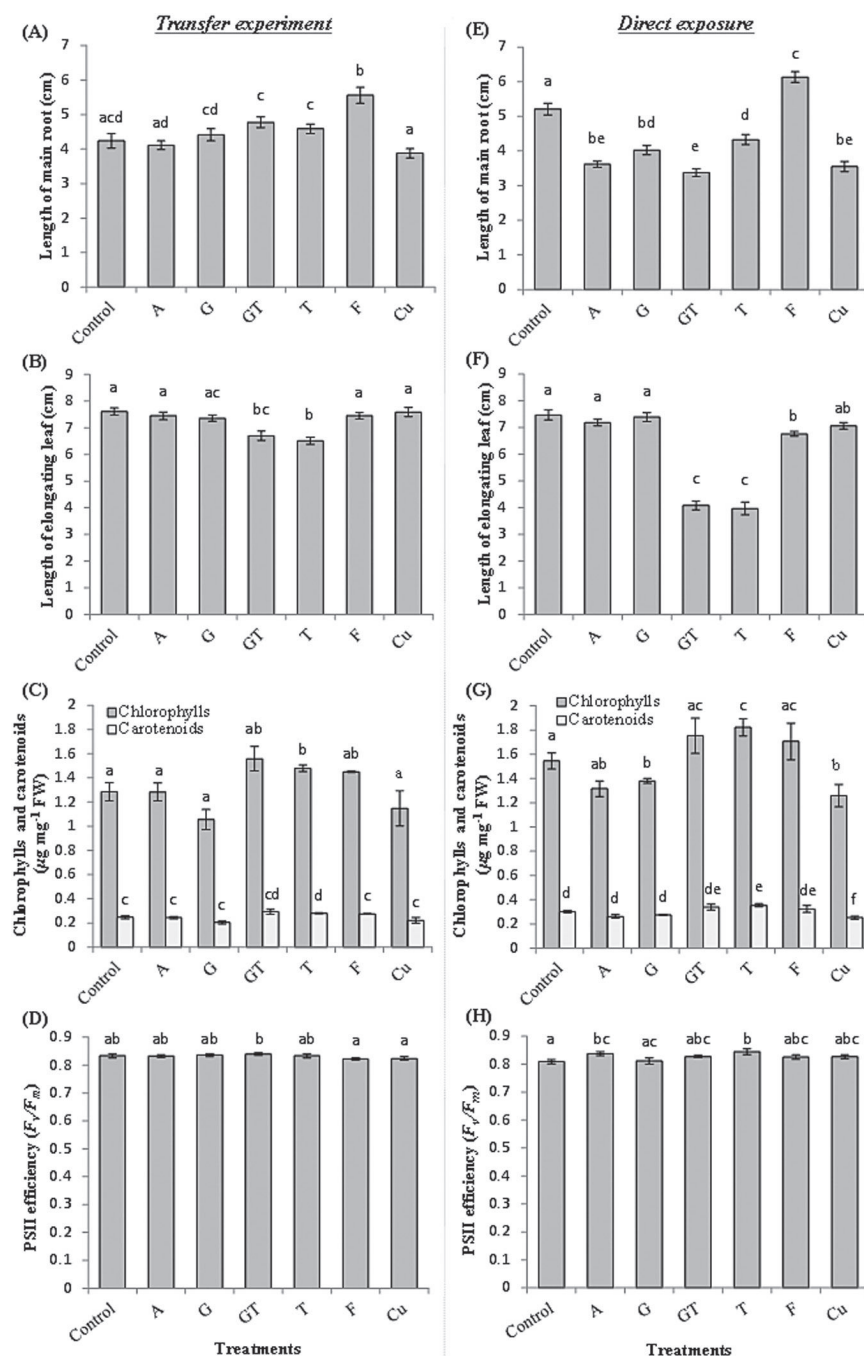
chemical stress (Fig. 1B, F). However, in a study of long-term (30 d) growth, *L. perenne* seedlings maintained development under these levels of chemical stress, or even escaped major root growth inhibition in the case of AMPA, thus confirming that exposures to chemical stress were subtoxic (Fig. 2).

The impact of treatments depended on the type of pollutant, on physiological trait, and on modality of chemical exposure (Fig. 1). Root length was particularly responsive to chemical stress under conditions of direct exposure, with all of the chemical treatments inducing a significant decrease in growth, except for fluoranthene, which induced an increase in root length (Fig. 1E). Differences of root length between controls of direct and transfer exposure experiments suggested that root growth was sensitive to mechanical processes that may occur during transfer protocol. However, these effects did not result in greater sensitivity to chemical stress (Fig. 1A, E).

Direct exposure to copper, glyphosate, and its degradation product AMPA showed the same extent of negative impact for root length (Fig. 1E) and photosynthetic pigment levels (Fig. 1G), without affecting leaf length (Fig. 1F). Leaf length was slightly decreased by fluoranthene, thus contrasting with its positive effect on root length. Glyphosate/tebuconazole (GT) mixture induced a more negative effect on root length than observed for each pollutant alone, although the combined effect was not strictly additive (Fig. 1E). In contrast, the length of elongating leaves was similarly negatively affected by tebuconazole and the GT mixture, whereas glyphosate, alone or in combination with tebuconazole, did not have any effect (Fig. 1F). Chlorophyll levels were negatively affected by glyphosate, whereas tebuconazole showed a positive effect and lifted the negative effect of glyphosate (Fig. 1G). Such differential responses to these treatments were observed for PSII efficiency with no effect of glyphosate and the GT mixture (Fig. 1H). PSII efficiency thus showed no adverse effect of chemical stress, with only AMPA and tebuconazole inducing a slight increase (Fig. 1H). Maintenance of PSII efficiency at or above the control level indicated that photosynthesis remained active in the presence of the different chemicals under the conditions of exposure applied. The present range of chemical stresses therefore seemed to act primarily on growth and development rather than on photosynthesis. Comparison of the effects of direct chemical stress on root length and leaf length indicated that glyphosate, AMPA, and copper had stronger impacts on root growth, whereas tebuconazole and, to a lesser extent, fluoranthene, had stronger impacts on leaf growth (Fig. 1E, F).

### *Subtoxic levels of chemical stressors cause major metabolic shifts*

Metabolomic analysis of a set of 61 metabolites was performed to reveal discriminant components of metabolic responses to chemical stress. Root and leaf metabolic profiles, resulting from treatments and exposure modalities, were analysed using PCA and associated hierarchical classification. Major metabolic variations separated samples into four response patterns corresponding to each kind of tissue and exposure conditions (Supplementary Fig. S1 at JXB online).



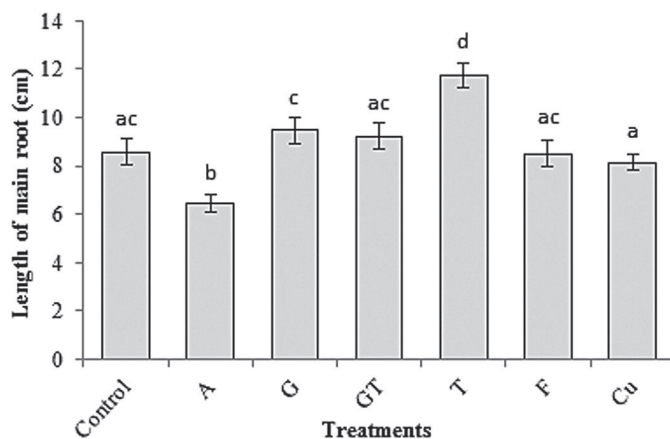
**Fig. 1.** Effects of subtoxic levels of chemical stressors on *L. perenne*. AMPA (A), glyphosate (G), tebuconazole (T), glyphosate plus tebuconazole (GT), fluoranthene (F), and copper (Cu) were tested. Values [mean±standard error of the mean (SEM)] of root length (A, E), leaf length (B, F), chlorophyll and carotenoid levels (C, G), and PSII efficiency ( $F_v/F_m$ ) (D, H) are shown. In transfer experiments, seedlings were grown for 7 d under control conditions and then transferred to fresh medium in the presence of chemical stressors for 4 d (A–D). In direct exposure experiments, seedlings were germinated and grown in the presence of chemical stressors for 11 d (E–H). Statistical analysis between means was carried out using the Mann–Whitney–Wilcoxon test. Statistically significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between treatments are indicated by different letters above the bars.

Metabolic patterns were determined first by the nature of the tissue (root or leaf), then by the type of chemical stress exposure, and finally by the nature of the chemical stressor, showing that subtoxic chemical stress did not deeply modify general metabolic signatures of organs and exposure modalities (Supplementary Fig. S1).

Metabolic responses were separately analysed (Fig. 3) for each type of exposure and for each organ. All of the chemical stressors caused major metabolic variations in both roots

and leaves, whatever the type of exposure. Under conditions of transfer exposure, chemical stressors induced metabolic changes (Fig. 3A, B) in the absence of a significant physiological impact (Fig. 1). Copper, glyphosate, or its degradation product AMPA caused, under transfer exposure, important metabolic changes in leaves (Fig. 3B) without any physiological effect on leaf growth or photosynthesis (Fig. 1B, D). Under conditions of direct exposure, chemical stressors induced metabolic changes in the absence of a significant impact on





**Fig. 2.** Long-term effects of subtoxic levels of chemical stressors on *L. perenne*. Chemical stressors are as described in Fig. 1. Treatments consisted of direct exposure where seedlings germinated and grew in the presence of chemical stressors for 30 d. Values (means±SEM) of root length after 30 d of growth are shown. Statistical analyses were performed as described in Fig. 1.

photosynthesis (Fig. 1G, H). Some response patterns showed close similarities: in root tissues, transfer and direct exposures resulted in a great proximity for control and AMPA, and for glyphosate and the GT mixture (Fig. 3A, C). In contrast, the distance between fluoranthene and tebuconazole differed greatly between transfer and direct exposures in the case of root tissues. Divergences in metabolic profiles of potentially close chemical treatments were also found. The glyphosate degradation product AMPA was never associated with its parent compound glyphosate (Fig. 3). Similarly, tebuconazole was disconnected from the GT mixture, despite their close physiological impacts (Figs 1 and 3). Finally, in some cases, such as the effects of AMPA on root or of the GT mixture on leaf, global metabolic patterns were close to the control (Fig. 3C, D) despite major physiological effects (Fig. 1E, F).

#### *Coordination of metabolome changes under conditions of subtoxic chemical stress*

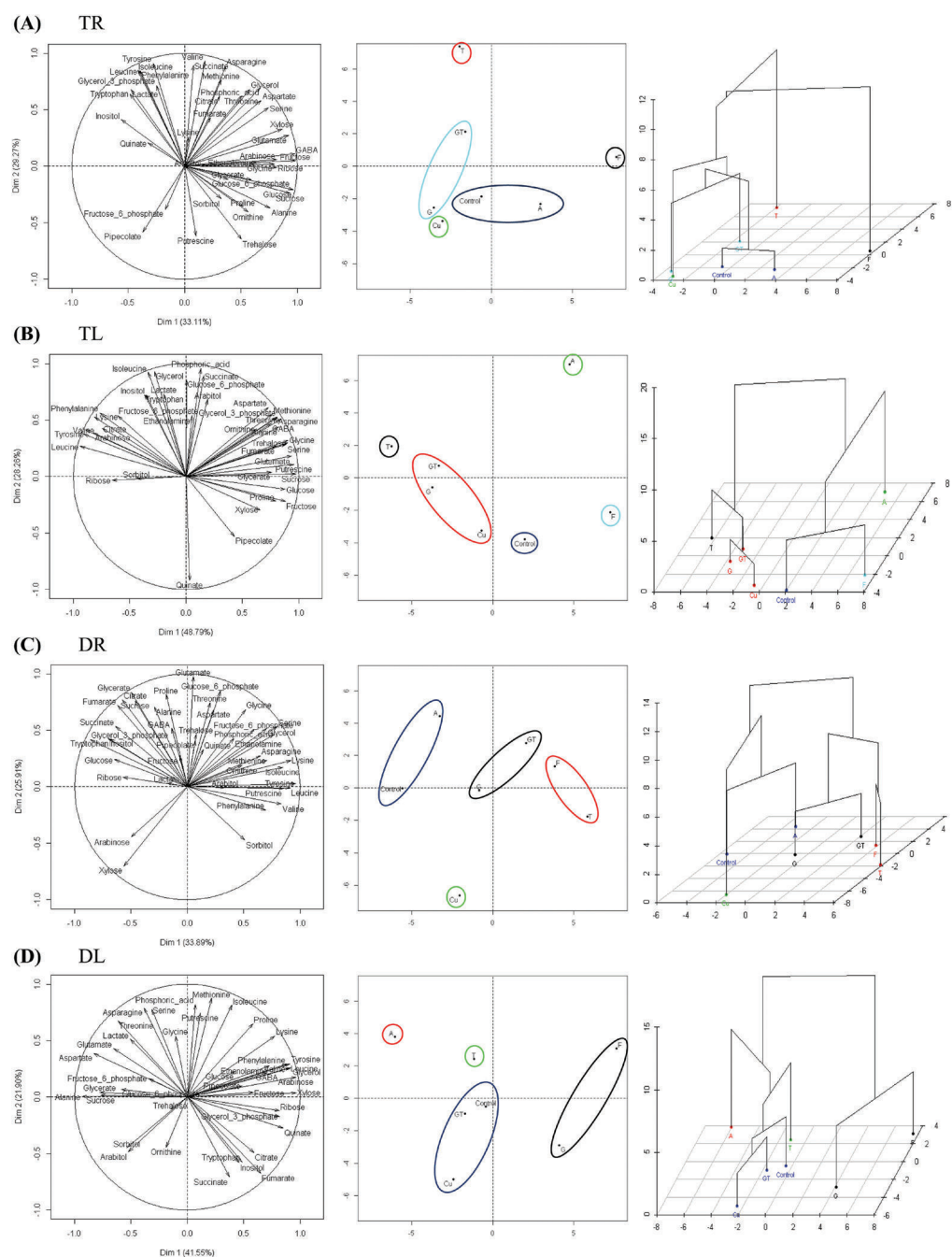
Among the 61 metabolites that were analysed and quantified, 42 showed significant variations in relation to at least one of the chemical stress treatments. Variations of these 42 metabolites relatively to control [ $\log_2(\text{ratio})$ ] were classified by hierarchical cluster analysis in order to define for each metabolite a pattern of chemical stress response across the six different stressors, the two modalities of exposure, and the two organs (Fig. 4). This hierarchical cluster analysis of the 24 analyses separated metabolites into distinct clusters and subclusters of chemical stress responses that were grouped into eight general clusters (Fig. 4). Several clusters were characterized by strong relationships between co-metabolites, such as tight clustering of tricarboxylic acids (TCAs: citrate, succinate, and fumarate; cluster F), of fructose (Fru) and glucose (Glc) (cluster G), or of fructose-6-phosphate (Fru-6-P) and glucose-6-phosphate (Glc-6-P) (cluster C). On the other hand, clustering of co-metabolites and of unrelated metabolites, such as Trp and inositol (cluster F), indicated potential regulatory networks (Fig. 4).

Highly contrasted clusters, such as clusters A and B on the one hand and clusters G and H on the other hand, were characterized, respectively, by a general increase and general decrease of metabolite levels in response to chemical stressors. The N-rich amino acid Asn (cluster A) showed a significant increase across most of the conditions, thus indicating that nitrogen redistribution and mobilization were important features of the chemical stress response in *L. perenne*. Clustering of Met with Asn could be ascribed to its positive variations, which were, however, much more limited than those of Asn, and to the absence of major negative variations. Cluster B consisted of a set of amino acids including all of the branched-chain amino acids (BCAAs; Leu, Ile, and Val), two aromatic amino acids (Tyr and Phe), and Lys, in association with glycerol and phosphate. It was characterized by a common increase in the leaf across all chemical stressors in at least one exposure condition. Moreover, cluster B metabolites increased in roots across several chemical stressors (glyphosate under direct exposure, and GT, tebuconazole, and fluoranthene under both transfer and direct exposures), which may also reflect the importance of root metabolism perturbations under conditions of subtoxic chemical stress (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2 at JXB online). In contrast, ribose and glycerate in clusters G and H, respectively, showed a significant decrease across most of the conditions. Moreover, the ribose-associated cluster, as well as the glycerate-associated cluster, comprised stress-related metabolites ( $\gamma$ -aminobutyric acid, Pro, and pipecolate), thus suggesting that chemical stress responses involved remodelling of general abiotic stress responses. Variations of Ala in cluster H may be in line with the remodelling of nitrogen metabolism that was highlighted by clusters A and B.

Metabolites from clusters C–F exhibited varied responses of increase or decrease depending on treatments. Some compounds showed changes of very low amplitude. This was especially the case for arabitol and sorbitol (cluster D). In contrast, all of the chemical stressors increased lactate levels (cluster D) in both roots and leaves, in at least one modality of exposure, thus indicating glycolysis and energy dysfunction. Cluster E comprised a set of amino acids, including the Asn co-metabolite Asp, and other N-rich compounds, such as the polyamine precursor ornithine and the polyamine putrescine. Interestingly, this cluster of amino compounds included the disaccharides sucrose (Suc) and trehalose (Tre), thus indicating the potential importance of carbon and nitrogen relationships.

#### *Specific effects of chemical stressors on metabolite levels*

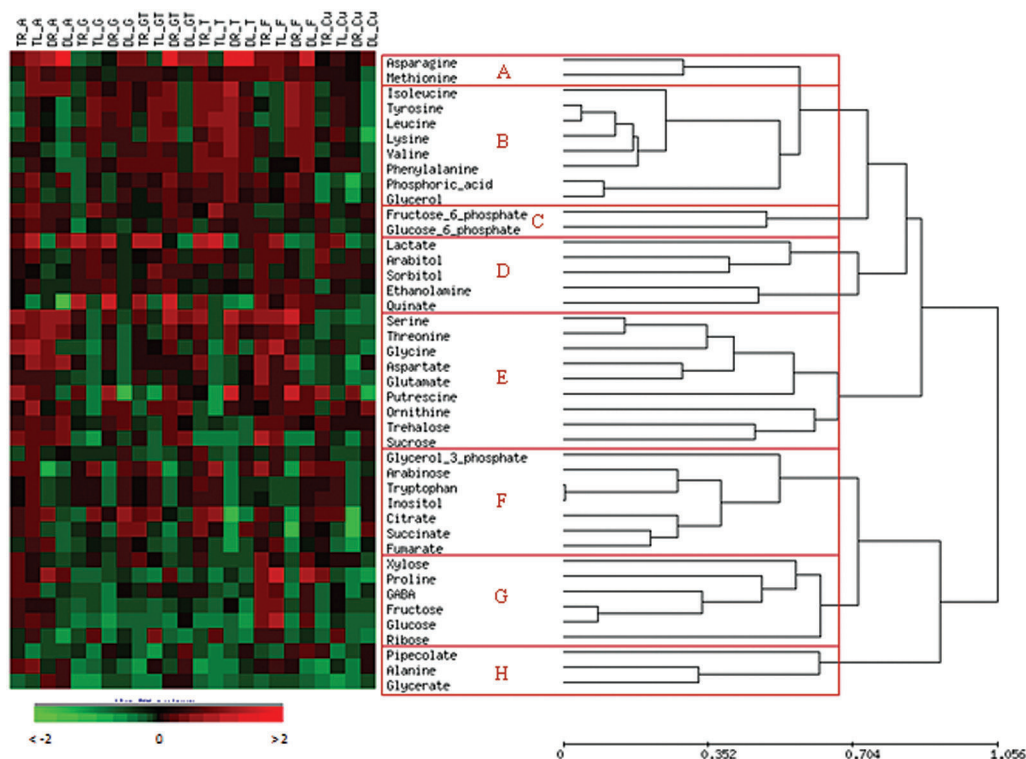
Some compounds showed contrasted variations according to the nature of the chemical stressor, thus giving important insights into the specific effects of a given chemical (Table 1). In addition to inducing the highest increase of Asn levels (5.7-fold in leaves; Fig. 5 and Supplementary Fig. S2), AMPA led to a strong decrease of quinate, a shikimate pathway component, in leaves (3.6-fold; Fig. 5 and Supplementary Fig. S2). In contrast, glyphosate, which targets a key step



**Fig. 3.** PCA and hierarchical classifications of metabolic responses of *L. perenne* to chemical stressors according to conditions of exposure and plant organ. The chemical stress treatments are described in Fig. 1. PCA was carried out on the correlation matrix of means of metabolite levels measured for two conditions of stress exposure and in two different organs: root (A; TR, root after transfer exposure) and leaf (B; TL, leaves after transfer exposure) metabolite levels for transfer experiments; root (C; DR, root after direct exposure) and leaf (D; DL, leaves after direct exposure) metabolite levels for direct exposure experiments. The position of chemical treatments, the distribution of metabolic parameters on the first plane (Dim1 and Dim2), and the corresponding hierarchical classifications are shown. Treatment groups obtained by hierarchical classifications are circled. (This figure is available in colour at JXB online.)

of the shikimate pathway and aromatic amino acid synthesis, caused a significant increase of quinate levels in roots but not in leaves, either alone or in association with tebuconazole (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2). Such specific variations of quinate suggested particular interference of glyphosate and AMPA with the shikimate pathway, despite the absence of major effects on levels of aromatic amino acids (Phe, Tyr, and Trp) (Fig. 5 and Supplementary Fig.

S2). Another striking effect of AMPA was a nearly 2-fold decrease in the cell-wall metabolite arabinose in roots (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2). A significant decrease in citrate and/or succinate was observed in the roots of tebuconazole- and copper-treated plants, thus suggesting TCA cycle depression and mitochondrial respiration dysfunction (Fig. 5). Fluoranthene treatment was characterized, under conditions of transfer exposure, by accumulation of Fru, Glc, and Ser



**Fig. 4.** Heatmap and average linkage hierarchical clustering of chemical stress-responsive metabolites. Heatmap and hierarchical tree result from relative levels of the 42 metabolites under study [ $\log_2(\text{metabolite level under stress}/\text{metabolite level in control})$ ] according to roots (R) and leaves (L), to six chemical stress treatments (A: AMPA, G: glyphosate, GT: glyphosate plus tebuconazole, T: tebuconazole, F: fluoranthene, Cu: copper) and to two stress exposures [transfer experiment (T) and direct exposure (D)]. The first two letters correspond, respectively, to the type of exposure and the type of tissue; the letter after the underscore corresponds to stress treatment. Metabolites are separated in different clusters (named A to H) according to hierarchical classification. (This figure is available in colour at JXB online.)

in roots and leaves, confirming major changes in carbon and nitrogen metabolisms (Table 1, Fig. 4 and Supplementary Fig. S2). Accumulation of Pro and soluble sugars in fluoranthene-treated leaves indicated possible osmotic stress, although the levels of other metabolic markers of the osmotic stress response, such as polyols, were not affected (Figs 4 and 5). Fluoranthene-enhanced root growth, associated with accumulation of the cell-wall metabolite arabinose in roots under transfer exposure, may thus represent increased water exploration resulting from the osmotic stress response (Figs 1 and 4 and Supplementary Fig. S2). The action of fluoranthene was also characterized by a global increase in ethanolamine, potentially indicating changes in phospholipid metabolism under fluoranthene treatments (Supplementary Fig. S2).

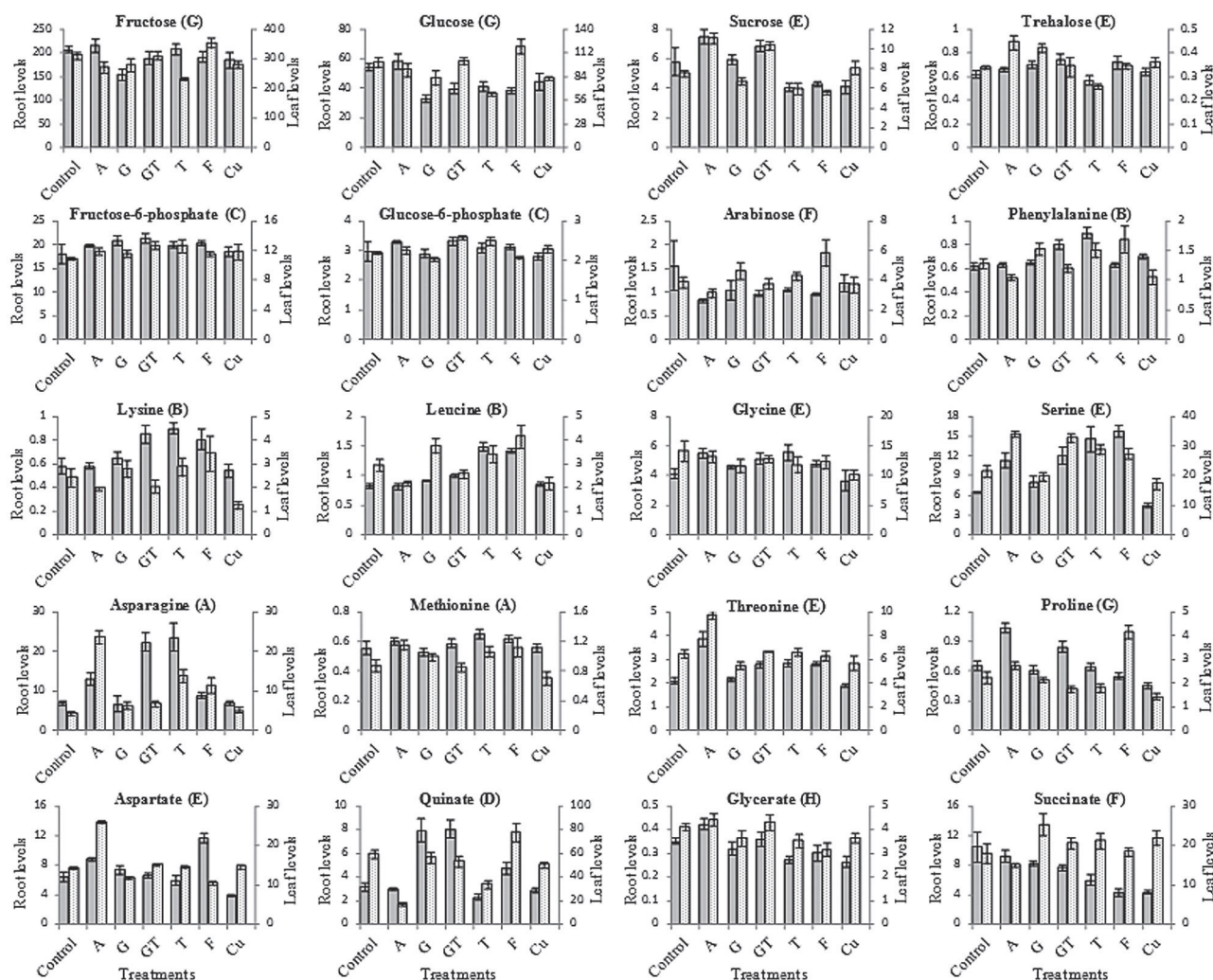
#### Identification of metabolic drivers of physiological responses to chemical stress

In order to determine whether physiological responses to chemical stress were related to metabolic changes, organ-specific trait-metabolite Pearson correlations were carried out (Fig. 6, Supplementary Table S2 at JXB online). This correlation approach highlighted global trends in relationships between metabolites and trait responses, rather than chemical stressor specificities. Leaf length was significantly negatively correlated to only one metabolite in leaves, Glc-6-P. In contrast, leaf chlorophyll level was positively

correlated to Glc-6-P, and also positively correlated to several metabolites of cluster B (Fig. 4), mainly represented by amino acids (Val, Leu, Phe, Lys, and Tyr) and glycerol, to putrescine (cluster E), to arabinose (cluster F), and to pipecolate (cluster H) (Fig. 6, Supplementary Table S2). Putrescine and pipecolate are metabolites that generally increase under stress (Hummel *et al.*, 2004; Servillo *et al.*, 2012). However, under chemical treatments inducing significant but limited pigment loss (AMPA, glyphosate, and copper; Fig. 1G), their levels were decreased (Supplementary Fig. S2). Thus, in accordance with chlorophyll-amino acid correlations (Fig. 6), responses to chemical stress in *L. perenne* were related to carbon and nitrogen metabolic rearrangement rather than to induction of the stress response metabolic pathways. In contrast, under tebuconazole treatment, which increases chlorophyll levels (Fig. 1C, G), an increase of these amino acids may indicate metabolic adaptation rather than proteolysis-related sensitivity (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2).

Leaf length was negatively correlated to several metabolites in root, the most highly correlated being the amino acids Asn (cluster A), Lys, Ile, and Tyr (cluster B) (Fig. 6, Supplementary Table S2). Although links between metabolite levels in root and leaf growth were not direct, such strong negative correlations with amino acids, in particular with N-rich amino acids such as Asn and Lys, highlighted the importance of root-shoot relationships under conditions of





**Fig. 5.** Effects of subtoxic levels of chemical stressors on root and leaf metabolite concentrations of *L. perenne*. Effects of AMPA (A), glyphosate (G), tebuconazole (T), glyphosate plus tebuconazole (GT), fluoranthene (F), and copper (Cu) on *L. perenne* are shown for direct growth, which induced greater impacts on all traits (see Fig. 1). Values (means  $\pm$  SEM) of root metabolite levels and leaf metabolite levels in  $\text{nmol mg}^{-1}$  of dry weight are shown as grey bars and dotted bars, respectively. For each metabolite, the corresponding cluster (as defined in Fig. 4) is indicated in brackets.

chemical stress. A negative correlation was also found with Ser (cluster E), which is a central amino acid involved in photosynthesis and in synthesis of glutathione components.

No significant correlation was found between root length and metabolite levels in roots. However, root length exhibited positive correlations with two metabolites quantified in leaves, Pro (cluster G) and quinate (cluster D) (Fig. 6, Supplementary Table S2). These positive correlations indicated that the negative effects of chemical stress on root length were associated with a decrease in Pro or quinate levels in leaves, although their accumulation has been reported under abiotic or chemical (herbicide or allelopathic compounds) stresses in *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, and *Pisum sativum* (Verbruggen and Hermans, 2008; Orcaray et al., 2010). Variations of Pro and quinate levels in leaves thus reflected a reorientation of leaf metabolic pathways in relation to root growth impacts. Since Pro is one end-product of amino acid synthesis, and quinate is a reserve compound of the shikimate pathway for aromatic acid synthesis (Orcaray et al., 2010), these variations may reflect perturbations of root–shoot nitrogen dynamics.

### Metabolite–metabolite correlations highlight the importance of carbon–nitrogen regulations

In order to reveal metabolic networks involved in chemical stress responses, a global pair-wise metabolite–metabolite correlation matrix was calculated (Supplementary Table S3 at JXB online), by Pearson correlation analysis of the complete set of organ- and modality-related metabolite data. Most of the physiological trait-correlated metabolites (Fig. 6) were correlated ( $P < 0.05$ ), mainly positively, with a range of metabolites across the eight clusters (Figs 7 and 8). Among these 15 metabolites, 11 (Leu, Lys, Val, Tyr, Phe, Ile, quinate, Ser, arabinose, Pro, and pipecolate) exhibited similar or close correlation networks (Supplementary Table S3), mainly integrating amino acids (Met, Ile, Tyr, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Thr, Gly, Asp, Glu, Trp, and Ala), carbohydrate metabolism compounds (Glc, Fru, Tre, and TCA), stress metabolites (arabitol, inositol, Pro,  $\gamma$ -aminobutyric acid, and pipecolate), and compounds such as arabinose, ethanolamine, and quinate. Putrescine exhibited a close but more restricted correlation profile, with only 10 correlations involving amino

**Table 1.** Major metabolic effects of subtoxic levels of chemical stressors on *L. perenne*

The chemical stressors and stress conditions are described in Fig. 1. Physiological effects are shown in Fig. 1. Major metabolic changes were identified from the response patterns shown in Fig. 5 and Supplementary Fig. S2.

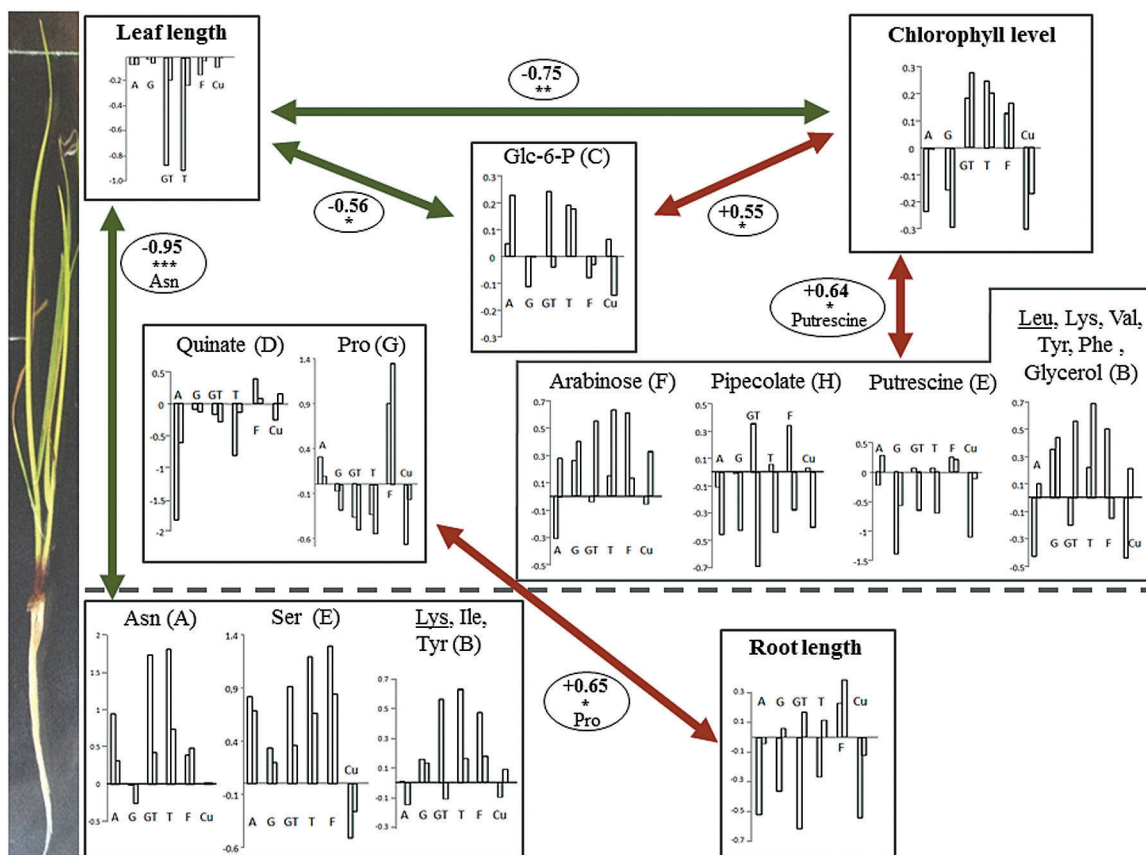
Stressor	Physiological effects	Major metabolic modifications	Organ	Potential impact
AMPA	Root growth inhibition	Quinate depletion; Asn accumulation	Leaf	N metabolism disturbance; stress-induced proteolysis
		Arabinose depletion	Root	Cell-wall metabolism disturbance
Glyphosate	Root growth inhibition	Quinate accumulation	Root	Quinate toxicity
Glyphosate+tebuconazole	Leaf growth inhibition	Quinate accumulation; Asn accumulation	Root	Quinate toxicity; N metabolism disturbance; stress-induced proteolysis
Tebuconazole	Root growth inhibition	Asn accumulation	Leaf	N metabolism disturbance; stress-induced proteolysis
	Leaf growth inhibition		Root	TCA limitation; N metabolism disturbance; stress-induced proteolysis
	Root growth inhibition	Citrate depletion; Asn accumulation	Root	TCA limitation; N metabolism disturbance; stress-induced proteolysis
Fluoranthene	Leaf growth inhibition	Fru accumulation; Glc accumulation; Asn accumulation; Ser accumulation; Pro accumulation	Leaf	C metabolism modification; N metabolism disturbance; stress-induced proteolysis; osmotic stress response
	Root growth enhancement	Fru accumulation; Glc accumulation; Ser accumulation; arabinose accumulation	Root	C metabolism modification; N metabolism disturbance; cell-wall metabolism modification
Copper	Root growth inhibition	Citrate depletion; succinate depletion	Root	TCA limitation; exogenous metal complexation

acids, TCA, and stress metabolites. The least correlated metabolite was Asn, which exhibited five correlations, mainly with metabolically close amino acids such as its direct precursor Asp and also Ser, Thr, and Ile. Except for copper and glyphosate under transfer exposure, chemical stressors induced Asn accumulation, which was almost systematically correlated to the increase in these metabolites (Figs 5 and 7, and Supplementary Fig. S2), thus confirming predominant roles for Asn and nitrogen metabolism in the chemical stress responses of *L. perenne*. This correlation level observed in the global matrix was extended by considering organ-specific correlation matrices. Asn was negatively correlated to quinate in leaves, and positively correlated to Glc-6-P, Fru-6-P, and Fru in roots (Supplementary Table S2).

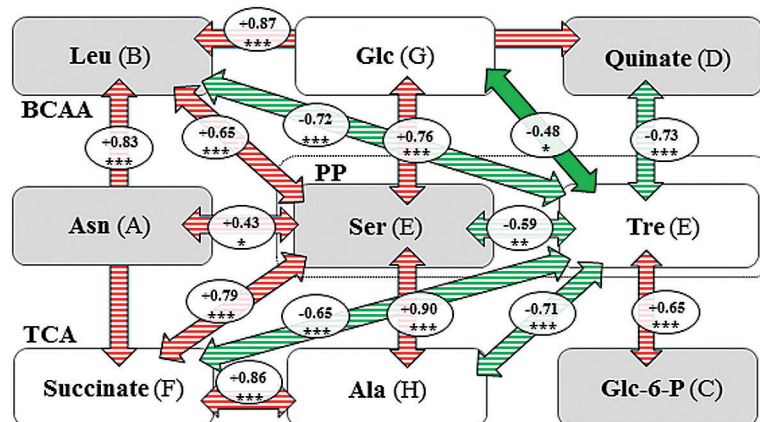
In the global correlation matrix, the physiological trait-correlated metabolite Glc-6-P exhibited the most differentiated correlation profile, with no correlation with amino acids and, in contrast, with numerous correlations with carbohydrates (Fru-6-P, Tre, Suc, and Fru) and stress-related metabolites (lactate, arabinol, sorbitol, ornithine, and pipercolate) (Figs 7 and 8, and Supplementary Table S3). Nevertheless, considering modality-specific correlation matrices analysing separately the transfer and direct exposure-related data, Glc-6-P was negatively correlated to key metabolites previously identified by metabolite–physiological trait correlations (amino acids, TCA, stress metabolites, arabinose, and quinate; Supplementary Table S4 at JXB online). This was also the case for Fru-6-P, which exhibited, for both transfer and direct exposure modalities, negative correlations to physiological parameter-correlated metabolites (Supplementary Table S4). Additionally, Fru was positively

correlated to the same correlated metabolites, except Asn, in the global correlation matrix (Supplementary Table S3), thus highlighting the importance of soluble and phosphorylated sugars in metabolic responses to chemical stress.

The disaccharide Tre, whose levels generally increased in response to all types of chemical stress (except in the presence of tebuconazole), was characterized, like ribose, by a majority of negative correlations (25 *versus* five positive correlations) (Figs 7 and 8). Variations in Tre levels were closely linked with variations of almost all of previously cited metabolites (Leu, Glc, Ser, succinate, Glc-6-P, and Ala), thus suggesting a central role of Tre, as represented in Fig. 8, in spite of low concentration and weak variations (Supplementary Fig. S2). Tre was negatively linked to succinate, with depletions or increases in this highly variable TCA being associated, respectively, with increases or depletions of Tre in most cases (Figs 4 and 7). Tre was negatively correlated to Glc, which could reflect direct transformation of Tre into Glc by trehalase. In contrast, no correlation was found between Tre and Suc, in contrast to studies showing parallel variations of Suc and Tre [or trehalose-6-phosphate (Tre-6-P)] (Lunn *et al.*, 2014). One of the positive correlations exhibited by Tre was with its precursor, Glc-6-P, which can generate Tre-6-P and then Tre through combined activities of trehalose phosphate synthase and trehalose phosphate phosphatase (Figs 7, 8). However, comparison of relative levels of Tre and other correlated metabolites, such as Glc and Glc-6-P, did not show causal and strict relationships, thus suggesting that these convergent correlations could be attributed to more central regulatory roles for Tre, or Tre-6-P.



**Fig. 6.** Involvement of metabolic correlations in the effects of chemical stressors. Organ-specific physiological trait–metabolite correlations are shown. For each metabolite, the corresponding cluster (as defined in Fig. 4) is indicated in brackets. For metabolites of cluster B, graphs correspond to underlined metabolites. Inserted graphs represent relative variations of physiological traits or metabolites against control conditions [ $\log_2(\text{ratio})$ ]. Each inserted graph shows, from left to right, changes in trait responses and in metabolite levels under direct growth and transfer exposure for each treatment (A, AMPA; G, glyphosate; GT, glyphosate plus tebuconazole; T, tebuconazole; F, fluoranthene; Cu, copper). The Pearson correlation coefficient ( $r$ ) for each pair of parameters is shown. Asterisks indicate significant correlations:  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.001$ , and  $***P \leq 0.0001$ . (This figure is available in colour at JXB online.)

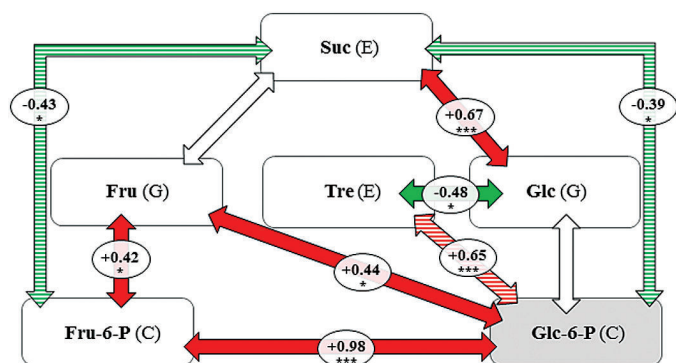


**Fig. 7.** Correlations of chemical-stress-related metabolic networks with carbohydrate, tricarboxylate and photorespiratory metabolites. The green filled arrow represents a negative Pearson correlation between directly connected metabolites; red and green hatched arrows represent, respectively, positive and negative Pearson correlations between indirectly connected metabolites. For each cluster, a typical metabolite is shown. For each metabolite, the corresponding cluster (as defined in Fig. 4) is indicated in brackets. Shaded metabolites are correlated to physiological parameters (Fig. 6). BCAA, branched-chain amino acid; PP, photorespiratory pathway; TCA, tricarboxylic acid. The Pearson correlation coefficient ( $r$ ) for each pair of metabolites is shown. Asterisks indicate significant correlations:  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.001$ , and  $***P \leq 0.0001$ . (This figure is available in colour at JXB online.)

Considering correlation networks between soluble sugars (Fig. 8), the highest correlation was found for Glc-6-P and Fru-6-P, which exhibited similar increases in response to all

of the chemical stressors, except glyphosate. Suc and Glc were positively correlated, their levels being increased by AMPA, and decreased by glyphosate, tebuconazole, or copper. The





**Fig. 8.** Integration of soluble sugar dynamics and Glc-6-P regulation. Red and green filled arrows represent, respectively, positive and negative Pearson correlations between directly connected metabolites in a pathway; red and green hatched arrows represent, respectively, positive and negative Pearson correlations between indirectly connected metabolites. Colourless arrows represent metabolic pathways without significant Pearson correlation. For each metabolite, the corresponding cluster (as defined in Fig. 4) is indicated in brackets. Shaded metabolites correlate to physiological parameters (Fig. 6). The Pearson correlation coefficient ( $r$ ) for each pair of metabolites is shown. Asterisks indicate significant correlations: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.001$ , and \*\*\* $P \leq 0.0001$ . (This figure is available in colour at JXB online.)

patterns of Glc and Fru, which are directly dependent on Suc metabolism, were similar for most chemical stress conditions. Nevertheless, correlation between Suc and Fru was not significant, thus suggesting that Glc and Fru levels could be regulated through stress mechanisms involving Glc-6-P and Tre pathways. A major feature of the chemical stress response in *L. perenne* was therefore the modification of carbohydrate metabolism, leading to decrease of Suc, Glc (which are among the 13 highly variable metabolites with a  $\log_2(\text{ratio}) > 1$  or  $< -1$ ; Fig. 5 and Supplementary Fig. S2) or Fru levels, globally correlated with accumulation or maintenance of Tre, Fru-6-P, and Glc-6-P.

Carbohydrate metabolism was linked to amino acid metabolism, with Tre being negatively correlated to Leu and Ser (Fig. 7). The Leu decrease in leaves was associated with Tre accumulation in the presence of AMPA (Fig. 5). Leu belongs to the BCAAs (Ile, Leu, Val), which were grouped in cluster B and were strongly interconnected. A simultaneous increase in Leu, Ile, and Val levels in response to tebuconazole (Fig. 4), or their concomitant decrease in leaves under direct exposure in response to copper (Fig. 4), indicated coordinated changes of BCAA catabolism. Cluster B metabolites showed the greatest number of correlations with other metabolites. Leu was positively correlated to chlorophyll levels (Fig. 6) and to 27 metabolites, including Ser and the shikimate pathway derivative quinate.

Ser (cluster E) was among the most highly variable metabolites [ $\log_2(\text{ratio}) > 1$  or  $< -1$ ; Fig. 5 and Supplementary Fig. S2] and was highly accumulated in response to fluoranthene and tebuconazole. Ser exhibited 33 significant correlations, among which there were only two negative cases, with Tre and ribose (Fig. 7), and was strongly positively correlated to Gly and Glu, which are close photorespiratory intermediates. Indeed, the levels of these amino acids increased in response to most of the chemical stressors under at least one

condition, except for glyphosate treatment and copper treatment where they decreased jointly (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2). Ser was positively correlated to Asn and Ala, which constitute amino group donors for synthesis of the photorespiratory intermediate Gly (Fig. 7). These correlations may confirm the involvement of the photorespiratory pathway in chemical stress responses and highlight the importance of Ser. Photorespiration and N status, which were closely connected and regulated, thus seem to play important roles in the responses to chemical stress in *Lolium*.

## Discussion

### *Chemical stressors at subtoxic levels have major impacts on growth and metabolic composition*

Subtoxic levels of chemical stressors induced significant physiological effects in *L. perenne*. The extent of these effects depended on the type of pollutant, modality of exposure, and physiological trait. Parallel investigation of physiological modifications in roots and leaves for different chemicals highlighted primary impacts of chemical stressors on roots, the first organ exposed to stress, across various stressors and across various modes of action. Leaf-related parameters (leaf length, pigment contents), exhibited intermediary sensitivity to chemicals. In contrast, PSII efficiency ( $F_v/F_m$ ) remained unaffected by the different treatments under conditions of transfer or direct exposure (Fig. 1D, H). Although a species-specific effect of *L. perenne* could not be excluded, this result suggests low sensitivity of PSII efficiency to low or sublethal levels of chemical stressors, contrasting with its wide use as chemical stress marker under high exposure levels (Li *et al.*, 2013; Mateos-Naranjo and Perez-Martin, 2013; Kreslavski *et al.*, 2014). Low-intensity chemical stress therefore seems to act primarily on growth and development rather than on photosynthesis, thus suggesting that developmental processes may be important targets of subtoxic chemical stress.

Although transfer and direct exposures led to similar trends across treatments, in terms of physiological responses, direct exposure induced more pronounced effects than transfer exposure. These results could be related to intensity of chemical stress and to levels of chemical stress sensitivity. Exposure modalities reflected different durations of exposure, with nearly a three times longer exposure for direct exposure. Exposure modalities differed in the developmental stage at which *Lolium* was submitted to chemicals, since direct exposure was applied to seeds, whereas transfer experiments affected 7-d-old plantlets.

Subtoxic levels of chemical stressors induced metabolic effects that did not overrun general metabolic signatures of plant organs and exposure modalities (Supplementary Fig. S1). Nevertheless, metabolic analysis of roots, which were the primary site of exposure, under direct exposure (Fig. 3C), which gave the most intense physiological effects (Fig. 1), revealed different types of chemical stress responses: (i) a low-intensity response highlighted by AMPA; (ii) a glyphosate response (glyphosate, GT) characterized by quinate accumulation; (iii) a heavy-metal response characterized by citrate



and succinate depletion; and (iv) a cyclic-compound response (fluoroanthene, tebuconazole), characterized by putrescine accumulation. These metabolic changes, not deeply altering the global plant metabolome and occurring with maintenance of plant growth (Fig. 2), are likely to reflect chemical stress adjustment rather than deregulation of homeostasis, leading, under long-term exposure, to avoidance of root growth inhibition for most of the chemical stressors (glyphosate, tebuconazole, and copper) (Fig. 2).

The effects of chemical stressors, such as those induced by AMPA, the degradation product of glyphosate, led to important changes in metabolic composition, especially affecting amino acid and sugar compositions, which are major components of ryegrass nutritional quality for herbivores (Barbehenn *et al.*, 2004). It was noteworthy that such changes of metabolic composition could occur in the absence of a major physiological impact, as was the case for transfer exposure and for some of the direct exposure treatments (Figs 1 and 3), thus emphasizing that assessment of chemical stress impact in the environment should integrate a wider range of parameters than PSII efficiency, chlorophylls, or plant growth. Perennial ryegrass is a major component of grazed pastures and grasslands, which cover a large fraction of the Earth's land surface (Barbehenn *et al.*, 2004). The chemical stressors that were shown in the present study to affect ryegrass, in terms of growth/biomass and metabolite contents (i.e. soluble sugars and amino acids), are part of diffuse pollution problems associated with agriculture (Dévier *et al.*, 2011). Discrete adjustments of grassland species to diffuse soil pollution may have important consequences on grassland functions, such as herbivore nutrition (Barbehenn *et al.*, 2004), carbon sequestration, and global change mitigation (Laliberté and Tylianakis, 2012). In this global context, understanding the mechanisms of ryegrass–xenobiotic interactions is of primary importance.

#### *Comparative analysis reveals novel mechanisms of action of chemical stressors*

Metabolomics has been used in pesticide and bioregulator research to study modes of action of chemicals and associated metabolic responses (Grossmann *et al.*, 2012). Most studies have been carried out on one chemical or a few close chemicals affecting known cellular targets. The present work showed that parallel metabolomic investigation of different chemical stressors was useful to discover common and specific response patterns, including novel effects that could not be inferred from commonly known modes of action. General chemical stress responses consisted of a systematic or frequent increase in key amino acids, including N-rich amino acid Asn, BCAAs, and Lys, and in a systematic decrease in glycerate and Ala (Figs 4 and 5). Under chemical stress, *L. perenne* underwent metabolism reorganization rather than stress response induction, commonly characterized by stress metabolite accumulation (Fig. 6). None of the key metabolites involved in general chemical stress responses was significantly correlated to root or leaf physiological parameters (Supplementary Table S2), thus suggesting that physiological

responses may be more related to specific actions of each chemical stressor than to a general metabolic response.

Besides common responses, chemical stressors induced specific metabolite variations (Table 1), thus highlighting potential novel modes of action. Glyphosate, an inhibitor of the shikimate pathway (Gomes *et al.*, 2014), generated a large accumulation of quinate in roots, contrasting with its absence of effects on aromatic amino acid levels (Phe, Tyr). Maintenance of these 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition markers could be ascribed to the low level of glyphosate exposure (Serra *et al.*, 2013). However, quinate accumulation in glyphosate-treated pea seedlings has been reported to result from glyphosate-induced modification of carbon flux in the direction of quinate synthesis (Orcaray *et al.*, 2010). Glyphosate toxicity could originate from a high quinate level in root, associated with shikimate pathway deregulation, leading to shoot and root growth inhibition (Orcaray *et al.*, 2010; Zulet *et al.*, 2013). This characteristic quinate accumulation was maintained under the GT mixture, which resulted in root growth inhibition. Glyphosate also affects cell division in sea urchin by impeding activation of cell-cycle regulator CDK1/cyclin B (Marc *et al.*, 2002). Since CDKs and cell-cycle checkpoints are universal in eukaryotes, root growth inhibition of *L. perenne* under glyphosate treatment may reflect the action of glyphosate on root meristem activity and cell division. AMPA was also found to inhibit root growth (Fig. 1). However, analysis of related metabolic profiles indicated different modes of action in comparison with its parent compound glyphosate, since AMPA led to large quinate depletion in leaves (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2). Such quinate variations could be due to shikimate pathway deregulation or redistribution of carbon by this highly translocable carbon form (Orcaray *et al.*, 2010). AMPA also led to an arabinose decrease in roots (Fig. 5), clearly highlighting cell-wall metabolism disturbance with potential significant impacts on root growth (Fig. 1). Given the structural analogy of AMPA with the amino acid Gly (Serra *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2014), cell-wall disturbance could originate from AMPA-induced imbalance in glycine-rich proteins in cell walls. Glycine-rich proteins are induced under stress and are hypothesized to interact with signaling pathways, thus suggesting a potential role as cell-wall structure regulators (Caffall and Mohnen, 2009). Regarding *Lolium* metabolic profiles, AMPA altered Gly metabolism dynamics, as reported previously (Serra *et al.*, 2013). However, whereas it led to Gly depletion in *A. thaliana* (Serra *et al.*, 2013), it globally increased Gly levels in *L. perenne* (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2).

Metabolic profiles induced by some chemical stresses confirmed previously reported modes of action. Copper treatment induced, under direct exposure, TCA depletion in roots, which could originate from increasing energy demand for ATP synthase and ATPase-dependent copper exclusion (Li *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013), as well as from release of citrate- and succinate-containing root exudates for metal complexation (Meier *et al.*, 2012). Tebuconazole, which decreases gibberellin levels by interacting with cytochrome P450 in the phytosterol biosynthesis pathway (Child *et al.*, 1993; Lamb

*et al.*, 2001), also affected TCA levels (Table 1), as described by Ribeiro *et al.* (2012) in the case of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor. TCA levels, however, varied differently, increasing in *A. thaliana* leaves under paclobutrazol, being relatively unchanged in *A. thaliana* seedlings under tebuconazole (Serra *et al.*, 2013), and decreasing in *L. perenne* root under tebuconazole, thus showing species-specific triazole responses. Triazoles have been reported to induce abiotic stress tolerance (Horn *et al.*, 2013), triazole-induced inhibition of gibberellin potentially affecting sugar-related signalling pathways and growth regulation (Child *et al.*, 1993; Lamb *et al.*, 2001). Tebuconazole was hypothesized to improve mRNA and protein stability and to induce compatible solute accumulation, leading to stress tolerance (Horn *et al.*, 2013). Despite root growth inhibition, maintenance of high levels of pigment contents was found for tebuconazole and GT treatments in comparison with glyphosate treatment (Fig. 1). Nevertheless, no clear accumulation of compatible solutes was observed (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2), suggesting that interactions between chemicals may interfere with the expected positive effects of tebuconazole. Indeed, the effects of the GT mixture probably resulted in a mix of deleterious effects of single chemicals, mainly characterized by inhibition of root and leaf growth associated with quinate and Asn accumulation, and TCA depletion (Figs 1, 4 and 5, and Supplementary Fig. S2). Finally, the increase in Ser levels by fluoranthene (Fig. 5) was in accordance with the increase of glutathione levels reported by Kummerová *et al.* (2013) in pea and maize. In fact, fluoranthene, and more largely PAHs, generate, particularly in the meristem zones, reactive oxygen species, which must be detoxified (Zezulka *et al.*, 2013; Kreslavski *et al.*, 2014). Oxidation of membrane lipids by PAHs (Kreslavski *et al.*, 2014) may lead to membrane disturbance that could explain the osmotic stress response observed in *Lolium* under fluoranthene treatment. This osmotic stress response was characterized by root growth enhancement (Fig. 1A, E) and leaf Pro accumulation (Fig. 5), as observed in *Lolium* seedlings under pyrene treatment (Chigbo and Batty, 2012), and by arabinose variations, which may reflect modifications of the cell-wall pectic fraction (Mustard and Renault, 2004). Association of fluoranthene and tebuconazole treatments into a cyclic-compound response under conditions of direct exposure (Fig. 3C, most intense physiological effects) may also be related to oxidative stress. Indeed, this association was characterized by accumulation of the antioxidant compound putrescine (Scandalios, 2005), while fluoranthene generates reactive oxygen species (Kreslavski *et al.*, 2014) and tebuconazole induces antioxidant systems (Zhang *et al.*, 2010).

#### *Reorientation of carbon and nitrogen metabolism is a major feature of the chemical stress response*

Our results showed that modifications in carbon and nitrogen metabolism were key factors in subtoxic chemical stress responses: (i) N-rich Asn was highly accumulated under most of the chemical stress conditions (Fig. 5 and Supplementary Fig. S2); (ii) Asn levels in roots were negatively correlated

with leaf length (Fig. 6); and (iii) Asn levels were positively correlated with levels of other amino acids (Fig. 7). In parallel, levels of Glc, Fru, or Suc decreased in response to each of the chemical stressors in at least one of the chemical stress conditions (Figs 4 and 5, and Supplementary Fig. S2). Such differential dynamics of Glc, Fru, and Suc could reflect modifications of carbon balance and carbon utilization, which were also suggested by effects of chemical stress on growth (Fig. 1) and on energy metabolism (Fig. 4). Further studies should determine whether changes in carbon balance entail increased synthesis of storage carbohydrates, as has been shown in *L. perenne* under other conditions of abiotic stress (Amiard *et al.*, 2003).

Accumulation of Asn has generally been associated with different conditions of abiotic stress (mineral deficiencies, drought, salt, toxic metals) where the plant is unable to support normal protein synthesis (Lea *et al.*, 2007; Maaroufi-Dguimi *et al.*, 2011). Jia *et al.* (2001) demonstrated that metsulfuron-methyl herbicide stress led to impairment of nitrogen metabolism and an increase in Asn levels in soybean. Relationships between nitrogen metabolism and soluble carbohydrates have been shown in leaves of *L. perenne*, where nitrogen deficiency was associated with a lower Suc content (Lattanzi *et al.*, 2012). *Oryza sativa* genotypes with contrasting tolerance to zinc deficiency and bicarbonate excess also exhibit a decrease in Glc and Fru and an increase in Asn, Asp, Gln, Val, and Ile (Rose *et al.*, 2012). The specific effects of chemical stressors therefore occur in association with perturbations of carbon–nitrogen homeostasis and *trans*-regulation of global amino acid metabolism, which may be a part of the global and common responses to environmental stresses.

Asn is important for nitrogen storage and transport from sources to sinks, especially under stress conditions of carbon limitation (Lam *et al.*, 1998). Asparagine synthetase genes that are involved in Asn synthesis are regulated by levels of carbohydrates (Lam *et al.*, 1998; Foito *et al.*, 2013). Jia *et al.* (2001) suggested that Asn could be a signalling molecule involved in sensing nitrogen status. Moreover, Asn has been characterized as an ammonia detoxification product (Lam *et al.*, 1998; Lea *et al.*, 2007). It would thus be important to determine whether, under conditions of subtoxic chemical stress, nitrogen mobilization is associated with ammonia toxicity and to what extent Asn accumulation plays a signalling role in orchestrating metabolic adjustments.

Asn, which is an amino group donor for synthesis of photorespiratory intermediate Gly, was positively correlated with Ser (Fig. 7). This was also the case for Ala, another amino group donor for photorespiration. Asn accumulation under chemical stress and such metabolic and functional correlations indicated the involvement of photorespiratory pathway regulation in chemical stress responses in *L. perenne*, in line with previously described effects of environmental stresses on other plant species (Ros *et al.*, 2013), and highlighted the importance of Ser, which was recently described as a metabolic signal for transcriptional control of photorespiratory pathway genes in *Arabidopsis* (Timm *et al.*, 2013). Photorespiration metabolism and nitrogen status, which are closely connected and co-regulated (Florian *et al.*, 2013),

are therefore likely to play important roles in responses to chemical stress in *L. perenne*, thus emphasizing the need to improve current knowledge on photorespiratory processes in  $C_3$  grasses. Perturbations of nitrogen nutrition affect leaf growth of *L. perenne* (Kavanová *et al.*, 2008). Because of the negative correlations between leaf growth and Asn and Ser levels in roots (Fig. 6), it will be important to investigate the potential involvement of these two amino acids in root–shoot signalling, especially under chemical stress conditions primarily affecting root systems. It was noteworthy that a major common response to all of the chemical stressors was the depletion of two photorespiration-related compounds, Ala and glycerate (Florian *et al.*, 2013). Given the importance of the photorespiration increase in abiotic stress responses (Voss *et al.*, 2013), this depletion may indicate potential perturbations of adaptive mechanisms in chemically stressed ryegrass.

*Coordination of chemical stress responses is associated with complex networks of correlations between amino acid and soluble sugar dynamics*

The important metabolic changes described above were shown to be strongly interconnected (Figs 7 and 8), thus indicating underlying mechanisms of regulation for coordination of amino acid, photorespiration, and carbohydrate dynamics under conditions of subtoxic stress. As shown in Fig. 7, all of the metabolic response clusters were interconnected through significant correlations that converged towards cluster E, especially towards Ser, which showed an extended network of positive correlations (Fig. 7), and towards Tre, which showed an extended network of negative correlations (Figs 7 and 8). Ser was significantly correlated (Supplementary Table S3) with Glc ( $r=0.76$ ) and with Suc ( $r=0.74$ ). The dynamics of soluble sugars, Glc-6-P, and Fru-6-P was structured as a Suc/Glc nexus in interaction with a Fru/Fru-6-P/Glc-6-P/Tre nexus, both nexus being centred on a negative Glc/Tre correlation (Fig. 8). All of these relationships suggested that stress-induced physiological and metabolic changes (Figs 6 and 7) could be modulated by differential dynamics and interconversion of soluble sugars. The central position of these amino acid and soluble carbohydrate correlations, especially those involving Ser and Tre, revealed novel aspects of chemical stress responses that are seldom taken into account. Finally, the integration of Glc-6-P regulation in the network of soluble sugar dynamics could be related to the stability and buffering of Glc-6-P levels under subtoxic chemical stress (Fig. 5). The regulation of this stability may be an important determinant of the long-term adjustment of *L. perenne* to chemical stress (Fig. 2).

Such metabolic and physiological correlations can result from combinations of metabolic, regulatory, and signalling relationships (Obata and Fernie, 2012). Glc-6-P is a major metabolic intermediate (Valluru and Van den Ende, 2011; Schluepmann *et al.*, 2012) and an allosteric regulator of enzyme activities (Toroser *et al.*, 2000). Glc-6-P can interact with signalling systems, as a substrate for the synthesis of the signalling metabolite Tre-6-P (Lunn *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2014) and as a potential inhibitor of the energy sensor sucrose

non-fermenting 1 (SNF1)-related kinase 1 (SnRK1) (Toroser *et al.*, 2000; Valluru and Van den Ende, 2011; Nunes *et al.*, 2013). Soluble carbohydrates involved in the central correlations described above (especially Glc, Suc, Tre) have been associated with signalling networks involving hexokinases (Granot *et al.*, 2014), SnRK1 (Baena-González and Sheen, 2008; Dietrich *et al.*, 2011; Lunn *et al.*, 2014) or the target-of-rapamycin (TOR) kinase (Lastdrager *et al.*, 2014; Xiong and Sheen, 2014). Ser is a metabolic signal for transcriptional control (Timm *et al.*, 2013). All of these signalling regulations provide mechanisms of integration between growth, metabolism, and stress responses in cross-talk with hormonal regulations (Valluru and Van den Ende, 2011; Xiong and Sheen, 2014). Their major effects consist of regulation of genes involved in catabolism (proteolysis, amino acid catabolism, sugar degradation, lipid mobilization), especially of genes involved in Asn and BCAA metabolism (Valluru and Van den Ende, 2011). As shown in the present work (Figs 4, 6 and 7), changes in Asn and BCAA metabolism were indeed important features of the chemical stress responses in *L. perenne*. Further work is therefore needed to analyse relationships between regulation of amino acid metabolism genes and SnRK1 functioning under conditions of subtoxic chemical stress.

## Conclusions

*L. perenne* was shown to undergo major metabolic changes under conditions of adjustment to chemical stresses and in the absence of major physiological and developmental alterations. These changes resulted in major reorientations of central carbon (Suc, Glc, and Fru) and nitrogen (asparagine, BCAAs, and photorespiration) metabolisms. Some of these changes showed correlations with slight effects on physiological traits such as root length and leaf length. The extent of these metabolic responses did not however translate into long-term loss of fitness, thus reflecting adaptive flexibility of metabolism rather than deregulation of cellular and metabolic homeostasis. Moreover, this metabolic flexibility was shown to occur in response to diverse xenobiotic and heavy-metal stresses, indicating common underlying response mechanisms. These mechanisms were associated with complex correlation networks between amino acids and soluble sugars and with contrasted dynamic ranges of responses among closely related metabolites. Carbohydrate metabolites such as Suc showed important variations, in line with other situations of abiotic stress, whereas other key metabolites such as Glc-6-P followed a pattern of limited variations, which may thus be important links between metabolic flexibility and long-term tolerability to subtoxic chemical stresses. It was also noteworthy that parallel metabolomic analysis of diverse chemical stresses revealed common response patterns in a background of differing modes of action and stressor-specific mechanisms, thus suggesting that general lines of defence were induced under low-intensity chemical stress. However, given the wide range of ecosystem functions associated with grasslands and pastures, higher-level impacts of metabolic changes in chemically stressed *L. perenne* cannot be excluded.



## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

**Supplementary Fig. S1.** Principal component analysis (PCA) and hierarchical classification of global metabolic responses to chemical stressors.

**Supplementary Fig. S2.** Relative variations of levels of metabolites in *Lolium perenne* under chemical stress in comparison to control conditions (log<sub>2</sub> ratio).

**Supplementary Method S1.** Metabolite profiling method.

**Supplementary Table S1.** Metabolites analysed by GC/MS method.

**Supplementary Table S2.** Organ-specific physiological trait-metabolite and metabolite-metabolite correlation matrix.

**Supplementary Table S3.** Global correlation matrix.

**Supplementary Table S4.** Glc-6-P and Fru-6-P correlation matrix.

## Acknowledgements

This work was supported by the interdisciplinary program 'Ingénierie écologique' [Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France] and by the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB), France. AAS is supported by a doctoral scholarship from the Brittany regional council (France). We are grateful to Jean-Luc Foulon (Ecobio Research Unit) for help with plant culture systems and to Sandra Rigaud (Ecobio Research Unit) for administrative and accounting work.

## References

- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Keller F, Prud'homme MP. 2003. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiology* **132**, 2218–2229.
- Baena-González E, Sheen J. 2008. Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science* **13**, 474–482.
- Barbehenn RV, Chen Z, Karowe DN, Spickards A. 2004. C3 grasses have higher nutritional quality than C4 grasses under ambient and elevated atmosphere CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology* **10**, 1565–1575.
- Bidar G, Pruvot C, Garçon G, Verdin A, Shirali P, Douay F. 2009. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* **16**, 42–53.
- Caffall KH, Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* **344**, 1879–1900.
- Chigbo C, Batty L. 2012. Effect of combined pollution of chromium and benzo(a)pyrene on seed growth of *Lolium perenne*. *Chemosphere* **90**, 164–169.
- Child RD, Evans DE, Allen J, Arnold GM. 1993. Growth responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.) to combined applications of the triazole chemicals triphenol and tebuconazole and interactions with gibberellin. *Plant Growth Regulation* **13**, 203–212.
- Couée I, Serra AA, Ramel F, Gouesbet G, Sulmon C. 2013. Physiology and toxicology of hormone-disrupting chemicals in higher plants. *Plant Cell Reports* **32**, 933–941.
- Dear BS, Sandral GA, Wilson BCD. 2006. Tolerance of perennial pasture grass seedlings to pre- and post-emergent grass herbicides. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **46**, 637–644.
- Dévier MH, Mazellier P, Ait-Aissa S, Budzinski H. 2011. New challenges in environmental analytical chemistry: identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie* **14**, 766–779.
- Dietrich K, Weltmeier F, Ehler A, Weiste C, Stahl M, Harter K, Dröge-Laser W. 2011. Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell* **23**, 381–395.
- Dorato MA, Engelhardt JA. 2005. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **42**, 265–274.
- D'Orazio V, Ghanem A, Senesi N. 2013. Phytoremediation of pyrene contaminated soils by different plant species. *Clean—Soil, Air, Water* **41**, 377–382.
- Florian A, Araújo WL, Fernie AR. 2013. New insights into photorespiration obtained from metabolomics. *Plant Biology* **15**, 656–666.
- Foito A, Byrne S, Hackett CA, Hancock RD, Stewart D, Barth S. 2013. Short-term response in leaf metabolism of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to alterations in nitrogen supply. *Metabolomics* **9**, 145–156.
- Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Hénault-Ethier L, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4691–4703.
- Gonthier R, Francis D. 1989. Changes in the pattern of cell division in the shoot and root meristem of *Lolium perenne* during the transition from vegetative to floral growth. *Journal of Experimental Botany* **40**, 285–292.
- Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R. 2014. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of Experimental Botany* **65**, 809–819.
- Grossmann K, Christiansen N, Looser R, Tresch S, Hutzler J, Pollmann S, Ehrhardt T. 2012. Physionomics and metabolomics—two key approaches in herbicidal mode of action discovery. *Pest Management Science* **68**, 494–504.
- Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K. 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science* **17**, 569–574.
- Horn R, Chudobova I, Hänsel U, Herwartz D, Koskull-Döring PV, Schillberg S. 2013. Simultaneous treatment with tebuconazole and abscisic acid induces drought and salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* by maintaining key plastid protein levels. *Journal of Proteome Research* **12**, 1266–1281.
- Hu C, Ou Y, Zhang D, Zhang H, Yan C, Zhao Y, Zheng Z. 2012. Phytoremediation of the polluted Waigang River and general survey on variation of phytoplankton population. *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 4168–4175.
- Hummel I, El-Amrani A, Gouesbet G, Hennion F, Couée I. 2004. Involvement of polyamines in the interacting effects of low temperature and mineral supply on *Pringlea antiscorbutica* (Kerguelen cabbage) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1125–1134.
- Jia M, Keutgen N, Matsushashi S, Mitzuniwa C, Ito T, Fujimura T, Hashimoto S. 2001. Ion chromatographic analysis of selected free amino acids and cations to investigate the change of nitrogen metabolism by herbicide stress in soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 276–280.
- Kavanová M, Lattanzi FA, Schnyder H. 2008. Nitrogen deficiency inhibits leaf blade growth in *Lolium perenne* by increasing cell cycle duration and decreasing mitotic and post-mitotic growth rates. *Plant, Cell and Environment* **31**, 727–737.
- Kreslavski VD, Lankin AV, Vasilyeva GK, Luybimov VY, Semenova GN, Schmitt FJ, Friedrich T, Allakhverdiev SI. 2014. Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **81**: 135–42.
- Krutz LJ, Senseman SA, Zablotowicz RM, Matocha MA. 2005. Reducing herbicide runoff from agricultural fields with vegetative filter strips: a review. *Weed Science* **53**, 353–367.
- Kummerová M, Zezulka Š, Babula P, Váňová L. 2013. Root response in *Pisum sativum* and *Zea mays* under fluoranthene stress: morphological and anatomical traits. *Chemosphere* **90**, 665–673.
- Lablerté E, Tylanakis M. 2012. Cascading effects of long-term land-use changes on plant traits and ecosystem functioning. *Ecology* **93**, 145–155.
- Lam HM, Hsieh MH, Coruzzi G. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 345–353.
- Lamb DC, Cannieux M, Warrilow AG, Bak S, Kahn RA, Manning NJ, Kelly DE, Kelly SL. 2001. Plant sterol 14α-demethylase affinity for azole

fungicides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**, 845–849.

**Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S.** 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **65**, 799–807.

**Lattanzi FA, Ostler U, Wild M, Morvan-Bertrand A, Decau ML, Lehmeier CA, Meuriot F, Prud'homme MP, Schäufele R, Schnyder H.** 2012. Fluxes in central carbohydrate metabolism of source leaves in a fructan-storing C3 grass: rapid turnover and futile cycling of sucrose in continuous light under contrasted nitrogen nutrition status. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2363–2375.

**Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG.** 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* **150**, 1–26.

**Li G, Peng X, Xuan H, Wei L, Yang Y, Guo T, Kang G.** 2013. Proteomic analysis of leaves and roots of common wheat (*Triticum aestivum* L.) under copper-stress conditions. *Journal of Proteome Research* **12**, 4846–4861.

**Lin CY, Trinh NN, Fu SF, Hsiung YC, Chia LC, Lin CW, Huang HJ.** 2013. Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Molecular Biology* **81**, 507–522.

**Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M.** 2014. Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal* **79**, 544–567.

**Maaroufi-Dguimi H, Debouba M, Gaufichon L, Clément G, Gouia H, Hajjaji A, Suzuki A.** 2011. An Arabidopsis mutant disrupted in *ASN2* encoding asparagine synthetase 2 exhibits low salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 623–628.

**Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Bellé R.** 2002. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chemical Research in Toxicology* **15**, 326–331.

**Mateos-Naranjo E, Perez-Martin A.** 2013. Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. *Chemosphere* **93**, 2631–2638.

**Meier S, Alvear M, Borie F, Aguilera P, Ginocchio R, Cornejo P.** 2012. Influence of copper on root exudate patterns in some metallophytes and agricultural plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **75**, 8–15.

**Mustard J, Renault S.** 2004. Effects of NaCl on water relations and cell wall elasticity and composition of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **121**, 265–271.

**Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ.** 2013. Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**, 89–98.

**Obata T, Fernie AR.** 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3225–3243.

**Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A, Royuela M.** 2010. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science* **66**, 262–269.

**Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I.** 2009. Natural variation reveals significant integration of carbohydrate nutritional status and acclimation to xenobiotic stress in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *Annals of Botany* **104**, 1323–1337.

**Ramel F, Sulmon C, Serra AA, Gouesbet G, Couée I.** 2012. Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3999–4014.

**Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JH, Mueller-Roeber B.** 2012. Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2769–2786.

**Ros R, Cascales-Miñana B, Segura J, Anoman AD, Toujani W, Flores-Tornero M, Rosa-Tellez S, Muñoz-Bertomeu J.** 2013. Serine biosynthesis by photorespiratory and non-photorespiratory pathways: an interesting interplay with unknown regulatory networks. *Plant Biology* **15**, 707–712.

**Rose MT, Rose TJ, Pariasca-Tanaka J, Yoshihashi T, Neuweiger H, Goesmann A, Frei M, Wissuwa M.** 2012. Root metabolic response of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with contrasting tolerance to zinc deficiency and bicarbonate excess. *Planta* **236**, 959–973.

**Scandalios JG.** 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 995–1014.

**Schluepmann H, Berke L, Sanchez-Perez GF.** 2012. Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3379–3390.

**Serra AA, Nuttens A, Larvor V, Renault D, Couée I, Sulmon C, Gouesbet G.** 2013. Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2753–2766.

**Servillo L, Giovane A, Balestrieri ML, Ferrari G, Cautela D, Castaldo D.** 2012. Occurrence of pipercolic acid and pipercolic acid betaine (homostachydrine) in Citrus genus plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 315–321.

**Timm S, Florian A, Wittmiß M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H.** 2013. Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**, 379–389.

**Toroser D, Plaut Z, Huber SC.** 2000. Regulation of plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology* **123**, 403–411.

**Valluru R, Van den Ende W.** 2011. Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress. *Plant Science* **181**, 387–400.

**Verbruggen N, Hermans C.** 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**, 753–759.

**Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS.** 2013. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* **15**, 713–722.

**Xiong Y, Sheen J.** 2014. The role of TOR signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiology* **164**, 499–512.

**Yadav UP, Ivakov A, Feil R, et al.** 2014. The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1051–1068.

**Zezulka S, Kummerová M, Babula P, Váňová L.** 2013. *Lemna minor* exposed to fluoranthene: growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic Toxicology* **140–141**, 37–47.

**Zhang YJ, Zhang XA, Chen CJ, Zhou MG, Wang HC.** 2010. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **98**, 151–157.

**Zulet A, Zabalza A, Royuela M.** 2013. Phytotoxic and metabolic effects of exogenous quinate on *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**, 779–788.

### Supplementary Method S1: Metabolite profiling method

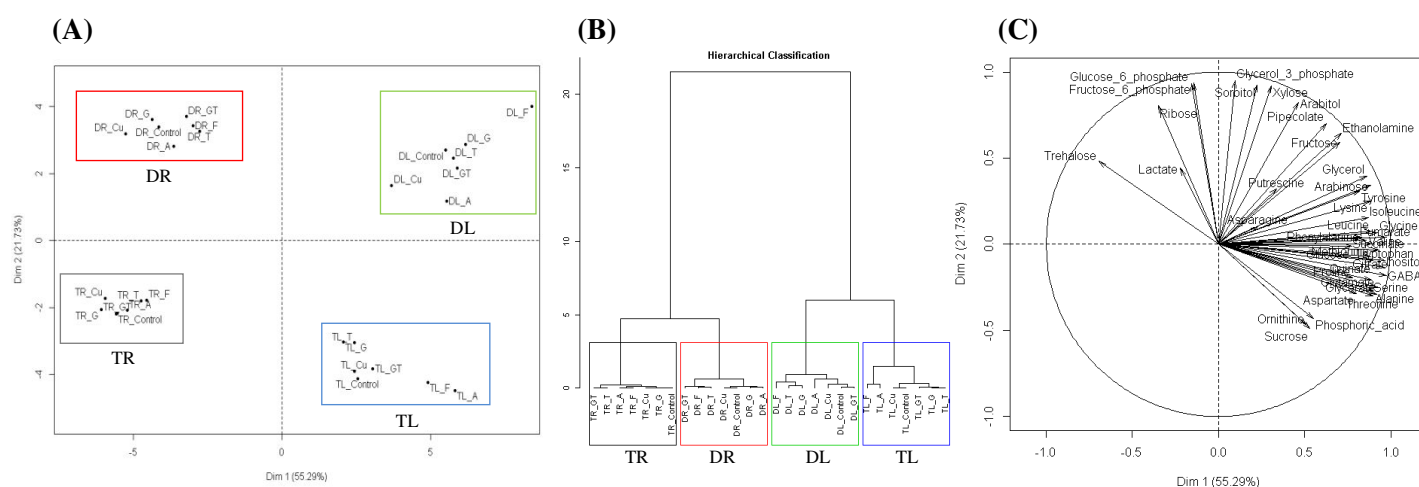
**Metabolite derivatization:** The dried aliquots were re-suspended in 30  $\mu\text{L}$  of 20  $\text{mg L}^{-1}$  methoxyamine-pyridine solution, and placed under automatic orbital shaking at 40°C for 1 h. Thirty  $\mu\text{L}$  of N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide were added and derivatization was conducted at 40°C for 1 h under agitation. All the derivatization process was automatized using a CTC CombiPal autosampler (GERSTEL GmbH and Co.KG, Mülheim an der Ruhr, Germany), thus ensuring identical derivatization time and process for all samples.

**Parameters of injection and of chromatography:** The injector temperature was held at 250°C. The oven temperature ranged from 70 to 170°C at 5°C  $\text{min}^{-1}$ , from 170 to 280°C at 7°C  $\text{min}^{-1}$ , from 280 to 320°C at 15°C  $\text{min}^{-1}$ . The oven then remained at 320°C for 4 min. A 30 m fused silica column (95% dimethyl siloxane, 5% phenyl polysilphenylene-siloxane, v/v) was used with helium as the carrier gas at a constant rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . One microliter of each sample was injected using the split mode (25:1).

### Supplementary Table S1: Plant metabolites analysed by GC/MS method

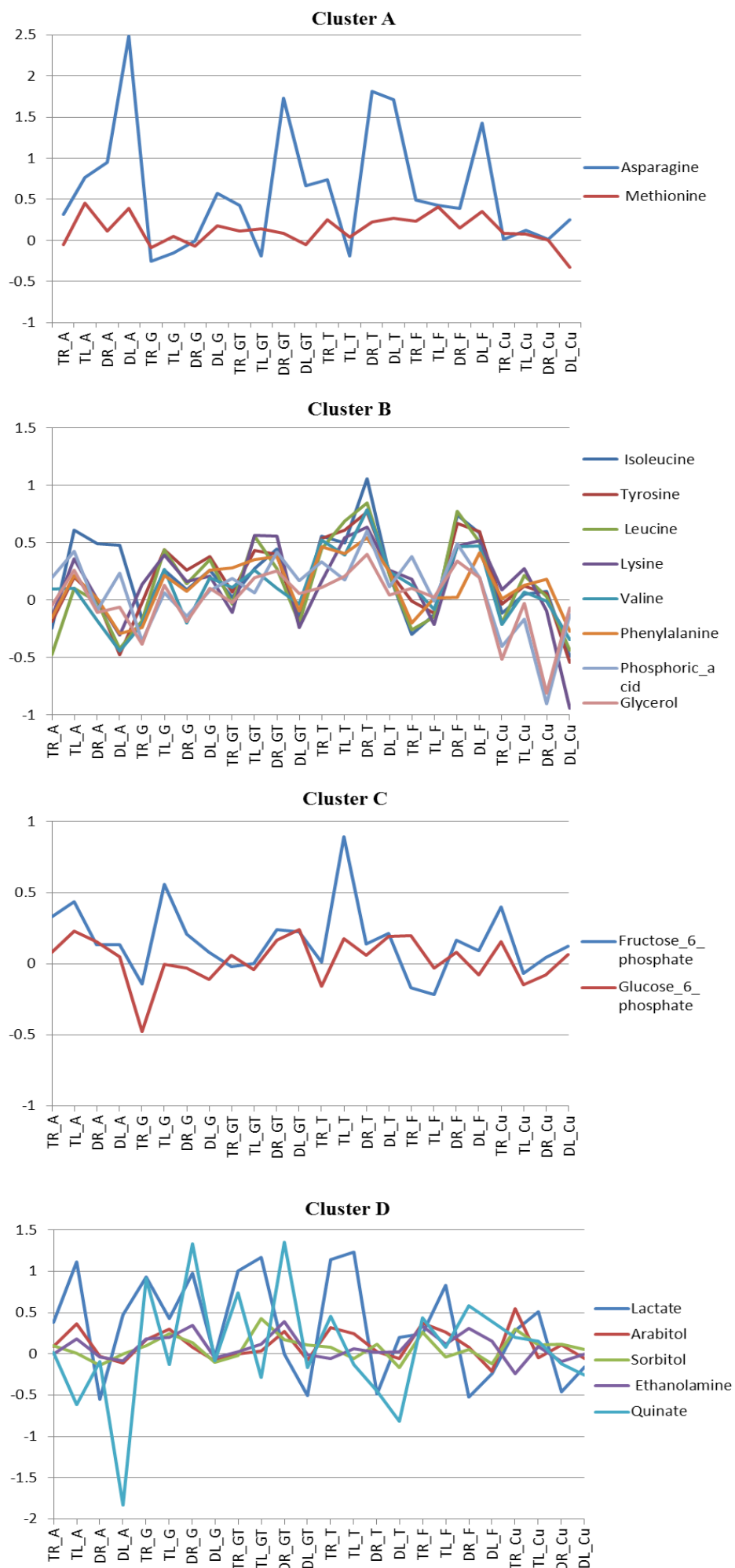
<i>Amino acids</i>	<i>Oses</i>	<i>Amines</i>	<i>Polyols</i>
Alanine	Arabinose	Cadaverine	Arabitol
Asparagine	Fructose	Dopamine	Erythritol
Aspartate	Fructose-6-phosphate	Ethanolamine	Galactitol
Citrulline	Galactose	Putrescine	Glycerol
GABA	Galacturonic acid	Spermidine	Glycerol-phosphate
Glumate	Glucose	Spermine	Inositol
Glycine	Glucose-6-phosphate	Triethanolamine	Mannitol
Isoleucine	Maltose	Tyramine	Sorbitol
Leucine	Mannose	<b><i>Nucleobase</i></b>	Xylitol
Lysine	Ribose	Cytosine	
Methionine	Sucrose	<b><i>Organic acids</i></b>	
Ornithine	Trehalose	Ascorbate	
Phenylalanine	Xylose	Citrate	
Proline		Fumarate	
Serine		Galactonolactone	
Threonine		Glycerate	
Tryptophane		Lactate	
Tyrosine		Malate	
Valine		Phosphoric acid	
		Pipecolate	
		Quinate	
		Succinate	

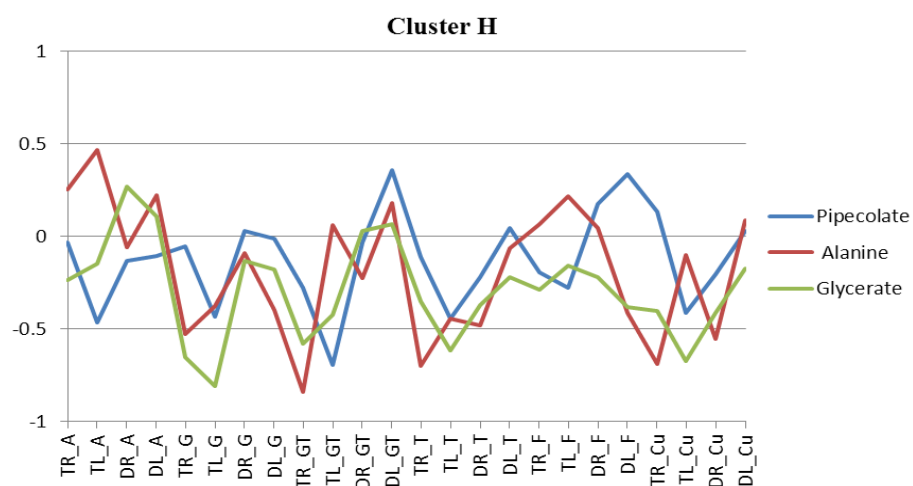
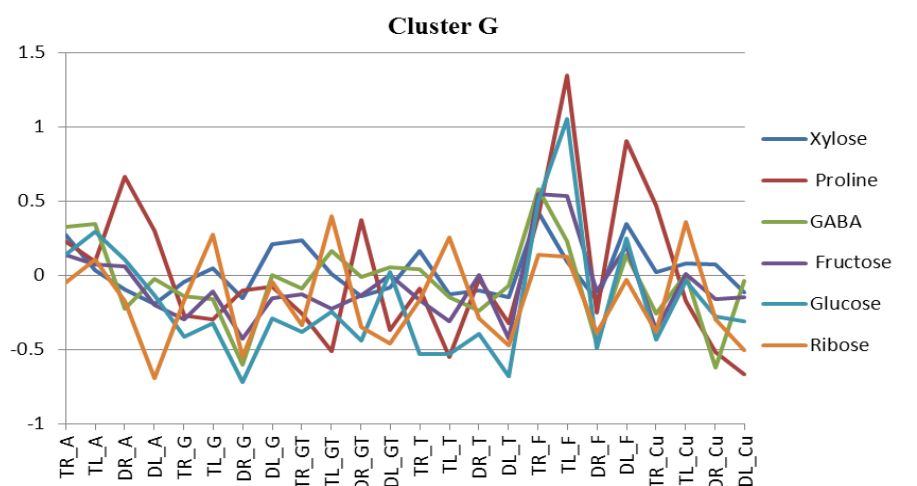
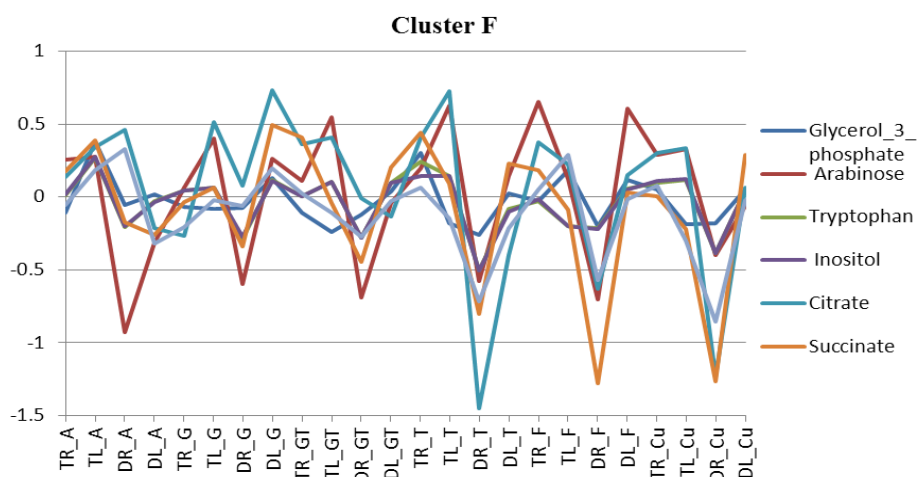
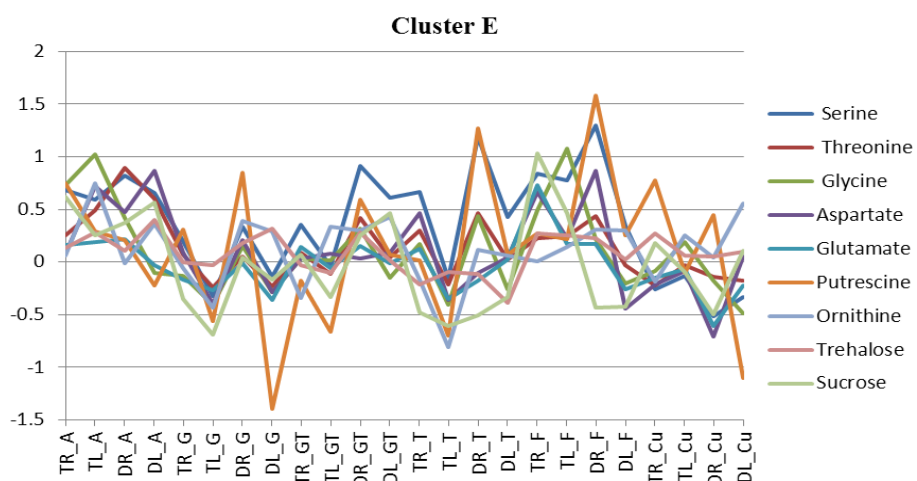
**Supplementary Figure S1: Principal component analysis (PCA) and hierarchical classification of global metabolic responses to chemical stressors.** Analysis was carried out on root (R) and leaf (L) metabolic responses of *Lolium perenne* to two types of chemical stress exposure [transfer experiment (T) and direct exposure (D)] to various chemical stressors as described in Fig. 1. PCA was carried out on the correlation matrix of averages of metabolite levels. The first two letters correspond, respectively, to the condition of stress exposure and the type of organ. The letter after the underscore corresponds to chemical treatment, as described in Fig. 1. The position of treatments (A), the corresponding hierarchical classification (B), and distribution of metabolic parameters on the first plane (Dim1 and Dim2; C) are shown. The four groups correspond to combinations of the two exposure modalities with the two organs: TR and TL for, respectively, root and leaves after transfer exposure, and DR and DL for, respectively, root and leaves after direct exposure.





**Supplementary Figure S2: Relative variations of the levels of metabolites in *Lolium perenne* under chemical stress in comparison to the control condition (Log<sub>2</sub> ratio).**





**3. Article n°4 : Transcriptomic analysis reveals molecular and signaling responses of the grass species *Lolium perenne* to low-level xenobiotic exposures**

Anne-Antonella Serra, Ivan Couée, David Heijnen, Sophie Coudouel, Cécile Sulmon,  
Gwenola Gouesbet

**Transcriptomic analysis reveals molecular and signaling responses of the grass species *Lolium perenne* to low-level xenobiotic exposures**

Anne-Antonella Serra<sup>1</sup>, Ivan Couée<sup>1</sup>, David Heijnen<sup>1</sup>, Sophie Coudouel<sup>2</sup>, Cécile Sulmon<sup>1</sup>, Gwenola Gouesbet<sup>1</sup>

Preliminary version for the special research topic “Abiotic stress signaling in plants: functional genomic intervention” in Frontiers in Plant Science-section Plant Physiology (Girdhar K. Pandey, editor). Large supplemental tables of unigenes count per functional category and of reads count per functional category are not included in the present draft. The corresponding data are thus referred to as data not shown.

**Institution address:**

<sup>1</sup> Université de Rennes 1

Centre National de la Recherche Scientifique

UMR 6553 ECOBIO

Campus de Beaulieu, bâtiment 14A

F-35042 Rennes Cedex, France

<sup>2</sup> Université de Rennes 1

Centre National de la Recherche Scientifique

UMS 3343 OSUR

Campus de Beaulieu, bâtiment 14A

F-35042 Rennes Cedex, France

**Abstract**

Perennial ryegrass, *Lolium perenne*, which is a major component of grasslands, can be subjected to situations of xenobiotic stresses through its various uses in pastures, lawns, vegetated filter strips and phytoremediation. Metabolomic studies have recently shown that *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of xenobiotic stress. A *de novo* transcriptome analysis of *Lolium perenne* was carried out on leaves from plants subjected to subtoxic xenobiotic stresses with two structurally-distinct stressors, glyphosate and tebuconazole, and one situation of equal combination. Functional categories related to transcription, regulations, signaling and stress responses were found to be well represented. Gene families involved in signaling, such as Serine/Threonine-protein kinases, could be accurately described, thus bringing novel knowledge on the signaling processes of *Lolium perenne*. Chemical treatments were found to influence significantly the relative proportions of transcripts related to carbohydrate processes and signaling, in line with the important metabolic and regulatory changes revealed by metabolomic analysis. More generally, transcript families related to protein-kinase cascades, transcriptional factors, responses to abiotic or biotic stimuli and responses to phytohormones such as jasmonate, ethylene and salicylate were sensitive to xenobiotic treatments. Xenobiotic-regulated variations of specific genes encoding different types of SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related kinases involved in sugar and stress signaling were confirmed by qRT-PCR. This RNA-Seq and gene expression analysis of *Lolium perenne* therefore highlighted the complexity of crosstalks between molecular responses to organic xenobiotics on one hand and on the other hand sugar, phytohormone and calcium signaling.

**Keywords**

signaling, glyphosate, tebuconazole, subtoxic, residual pollution, perennial ryegrass, xenobiotics, mass sequencing, RNA-Seq

## **Introduction**

Modern agriculture uses large amounts of phytosanitary products to maximize crop production. These products are mainly pesticides or mixtures of pesticides, which have been developed to repel, attenuate or kill pests and competitive plants (Arias-Estévez et al., 2008). However, processes related to water flows such as runoff and leaching, as well as spray drift lead to the entry of a large fraction of pesticides into environmental compartments (soil, water, sediment or atmosphere). These diffuse and residual contaminations are composed of mixtures of parent compounds, of their degradation products, and also of associated adjuvants (Helander et al., 2012) and induce many environmental impacts (Patty et al., 1997; Köhler and Triebkorn, 2013). Pesticides and related-degradation products affect many non-target organisms in natural ecosystems, among which plants are particularly impacted as sessile organisms (Child et al., 1993; Serra et al., 2013; Serra et al., 2015).

The mechanisms of plant responses to chemical stress induced by such xenobiotics are not fully understood. Plant responses to xenobiotics are often studied under conditions of high exposures corresponding to application protocols in the field. In contrast, few studies deal with the responses to realistic conditions of low exposure to pesticides in a context of runoff or residual contaminations. Moreover, realistic conditions require to take into account the existence of complex mixtures which can induce in plants very different effects in comparison to molecules applied alone. Indeed, the effects of mixtures do not always correspond to the addition of individual effects of compounds, but can lead to higher (synergism) or weaker (antagonism) toxicity (Hertzberg and MacDonell, 2002). The effects of agricultural pesticide pollutions, which often consist in mixtures, are thus difficult to analyze and to predict (Serra et al., 2013; Serra et al., 2015). A recent integrative study (Serra et al., 2013) analyzed the effects of sublethal doses of pesticides, of pesticide degradation products and of their mixtures on the xenobiotic-sensitive plant model *Arabidopsis thaliana*. These chemical stresses had significant impacts on plant functioning, affecting plant development and physiology, and inducing extensive metabolic changes. Low levels of pesticides and of pesticide degradation products thus led to accumulation of stress-related metabolites, such as ascorbate, and to the reduction of carbohydrate levels. Moreover, these chemical stresses effects occurred in parallel with gene regulation of hormone-related and transcription regulation-related gene expression, thus suggesting cryptic and non-target actions of such xenobiotic compounds (Serra et al., 2013). Serra et al. (2013) also demonstrated unpredictable interaction effects between pollutants at the molecular, metabolic and physiological levels, thus confirming that pesticide-related products may act on regulation pathways, probably through signaling



processes (Ramel et al., 2012; Couée et al., 2013). Mechanisms and regulations of chemical stress responses may differ between species as a result of micro- and macroevolutionary processes (Medina et al., 2007) and may influence the sensitivity or tolerance of plants and thereby their capabilities to maintain growth and development in polluted area. *Lolium perenne* (perennial ryegrass) is a perennial non-model species of high ecological and agronomic interest (Barbehenn et al., 2004; Gilliland et al., 2012), which is known to be relatively tolerant to various pollutants of different chemical nature (Dear et al., 2006). An integrative study, focusing on the physiological and metabolic responses of *L. perenne* to diverse subtoxic conditions of chemical stresses showed the early effects of chemical stressors on seedling metabolism, physiology and growth (Serra et al., 2015). These did not however translate into long-term loss of fitness, thus indicating a certain level of tolerance to low-level chemical stress. From a physiological point of view, subtoxic levels of pesticides caused discrete effects on root and leaf traits, with root growth being the most sensitive parameter (Serra et al., 2015). These slight effects were however associated with metabolic changes corresponding to major reorientation of central carbon and nitrogen metabolisms. In particular, metabolic responses to chemical stress were associated with complex correlation networks between amino acids and soluble sugars and with contrasted dynamic ranges of responses among closely related metabolites (Serra et al., 2015). Such complex metabolic regulations in response to low chemical stress highlighted the possible involvement of regulatory molecular processes (Serra et al., 2015). More importantly, this analysis suggested that complex signaling networks may directly participate in chemical stress responses and thus rapidly adjust plant metabolism and counteract mild damaging stress.

The present work analyzes the molecular responses of *Lolium perenne*, using a transcriptomic approach, in order to characterize the mechanisms underlying physiological and metabolic effects of pesticide-related chemical stress. In order to decipher primary mechanisms and networks involved in adjustments, stress treatments consisted in transfer experiments of non-stressed plants to xenobiotic-containing medium and short periods of exposure. Pesticide treatments consisting of glyphosate, tebuconazole and their combination were applied at subtoxic levels to *L. perenne* seedlings. Glyphosate is a broad spectrum herbicide (Duke and Powles, 2008) which disrupts the synthesis of aromatic amino acids by inhibiting 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), a key enzyme in the shikimate pathway (Steinrücken and Amrhein, 1980). Tebuconazole, despite acting and being used as a fungicide, inhibits the plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase enzyme in *Sorghum* (Lamb et al., 2001) and limits the rate of gibberellin biosynthesis in rapeseed (Child et al., 1993). Because of the

lack of *Lolium* genomic or transcriptomic resources, transcriptomic analysis of *Lolium* responses to chemical stress was carried out by RNA-Seq approach involving the pyrosequencing of leaf cDNA libraries (Ward et al., 2012; Huang et al., 2012). A *de novo* transcriptome of *Lolium perenne* was thus obtained by the assembly of cDNA reads. Transcriptomic data were annotated and differential expression of genes or functions were analyzed to obtain a functional view of molecular regulations induced by chemical stress.

## **Materials and Methods**

### **Plant material and growth conditions**

Seeds of *Lolium perenne* (Brio cultivar) were briefly washed in ethanol and surface-sterilized in bayrochlore (20 g L<sup>-1</sup> in water) containing 0.05% tween (v/v) for 20 min and rinsed five times in sterilized water. Moistened seeds were placed in Petri dishes in the dark at 4°C for 7 days in order to break dormancy and homogenize germination. Seeds were sown on pieces of gauze and placed at the top of sterile culture tubes containing liquid growth medium. Gauze pieces were continuously moistened by soaking gauze edges into culture medium, in order to maintain humidity for germination. Germination and growth were carried out under axenic conditions in a control growth chamber at 22°C/20°C under a 16 h light (6000 lux)/8 h dark regime. Growth medium consisted of Hoagland basal salt mix (N°2, Caisson Laboratories, North Logan, UT, USA) adjusted to pH 6. Transfer experiments consisted in xenobiotic exposure of young plants at the same stage of photosynthetic development. After 7 days of growth under control conditions, seedlings were transferred to fresh growth medium containing chemical stressors, thus resulting in xenobiotic exposure at root level. Shoots and roots were harvested 4 days later, thus corresponding to 11 days of total growth. Different chemical treatments were applied: the broad-spectrum herbicide glyphosate (G, 1 µM), the fungicide tebuconazole (T, 4 µM) and a combination of glyphosate and tebuconazole (GT, 1 µM and 4 µM, respectively). Roots and leaves of seedlings were separately collected just before the start of the daylight period, freeze-dried, ground in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

### **Transcriptome sequencing**

Five independent biological replicates, consisting in aerial parts (50 mg) of 10 plantlets each, were harvested after transfer experiment and used for transcriptome sequencing. RNA was extracted using TRI Reagent® (Sigma) with an additional DNase treatment. Total RNA samples from each replicate were pooled per treatment condition [Control (C), glyphosate (G), tebuconazole (T) and glyphosate and tebuconazole mixture (GT)] and resulting samples

were polyA-enriched with the Oligotex mRNA kit (Qiagen Cat. N° 70042). Then, 250 ng of mRNA enriched RNA were fragmented ( $\text{ZnCl}_2$ ), and reverse-transcribed to cDNA using cDNA Synthesis System kit (Roche Cat. N° 11117831001).

For each treatment, one Roche 454 library was prepared and sequenced twice on a quarter of plate on a Roche 454 GS-FLX, using titanium chemistry (titanium chemistry, Sequencing Kit XL+) at the Biogenouest Genomics and the Environmental and Functional Genomics Platform core facility (Rennes, France). The sequencing data will be available in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi>).

### **Assembly and read processing**

Read filtering and final assembly were performed using Galaxy instance (Goecks et al., 2010). The 454 reads were processed to remove sequences below 250-bp and above 1000-bp. Reads were improved according to quality and by removing adapter sequences, undetermined bases (“N”) and poly-A/T tails. For generation of the reference transcriptome, selected clean reads from all libraries were pooled and assembled to improve mRNA lengths and produce a global library. Reads were assembled in contigs using the *de novo* assembly program Trinity (Haas et al., 2013). Trinity is an Illumina/Solexa-specialized transcriptomic assembler, which is suitable for non-strand-specific and single-end-read data. According to Ren et al. (2012), it gives the best performance among the multiple de Bruijn graph assemblers, and represents an alternative solution for reconstructing full-length transcripts from 454 reads. The assembly was conducted using the default parameters. Reads were ascribed to contigs using RSEM (RNA-Seq by expectation-maximization) software and filtered according to the reads per kilobase of target transcript length per million reads mapped (RPKM) values equal to 1 or greater. After a first Trinity assembly, the unmapped (172 634 total unmapped sequences), and unused reads, were submitted again to the Trinity program, thus leading to a new assembly. Reads that again did not fit into contigs (42 351 unmapped reads) were defined as singletons. These unique sequences were added to the 14 811 unique contigs to constitute the reference transcriptome. The resulting singletons and contigs represented the candidate unigene set.

### **Functional analyses**

After assembling, tBLASTx alignments ( $e\text{-value} < 10e^{-5}$ ) against The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org.gate1.inist.fr>) databases were undertaken and unigenes with the highest sequence similarity were functionally annotated using Blast2GO (Conesa et al., 2005) with cut-off  $e\text{-values}$  of  $10e^{-5}$  (Blastx) and  $10e^{-6}$  (mapping). Blast-based annotations were complemented with domain-based annotations using the Inter-ProScan tool

(v5). Functional classification of unigenes was based on Blast2GO analysis. Pathway assignments were carried out according to KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) resource; <http://www.kegg.jp/> or <http://www.genome.jp/kegg/>). Gene Ontology (GO) enrichment analyses were performed with Fisher's exact test as integrated in the Blast2GO software (Conesa et al., 2005).

### **Differential expression analysis**

In order to determine differentially expressed genes between the 4 conditions, the DESeq method was used. This normalization method is included in the DESeq Bioconductor package (Anders et al., 2013). As each condition was represented by a single sample of pooled individuals, the differential expression for each gene was estimated by using the variance of expression for this gene across the 4 conditions. Unigenes were considered as differentially expressed at  $p\text{-value} < 0.05$ .

### **qRT-PCR validation**

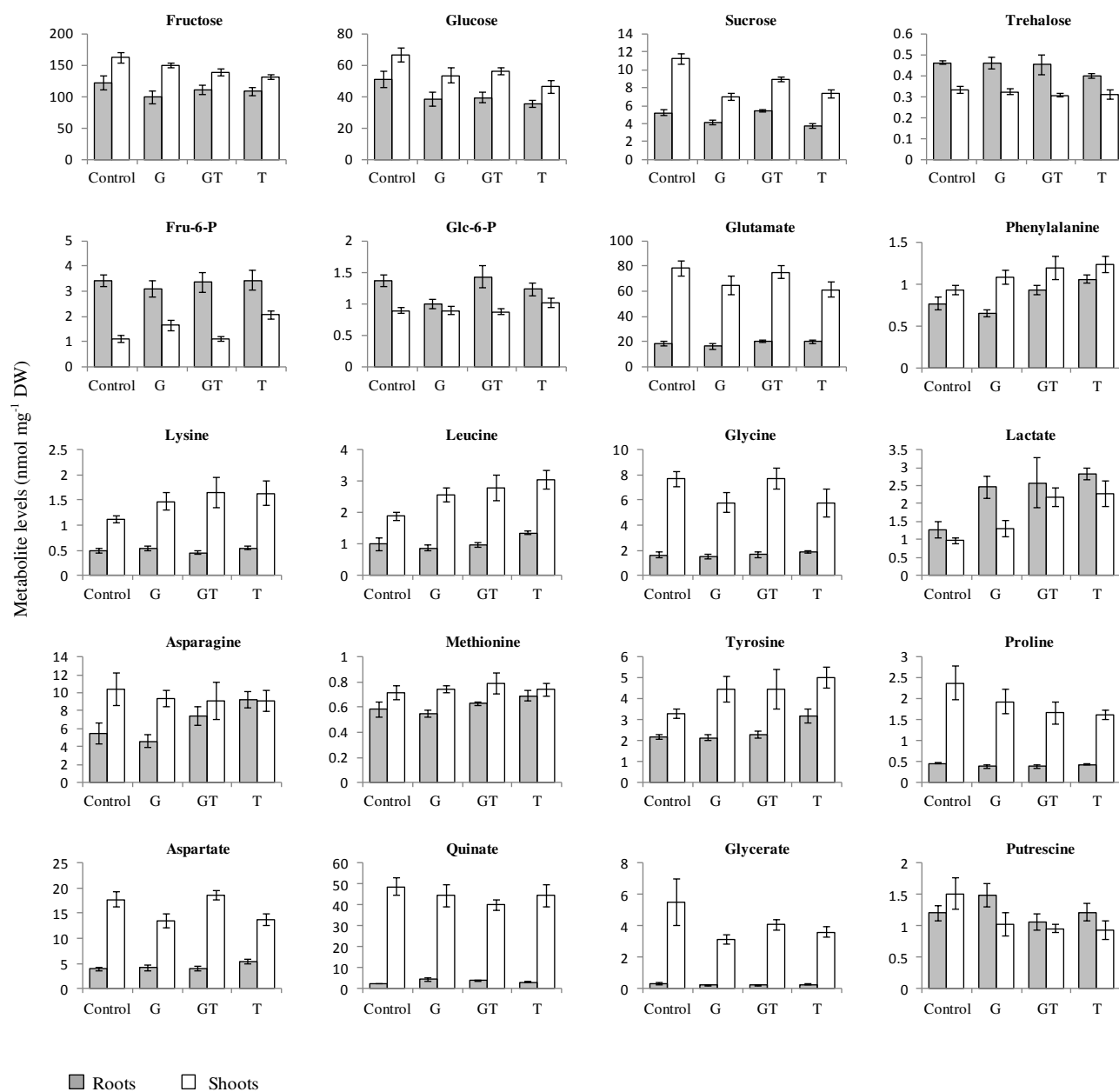
Quantitative RT-PCR was used to confirm *in silico* differential expression and analyze the expression of genes potentially involved in chemical stress response in *Lolium perenne*. qRT-PCR experiments were carried out using, for each condition, five independent biological replicates of pooled aerial parts (50 mg) from 10 plantlets harvested after transfer experiments. RNA from aerial parts was used for cDNA synthesis (Iscrip<sup>TM</sup> cDNA Synthesis kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Resulting cDNAs were used to determine expression profiles according to the different treatments. Quantitative PCR was performed using iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Conditions were as follows: 95°C 3 min, and 40 (95°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec) cycles. All samples were run in duplicate for each primer set. Specific primers for each gene selected for analysis were designed according to 454 sequences using Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000) (Supplemental Table 1). The results of the analysis were treated with Gene Expression version 1.1 software.

### **Metabolic profiling**

Five independent biological replicates of root and aerial part samples, each consisting in 10 pooled plantlets, were harvested after a transfer experiment and used for metabolomic profiling. Samples were extracted and analyzed using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) as described by Serra et al. (2015). Metabolite levels were quantified using XCalibur v2.0.7 software (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) and expressed as  $\text{nmol.mg}^{-1}$  of dried weight (DW).

Figure legends are at the end of the article (p. 254)

**Figure 1**



## **Results**

### **Short-term root-level exposure to subtoxic levels of chemical stressors causes important metabolic modifications in both roots and shoots**

The effects of subtoxic levels of glyphosate, tebuconazole and glyphosate plus tebuconazole on *Lolium* growth have been previously described (Serra et al., 2015). We demonstrated that survival of perennial ryegrass to subtoxic levels of xenobiotic stresses was associated with discrete physiological perturbations and major flexibility and complex regulations of metabolisms (Serra et al., 2015). While G treatment did not have any effect on root or leaf growth and on chloroplastic pigment levels, T and GT treatments led to reduction in leaf size, and to increase of root size and of pigment levels under such subtoxic stress (Serra et al., 2015). Similar stimulating effects of low doses of xenobiotics on chloroplast-related parameters have been described in maize and bean seedlings for DCMU application (Nyitrai et al., 2003). According to similarities in observed effects, the authors argued that plants counteracted mild damaging stress by mobilizing their metabolism through signal transduction pathways involving cytokinins.

All of the subtoxic conditions analyzed here (G, T, GT) induced a decrease of soluble sugar contents (Fru, Glc, Suc and Tre), with Suc levels being less affected by GT (Figure 1). An increase of Fru-6-P level in leaves in the presence of G or T was observed, while the opposite effect was observed in roots for Glc-6-P. All of the xenobiotic treatments therefore induced a decrease of soluble carbohydrates (Fru, Glc, Suc), which could amount to a situation of carbon limitation. In contrast, G and T acted differently on the levels of Glc-6-P and Fru-6-P compared to the mixture. All treatments tended to increase the levels of arabinose, Phe, Lys, Leu, Met, Tyr, and lactate and to decrease the levels of Glycerate and Pro. Effects of G or T alone were mostly comparable, and the effects of GT mixture were not additive. However, GT and T conditions induced an increase of Asn content in root, and G, and to a lesser extent, GT and T, caused significant increase of quinate levels in roots, but not in leaves. Glyphosate response was also characterized by the accumulation in root of the stress-related metabolite putrescine. A reduction of glutamate levels in leaf was observed in response to G and T, while a slight accumulation was found in roots in response to T and GT. All these variations seemed to underline that, even under conditions of short-term and subtoxic exposure, xenobiotics effected major metabolic rearrangements facilitating nutrient and nitrogen mobilization for enhanced stress tolerance. Moreover, these metabolic rearrangements not only affected roots, as the primary site of exposure, but also the shoots, thus demonstrating short-term xenobiotic-

**Table 1:** Summary of 454 sequencing data

Number of high-quality (HQ) reads		Control	Glyphosate	Tebuconazole	Glyphosate + Tebuconazole
Sequencing reads before preprocessing (Average bp length of HQ reads)	Run 1	224 814 (481 +/-184)	207 483 (450 +/-180)	234 687 (488 +/-176)	227 001 (483 +/-183)
	Run 2	171 316 (401 +/-232)	143 737 (351 +/-218)	193 881 (431 +/-224)	173 328 (411 +/-233)
Reads after 250-1000 bp trimming	Run 1	190 551	169 605	202 685	193 374
	Run 2	112 834	84 325	139 427	116 918
Reads after trimming and preprocessing (polyA, N, Qual)	Run 1	189 143	167 578	200 697	191 833
	Run 2	111 652	81 676	137 314	115 200
Total HQ reads in pools of run 1 and run 2		Pool	300 795	249 254	338 011
Reference Transcriptome		Pool	1 195 093 reads		

**Table 2:** Assembly results

A	First assembly				
	Reference	control	glyphosate	tebuconazole	glyphosate + tebuconazole
Number of contigs	14 492	10 155	5 773	9 109	9 408
Total length of contigs (bp)	12 905 107	10 070 689	6 098 760	9 166 250	9 611 071
Number of Contig $\geq$ 1000 bp	4 342	3 937	2 549	3 661	3 921
Mean contig length (bp)	890 $\pm$ 466	991 $\pm$ 498	1 056 $\pm$ 537	1 006 $\pm$ 508	1 031 $\pm$ 503
B	Final assembly				
	Reference	control	glyphosate	tebuconazole	glyphosate + tebuconazole
First assembly	14 492	8 089	3 646	7 005	7 256
Second assembly	319	130	50	94	103
Singletons	42 351	8 089	6 218	12 553	11 025
Total	57 162	22 087	9 914	19 652	18 384



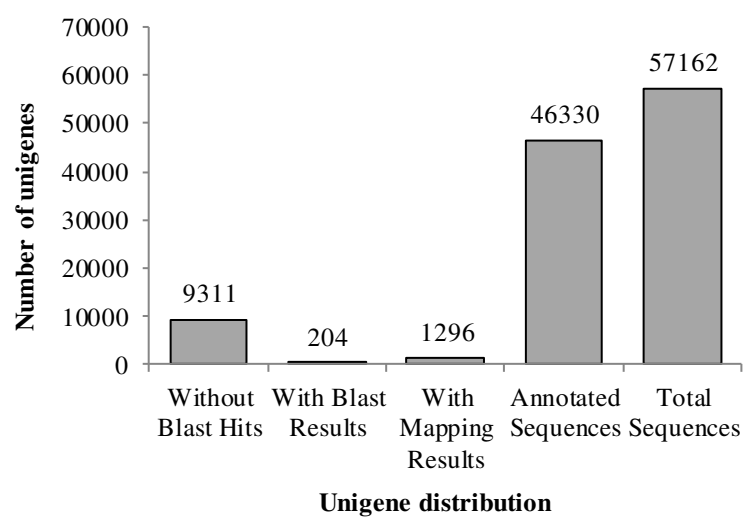
related root-shoot relationships, through xenobiotic, metabolite or signal transport. Finally, as previously shown (Serra et al., 2013, 2015), glyphosate treatment did not decrease aromatic amino acid levels, thus suggesting induced metabolic and molecular regulatory effects that were target (EPSPS)-independent (Vivancos et al., 2011; Serra et al., 2013, 2015).

### ***De novo* sequence assembly of the *L. perenne* shoot reference transcriptome**

*Lolium perenne* seedlings were submitted to 3 conditions of short-term low-level xenobiotic exposure (G, T, GT) in comparison to control condition. Leaf cDNA libraries, corresponding to these 4 conditions, were prepared and sequenced using 454 mass sequencing. Before preprocessing, sequencing of cDNA libraries resulted in approximately 0.7 Gbp of sequence data with a GC content of 54%, the genome size of *Lolium* being estimated to 2.7 Gb (Fiil et al., 2011). Each quarter plate run was preprocessed, and the runs of each treatment were pooled, thus leading to 300 795, 249 254, 338 011 and 307 033 high-quality reads for control, glyphosate, tebuconazole and glyphosate + tebuconazole treatments, respectively (Table 1). The reference transcriptome, which was derived from the complete pool of reads from the 4 conditions (C, G, T, GT), contained 1 195 093 reads (Table 1).

Read assembly resulted in an initial reference transcriptome of 14 492 contigs with length range from 250 to 6437 bp (Table 2A) and an average contig size of 890 bp. The unmapped reads (172 634 reads) of length range from 250 to 1000 bp were used for a second round of assembly, which resulted in 3 564 new contigs. Among the 172 634 reads used, 42 351 remained unmapped and were defined as resulting singletons. Among the 3 564 new contigs, 3 245 were very similar, if not identical, to contigs built in the first assembly. The 42 351 singletons and the 319 new contigs were added to the 14 492 contigs leading to 57 162 sequences or unigenes (Table 2B) which were used further for whole transcriptome annotation.

The quality of the assembly was checked by comparing the resulting transcriptome to SRA data of *Lolium perenne* (43 049 sequences, E-MTAB-1556 in ArrayExpress; Vigeland et al., 2013). A tblastx analysis using an e-value < 10e<sup>-6</sup> revealed that 45 962 sequences (13 782 contigs and 32 180 singletons) from our transcriptome matched similar sequences from the deposited SRA data. The reference transcriptome was also compared to the complete mitochondrial (GenBank: JX999996.1) and chloroplastic (NCBI Reference Sequence: NC\_009950.1) genomes of *Lolium perenne* using tblastx program. The mitochondrial genome contains genes corresponding to 14 tRNA, 3 rRNA and 34 proteins (Islam et al., 2013), among which 27 genes matched with high identities (e-value < 10e<sup>-6</sup>) with unigenes from the

**Figure 2**

reference transcriptome. Furthermore, 80 genes from the complete chloroplastic genome, which contains genes encoding 76 unique proteins, 30 tRNAs and four rRNAs (Diekmann et al., 2009), were identical or very close ( $e\text{-value} < 10e^{-6}$ ) to the transcriptome unigenes.

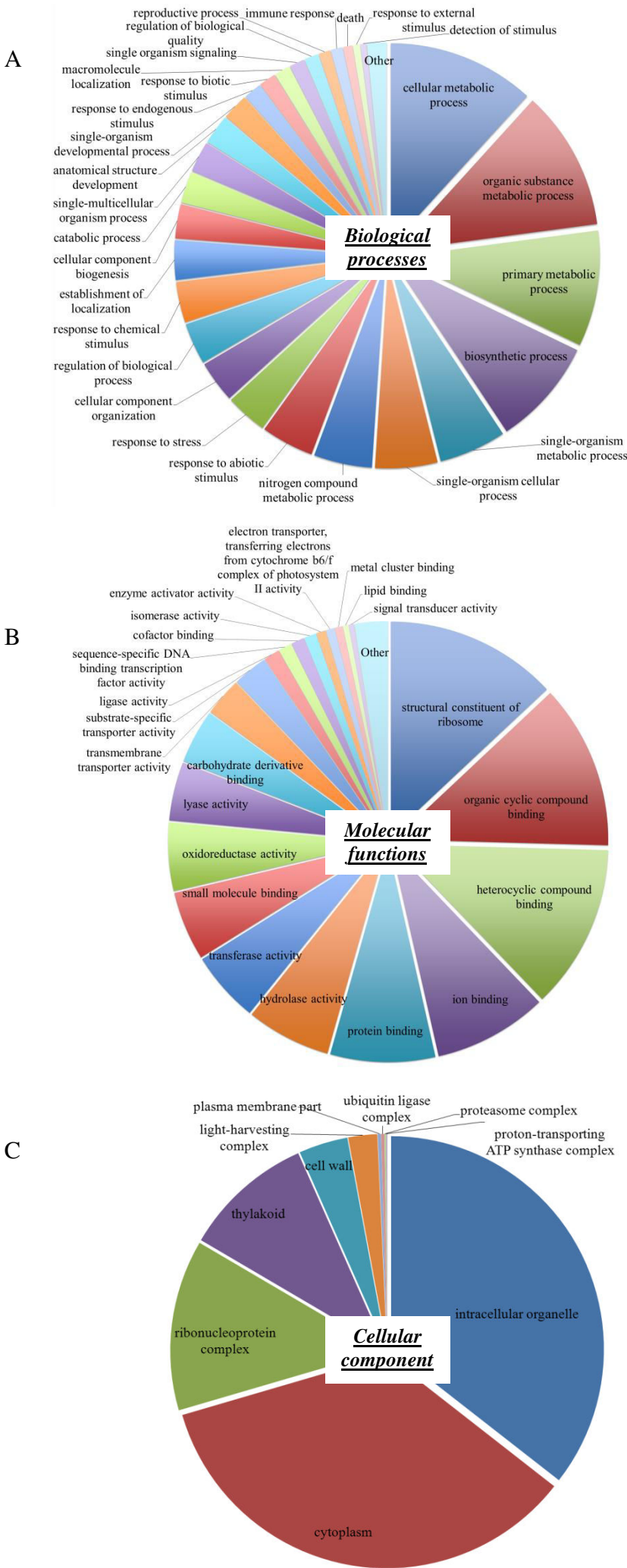
In order to validate further the assembled unigenes, sequence-based alignments were performed against the TAIR (*Arabidopsis thaliana*) database by using the tblastx algorithm (Altschul et al., 1997) with an  $e\text{-value}$  threshold of  $10e^{-6}$ . According to tblastx data, 55.44% (31 696 unigenes) of the matched sequences showed strong homology with TAIR data ( $e\text{-value} < 10e^{-50}$ ), and 84.9% (48 550 unigenes) of the top hits exhibited lower but significant homology ( $e\text{-value}$  over  $10e^{-6}$ ).

### **Functional annotation of the *L. perenne* shoot reference transcriptome**

Functional annotation of the reference transcriptome was undertaken using the Blast2GO tool and TAIR database. 9 311 (16% of all unigenes) unigenes were found without blast hit in the TAIR (*Arabidopsis thaliana*) database (Figure 2). Among the unigenes yielding blast results, 204 (0.32%) were not mapped and 1 296 (2.2%) mapped unigenes were not annotated, thus leading to 46 330 (81%) annotated unigenes (Figure 2). In many cases, multiple GO terms were assigned to the same unigene.

GO terms were classified into functional groups according to biological processes, molecular functions, and cellular components classes. Distribution of the various GO terms identified for the *Lolium* reference transcriptome is presented in Figure 3 for each main GO class. The different kinds of biological activities that are typical of plant cell functioning were well represented. GO terms linked to metabolism and biosynthetic processes represented more than 50% of the biological processes (Figure 3A). Moreover, GO terms related to stress responses, signaling and regulations (response to stress, response to external/abiotic/chemical stimulus, detection of stimulus, single organism signaling, regulation of biological processes) were also largely represented. Concerning molecular functions (Figure 3B), GO terms linked to various binding activities were highly represented, as also reported by Farrell et al. (2014). Furthermore, activities related to translation (structural components of ribosomes) were largely represented. Functional categories also described main enzyme activities such as hydroxylase, transferase, oxidoreductase, or lyase activities. The subcellular localization of these processes and functions (Figure 3C) showed the importance of gene products associated with intracellular organelles, chloroplasts (thylakoids, light-harvesting complex), cytoplasm and ribosomal complexes. Such functional distribution demonstrated that this *L. perenne* reference transcriptome exhibited a good coverage of different types of biological activities.

Figure 3



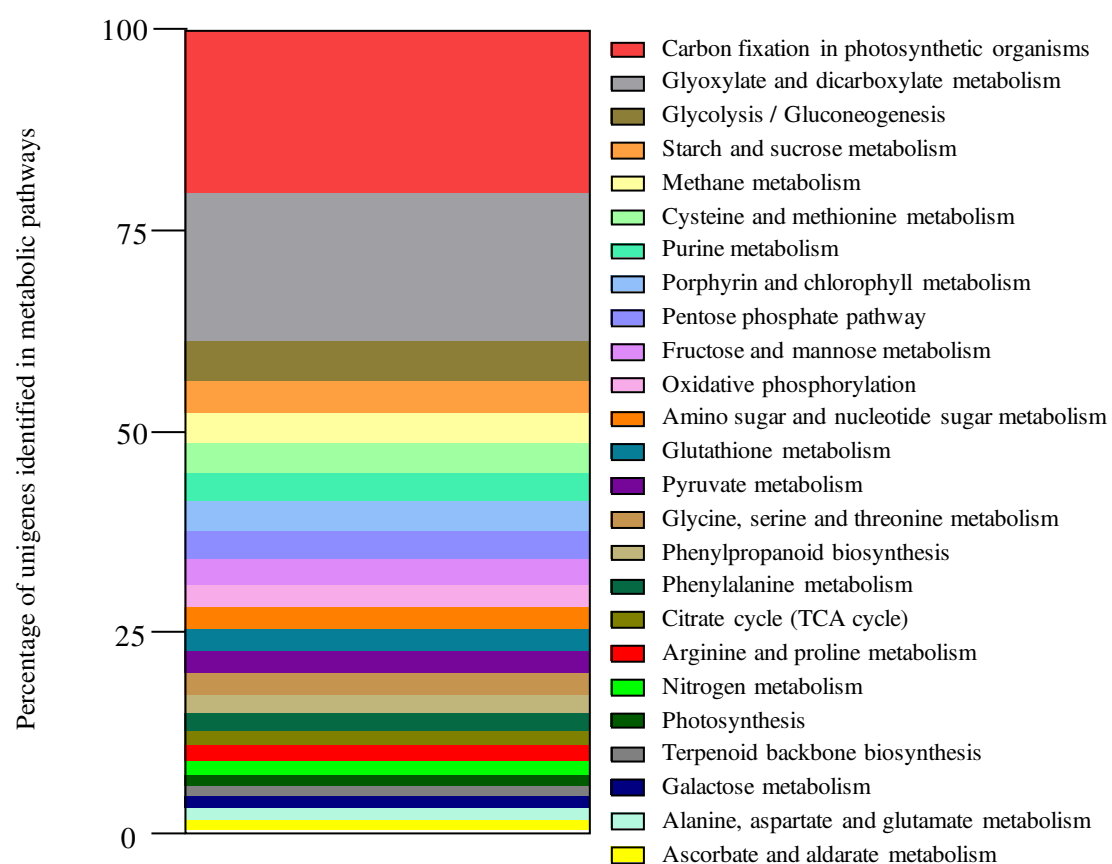
The relative importance of various metabolic pathways was assessed from the assignment of unigene annotations in the KEGG database (Figure 4). Most of the predominant pathways were found to belong to carbohydrate metabolism (Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, Glycolysis/Gluconeogenesis, Starch and sucrose metabolism, Pentose phosphate pathway, Fructose and mannose metabolism, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Pyruvate metabolism, TCA cycle, Galactose metabolism, Ascorbate and aldarate metabolism) and to energy metabolism (Carbon fixation in photosynthetic organisms, Methane metabolism, Oxidative phosphorylation, Nitrogen metabolism, Photosynthesis). Five pathways related to amino acid metabolism were also represented. These results thus gave an adequate overview of major central metabolism pathways. Moreover, the predominance of pathways involved in carbohydrate metabolism was in agreement with the fact that the primary source of readily available energy in this forage species is water-soluble carbohydrates (Smith et al., 1998).

### **Effects of short-term root-level exposure to subtoxic levels of chemical stressors on the relative regulation and expression of transcript functional categories in *Lolium perenne* leaves**

#### ***Assessment of xenobiotic-related molecular effects***

The relative proportions of functional categories, as defined by GO terms, were analyzed relatively to the different conditions of chemical stress. GO enrichment analysis for each class (biological processes, cellular components and molecular functions) revealed the GO terms for which the quantity of annotated unigenes (contigs and singletons) presented significant differences ( $FDR < 0.01$  and  $p\text{-value} < 0.0001$ ) between conditions (C, G, T, GT). Results were expressed as the percentage of unigenes in each GO term category in a given condition relatively to the total number of annotated unigenes in the same class. The distribution of significantly-enriched GO term categories is given in Figure 5. The percentage of annotated reads in each GO term category in a given condition was also calculated relatively to the total number of annotated reads in the same class. In this analysis of annotated read levels, only GO term categories for which at least 50 reads had been counted in at least one condition were selected (data not shown).

In a number of cases, the relative proportions of GO term categories were generally decreased by xenobiotic treatments in terms of percentages relatively to annotated and enriched unigenes (Figure 5), and also in terms of percentages relatively to annotated reads (data not shown). Nevertheless, specific effects of each type of xenobiotic treatments could be observed (Figure 5). This was particularly the case for G treatment which often led to more pronounced

**Figure 4**

effects than those of T and GT treatments (Figure 5). Such modifications of proportions of GO term categories in terms of unigene enrichment were likely to reflect the effects of xenobiotic treatments on global regulatory processes of genome expression affecting each category. Modifications of proportions of GO term categories in terms of read enrichment gave further information on transcript-level induction or repression.

### ***Effects on gene expression processes***

The “structural constituent of ribosome” category (Figure 5B) showed increased proportions in the presence of G or T, while all the chemical treatments (G, T, GT) induced an increase of reads number (data not shown). The potential involvement of ribosome components in xenobiotic responses was also reflected by the significant increase of “ribosomal subunit” category in the presence of G (Figure 5C). The biogenesis of functional ribosomes seemed however to be sensitive to chemical stresses, since GO terms categories such as “ribonucleoprotein complex biogenesis”, “rRNA processing”, “ribosome biogenesis” were negatively affected by the 3 chemical stress treatments. G and GT treatments also induced slight decrease of unigenes proportions for “DNA-dependent transcription” (Figure 5A). The increase of “negative regulation of translation”-related proportion in the presence of T and G contrasted with a strong decrease in presence of GT (Figure 5A). For upper-level biological process categories, such as “translation” and “gene expression”, the increase of unigenes proportions in the presence of G or T (Figure 5A) was associated with an increase in reads number (data not shown), thus indicating the induction of specific genes. This increase of “gene expression” category occurred in parallel with a decrease in the “gene silencing” category (Figure 5A). Finally, negative effects of G on “histone modification”-related unigenes were also observed in upper levels of classification such as “chromatin organization” and “macromolecule modification” (Figure 5A).

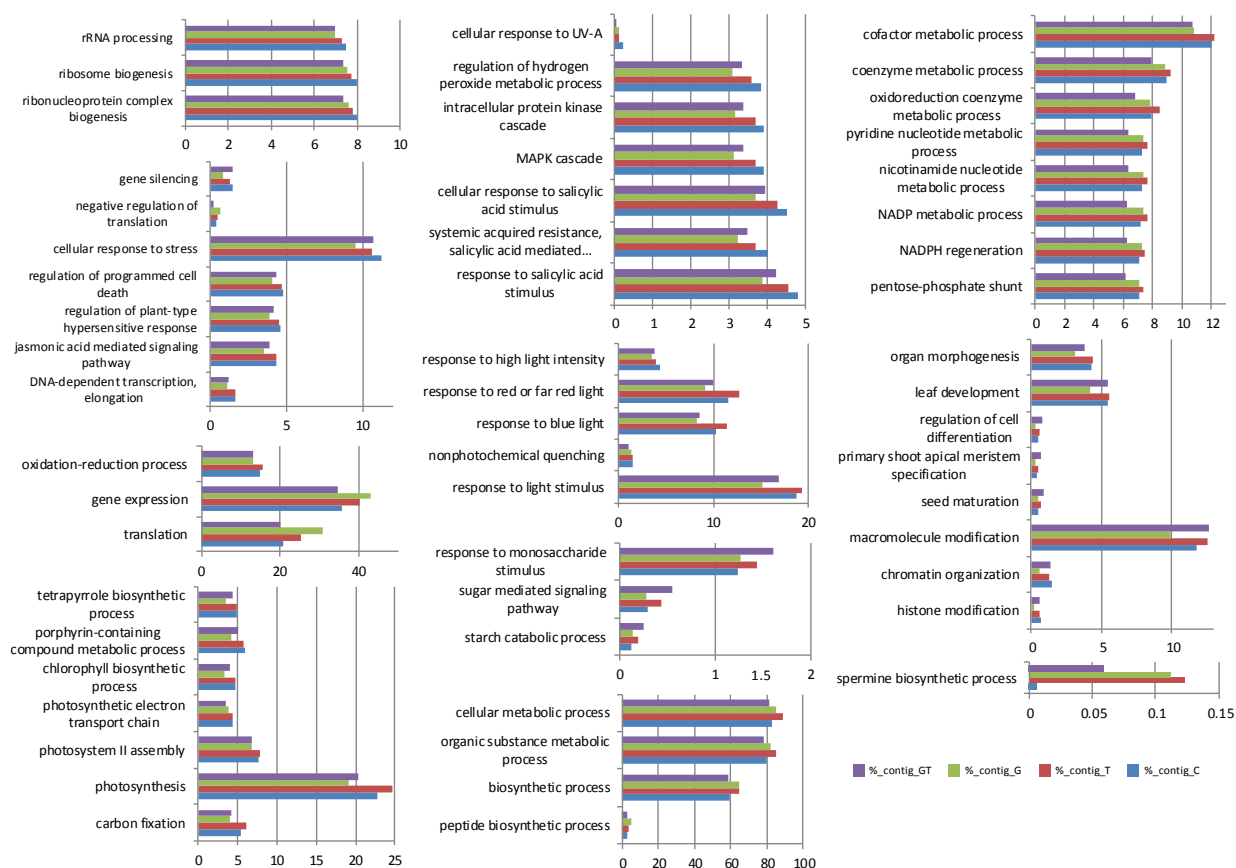
### ***Effects on photosynthesis and ATP dynamics***

Unigenes linked to the “ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activator activity” molecular function category showed decreased proportion in response to xenobiotics, particularly in response to G (Figure 5B). This GO term is linked to the regulation of Rubisco activity. The corresponding “ribulose-bisphosphate carboxylase activity” category was significantly more represented in response to T and underrepresented in the presence of G and GT. G and GT treatments reduced unigene proportions corresponding to biological processes associated to “carbon fixation”, “photosynthesis”, “photosystem II assembly” and “photosynthetic electron transport chain”. Glyphosate application also reduced the number of unigenes involved in “chlorophyll biosynthetic process” and in related pathways such as “por-

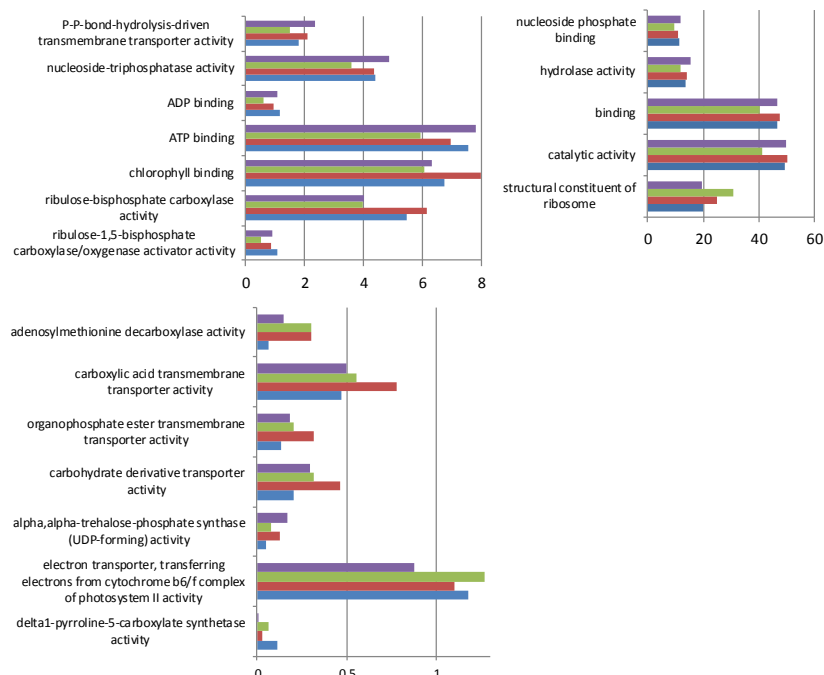


Figure 5

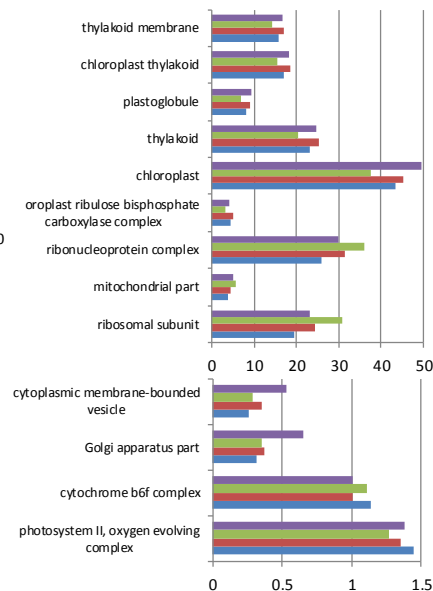
## A- Biological processes



## B- Molecular functions



## C- Cellular components



phyrin-containing compound metabolic process” and “tetrapyrrole biosynthetic process” (Figure 5A). However, the number of corresponding reads was significantly increased (data not shown), thus suggesting that specific genes in this category were positively regulated. While no unigene enrichment of “magnesium chelatase activity” category was observed, there was an increase in read numbers in the presence of the 3 xenobiotic treatments for genes encoding these chlorophyll biosynthetic pathway enzymes (data not shown). In contrast, the representation of annotated unigenes in the “chlorophyll binding” category increased in response to T, while GT reduced it. Xenobiotic-related perturbations in chloroplastic and photosynthetic pathways were also identified in the analysis of cellular component categories (Figure 5C). Numerous unigenes were ascribed to GO terms related to “chloroplast”, “thylakoid”, “plastoglobule”, “chloroplast thylakoid” and “thylakoid membrane”. These categories generally showed higher proportions in the presence of T and GT treatments, while “photosystem II oxygen evolving complex” and “cytochrome b6f complex” categories presented lower proportions in the presence of, respectively, T and G treatments, and T and GT treatments (Figure 5C).

The “binding” GO term category was significantly represented, in particular with regard to “nucleoside phosphate binding”, “ATP binding” and “ADP binding”. Proportions of annotated unigenes for these molecular functions decreased in the presence of T and G, and slightly increased in the presence of GT. However, concerning the “ATP binding” annotation, which was highly represented among GO terms, an increase of the number of corresponding reads was observed in the presence of G, thus suggesting strong expression of specific unigenes (data not shown). Likewise, other functions related to nucleoside and nucleotide dynamics, which showed frequent occurrences and high percentages, were responsive to xenobiotic treatment. Thus, the GO term category “nucleoside-triphosphatase activity” showed decreased proportions in the presence of G, whereas GT treatment caused an increase (Figure 5B). This metabolic activity was characterized by an increase of related read number in the presence of G, T and GT, thus suggesting strong expression of specific unigenes. This pattern of modifications was reflected in the changes affecting the corresponding upper-level GO term, “hydrolase activity”. Nucleoside-triphosphatase activity is an essential provider of energy for active transport and is thus related to the “P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity” category, which showed higher proportions in the presence of GT and T.

### ***Effects on metabolic flexibility and stress metabolism***

G and GT treatments induced slight decreases of unigene proportions for many biological processes related to abiotic and biotic stress signaling processes, such as “jasmonic acid mediated signaling pathway”, “regulation of plant-type hypersensitive response”, “regulation of programmed cell death” and “cellular response to stress” (Figure 5A). Moreover, the proportions of unigenes and reads related to “response to salicylic acid”, “MAPK cascade”, “intracellular protein kinase cascade”, “regulation of hydrogen peroxide metabolic process” and “cellular response to UV-A” were negatively affected by all the chemical stressors (Figure 5A). Conversely, the “peptide biosynthetic process” category was overrepresented under all of the xenobiotic conditions, in particular in the presence of glyphosate. These variations resulted in correlated increases of unigene and read proportion for upper-level GO terms such as “biosynthetic process”, “organic substance metabolic process” and “cellular metabolic process” in response to all chemical treatments. Most of the biological processes linked to light responses showed a decrease of related unigene proportion in the presence of G and GT. GO term categories such as “response to light stimulus”, and related sublevels such as “non photochemical quenching”, “response to blue light”, “response to red or far red light” and “response to high light intensity”, followed the same tendency (Figure 5A).

The proportions of unigene categories linked to carbohydrates and their derivatives were significantly influenced by chemical treatments. Unigenes annotated in “starch catabolic process”, “sugar mediated signaling pathway” and “response to monosaccharide stimulus” in biological processes were induced by T and GT treatments, without however strong increases of related reads, thus suggesting an increase in the diversity of corresponding expressed genes (Figure 5A). While T slightly increased the proportion of unigenes related to “pentose-phosphate shunt”, GT condition reduced the number of unigenes and reads involved (Figure 5A). The pentose-phosphate pathway involves oxidation of Glc-6-P and production of NADPH and pentoses. Effects of chemical treatments on the “pentose-phosphate shunt” category were reflected in the responses of related categories such as “NADPH regeneration”, “NADP metabolic process”, “nicotinamide nucleotide metabolic process”, “pyridine nucleotide metabolic process”, “oxidoreduction coenzyme metabolic process”, “coenzyme metabolic process” and “cofactor metabolic process” (Figure 5A). The pentose phosphate pathway is important for the conversion of hexoses to pentoses and for the synthesis of aromatic amino acids. It is also a major source of reducing equivalents, not only for biosynthesis reactions, but also for antioxidant and detoxification defenses, thus pointing out to the potential importance of the pentose-phosphate pathway in the responses of *Lolium* to

xenobiotic stress. A number of transport activities were found to be potentially induced by xenobiotics, particularly by T. This was the case for the “organophosphate ester transmembrane transporter” and “carboxylic acid transmembrane transporter activity” categories (Figure 5B). There was also an increase in the unigenes proportion of “cytoplasmic membrane-bound vesicle” category in response to all xenobiotic treatments (Figure 5C), thus suggesting potential mechanisms of defense allowing plants to manage toxic compounds through transport and vesicle sequestering (Figure 5C). Finally, all the chemical treatments decreased the unigene proportion of molecular function category “delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase activity” (Figure 5B), which corresponds to the synthesis of glutamic-gamma-semialdehyde from glutamate in the proline biosynthesis pathway. The reduction of “delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase” category could be related to the decrease of proline levels in shoots and roots of plants subjected to GT and G (Figure 1).

### ***Effects on growth and development processes***

All of the chemical treatments, and more particularly T and G, increased the number of unigenes annotated in the “adenosylmethionine decarboxylase activity” molecular function category, and involved in spermidine and spermine biosynthesis from putrescine, thus showing interactions with growth and stress regulations. In contrast, the “polyamine oxidase activity” category, which catalyzes the oxidative degradation of polyamines, showed decreased number of reads in response to T, G and GT (data not shown). These results therefore suggested a potential increase in polyamine (spermine and spermidine) levels, that could be associated with strong inductions of the “spermine biosynthetic process” biological process category (Figure 5A), and with the decrease of putrescine levels in shoots from xenobiotic-treated plants (Figure 1). At a higher level of organization, chemical treatments by T and GT enhanced the number of unigenes correlated to developmental processes, as “seed maturation”, “primary shoot apical meristem specification” and more generally “regulation of cell differentiation”, while G treatment had opposite effects. These variations of unigenes proportion were linked to similar variations in reads number (data not shown). In contrast, the presence of G induced a decrease of unigenes proportions linked to “leaf development” and “organ morphogenesis”.

### **Effects of short-term root-level exposure to subtoxic levels of chemical stressors on differential gene expression in *Lolium perenne* leaves**

Using a  $p\text{-value} < 0.05$ , DESeq analysis showed that only 69 unigenes were significantly differentially expressed in at least one of the four conditions (Table 3). In order to validate

**Table 3:** Significantly differentially expressed transcripts (DESeq analysis) and associated GO terms. (C: control, G: glyphosate, T: tebuconazole, G+T: glyphosate + tebuconazole). The  $\log_2$  [fold change] values could not be calculated when no expression was detected for a given transcript. Such cases were indicated by "Induced" when no expression was detected in the control, "Repressed" when no expression was detected in the treatment conditions. "NDE" indicated cases for which transcripts were non-differentially expressed.

UnigeneID	Description (TAIR)	Associated GO term		DESeq analysis ( $\log_2$ Fold Change)			
				T/C	G/C	G/T	G/T
comp7278_c0_seq1	magnesium-chelatase subunit chlH	chlorophyll biosynthetic process	Biological Process	Repressed	Repressed	0.3037	0.3037
comp7493_c0_seq1	protein Fluorescent in Blue Light (FLU)	chlorophyll biosynthetic process	Biological Process	-2.4557	Repressed	-1.1239	-1.1239
comp7590_c0_seq3	plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)	chlorophyll biosynthetic process	Biological Process	Induced	Induced	Induced	Induced
comp7590_c0_seq4	plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)	chlorophyll biosynthetic process	Biological Process	Repressed	Repressed	-1.1239	-1.1239
comp7427_c0_seq4	light harvesting complex PSI	photosynthesis, light harvesting	Biological Process	Repressed	Repressed	-1.1494	-1.1494
comp7634_c0_seq2	PSI, PsaA/PsaB protein	photosynthesis, light harvesting in PSI	Biological Process	0.9386	Repressed	0.0688	0.0688
comp7693_c0_seq11	PSII reaction center protein D	photosynthesis, light harvesting in PSII	Biological Process	3.1293	4.8745	Repressed	Repressed
comp7726_c0_seq27	PSII reaction center protein B	PSII assembly	Biological Process	-1.3626	Repressed	-2.8788	-2.8788
comp7726_c0_seq5	PSII reaction center protein B	PSII assembly	Biological Process	-1.7036	1.1671	Repressed	Repressed
comp7726_c0_seq1	PSII reaction center protein B	PSII assembly	Biological Process	-0.4337	Repressed	-0.6544	-0.6544
comp6560_c0_seq1	PSII P subunit	photosynthetic electron transport in PSI	Biological Process	1.2224	Repressed	-1.3718	-1.3718
comp6663_c0_seq5	isoleucyl-tRNA synthetase-like protein	thylakoid membrane organization	Biological Process	Repressed	Repressed	1.7062	1.7062
comp7674_c0_seq3	phosphoenolpyruvate carboxylase	carbon fixation	Biological Process	Induced	NDE	NDE	NDE
comp6943_c0_seq1	uncharacterized protein	pentose-phosphate shunt	Biological Process	-0.3803	Repressed	-0.3660	-0.3660
comp6984_c0_seq1	rubredoxin family protein	pentose-phosphate shunt	Biological Process	Induced	NDE	Induced	Induced
comp6746_c0_seq2	actin 7	glucose catabolic process	Biological Process	Repressed	2.5865	3.3786	3.3786
comp7483_c1_seq2	Phosphoglycerate kinase family protein	glycolysis	Biological Process	-0.7232	Repressed	-2.2394	-2.2394
comp7355_c0_seq2	CIPK9, SNRK3.12, CBL-interacting protein kinase	potassium ion homeostasis	Biological Process	1.0969	Repressed	1.7936	1.7936
comp7489_c0_seq2	calcium sensing receptor	positive regulation of catalytic activity	Biological Process	Repressed	2.4150	0.6537	0.6537
comp7362_c0_seq6	aldehyde dehydrogenase 3F1	calcium-mediated signaling	Biological Process	-2.3786	2.7370	0.2911	0.2911
comp7713_c0_seq4	Protein kinase superfamily protein	protein amino acid phosphorylation	Biological Process	Induced	NDE	Induced	Induced
comp7705_c0_seq3	phototropin serine-threonine kinase	phosphorelay signal transduction system	Biological Process	Repressed	Repressed	0.6448	0.6448
comp7527_c0_seq1	Protein phosphatase 2C family protein	protein dephosphorylation	Biological Process	2.7370	Repressed	-0.5162	-0.5162
comp7476_c0_seq2	ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase 1 (FNR)	MAPK cascade	Biological Process	-1.0995	Repressed	0.6697	0.6697
comp7633_c0_seq4	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	MAPK cascade	Biological Process	Induced	NDE	Induced	Induced
comp7402_c0_seq2	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit delta	MAPK cascade	Biological Process	Repressed	4.2645	1.8627	1.8627
comp7682_c1_seq3	H(+)ATPase 2	ATP hydrolysis coupled proton transport	Biological Process	Repressed	-1.3219	0.1916	0.1916
comp7721_c0_seq19	ATP synthase subunit alpha	ATP synthesis coupled proton transport	Biological Process	Induced	NDE	Induced	Induced
comp7721_c0_seq17	ATP synthase subunit alpha	ATP synthesis coupled proton transport	Biological Process	Repressed	1.4150	-1.2938	-1.2938
comp7700_c0_seq2	ABC transporter F family	transporter activity	Biological Process	-0.2137	Repressed	0.0155	0.0155
comp7571_c0_seq5	Major facilitator superfamily protein	transporter activity	Biological Process	0.9594	Repressed	0.5642	0.5642
comp7726_c0_seq35	RNA polymerase subunit alpha	DNA-dependent transcription	Biological Process	Induced	NDE	NDE	NDE
comp7697_c0_seq14	Homeodomain-like superfamily protein	negative regulation of sequence-specific DNA binding TF activity	Biological Process	-0.0291	Repressed	0.2323	0.2323
comp7697_c0_seq11	Homeodomain-like superfamily protein	negative regulation of sequence-specific DNA binding TF activity	Biological Process	0.2224	Repressed	Repressed	Repressed

gene expression profiling data obtained from RNA-Seq, qRT-PCR analysis was used to quantify the relative expression of selected genes (Figure 6). The choice of genes was based on different criteria. A first list included unigenes related to molecular functions or biological processes which were found to be significantly enriched or unigenes that were themselves differentially expressed. Genes involved in functions which were related to xenobiotic-regulated metabolic modifications (Figure 1) were also taken into account.

Most of the observed differential expressions validated the analysis of GO term category variations under conditions of xenobiotic treatment (Table 3). Among the differentially expressed (DE) unigenes, a high proportion of xenobiotic-repressed genes were associated to photosynthesis or chlorophyll biosynthetic processes. In particular, the transcripts of genes related to the tetrapyrrole pathway, such as those encoding Magnesium-chelatase subunit chlH and Fluorescent In Blue Light (FLU), which are both known to be involved in negative effects on tetrapyrrole biosynthesis (Apitz et al., 2014; Kauss et al., 2012), were decreased by xenobiotics (Table 3). This decrease was confirmed by qRT-PCR, when glyphosate or tebuconazole were applied alone (Figure 6). Similar expression profiles were observed for all photosynthesis- and chlorophyll-related unigenes, except for one isoform encoding plastid transcriptionally active 16 (*PTAC16*) that was induced by all conditions (Table 3). *PTAC16* has been suggested to be a candidate protein interacting with Cold Shock domain protein 3 (*AtCSP3*) involved in freezing tolerance in Arabidopsis (Kim et al., 2013). Induction of expression was also detected by DESeq for the transcript annotated “photosystem II reaction center protein D” under G and T treatments. This was also the case for some genes related to photosystems, which exhibited significant induction under either G or T treatments.

The DESeq analysis revealed a high proportion of genes that are involved in signaling, and more particularly, in signal transduction through protein-kinases and protein-phosphatases (Table 3). This was the case for CIPK9, which is a Calcineurin B-Like Protein (CBL)-interacting protein kinase. This Serine/Threonine protein kinase, also known as SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.12 (SNRK3.12), is involved in plant responses to abiotic stresses and in the regulation of potassium homeostasis through interactions with Calcium Sensor Calcineurin B-Like Protein3 (Liu et al., 2013). A CIPK9-related unigene as well as a calcium sensing receptor-related transcript in *Lolium* were found to be differentially expressed (Table 3). However, while DESeq showed a repression of *CIPK9* by G and an induction by T and GT, and a repression by G and an induction by T for the unigene related to calcium sensing receptor (Table 3), qRT-PCR analysis gave different results with T and G repressing *CIPK9*, whereas they did not significantly affect the expression of the transcript



Table 3 continued

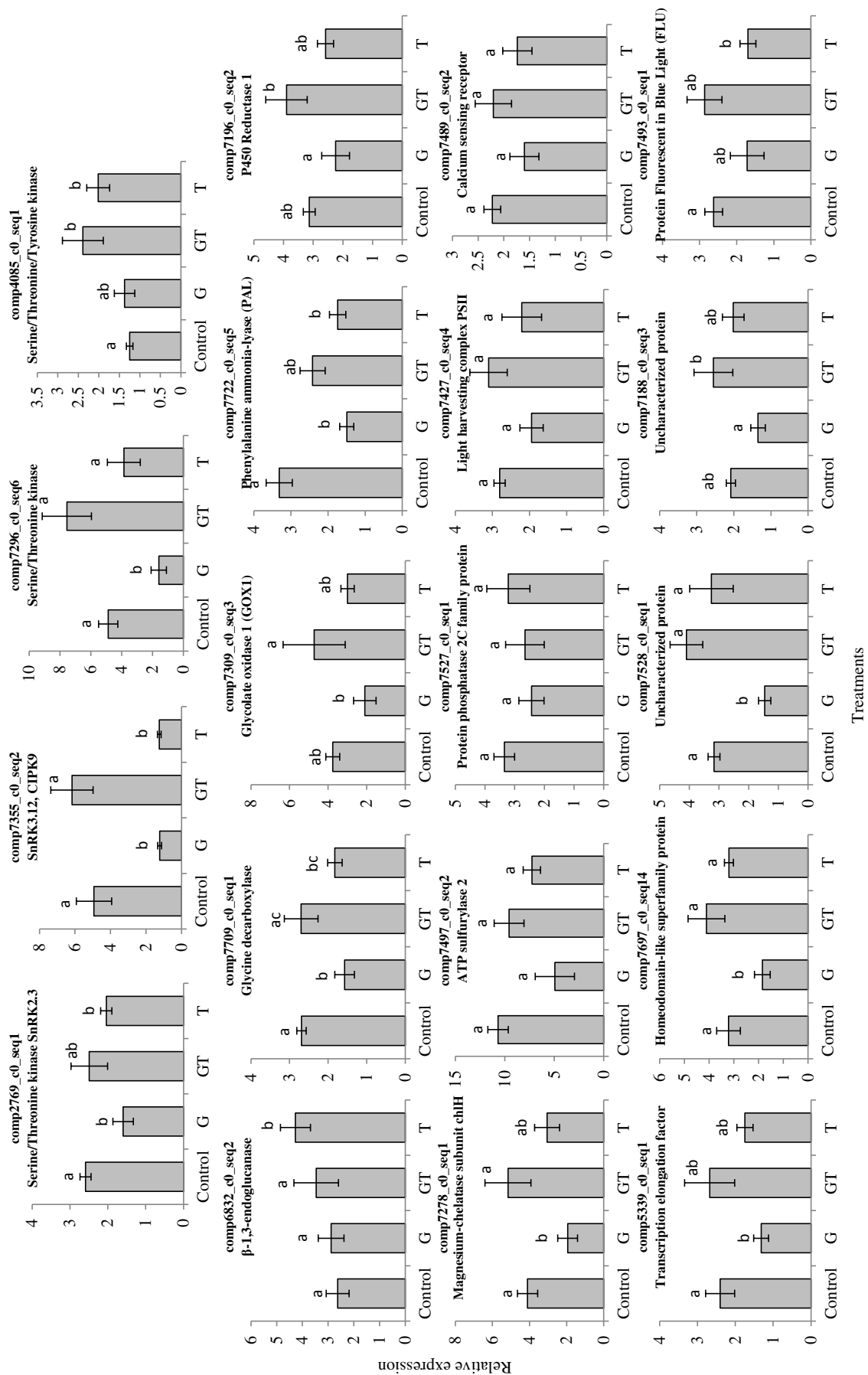
UnigeneID	Description (TAIR)	Associated GO term		DESeq analysis (log <sub>2</sub> Fold Change)			
				Biological Process	Molecular Function	T/C	G/C
comp7688_c0_seq2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	mRNA modification	unknown			Repressed	0.0227
comp7592_c0_seq2	translation initiation factor IF	transcription from plastid promoter				-0.7776	Repressed
comp6892_c0_seq2	gametogenesis related family protein	translation				0.8241	2.3142
comp7302_c0_seq1	uncharacterized protein	translation				0.7403	1.8156
comp7589_c0_seq4	chloroplast stem-loop binding protein	positive regulation of translation				3.3923	4.2645
comp7452_c0_seq3	indoleacetic acid-induced protein	cytokinin mediated signaling pathway				Induced	NDE
comp7604_c0_seq2	tubulin alpha-5	GTP catabolic process				-2.0995	Repressed
comp7501_c0_seq5	DNA photolyase	DNA repair				-0.3137	Repressed
comp7711_c0_seq1	presequence protease 1	hydrogen peroxide catabolic process				-1.3965	Repressed
comp7711_c0_seq5	presequence protease 1	hydrogen peroxide catabolic process				NDE	Induced
comp7711_c0_seq3	presequence protease 1	hydrogen peroxide catabolic process				Induced	NDE
comp7458_c0_seq2	Peroxidase superfamily protein	response to oxidative stress				Induced	NDE
comp7458_c0_seq1	Peroxidase superfamily protein	response to oxidative stress				Repressed	-0.2854
comp7628_c1_seq8	senescence-associated protein	cellular response to oxidative stress				-0.5552	1.4150
comp7309_c0_seq3	glycolate oxidase 1 (GOX1)	hydrogen peroxide biosynthetic process				2.4100	Repressed
comp7324_c0_seq3	phenylalanine ammonia-lyase	cellular modified AA biosynthetic process				Repressed	0.3370
comp7722_c0_seq7	phenylalanine ammonia-lyase	cellular modified amino acid biosynthetic process				Repressed	1.6781
comp7722_c0_seq5	phenylalanine ammonia-lyase	cellular modified AA biosynthetic process				-0.7105	-2.9773
comp7722_c0_seq3	phenylalanine ammonia-lyase	cellular modified AA biosynthetic process				NDE	NDE
comp6929_c0_seq4	O-methyltransferase	cellular modified AA biosynthetic process				Repressed	0.0931
comp7591_c1_seq3	ACC oxidase 5 (ACO5)	brassinosteroid biosynthetic process				Induced	Induced
comp7591_c1_seq4	ACC oxidase 5 (ACO5)	brassinosteroid biosynthetic process				Repressed	-0.7004
comp6832_c0_seq2	beta-1,3-endoglucanase	defense response to fungus, incompatible interaction				2.4854	Repressed
comp7382_c0_seq3	glutamate synthase 1 [NADH]	ammonia assimilation cycle				0.7529	Repressed
comp7386_c0_seq10	polyamine oxidase	polyamine catabolic process				Induced	NDE
comp7536_c0_seq5	sulfite reductase	cysteine biosynthetic process				Induced	NDE
comp7497_c0_seq1	ATP sulfurylase 2	sulfate assimilation				Repressed	1.8301
comp7497_c0_seq2	ATP sulfurylase 2	sulfate assimilation				0.2224	Repressed
comp6892_c0_seq1	uncharacterized protein	peptide biosynthetic process				0.8499	2.1483
comp7454_c0_seq1	uncharacterized protein	unknown				-0.9151	1.1255
comp7706_c0_seq8	dentin sialophosphoprotein-related	unknown				Repressed	0.6988
comp7528_c0_seq1	uncharacterized protein	unknown				2.1699	1.6077
comp7706_c0_seq6	dentin sialophosphoprotein-related	unknown				Induced	Induced
comp7188_c0_seq3	unknown protein	unknown				Induced	Induced
comp6657_c0_seq2	Pentapeptide repeat-containing protein	unknown				Induced	Induced



encoding the calcium sensing receptor (Figure 6).

Transcripts related to protein phosphorylation and dephosphorylation, which are important regulatory mechanisms of abiotic stress responses, were highly represented in the different datasets. The effects of xenobiotic stresses on several Serine/Threonine protein kinases, including a unigene (comp2769\_c0\_seq1) putatively encoding a SNRK [sucrose non-fermenting (SNF)-related kinase family of serine/threonine kinase] protein (Kertesz et al., 2002), were therefore analyzed by qRT-PCR (Figure 6). Except for one putative protein kinase encoded by comp4085\_c0\_seq1, glyphosate or tebuconazole alone repressed gene expression relatively to the effects of the GT mixture. According to the DESeq analysis, activities of phosphorylation linked to signal transduction were also related to the differential expression of genes related to MAPK cascade and to ATP synthesis or hydrolysis (Table 3). Different types of expression profile were found, such as the high upregulation of F-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit delta encoding gene by G, the specific repression of the unigene related to H<sup>+</sup>-ATPase 2 by G or T, or the induction by T or GT of one of the isoforms encoding an ATP synthase subunit alpha (Table 3). The expression of unigenes associated to the regulation of translation or transcription also differed depending on the chemical stressor, thus suggesting some specific responses. As found by DESeq and qRT-PCR analyses, glyphosate repressed the expression of genes associated to Homeodomain-like superfamily proteins and involved in the regulation of transcription (Table 3, Figure 6). Another transcription factor encoded by comp5339\_c0\_seq1 presented an equivalent expression profile (Figure 6). On the contrary, the expression of 3 unigenes, whose function was linked to translation (comp6892\_c0\_seq2, comp7302\_c0\_seq1 and comp7589\_c0\_seq4), was significantly upregulated by glyphosate and GT (Table 3). Xenobiotics at subtoxic levels also modified the expression of genes allowing plants to overcome oxidative stress damages. Most of the unigenes linked to the responses to oxidative stress and involved in metalloendopeptidase or peroxidase activities were induced by chemical stresses (Table 3). Glycolate oxidase (GOX1) can modulate reactive oxygen species-mediated signal transduction through its activity of oxidation on glycolate, leading to the production of glyoxylate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during photorespiration (Fahnenstich et al., 2008). Glycolate production is also dependent on Rubisco activity which produces glycolate 2-phosphate. Our results showed that *GOX1* was differentially repressed in the presence of glyphosate (Table 3, Figure 6), as was the case for the enriched GO term “Rubisco activity” category (Figure 5). Cytochrome P450 reductase proteins, such as ATR1, which transfer electrons from NADPH to cytochrome P450 oxidases and are involved in phenylpropanoid metabolic processes

Figure 6



(Sundin et al., 2014), tended to be repressed by glyphosate or tebuconazole alone, whereas the GT mixture had opposite effects (Figure 6). This was connected to the differential expression of genes encoding Phenylalanine ammonia-lyases (PAL). PALs catalyze the first step of the phenylpropanoid pathway and are known to have overlapping roles in plant growth, development, and responses to environmental stresses (Huang et al., 2010). The qRT-PCR analysis of one of these unigenes demonstrated the repressive effect of xenobiotics on its expression (Figure 6). A gene homologous to a gene encoding an O-methyltransferase, also involved in the phenylpropanoid pathway, was repressed by T and GT (Table 3). ACC oxidases involved in ethylene synthesis (Jafari et al., 2013) were characterized in the shoot transcriptome of *Lolium* by two isoforms that were differentially regulated, with one being induced, while the other was repressed, by chemical stresses (Table 3). In parallel, a putative  $\beta$ -1,3-endoglucanase was induced by T and GT, as confirmed by qRT-PCR trends for T treatment (Table 3, Figure 6). This gene encoding a glycosyl hydrolase family 17 protein/ $\beta$ -1,3-glucanase class I precursor is induced by ethylene (Zhong and Burns, 2003) and ACC treatments (Soeno et al., 2010).

The effects of chemical stresses on metabolic processes (Figure 1) were reflected at the molecular level through the induction or repression of transcripts linked to several biosynthetic processes. The expression decrease of a glutamate synthase transcript (Table 3) was reminiscent of decrease of glutamate levels in *Lolium* leaves in response to G and GT (Figure 1). The induction by T and GT of the unigene encoding a polyamine oxidase (Table 3) was in line with the decrease in putrescine levels in *Lolium* leaves in response to xenobiotic treatments and the significant decrease of related GO term categories (Figures 1 and 4). The effects of glyphosate or tebuconazole alone on the decrease of glycine levels (Figure 1) could be compared to the effects on a transcript encoding a glycine decarboxylase, which was found to be repressed by G or T alone (Figure 6). The sulfur assimilation pathway, which leads to cysteine biosynthesis and *in fine* to glutathione (GSH) biosynthesis, involves, *inter alia*, ATP sulfurylase and sulfite reductase (Davidian and Kopriva, 2010). In *Lolium*, one of the 2 isoforms encoding an ATP sulfurylase showed a repression by T and an induction by G, while the other was repressed by G and GT (Table 3). The qRT-PCR analysis showed also that G tended to repress this last isoform (Figure 6). In contrast, T and GT had a positive impact on the transcription of sulfite reductase gene (Table 3). Although the transcription of genes linked to sulfate assimilation are induced by heavy metal exposure, oxidative stress and sulfur or nitrogen deficiency (Davidian and Kopriva, 2010), Koprivova et al. (2008) showed that the regulation of that pathway cannot be wholly ascribed to transcriptional impacts, but

rather to a complex signaling network with post-transcriptional regulations and multiple signaling pathways including phytohormones as gibberellins. Finally, differential expression analysis revealed several uncharacterized transcripts whose expression, for most of them, was induced in the presence of glyphosate and with contrasting effects of the other treatments (Table 3). The induction of expression of *comp7188\_c0\_seq3* by GT was validated by qRT-PCR (Figure 6).

## **Discussion**

The transfer experiment of short-term exposure to low levels of xenobiotics was therefore sufficient to induce small, but significant, metabolic and physiological changes in *L. perenne*, thus suggesting the establishment of fine mechanisms that allow *Lolium* plants to avoid detrimental processes in the long term. These effects under conditions of short exposure thus provided an opportunity to identify early molecular mechanisms that were triggered by low doses of xenobiotics. The *de novo* RNA-Seq approach proved to be very useful to explore the relationships between metabolic changes, stress adjustments, regulation of metabolism genes and signaling pathways under these conditions of xenobiotic stress. Low-level xenobiotic exposure has previously been shown to have major metabolic effects in a context of moderate physiological effects (Serra et al., 2013, 2015). The strong impact of the various xenobiotic treatments on proportions of transcript functional categories and on gene expression thus demonstrated that low-level xenobiotic exposure strongly interacted with molecular regulations of gene expression. Differential effects of the different xenobiotic treatments showed that there were some specificities at the molecular level in the potential mechanisms of xenobiotic action and of plant responses to xenobiotics. In particular, the mixture of G and T led to specific molecular responses that differed from the mere additivity of single xenobiotic effects. However, this global analysis also revealed the involvement of common molecular mechanisms such as processes related to ribosome biogenesis and functioning, signal transduction, polyamine synthesis, chlorophyll synthesis, ATP dynamics and carbohydrate metabolism.

The major genes that were found to be differentially expressed under xenobiotic did not belong to classical abiotic stress response pathways, thus suggesting the establishment of specific molecular mechanisms leading to the xenobiotic-induced metabolic rearrangements. Most of the 69 genes underlined by the DESeq analysis, which allowed to select, without *a priori*, only differentially expressed transcripts, were surprisingly closely interconnected. As shown by soluble sugar variations and variations of corresponding GO term categories,

pathways belonging to carbohydrate metabolism, in association with photosynthesis processes, played a central role in response to xenobiotic stresses. In parallel, most of these identified genes were related to phytohormonal regulation pathways and their corresponding signal transduction mechanisms. Most of the differentially-expressed genes identified in the present study are linked to signal transduction pathways, thus underlining the complexity of homeostatic mechanisms and crosstalks between metabolite, carbohydrate, phytohormone, plastid-to-nucleus and light signaling. The present results thus confirmed the complexity of crosstalk between sugar signaling, the signaling pathways associated with phytohormones and calcium (Rolland et al., 2006; Kudla et al., 2010; Biswal et al., 2011) and the molecular responses to organic xenobiotics (León and Sheen, 2003).

Globally, a repressive effect of glyphosate or tebuconazole alone on gene expression was observed, while the GT mixture did not have such large effects on gene expression. It was particularly the case for the Fluorescent In Blue Light (FLU) and Magnesium-chelatase subunit ChlH genes. FLU and more particularly ChlH are involved in one of the multiple signaling pathways which mediate plastid signals controlling expression of Photosynthesis-Associated Nuclear Genes (PhANG) (Mochizuki et al., 2008; Moulin et al., 2008; Zhang et al., 2013). During chlorophyll and carotenoid biosynthesis processes, ChlH subunit catalyzes the conversion of Protoporphyrin to Mg-Protoporphyrin IX (Mg-Proto IX). The transient accumulation of Mg-Proto IX is thought to be involved in plastid signaling leading to the repression of PhANGs (Zhang et al., 2011a; Zhang et al., 2013). Besides the fact that a role of putative receptor for abscisic acid (ABA) has been proposed and then questioned for ChlH in *A. thaliana* (Shen et al., 2006; Wu et al., 2009; Müller and Hansson, 2009), tetrapyrrole gene expression and ABA signaling are interdependent in chloroplast-to-nucleus signaling pathways (Voigt et al., 2010). Zhang et al. (2011b) showed that the resistance to a high-light and herbicide concomitant stress was correlated to a doubling of cellular total RNA, which requires the activity of ABI4, an *Apetala 2* (AP2)-type transcription factor. They also demonstrated that herbicide treatments and environmental stresses that lead to ABA and ROS accumulation induce the downregulation of transcription factors (TF) by the master TF ABI4 (Zhang et al., 2013). Moreover, ABI4 is known to be involved in the coordination of several pathways such as sugar, redox and hormonal [ABA, jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA)] signaling during stress response (Foyer et al., 2012).

The increase of phenylalanine levels in roots and leaves in response to GT and T treatments was correlated to the repression of genes related to PAL activity which enables the biosynthesis of phenylpropanoids from phenylalanine. When added at high and toxic levels,

the herbicides paraquat and glyphosate induce PAL activity in *Rehmannia glutinosa* and *Glycine max* (L.), respectively, thus suggesting the involvement of PAL in the regulation of the phenylpropanoid pathway in response to oxidative stress produced by lethal herbicide levels (Lee et al., 2003; Duke et al., 1980). Nevertheless, different isoforms of PAL have been found in *Arabidopsis* and two of them, PAL1 and PAL2, have important roles in flavonoid biosynthesis, the existence of different isoforms suggesting differential roles in the different branches of the phenylpropanoid pathway (Huang et al., 2010). It has thus been suggested that PAL was involved in the biosynthesis of salicylic acid (SA) (Chen et al., 2009). Furthermore, phenylalanine ammonia lyase (PAL), ACC synthase, which catalyzes the synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in the pathway of ethylene production, and auxin biosynthesis are inhibited by a common exogenous compound, L-aminooxyphenylpropionic acid (Soeno et al., 2010; Duke et al., 1980), thus demonstrating tight overlapping between signaling, responses to organic xenobiotics and hormone metabolism or signaling. Involvement of phytohormone signaling pathways in xenobiotic responses has been reported in a number of previous studies. Triazoles, such as tebuconazole, have been shown to be inhibitors of brassinosteroid synthesis and ABA catabolism (Saito et al., 2006; Kaschani and van der Hoorn, 2007), of the plant sterol pathway in *Sorghum* (Lamb et al., 2001) and of gibberellin accumulation in rapeseed (Child et al., 1993). Promoter-level induction by glyphosate and hormones has been described in rice for a Glutathione S-transferase involved in xenobiotic detoxification (Hu et al., 2011) and xenobiotic regulation of hormone-related genes has been found in *Arabidopsis thaliana* subjected to diverse pesticides and pesticide metabolites (Serra et al., 2013). Moreover, involvement of phytohormones in xenobiotic responses was confirmed by studies coupling hormone-signaling mutants and xenobiotic-induced stress (Sulmon et al., 2007; Weisman et al., 2010).

Although photosynthesis efficiency is related to global sensing of environmental stresses in plants (Biswall et al., 2011), the present modalities of xenobiotic stress did not affect photosynthetic parameters (Serra et al., 2015). Nevertheless, genes related to components of photosynthetic reaction centers presented patterns of expression that were largely influenced by xenobiotics. The gene encoding photosystem II reaction center protein D presented the highest observed induction by G and T and a repression by GT. Some xenobiotics, such as atrazine, act through binding to the D1 protein of photosystem II (PSII) reaction center, thus blocking electron transfer to the plastoquinone pool (Rutherford and Krieger-Liskay, 2001; Sulmon et al., 2004), but this is not the case for glyphosate nor for tebuconazole. Moreover, the differential regulation of genes related to photosynthesis in the presence of sublethal

concentrations of xenobiotics was specific of the xenobiotic involved (Table 3). It thus seemed that perception of xenobiotic stress led to cellular energy imbalance. Some of the metabolic changes induced by xenobiotics, especially lactate accumulation (Figure 1), also suggested a situation of energy imbalance. However, this xenobiotic-induced imbalance seemed to be corrected through complex regulations of metabolisms, notably through redox homeostasis and hexose-phosphate and carbohydrate balance (Serra et al., 2015). Recently, Qian et al. (2014) demonstrated that a *pgr5* mutant of Arabidopsis, which is defective in the Proton Gradient Regulation 5 pathway, involved in electron flow in Photosystem I, was oversensitive to sublethal levels of atrazine and methyl viologen, when compared to the wild type.

Stress-induced energy deficit can lead to the activation of genes involved in catabolism (AA catabolism, sugar degradation, lipid mobilization) and repression of genes involved in protein synthesis (Valluru and Van den Ende, 2011; Serra et al., 2013). The induction of a beta-1,3-endoglucanase gene in the presence of T and GT could thus correspond to breakdown of cell-wall polysaccharides to sugars. Similarly, the differential expression of genes linked to the pentose phosphate shunt could affect carbohydrate levels (Table 3) and thus provide alternative sources of energy under sugar-limiting conditions. Sugar limitation and energy deprivation induced by abiotic stresses are known to be signaled and regulated by sensor SnRK1 [SNF1 [sucrose non-fermenting 1]-related kinase 1] protein kinases in plants (Baena-González and Sheen, 2008; Dietrich et al., 2011). SnRK1 is thus involved in response to a range of stresses that limit photosynthesis and respiration, including to the PSII-inhibiting herbicide, DCMU (Baena-González et al., 2007). Sugars, and more particularly Glc-6-P produced by hexokinase (HXK) and Tre-6-P, can block SnRK1 response (Baena-González and Sheen, 2008; Ramon et al., 2008; Nunes et al., 2013; Valluru and Van den Ende, 2011). In *Lolium*, individual xenobiotic molecules were found to induce similar variations trends for Glc-6-P, and its highly correlated co-metabolite, Fru-6-P (Serra et al., 2015), and also for several serine/threonine kinase genes, including those related to SnRK2 and SnRK3. In Arabidopsis, 38 members of the Sucrose non-fermenting-1 (SNF1)-related protein kinase (SnRKs) family have been described, and are associated with diverse metabolic regulations and stress responses. The transcription factors ABA-response-element-binding proteins (AREBPs) have been shown to be substrates for all SnRKs subfamilies (Coello et al., 2012). The different SnRK subfamilies, SnRK1, SnRK2 and SnRK3, have respectively 2, 10 and 25 representatives (Halford and Hey, 2009). The analysis of the shoot reference transcriptome in *Lolium* identified 146 unigenes with high homologies (e-value<10<sup>-6</sup>) with these SnRK



subfamilies. ABA regulates the activity of SnRK2 and SnRK3 subfamilies which are part of signaling pathways involved in responses to abiotic stresses such as nutrient limitation, drought, cold, salt, and osmotic stresses (Coello et al., 2011). Protein Phosphatase 2Cs (PP2Cs) are major negative regulators of ABA signaling, while SnRK2s are major positive regulators (Danquah et al., 2014). The involvement of SnRK2 genes in the stress signaling pathway has been demonstrated in the response to abiotic stresses (Bello et al., 2014; Umezawa et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Zhang et al., 2010). As shown by differential expression through transcriptome analysis and qRT-PCR results, a transcript related to SnRK3.12 was repressed by G treatment, which, in contrast, induced the expression of a calcium sensing receptor and an aldehyde dehydrogenase involved in calcium-mediated signaling and stress-regulated detoxification pathway in young plants (Stiti et al., 2011). SnRK3s interact with calcineurin B-like (CBL) calcium-binding proteins, hence their description as CBL-interacting kinases (CIPKs) (Coello et al., 2011). These CIPKs carry out a crosstalk between  $\text{Ca}^{2+}$  and ABA signaling in the responses to abiotic stresses. However, although SnRKs proteins are a family of protein kinases found in many plants, their regulation can diverge according to species. Thus, in wheat, Coello et al. (2012) have shown that a SnRK2 was activated by  $\text{Ca}^{2+}$ .

The eukaryotic homolog kinase of SnRK, the AMP-activated kinase (AMPK) energy sensor, has been described to be involved in response to stress when the environmental constraint decreases ATP levels (Blättler et al., 2007; Hardie et al., 2012). Thus, AMPK-dependent responses to xenobiotic stress are triggered by the activation of an upstream regulatory protein kinase by mitochondrially-generated reactive oxygen species (Blättler et al., 2007). In *Lolium*, several genes encoding F-type  $\text{H}^+$ -transporting ATPase,  $\text{H}^+$ -ATPase and ATP synthase were found to be differentially expressed in the presence of xenobiotics. Moreover, repression of a gene involved in ATP hydrolysis and induction of ATP synthesis genes suggested a cellular mobilization for energy restoration in response to xenobiotic stress (Table 3).

The present results are therefore in line with the involvement of differentially-expressed genes linked to SnRKs and other protein kinases in response to low-intensity chemical stresses in *Lolium*. More generally, our results show that responses to xenobiotic stresses require signal transduction mechanisms involving protein-kinases and protein-phosphatases (Sulmon et al., 2007; Fukudome et al., 2014). Interestingly, herbicide resistance in the agricultural weed *Ipomoea purpurea* has been associated with the differential expression of genes involved in such cellular signaling, with high glyphosate treatment inducing a serine/threonine-protein

kinase AtPK7-like and repressing genes encoding receptor-like kinases (Leslie and Baucom, 2014). Thus, it is tempting to postulate that, according to species, protein kinases from the different SnRK subfamilies could be differentially regulated whilst keeping their role of key metabolic regulators. Those functions of regulation of carbon metabolism and homeostasis, through the modulation of enzyme activity by direct phosphorylation or redox activation of metabolic enzymes, and through the regulation of gene expression, may follow different evolutionary dynamics.

### **Supplementary data**

Supplemental Table 1:

Selected candidate genes and corresponding primer sequences for qRT-PCR analysis

### **Acknowledgments**

We are grateful to Dr Erwan Corre from the CNRS-UPMC ABIMS bioinformatics platform (Station biologique de Roscoff, France) for providing help and support with bioinformatics analysis, the ABGC technical core facility (UMR CNRS 6553, University of Rennes 1, France) for biochemical analyses and the Biogenouest Environmental and Functional Genomics Platform core facility (UMS CNRS 3343, Observatoire des Sciences de l'Univers de Rennes, France) for transcriptome sequencing. We also wish to thank Jean-Luc Foulon (UMR CNRS 6553, University of Rennes 1, France) for help with plant culture systems and Sandra Rigaud (UMR CNRS 6553, University of Rennes 1, France) for administrative and accounting work. This work was supported by the interdisciplinary program 'Ingénierie écologique' from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and by the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, France). AAS is supported by a doctoral scholarship from the Brittany regional council (France).

### **Conflict of Interest Statement**

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

## References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Anders, S., McCarthy, D.J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G.K., Huber, W., *et al.* (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.* 8, 1765-1786. doi: 10.1038/nprot.2013.099
- Apitz, J., Schmied, J., Lehmann, M.J., Hedtke, B. and Grimm, B. (2014). GluTR2 complements a *hemal* mutant lacking glutamyl-tRNA reductase 1, but is differently regulated at the post-translational level. *Plant Cell Physiol.* 55, 645-657. doi: 10.1093/pcp/pcu016.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.-C. and García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123, 247-260. doi:10.1016/j.agee.2007.07.011
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M. and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448, 938-943. doi: 10.1038/nature06069
- Baena-González, E., and Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 13, 474-82. doi: 10.1016/j.tplants.2008.06.006.
- Barbehenn, R.V., Karowe, D.N., and Spickard, A. (2004). Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on the nutritional ecology of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grass-feeding caterpillars. *Oecologia* 140, 86-95. doi 10.1007/s00442-004-1572-9
- Bello, B., Zhang, X., Liu, C., Yang, Z., Yang, Z., Wang, Q., *et al.* (2014). Cloning of *Gossypium hirsutum* Sucrose Non-Fermenting 1-Related Protein Kinase 2 gene (*GhSnRK2*) and its overexpression in transgenic *arabidopsis* escalates drought and low temperature tolerance. *PLoS One* 9:e112269. doi: 10.1371/journal.pone.0112269
- Biswal, B., Joshi, P.N., Raval, M.K., and Biswal, U.C. (2011). Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signalling and adaptation. *Curr. Sci.* 101, 47-56.
- Blättler, S.M., Rencurel, F., Kaufmann, M.R., and Meyer, U.A. (2007). In the regulation of cytochrome P450 genes, phenobarbital targets LKB1 for necessary activation of AMP-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1045-1050. doi: 10.1073/pnas.0610216104
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav.* 4, 493-496.
- Child, R.D., Evans, D.E., Allen, J., and Arnold, G.M. (1993). Growth responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.) to combined applications of the triazole chemicals triapenthenol and tebuconazole and interactions with gibberellin. *Plant Growth Regul.* 13, 203-212. doi: 10.1007/BF00024263

- Coello, P., Hey, S.J., and Halford, N.G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J. Exp. Bot.* 62, 883-893. doi: 10.1093/jxb/erq331.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S.J., Muttucumaru, N., Martinez-Barajas, E., Parry M.A., *et al.* (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J. Exp. Bot.* 63, 913-924. doi: 10.1093/jxb/err320
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610
- Couée, I., Serra, A.A., Ramel, F., Gouesbet, G., and Sulmon, C. (2013). Physiology and toxicology of hormone-disrupting chemicals in higher plants. *Plant Cell Reports* 32, 933-941. doi: 10.1007/s00299-013-1428-z
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., and Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* 32, 40-52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.006
- Davidian, J.C., and Kopriva, S. (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation-the same or not the same? *Mol. Plant.* 3, 314-325. doi: 10.1093/mp/ssq001
- Dear, B.S., Sandral, G.A., and Wilson, B.C.D. (2006). Tolerance of perennial pasture grass seedlings to pre- and post-emergent grass herbicides. *Aust. J. Exp. Agr.* 46, 637-644. doi: org/10.1071/EA04173
- Diekmann, K., Hodkinson, T.R., Wolfe, K.H., van den Bekerom, R., Dix, P.J., and Barth, S. (2009). Complete chloroplast genome sequence of a major allogamous forage species, Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). *DNA Res.* 16, 165-176. doi: 10.1093/dnares/dsp008
- Dietrich, K., Weltmeier, F., Ehlert, A., Weiste, C., Stahl, M., Harter, K., *et al.* (2011). Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell* 23, 381-395. doi: 10.1105/tpc.110.075390
- Duke, S.O., Hoagland, R.E., and Elmore, C.D. (1980). Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds: V. l-alpha-aminooxy-beta-phenylpropionic acid and glyphosate effects on phenylalanine ammonia-lyase in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 65, 17-21.
- Duke, S.O., and Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64, 319-325. doi: 10.1002/ps.1518
- Fahnenstich, H., Scarpeci, T.E., Valle, E.M., Flügge, U.I., and Maurino, V.G. (2008). Generation of hydrogen peroxide in chloroplasts of Arabidopsis overexpressing glycolate oxidase as an inducible system to study oxidative stress. *Plant Physiol.* 148, 719-729. doi: 10.1104/pp.108.126789
- Farrell, J.D., Byrne, S., Paina, C., and Asp, T. (2014). *De novo* assembly of the perennial ryegrass transcriptome using an RNA-seq strategy. *PLoS One* 9:e103567. doi: 10.1371/journal.pone.0103567

- Fiil, A., Lenk, I., Petersen, K., Jensen, C.S., Nielsen, K.K., Schejbel, B., *et al.* (2011). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium of nine genes with putative effects on flowering time in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Sci.* 180, 228-237. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.08.015
- Foyer, C.H., Kerchev, P.I., and Hancock, R.D. (2012). The ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4) transcription factor links redox, hormone and sugar signaling pathways. *Plant Signal Behav.* 7, 276-281. doi: 10.4161/psb.18770
- Fukudome, A., Aksoy, E., Wu, X., Kumar, K., Jeong, I.S., May, K., *et al.* (2014). Arabidopsis CPL4 is an essential C-terminal domain phosphatase that suppresses xenobiotic stress responses. *Plant J.* 80, 27-39. doi: 10.1111/tpj.12612
- Gilliland, N.J., Chappelka, A.H., Muntifering, R.B., Booker, F.L., and Ditchkoff, S.S. (2012). Digestive utilization of ozone-exposed forage by rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Environ. Pollut.* 163, 281-286. doi: 10.1016/j.envpol.2012.01.003
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J. and The Galaxy Team (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11:R86. doi: 10.1186/gb-2010-11-8-r86
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., *et al.* (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494-512. doi: 10.1038/nprot.2013.084
- Halford, N.G., and Hey, S.J. (2009). SNF1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.* 419, 247-259. doi: 10.1042/BJ20082408
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251-262. doi: 10.1038/nrm3311
- Helander, M., Saloniemi, I., and Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant Sci.* 17, 569-574. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.008
- Hertzberg, R.C., and MacDonell, M.M. (2002). Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci. Total Environ.* 288, 31-42. doi:10.1016/S0048-9697(01)01113-5
- Hu, T., He, S., Yang, G., Zeng, H., Wang, G., Chen, Z., *et al.* (2011). Isolation and characterization of a rice glutathione S-transferase gene promoter regulated by herbicides and hormones. *Plant Cell Rep.* 30, 539-549. doi: 10.1007/s00299-010-0964-z
- Huang, H.H., Xu, L.L., Tong, Z.K., Lin, E.P., Liu, Q.P., Cheng, L.J., *et al.* (2012). *De novo* characterization of the Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) transcriptome and analysis of candidate genes involved in cellulose and lignin biosynthesis. *BMC Genomics* 13:648. doi: 10.1186/1471-2164-13-648
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.H., *et al.* (2010). Functional analysis of the Arabidopsis *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol.* 153, 1526-1538. doi: 10.1104/pp.110.157370

- Islam, M.S., Studer, B., Byrne, S.L., Farrell, J.D., Panitz, F., Bendixen, C., *et al.* (2013). The genome and transcriptome of perennial ryegrass mitochondria. *BMC Genomics*, 14:202. doi: 10.1186/1471-2164-14-202
- Jafari, Z., Haddad, R., Hosseini, R., and Garoosi, G. (2013). Cloning, identification and expression analysis of ACC oxidase gene involved in ethylene production pathway. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1341-1350. doi: 10.1007/s11033-012-2178-7
- Kaschani, F., and van der Hoorn, R. (2007). Small molecule approaches in plants. *Curr. Opinion Chem. Biol.* 11, 88-98. doi:10.1016/j.cbpa.2006.11.038
- Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K., and Meskauskiene, R. (2012). FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the  $Mg^{++}$ -branch of this pathway. *FEBS Lett.* 586, 211-216. doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.029
- Kertesz, N., Samson, J., Debacker, C., Wu, H., and Labastie, M.C. (2002). Cloning and characterization of human and mouse SNRK sucrose non-fermenting protein (SNF-1)-related kinases. *Gene* 294, 13-24. doi:10.1016/S0378-1119(02)00829-6
- Kim, M.H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Kaminaka, H., and Imai, R. (2013). Interactome analysis reveals versatile functions of Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress Chaperon.* 18, 517-525. doi: 10.1007/s12192-012-0398-3
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., and Kagaya, Y. (2005). Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element binding factors. *Plant J.* 44, 939–949. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02583.x
- Köhler, H.R., and Triebskorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759-765. doi: 10.1126/science.1237591
- Koprivova, A., North, K.A., and Kopriva, S. (2008). Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 146, 1408-1420. doi: 10.1104/pp.107.113175
- Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22, 541-563. doi: 10.1105/tpc.109.072686
- Lamb, D.C., Cannieux, M., Warrilow, A.G., Bak, S., Kahn, R.A., Manning, N.J., *et al.* (2001). Plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase affinity for azole fungicides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 845–849. doi:10.1006/bbrc.2001.5010
- Lee, B.K., Park, M.R., Srinivas, B., Chun, J.C., Kwon, I.S., Chung, I.M., *et al.* (2003). Induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression by paraquat and stress-related hormones in *Rehmannia glutinosa*. *Mol. Cells* 16, 34-39.
- León, P., and Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8, 110-116. doi:10.1016/S1360-1385(03)00011-6



- Leslie, T., and Baucom, R.S. (2014). *De novo* assembly and annotation of the transcriptome of the agricultural weed *Ipomoea purpurea* uncovers gene expression changes associated with herbicide resistance. *G3 (Bethesda)*. 4, 2035-2047. doi: 10.1534/g3.114.013508
- Liu, L.L., Ren, H.M., Chen, L.Q., Wang, Y., and Wu, W.H. (2013). A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein Kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like Protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161, 266-277. doi: 10.1104/pp.112.206896
- Medina, M.H., Correa, J.A., and Barata, C. (2007). Microevolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67, 2105-2114. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.024
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T., and Nagatani, A. (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15184-15189. doi: 10.1073/pnas.0803245105
- Moulin, M., McCormac, A.C., Terry, M.J., and Smith, A.G. (2008). Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15178-15183. doi: 10.1073/pnas.0803054105
- Müller, A.H., and Hansson, M. (2009). The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol.* 150, 157–166. doi: 10.1104/pp.109.135277
- Nunes, C., Primavesi, L.F., Patel, M.K., Martinez-Barajas, E., Powers, S.J., Sagar, R., *et al.* (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Biochem.* 63, 89-98. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.011
- Nyitrai, P., Bóka, K., Gáspár, L., Sárvári, E., Lenti, K., and Keresztes, A. (2003). Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *J. Plant Physiol.* 160, 1175-1183. doi: 10.1078/0176-1617-00770
- Patty, L., Real, B., and Gril, J.J. (1997). The use of grassed buffer strips to remove pesticides, nitrate and soluble phosphorus compounds from runoff water. *Pestic. Sci.* 49, 243-251. doi: 10.1002/(SICI)1096-9063(199703)49:3
- Qian, H., Tsuji, T., Endo, T., and Sato, F. (2014). PGR5 and NDH Pathways in photosynthetic cyclic electron transfer respond differently to sublethal treatment with photosystem-interfering herbicides. *J. Agric. Food. Chem.* 62, 4083–4089. doi: 10.1021/jf500143f
- Ramel, F., Sulmon, C., Serra, A.A., Gouesbet, G., and Couée, I. (2012). Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *J. Exp. Bot.* 63, 3999-4014. doi: 10.1093/jxb/ers102
- Ramon, M., Rolland, F., and Sheen, J. (2008). Sugar sensing and signaling. *Arabidopsis Book* 6:e0117. doi: 10.1199/tab.0117
- Ren, X., Liu, T., Dong, J., Sun, L., Yang, J., Zhu, Y., *et al.* (2012). Evaluating de Bruijn graph assemblers on 454 transcriptomic data. *PLoS One* 7:e51188. doi: 10.1371/journal.pone.0051188



- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675-709. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441
- Rozen, S., and Skaletsky, H.J. (2000). "Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers," in *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, ed. S. Misener, and S.A. Krawetz (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), 365-386.
- Rutherford, A.W., and Krieger-Liszkay, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 26, 648-653. doi:10.1016/S0968-0004(01)01953-3
- Saito, S., Okamoto, M., Shinoda, S., Kushiro, T., Koshiba, T., Kamiya, Y., *et al.* (2006). A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1731-1739.
- Serra, A.A., Nuttens, A., Larvor, V., Renault, D., Couée, I., Sulmon, C., *et al.* (2013). Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 64, 2753-2766. doi: 10.1093/jxb/ert119
- Serra, A.A., Couée, I., Renault, D., Gouesbet, G., and Sulmon, C. (2015). Metabolic profiling of *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses under subtoxic conditions of chemical stress. *J. Exp. Bot.* in the press. doi:10.1093/jxb/eru518
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., *et al.* (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443, 823-826. doi: 10.1038/nature05176
- Smith, K., Simpson, R.J., Oram, R.N., Lowe, K.F., Kelly, K.B., Evans, P.M., *et al.* (1998). Seasonal variation in the herbage yield and nutritive value of perennial ryegrass cultivars with high or normal herbage water soluble carbohydrate concentrations grown in three contrasting Australian dairy environments. *Aust. J. Exp. Agric.* 38, 821-830
- Soeno, K., Goda, H., Ishii, T., Ogura, T., Tachikawa, T., Sasaki, E., *et al.* (2010). Auxin biosynthesis inhibitors, identified by a genomics-based approach, provide insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 51, 524-536. doi: 10.1093/pcp/pcq032
- Steinrücken, H.C., and Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1207-1212.
- Stiti, N., Missihoun, T.D., Kotchoni, S.O., Kirch, H.H., and Bartels, D. (2011). Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Front. Plant Sci.* 2:65. doi: 10.3389/fpls.2011.00065
- Sulmon, C., Gouesbet, G., Couée, I., and El Amrani, A. (2004). Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. *Plant Sci.* 167, 913-923.
- Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A., and Couée I. (2007). Involvement of the ethylene-signalling pathway in sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Plant Physiol.* 164, 1083-1092. doi:10.1016/j.jplph.2006.11.005

- Sundin, L., Vanholme, R., Geerinck, J., Goeminne, G., Höfer, R., Kim, H., *et al.* (2014). Mutation of the inducible *Arabidopsis thaliana* Cytochrome P450 reductase 2 alters lignin composition and improves saccharification. *Plant Physiol.* 166, 1956-1971. doi: 10.1104/pp.114.245548
- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2004). SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17306–173011. doi: 10.1073/pnas.0407758101
- Valluru, R., and Van den Ende, W. (2011). Myo-inositol and beyond-emerging networks under stress. *Plant Sci.* 181, 387-400. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.07.009
- Vigeland, M.D., Spannagl, M., Asp, T., Paina, C., Rudi, H., Rognli, O.A., *et al.* (2013). Evidence for adaptive evolution of low-temperature stress response genes in a Pooideae grass ancestor. *New Phytol.* 199, 1060-1068. doi: 10.1111/nph.12337
- Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., *et al.* (2011). Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiol.* 157, 256-268. doi: 10.1104/pp.111.181024
- Voigt, C., Oster, U., Börnke, F., Jahns, P., Dietz, K.J., Leister, D., *et al.* (2010). In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling. *Physiol. Plant.* 138, 503-519. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01343.x
- Ward, J.A., Ponnala, L., and Weber, C.A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am. J. Bot.* 99, 267-276. doi: 10.3732/ajb.1100334
- Weisman, D., Alkio, M., and Colón-Carmona, A. (2010). Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signalling pathways. *BMC Plant Biol.* 10: 59. doi: 10.1186/1471-2229-10-59
- Wu, F.Q., Xin, Q., Cao, Z., Liu, Z.Q., Du, S.Y., Mei, C., *et al.* (2009). The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150, 1940–1954. doi: 10.1104/pp.109.140731
- Zhang, H., Mao, X., Wang, C., and Jing, R. (2010). Overexpression of a common wheat gene *TaSnRK2.8* enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS One* 5: e16041. doi: 10.1371/journal.pone.0016041
- Zhang, Z.W., Yuan, S., Feng, H., Xu, F., Cheng, J., Shang, J., *et al.* (2011a). Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANG-new evidence for a signalling role of tetrapyrroles in mature *Arabidopsis* plants. *J. Plant Physiol.* 168, 714–721. doi: 10.1016/j.jplph.2010.10.016
- Zhang, Z.W., Yuan, S., Xu, F., Yang, H., Chen, Y.E., Yuan, M., *et al.* (2011b) Mg-protoporphyrin, haem and sugar signals double cellular total RNAs against herbicide and

high-light-derived oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 34, 1031–1042. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02302.x

Zhong, G.Y., and Burns, J.K. (2003). Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol. Biol.* 53, 117-131. Zhang, Z.W., Feng, L.Y., Cheng, J., Tang, H., Xu, F., Zhu, F., *et al.* (2013). The roles of two transcription factors, ABI4 and CBFA, in ABA and plastid signalling and stress responses. *Plant Mol. Biol.* 83, 445-458. doi: 10.1007/s11103-013-0102-8

**Figure legends**

**Figure 1:** Effects of xenobiotics on metabolite levels in roots and shoots of *Lolium perenne* plants. *Lolium perenne* plants were grown for 7 d in the absence of xenobiotic and then transferred to fresh growth medium containing the different xenobiotic treatments [glyphosate (G, 1  $\mu$ M), tebuconazole (T, 4  $\mu$ M) and a combination of glyphosate and tebuconazole (GT, 1  $\mu$ M and 4  $\mu$ M, respectively)]. Metabolite levels (mean value  $\pm$  SEM) were quantified after 4 d of treatment.

**Figure 2:** Proportion of annotated sequences in the reference shoot transcriptome of *Lolium perenne*. Annotation analysis of unigenes of the reference shoot transcriptome of *Lolium perenne* was carried out by comparison with the TAIR (*Arabidopsis thaliana*) database using tblastx with a cut-off e-value of  $10e^{-5}$ , by Blast2GO with cut-off e-values of  $10e^{-5}$  (Blastx) and  $10e^{-6}$  (mapping) and by the Inter-ProScan tool (v5).

**Figure 3:** Distribution of Gene Ontology (GO) terms in the reference shoot transcriptome of *Lolium perenne*. Biological processes (A), Molecular functions (B) and Cellular components (C) classes are shown. The relative size of pie chart sectors reflects the percentages of annotated unigenes of each GO term category.

**Figure 4:** Distribution of metabolic pathways in the reference shoot transcriptome of *Lolium perenne*. Assignment of annotated unigenes to metabolic pathways was carried out with the KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) resource; <http://www.kegg.jp/> or <http://www.genome.jp/kegg/>). Results are expressed as percentages of annotated unigenes of each metabolic pathway.

**Figure 5:** Effects of xenobiotics on the distribution of representatively-enriched Gene Ontology (GO) terms in the shoot transcriptomes of *Lolium perenne*. Biological processes (A), Molecular functions (B) and Cellular components (C) classes are shown. Results are expressed as percentages of enriched and annotated unigenes for each GO term category and for each treatment (control, glyphosate, tebuconazole, glyphosate plus tebuconazole) relatively to the total number of annotated unigenes in that class (FDR<0.01 and pvalue<0.0001).

**Figure 6:** Effects of xenobiotics on the transcript levels of candidate xenobiotic-responsive genes in leaves of *Lolium perenne*. *Lolium perenne* plants were grown for 7 d in the absence of pesticide and then transferred to fresh growth medium containing the different xenobiotic treatments [glyphosate (G, 1  $\mu$ M), tebuconazole (T, 4  $\mu$ M) and a combination of glyphosate and tebuconazole (GT, 1  $\mu$ M and 4  $\mu$ M, respectively)]. Transcript levels (mean  $\pm$  SEM) were quantified by qRT-PCR after 4 d of treatment.

**Supplemental Table 1:** Genes selected and corresponding primer sequences for qRT-PCR analysis

Primer	Forward primer	Reverse primer	Product size	Amplified fragment
GAPDH	TCGATGAGGACCTTGTTTCC	GTGCTGTATCCCCACTCGTT	136	901-1036
comp27530_c0_seq1	GTTCTTTGTTGCCATGTGCT	ATTGCACTCCACAATGCATG	119	169-287
comp2769_c0_seq1	TCAGGTGACCCATTAGTCCT	CAGCAGTGGAGAGATTGTGT	84	267-350
comp3660_c0_seq1	GGTGTGGGTACAGTTGGAT	TAGCCTAGCAGCATTCTTGG	174	733-906
comp4085_c0_seq2	TGTCAATGGTGGAGAAGGTG	CTACAAACCTTGAGGCCCTT	126	1526-1651
comp5339_c0_seq1	TGAAGCTTTCTGGCAGATT	GACAAGCTGGATACCGTCTT	121	402-522
comp6832_c0_seq2	ACATGGCGAAGATGTAGGTC	CATCTACACCTCCCTGTTCG	230	332-561
comp7152_c0_seq1	CAACACCATCCTCTTCGACT	CCGTTCATCTTGTTCATCAGC	212	382-593
comp7196_c0_seq2	CACCCCTGCAAGTCTAATGT	AAGACCAATGCCTGAAATGT	102	243-344
comp7196_c0_seq5	AAACTGCCAGAGGTTGTAG	TGTCTGCATGGATGGTGAAA	80	655-734
comp7278_c0_seq1	CTATGTACGAGGAAGGTGCC	TGGAGAATGCAACATGGACA	268	711-979
comp7296_c0_seq6	CAAAAACCTCCACTGCAGTTG	CTCTTTCCCTGGCTCAAGT	245	676-920
comp7309_c0_seq3	CACCCAGATGGAGAGTATGC	TGAATCCAGCCTTTTCAGCT	196	351-546
comp7355_c0_seq2	TGCATACTGCTTGTGGAAT	ATTGGGATCGATAATGCGCT	248	474-721
comp7388_c0_seq1	CGAGCAGTCCTTCAACATCT	ATAATCCGCTTTCTCGACC	181	278-458
comp7427_c0_seq4	AACTCGATGTAGCCGATCAC	AAGGTGGAGCTGATTGACG	244	336-579
comp7452_c0_seq3	TAGGAGATTTGGCGACCTTA	AAATGTTCTGCTGACTCCTGT	269	30-298
comp7458_c0_seq2	TCGACAGTGTCTTCAAGTTGG	TCAGGAAGGACTGCAAGTTC	198	85-282
comp7489_c0_seq2	AGCAGTTCCTGAACCTACG	AAGGGCTCAAAACATCGTCAT	91	419-509
comp7493_c0_seq1	ACCAAGTTCGGTGTAGCAAT	CCATGGTACTCAGCATCTCC	92	238-329
comp7497_c0_seq1	AGCACAGCAAGGTGTTAGAA	TAGGACCTTCTTCCCATGGT	227	320-546
comp7527_c0_seq1	TGCCTTCCCTCCTTTAGAGA	CAAATGCCGCTATTGCTGAA	176	782-957
comp7591_c1_seq3-4	CTCCATCGCGTCCTTCTAC	GTACACGTCCATGTAGTCCC	118	811-928
comp7682_c1_seq3	TTGCAAGCAGGGTGAAATTG	GACTGACAACACTGTAGGCA	283	491-773
comp7682_c0_seq5	TGCTTGAGTTCGTGAATGGA	TCCCAAGATGTTGAGGCAAA	231	399-629
comp7697_c0_seq11-14	GGGCAAGCTCATGATATCGA	AAACTTCTCTCGTGGGTGTC	109	798-906
comp7705_c0_seq3	CCCAGAGGTTTACAGGCTT	CGGGACAACTCTTCTTGGA	92	1047-1138
comp7709_c0_seq1	GACAGGTTGTCTTGTTC	AAGTGCTGCTATGTGTGGA	111	1208-1318
comp7722_c0_seq3	ACAGTTCCTGACGGCATTCT	CATCTCTTCCAGGAAGACCG	133	538-670
comp7188_c0_seq3	AGCTTTGCCTTGCCATTAC	ATTGCTTCGTTCAAGTCCAG	88	808-895
comp7528_c0_seq1	AGCCGGTATTTAACAGCAT	CTCGCTCGAATTTGTATCGC	156	53-208

## **~ Chapitre VI ~**

### **Synthèse et perspectives**

## 1. Synthèse

Au cours de cette thèse, j'ai réalisé des études multi-échelles, intégrant des analyses sur le terrain et en conditions contrôlées de laboratoire, qui ont permis de mettre en évidence les capacités de protection environnementale des bandes enherbées et le rôle du compartiment végétal associé, ceci en lien avec la caractérisation des mécanismes de réponses des plantes aux xénobiotiques, à différents niveaux de complexité.

Dans le premier volet de ce travail de recherche, un suivi intégratif d'analyses écophysiologiques et d'analyses physico-chimiques a montré la complexité des pollutions en pesticides issues des pratiques agricoles et le rôle avéré des bandes enherbées et de leur composition végétale dans la limitation de la diffusion de ces pollutions. Cette complexité des pollutions d'origine agricole se caractérise par la présence, dans les bandes enherbées de la ZAA, de mélanges de pesticides pouvant présenter des caractéristiques physico-chimiques variées. Ces caractéristiques impliquent des propriétés de dispersions édaphique et aérienne différentes, des capacités différentes d'adsorption aux particules de sols et d'absorption par les plantes, et des temps de dégradation variables, aboutissant à une persistance de certains composés dans les milieux. Ces paramètres peuvent de plus être modifiés par les conditions environnementales, générant une difficulté de prédiction et d'estimation de ces pollutions. Ainsi, par les approches méthodologiques développées, il a été possible de détecter, au sein des bandes enherbées expérimentales, des herbicides, des fongicides et des insecticides, à des concentrations variables dans les sols et indépendantes de leurs quantités épandues sur les parcelles agricoles (Chap III, 2.). Ces pollutions résiduelles, persistantes et de faibles intensités, sont présentes à proximité des parcelles cultivées et sont, pour toutes les bandes étudiées, absentes du sol à une distance de 5 m des parcelles. Ce constat, valable pour la majorité des pesticides détectés, met en évidence le rôle remédiateur de ces zones tampons, permettant la limitation de la diffusion des pesticides, et confirmant ainsi les résultats d'autres travaux réalisés dans des contextes climatiques, paysagers et agricoles différents (Krutz et al., 2005 ; Reichenberger et al., 2007). Ce rôle remédiateur est lié, entre autres, au couvert végétal qui compose ces bandes (He et al., 2005 ; Krutz et al., 2005). L'analyse floristique qui a été menée sur deux années et qui a été combinée à la caractérisation des pollutions édaphiques constitue une approche innovante rarement mise en œuvre dans le contexte des bandes enherbées et des pollutions résiduelles. Bien que les conditions biotiques et abiotiques des différentes bandes enherbées soient complexes et variables, cette étude a montré pour ces milieux la disparition de certaines espèces végétales et le maintien et le développement



d'autres espèces, témoignant de leurs caractéristiques de sensibilité et tolérance, respectivement, vis-à-vis de ces contraintes environnementales associées aux bandes enherbées. La concordance des résultats de cette analyse *in situ*, avec les expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire qui ont mis en évidence les sensibilités et les tolérances des espèces végétales des bandes enherbées à un large panel de stress chimiques, suggère que parmi ces contraintes, les pollutions édaphiques pourraient constituer des facteurs structurants des communautés végétales. Ces études ont de plus révélé que certaines espèces de Poacées étaient particulièrement adaptées à ce contexte de pollution environnementale (Chap III, 3. et 4.). Ainsi, la Fétuque rouge traçante (*Festuca rubra*), le Ray-grass anglais (*Lolium perenne*), l'Agrostis stolonifère (*Agrostis stolonifera*) et la Fléole des prés (*Phleum pratense*) ont montré un maintien sur les bandes enherbées et des tolérances à de nombreux xénobiotiques et métaux lourds (Chap III, 4.). Ces espèces ont par ailleurs démontré leur capacité directe de bioremédiation par absorption des pesticides et stockage dans leur biomasse aérienne. En effet, la présence d'un herbicide, le nicosulfuron, dans les feuilles de plantes *in situ*, ainsi que l'absorption par le système racinaire de *Lolium*, en conditions contrôlées, d'un herbicide (glyphosate) et d'un fongicide (tébuconazole), témoignent des capacités des espèces végétales à remédier les sols (Chap III, 5.). De plus, les expérimentations en conditions contrôlées ont mis en évidence la dégradation au moins partielle *in planta* de l'herbicide et du fongicide, suggérant fortement l'existence d'un potentiel de dégradation en condition de terrain. Ces capacités n'ont toutefois pas été évaluées *in situ* du fait de la spécificité des méthodes d'analyse envers les molécules mères. Ces processus de phytoremédiation, peu étudiés et exploités dans ce contexte de bandes enherbées, pourraient ainsi avoir une part importante dans les fonctions bioremédiatrices globales des bandes, en complément, par exemple, de la dégradation microbienne des pesticides. Ces fonctions épuratrices sont dépendantes des capacités propres à chaque espèce à faire face à un stress chimique résiduel, notamment édaphique, impliquant des mécanismes d'interactions entre la plante et les polluants.

Le deuxième volet de cette thèse a consisté à comprendre ces mécanismes de réponses des plantes à des pollutions chimiques subtoxiques, par des études intégratives à différents niveaux de complexité, associant les échelles physiologiques et métaboliques à l'échelle de l'expression génétique (Chap IV et V). Ces travaux, réalisés en conditions contrôlées pour s'assurer que les effets obtenus ne soient pas dus à d'autres perturbations biotiques ou abiotiques du terrain, ont permis de caractériser les réponses de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, de contexte biochimique et moléculaire bien caractérisé, et de l'espèce prairiale *Lolium perenne*, à des mono- et multipollutions réalistes de type péri-agricole.

L'analyse comparative des deux espèces a permis de mettre en évidence des généralités dans les réponses des plantes aux stress chimiques subtoxiques. Chez les deux espèces, les faibles concentrations de pesticides ont des impacts significatifs à différents niveaux du fonctionnement végétal, sans toutefois affecter la survie, l'homéostasie cellulaire et la photosynthèse. Ces impacts ne sont pas toujours liés aux cibles connues des xénobiotiques, et suggèrent ainsi des mécanismes d'action cryptiques des xénobiotiques associés aux faibles concentrations. C'est le cas par exemple du glyphosate, dont les effets observés sont indépendants d'une inhibition de l'EPSPS et d'une modification du niveau des acides aminés aromatiques. Un des résultats à souligner concerne également les effets des produits de dégradation. Les travaux présentés démontrent que, bien qu'ils n'aient pas de cibles métaboliques clairement identifiées chez les plantes, ils entraînent d'importants remaniements métaboliques et moléculaires, différents de ceux provoqués par leur molécule mère. Le produit de dégradation du glyphosate, l'AMPA, semble ainsi interférer avec le métabolisme de la glycine et du quinate. L'étude des deux espèces végétales a aussi permis de montrer l'existence d'interactions entre xénobiotiques en situation de mélange, aboutissant à des réponses physiologiques, métaboliques et moléculaires différentes des effets des molécules seules. Il est donc clair que des multipollutions résiduelles, représentatives de certains contextes environnementaux (Chap III, 2.), entraînent des effets non additifs, pouvant être synergiques ou antagonistes selon les associations étudiées et également selon les organes ou les mécanismes étudiés. Ces résultats attestent de la complexité des interactions au sein des mélanges dans les mécanismes de réponses des plantes aux xénobiotiques. À l'échelle globale de l'organisme, ces différentes perturbations, qui s'accompagnent de remaniements complexes, sont aussi dépendantes du stade de développement de la plante lors de l'exposition à ces stress chimiques, de la durée de contact avec les polluants et du type d'exposition (choc causé par un transfert ou exposition continue depuis le stade semence). Les expérimentations lors desquelles les plantes âgées d'une semaine étaient mises en présence de polluants pendant 4 jours ont ainsi permis d'établir que les changements métaboliques et moléculaires induits par un choc d'exposition court diffèrent de ceux obtenus après 11 jours de croissance directe sur polluants, bien que les réponses physiologiques aient montré des tendances similaires. Ces remaniements globaux permettent *in fine* aux plantes d'éviter des pertes de fitness à long terme. L'analyse comparative des deux espèces a également montré des réponses contrastées vis-à-vis des stress chimiques de faible intensité, en lien avec leurs caractéristiques génétiques, développementales et fonctionnelles (Farrell et al., 2014 ; Lothier et al., 2014 ; Studer et al., 2012). Ces mécanismes de réponses pouvant différer selon l'espèce

laissent supposer des divergences en termes de perception et/ou de transport des polluants, ou de coordinations des réponses moléculaires et métaboliques (Chap I, 2.4 ; Couée et al., 2013 ; Cummins et al., 2013 ; Edwards et al., 2005 ; Patzold et al., 2002 ; Ramel et al., 2007, 2009ab, 2012 ; Sulmon et al., 2004). Ces réponses différentielles traduisent en partie la sensibilité (*Arabidopsis*) ou la tolérance (*Lolium perenne*) des espèces et soulignent la complexité potentielle des réponses aux stress chimiques au sein de la diversité végétale des bandes enherbées. *Arabidopsis* présente une coordination de ses réponses orientée vers une augmentation des métabolites de stress, une diminution des métabolites carbonés (sucres solubles), en parallèle de modifications de l'expression de gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, les défenses contre les stress xénobiotiques, ou la dynamique des phytohormones (Chap IV, 2.). Selon la nature du stress chimique (type de xénobiotique, mono ou multipollution), ces processus biologiques centraux de dynamique du carbone, de balance hormonale, de défenses antioxydantes et de détoxification ne sont pas affectés de façon similaire, et la mise en évidence de l'implication de régulations moléculaires suggère que des mécanismes de perception des stress chimiques et de signalisation interviennent (Serra et al., 2013 ; Foyer et Noctor, 2005, 2013 ; Ramel et al., 2012). Ces mécanismes sont aussi suggérés par l'analyse métabolomique et transcriptomique de *Lolium* (Chap V) en réponse aux stress chimiques. L'analyse métabolomique a montré des modifications majeures du métabolisme azoté, avec notamment une augmentation des niveaux d'asparagine, en réponse aux stress chimiques, ainsi qu'un remaniement des processus de photorespiration, aboutissant à une diminution des niveaux d'alanine et de glycerate (Chap V, 2.). En revanche, les métabolites de stress n'ont pas été impliqués dans la réponse de *Lolium* aux stress chimiques, contrairement à *Arabidopsis*. Des analyses statistiques de corrélations ont de plus souligné les relations chez *Lolium* entre certaines réorganisations métaboliques et les effets physiologiques, telles que la corrélation négative entre les niveaux d'Asn, de Ser et de Lys dans les racines et l'impact des xénobiotiques sur la longueur des parties aériennes, suggérant l'existence de processus de signalisation entre organes pouvant aboutir à des trade-off dans la croissance de la plante. Des réseaux complexes de corrélations entre métabolites ont aussi été établis, avec un lien significatif entre les acides aminés (dont Asn, Leu, Ser) et les sucres solubles. L'étude du transcriptome de *Lolium* a conforté ces résultats métabolomiques, en montrant l'implication des processus métaboliques dans les réponses aux stress chimiques (Chap V, 3.). Cette analyse moléculaire sans *a priori* a également mis en évidence l'implication de régulations moléculaires et de mécanismes de transduction de signal dans les réponses aux stress chimiques. Les pesticides modifient l'expression de familles de gènes

liées à des protéines kinases, à des facteurs de transcription, à des réponses aux stress abiotiques ou biotiques, et impliquant des phytohormones telles que le jasmonate, l'éthylène et l'acide salicylique. En particulier, l'implication de gènes codant différents types de SnRK dans la réponse aux stress chimiques de faible intensité montre le rôle prépondérant des processus énergétiques et des voies de signalisation lors de ces stress.

Mes travaux montrent donc la complexité des mécanismes de réponse et les couplages qui existent entre les signaux métaboliques, liés notamment aux sucres endogènes, les voies de signalisation associées aux phytohormones, la photosynthèse et les molécules signal. Ces réorganisations générales du fonctionnement végétal induites par les stress chimiques peuvent permettre le développement de tolérances chez certaines espèces et leur maintien sur des milieux contenant des pollutions résiduelles, tels que les bandes enherbées.

## **2. Importance du développement de méthodes d'intégration des données en masse pour la compréhension des réponses aux stress**

L'utilisation d'approches « omiques » offre la possibilité d'aborder de façon globale et intégrée les réponses des plantes aux stress abiotiques, et en particulier aux stress chimiques et xénobiotiques (Deshmukh et al., 2014 ; Duke et al., 2012ab ; Hirai et al., 2004 ; Ramel et al., 2007, 2009). Ces méthodes et les technologies associées, en parallèle d'études physiologiques, permettent en effet d'étudier à des niveaux biologiques multiples les modifications induites par des xénobiotiques. Ainsi, la complexité et l'interconnexion des processus cellulaires, qui influencent le fonctionnement global des plantes, peuvent être analysées en parallèle, permettant d'associer les mécanismes globaux de régulation aux variations d'expression de gènes et aux modulations des différentes voies métaboliques. Toutefois, les données obtenues à la suite de ces analyses sont généralement volumineuses et difficiles à appréhender.

Afin d'extraire des informations pertinentes permettant de répondre aux problématiques posées, j'ai utilisé divers outils statistiques. C'est le cas notamment de l'utilisation des analyses multivariées telles que l'ACP, ou des analyses de corrélation, qui ont permis de révéler les liens existant entre les variations des paramètres métabolomiques et physiologiques. Cependant, les choix de ces différentes méthodes, relativement classiques dans le cadre des analyses métabolomiques, n'ont pas été systématiquement explicités. Une comparaison approfondie des différentes méthodes pourrait être nécessaire pour affiner les résultats, mais ce type de comparaison est rarement abordé dans la littérature existante.

Enfin, les données de masse obtenues, notamment concernant l'analyse transcriptomique de *Lolium* qui a permis l'accès à des mécanismes moléculaires chez cette espèce non séquencée, offrent de nombreuses pistes inédites d'investigation, et pourrait exiger de nouveaux outils statistiques pour intégrer les données métabolomiques et transcriptomiques. Ces recherches permettront d'affiner les résultats actuels et d'établir de nouvelles hypothèses sur le fonctionnement de la plante en réponse aux contraintes de stress chimiques de faible intensité.

### **3. Approches analytiques et expérimentales complémentaires pour la caractérisation des processus de terrain**

Les études de terrain réalisées ont permis de répondre à des questions d'ordre environnemental importantes, avec la démonstration du rôle positif des bandes enherbées expérimentales dans le contexte agro-climatique de la ZAA et de l'implication du couvert végétal dans la limitation des pollutions en pesticides. Cependant, compte tenu de la diversité des paramètres influençant la rétention des polluants, le maintien de la communauté végétale et les capacités d'absorption et de dégradation des plantes, il est difficile de généraliser ces résultats à n'importe quel type de bande enherbée et à n'importe quel type de condition agro-climatique. En effet, la topographie et la surface de la zone contributrice, le type de labourage des parcelles cultivées, le type de sol des bandes enherbées, les espèces implantées sur ces bandes, sont autant de variables à prendre en compte pour l'estimation de l'efficacité de ces zones tampons (Krutz et al., 2005). Comme dans le cas des études « omiques », l'intégration de très nombreuses données et de paramètres très divers requiert un important travail d'analyses statistiques. Les analyses originales mises en œuvre dans ce travail (Chap III) seraient ainsi à développer.

Les analyses de sols présentées dans cette thèse montrent que les pesticides ne sont plus détectés, pour la plupart, à 5 m de distance de la parcelle cultivée dans les conditions particulières de 3 bandes enherbées de la ZAA. L'analyse des sols des autres bandes enherbées expérimentales permettra de compléter ces résultats, en lien avec les différentes caractéristiques des bandes enherbées. De plus, la quantification des pesticides dans des sols prélevés au niveau intermédiaire de distance à la parcelle (zone B) permettra d'établir quelle est la proportion de pesticides arrêtés dès la moitié de la bande et de relier plus finement cet abattement à la composition du couvert végétal. Ces analyses complémentaires seront effectuées par LC-MS/MS *via* une nouvelle méthode multirésidus actuellement développée au laboratoire. Ces analyses permettront la quantification d'un panel beaucoup plus large de pesticides et offriront une sensibilité de détection accrue. Cette méthode permettra alors de

mettre en évidence les composés présents dans les échantillons d'eau du sol, et d'avoir ainsi une idée plus précise des pesticides en solution et de leur biodisponibilité. Le lien entre cette biodisponibilité des composés, leur absorption et leur dégradation par les plantes pourra en outre être établi. En effet, une méthode d'extraction des pesticides à partir de biomasse végétale provenant des bandes enherbées (méthode QuEChERS, Chap II, 2.3.) est déjà disponible au laboratoire. L'analyse des échantillons végétaux du terrain permettra de compléter nos précédents résultats d'absorption des pesticides par les plantes et d'analyser leur dégradation, en ciblant les molécules mères et leurs métabolites principaux par analyse LC-MS/MS.

Ces résultats pourraient être complétés par la mise en œuvre de nouvelles expérimentations à un niveau de complexité intermédiaire, comme cela a été effectué par Lambrechts et al. (2014ab) pour évaluer l'efficacité de la végétation pour le piégeage des sédiments et d'éléments traces. Il pourrait ainsi être envisagé par des approches en mésocosmes, d'évaluer la part de phytoremédiation due directement aux plantes, comparativement à la bioremédiation due aux micro-organismes et au piégeage physico-chimique lié par exemple à l'adsorption sur les particules du sol, selon l'influence des conditions du milieu (pH, hygrométrie, température, type de sol). De plus, les plateformes expérimentales et techniques du laboratoire permettraient de réaliser des expériences de traçage radioactif des pesticides contaminants dans ces mésocosmes.

#### **4. Intégration de la complexité des conditions environnementales et physiologiques de terrain dans des approches expérimentales en conditions contrôlées de laboratoire**

La complexité des conditions de terrain est difficile à simuler en conditions contrôlées de laboratoire. J'ai mis en place des conditions d'expérimentation proches de la réalité pour étudier les réponses des plantes aux stress chimiques (Chap II, 3.3.) avec l'utilisation de concentrations en polluants correspondant à des dosages effectués en bordure de parcelles agricoles sur le terrain (Chap IV), ou correspondant à des doses subtoxiques représentatives de pollutions environnementales résiduelles (Chap III, 4., Chap V). Cependant, de nombreux aspects, en particulier la biodisponibilité des polluants édaphiques pour les plantes, posent des problèmes de comparaison et de compréhension. Ainsi, les expérimentations en conditions contrôlées, réalisées en milieu gélosé ou hydroponique, impliquent *a priori* une meilleure biodisponibilité des xénobiotiques que la biodisponibilité réelle dans les sols des bandes enherbées. Il serait donc pertinent de compléter ces approches par des cultures de plantes en

mésocosmes de sol, comme cela a été proposé ci-dessus. De plus, dans de tels mésocosmes, il pourrait être envisagé de faire varier la structure et la composition du sol, notamment en matière organique, comme c'est le cas en milieu naturel. Cela devrait permettre une meilleure caractérisation des stress chimiques rencontrés par les plantes *in situ*, et des interactions systèmes racinaires/particules du sol/eau du sol/xénobiotiques. De plus, ces conditions de culture pourraient permettre de caractériser des différences de développement racinaire en lien avec la composition, la densité et la porosité du substrat, ce paramètre racinaire jouant un rôle prépondérant dans la fonction remédiatrice des bandes enherbées.

## **5. Emergence de nouveaux questionnements sur les mécanismes de réponses aux faibles doses de xénobiotiques**

### a. Caractérisation des voies de réponses aux stress mises en jeu par les faibles doses de xénobiotiques

Les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse ont mis en évidence certains résultats majeurs inattendus et méconnus qui nécessitent une poursuite de l'étude afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. C'est le cas par exemple des effets cryptiques causés par les xénobiotiques à faibles doses. Ces effets, différents de ceux habituellement observés aux fortes doses, ont été décelés au niveau des réponses métaboliques et moléculaires des plantes. Etant donné les systèmes de réponse suggérés par ces marqueurs métaboliques et moléculaires, il serait intéressant d'étudier les impacts des xénobiotiques à faibles doses en termes de stress cellulaire, et en particulier en termes de stress membranaire, de stress de dénaturation protéique, ou de stress oxydatif. Ainsi, l'analyse de la dynamique des ROS en situation d'exposition à des faibles doses de xénobiotiques mettrait en évidence comment la gestion ou la prévention des dommages s'effectue. Il serait également intéressant d'effectuer ce type d'étude dans le cas d'exposition aux produits de dégradation des molécules mères. Les résultats de ce travail de thèse ont en effet révélé que des produits de dégradation de pesticides, souvent considérés comme significativement moins toxiques, induisaient en fait d'importantes perturbations du fonctionnement végétal, de manière individuelle ou de manière combinée. De tels effets perturbateurs de faibles doses de produits de métabolisation des xénobiotiques sont actuellement largement ignorés dans les études écotoxicologiques. Les résultats montrés lors de cette thèse, comme par exemple les liens entre l'AMPA et la glycine ou bien entre le glyphosate et le quinate, constituent des pistes prometteuses pour la compréhension de ces effets cryptiques. Enfin, les phénomènes d'interactions non prévisibles entre les effets des xénobiotiques en mélange montrent également la nécessité de déterminer



plus précisément la diversité des cibles et des effets à plus long terme des polluants résiduels.

#### b. Mécanismes de perception des xénobiotiques

Il est ressorti des analyses en conditions contrôlées chez *Arabidopsis* et chez *Lolium* que les xénobiotiques n'impliquent pas seulement des effets aux niveaux biochimiques et physiologiques, mais aussi à l'échelle de l'expression génétique, de la régulation, et des voies de signalisation des plantes, de manière spécifique au type de polluant. Ces réponses suggèrent l'existence de mécanismes de perception et de détection de ces composés organiques exogènes. De tels mécanismes de perception ont été mis en évidence chez d'autres organismes eucaryotes, en particulier chez les mammifères, mais restent toujours très mal connus chez les plantes. Les données transcriptomiques pourraient par exemple permettre de cibler des réseaux de gènes clés intervenant potentiellement dans ces processus de perception et de signalisation, et de faire des hypothèses sur les facteurs de transcription et les voies de transduction impliqués dans les premiers événements de signalisation. Leurs rôles primaires dans la mise en place des réponses de la plante pourraient ensuite être confirmés par des analyses basées sur l'étude de mutants affectés dans ces différents gènes. Ce type d'analyse est envisageable immédiatement chez *Arabidopsis thaliana*, où de nombreux mutants liés à des voies de signalisation sont disponibles (Sulmon et al., 2007a ; Ramel et al., 2012 ; Smeets et al., 2013) et où les collections de mutants permettent différentes approches de criblage. Dans le cas de *Lolium*, il pourrait être développé une approche d'extinction de gènes par interférence à l'ARN (Tu et al., 2010). Etant donné l'importance potentielle de la signalisation par les SnRKs, qui a été décrite ci-dessus, il serait particulièrement intéressant d'étudier le comportement de mutants SnRK d'*Arabidopsis* en situation de stress xénobiotique.

### **6. Développement de biomarqueurs biochimiques et moléculaires pour l'analyse *in situ* des réponses aux stress xénobiotiques**

Les réponses métaboliques et moléculaires caractérisées dans ce travail de thèse peuvent être la source d'un grand nombre de biomarqueurs potentiels de sensibilité ou de tolérance aux stress chimiques en situation réelle de terrain (milieux chroniquement pollués, pollutions accidentelles, bandes enherbées, protocoles de phytoremédiation). Certaines combinaisons de marqueurs métaboliques, tels que les sucres solubles, l'asparagine ou les acides aminés branchés, pourraient être directement utilisables dans une approche multi-espèces, étant donné leur fonctionnement universel dans les cellules végétales. Ainsi, des variations conjointes de diminution des sucres solubles et d'augmentation d'asparagine pourraient refléter un certain

état de stress de faible intensité lors d'études environnementales. Une telle utilisation de biomarqueurs nécessiterait cependant au préalable des caractérisations métaboliques complémentaires pour comparer les réponses d'une même espèce en situation de bande enherbée ou en conditions contrôlées de laboratoire. Dans cette optique, *Lolium perenne* est un modèle particulièrement intéressant, étant donné, d'une part son intérêt très large en agronomie, en écologie, et en remédiation, et d'autre part son adaptabilité aux conditions contrôlées de laboratoire et de chambre phytotronique, et la caractérisation de plus en plus précise de son contexte biochimique (Lothier et al., 2014), génomique (Islam et al., 2013) et transcriptomique (Farrell et al., 2014 ; Serra et al., 2015 ; Studer et al., 2012). Le développement de biomarqueurs de réponse aux stress chimiques chez *Lolium* apporterait ainsi des outils importants en sciences de l'environnement. L'analyse métabolomique des échantillons foliaires de *Lolium* et des autres espèces végétales prélevés *in situ* sur les bandes enherbées permettront de vérifier les liens avec les résultats obtenus en conditions contrôlées de laboratoire, et la comparaison entre les réponses des différentes espèces établira si ces biomarqueurs sont communs ou si l'histoire évolutive et la tolérance aux stress de chaque espèce impliquent des réponses différentes.

## 7. Conclusion

Les pollutions résiduelles péri-agricoles sont complexes et entraînent de profonds bouleversements à plusieurs niveaux du fonctionnement des espèces végétales. Ces faibles concentrations en xénobiotiques et en métaux lourds, entraînent des effets cryptiques métabolomiques et moléculaires. En effet, les concentrations subtoxiques des molécules mères ainsi que leurs produits de dégradation, pourtant considérés comme peu toxiques en contexte écotoxicologique, provoquent d'importantes perturbations *in planta*. Les mélanges de composés, reflétant des conditions réalistes de pollution *in situ*, entraînent des réponses autres que de l'additivité, impliquant ainsi une difficulté supplémentaire dans la compréhension des effets de ces stress chimiques complexes et dans l'estimation des conséquences de ces pollutions. Les approches intégrées utilisées au cours de cette thèse ont permis de montrer des réponses communes entre espèces et des réponses particulières, témoignant des caractéristiques de tolérance et de sensibilité diverses selon le type de plante. Ces tolérances sont particulièrement utiles en contexte de gestion des pollutions environnementales, car elles permettent aux plantes de se maintenir sur les milieux pollués, comme les bandes enherbées, et de contribuer significativement à la bioremédiation de ces milieux et à la limitation de la diffusion à plus large échelle des pollutions.

## **~ Références bibliographiques ~**

- AAC, Agriculture et Agroalimentaire Canada. 2013. L'implantation de zones tampons en milieu agricole. Fiche technique. 24pp.
- AbdElgawad H, Peshev D, Zinta G, Van den Ende W, Janssens IA, Asard H. 2014. Climate extreme effects on the chemical composition of temperate grassland species under ambient and elevated CO<sub>2</sub>: A comparison of fructan and non-fructan accumulators. PLoS One **9**, e92044.
- ADEME 2012a. Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués. Etat de l'art et guide de mise en œuvre. EDP Sciences. 87pp.
- ADEME 2012b. Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines polluées en France. Synthèse des données 2010. 114pp.
- Ahmad R, Nelson PN, Kookana RS. 2006. The molecular composition of soil organic matter as determined by <sup>13</sup>C NMR and elemental analyses and correlation with pesticide sorption. European Journal of Soil Science **57**, 883-893.
- Ahmadi MS, Haderlie LC, Wicks GA. 1980. Effect of growth stage and water stress on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control and on glyphosate absorption and translocation. Weed Science **28**, 277-282.
- Akkanen J, Tuikka A, Kukkonen JVK. 2012. On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Ecotoxicology and Environmental Safety **78**, 91-98.
- Al-Awadhi N, Al-Daher R, EINawawy A, Salba MT. 1996. Bioremediation of oil-contaminated soil in Kuwait. I. Landfarming to remediate oil-contaminated soil. Journal of Soil Contamination **5**, 243-260.
- Allison VJ, Rajaniemi TK, Goldberg DE, Zak DR. 2007. Quantifying direct and indirect effects of fungicide on an old-field plant community: an experimental null-community approach. Plant Ecology **190**, 53-69.
- Altenburger R, Bodeker W, Faust M, Grimme H. 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. Ecotoxicology and Environmental Safety **20**, 98-114.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research **25**, 3389-3402.
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Keller F, Prud'homme MP. 2003a. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. Plant Physiology **132**, 2218-2229.
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Prud'homme MP. 2003b. Fate of fructose supplied to leaf sheaths after defoliation of *Lolium perenne* L.: assessment by <sup>13</sup>C-fructose labelling. Journal of Experimental Botany **54**, 1231-1243.
- An YJ, Kim YM, Kwon TI, Jeong SW. 2004. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. Science of the Total Environment **326**, 85-93.
- Anastassiades M, Lehotay S. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International **86**, 412-431.
- Anders S. 2010. Analysing RNA-Seq data with the DESeq package. Molecular Biology, 1-17.

- Anders S, McCarthy DJ, Chen Y, Okoniewski M, Smyth GK, Huber W, Robinson MD.** 2013. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols* **8**, 1765-1786.
- Anderson MP, Gronwald, JW.** 1991. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. *Plant physiology* **96**, 104-109.
- Andreasen C, Streibig JC.** 2011. Evaluation of changes in weed flora in arablefields of Nordic countries based on Danish long-term surveys. *Weed Research* **51**, 214-226.
- Arabidopsis Genome Initiative.** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408(6814)**, 796.
- Araujo ASF, Monteiro RTR, Abarkeli RB.** 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* **52**, 799-804.
- Archbold HK.** 1940. Fructosans in the monocotyledons. A review. *New Phytologist* **39**, 185-219.
- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ.** 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment* **32**, 1147-1160.
- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto JC, García-Río L.** 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **123**, 247-260.
- Arienzo M, Adamo P, Cozzolino V.** 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Science of the Total Environment* **319**, 13-25.
- Aronsson H, Stenberg M, Ulén B.** 2011. Leaching of N, P and glyphosate from two soils after herbicide treatment and incorporation of a ryegrass catch crop: Leaching of N, P and glyphosate. *Soil Use and Management* **27**, 54-68.
- Arthur EL, Coats JR.** 1998. Phytoremediation. *Pesticide Remediation in Soil and Water*. 251-283.
- Asada K.** 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**, 391-396.
- Ashraf M, Ozturk M, Ahmad MSA.** 2010. *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Ed: Springer Netherlands. 491pp.
- Atagana HI.** 2004. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 510-520.
- Ateeq B, Abul farah M, Niamat Ali M, Ahmad W.** 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*. **518**, 135-144.
- Aubertot JN, Barbier JM., Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I, Voltz M.** 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France).
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J.** 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938-942.
- Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S, Werck-Reichhart D.** 2011. Cytochromes P450. *Arabidopsis Book* **9**, e0144.
- Baker ME.** 2005. Xenobiotics and the evolution of multicellular animals: emergence and

- diversification of ligand-activated transcription factors. *Integrative and Comparative Biology* **45**, 172-178.
- Balinova A, Mladenova R, Shtereva D.** 2007. Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography electron capture detection of pesticide residues in crops. *Journal of Chromatography A* **1150**, 136-144.
- Barbehenn RV, Chen Z, Karowe DN, Spickards A.** 2004. C3 grasses have higher nutritional quality than C4 grasses under ambient and elevated atmosphere CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology* **10**, 1565-1575.
- Bargagli R.** 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the Total Environment* **400**, 212-226.
- Barrek S, Cren-Olivé C, Wiest L, Baudot R, Arnaudguilhem C, Grenier-Loustalot MF.** 2009. Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. *Talanta* **79**, 712-722.
- Barriuso E, Benoit P, Charnay MP, Coquet Y, Louchart X, Schiavon M, Aurousseau P.** 2005. Pollutions organiques diffuses : mobilité et persistance des polluants organiques dans les sols. Dans: Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J, Morel JL. *Sols et Environnement*. Ed: Dunod Paris. 832pp.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N.** 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229-1240.
- Beketov MA, Kefford BJ, Schafer RB, Liess M.** 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **110**, 11039-11043.
- Bell TH, Joly S, Pitre FE, Yergeau E.** 2014. Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends in Biotechnology* **32**, 271-280.
- Belz RG, Duke SO.** 2014. Herbicides and plant hormesis. *Pest Management Science* **70**, 698-707.
- Berenzen N, Lentzen-Godding A, Probst M, Schulz H, Schulz R, Liess M.** 2002. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* **58**, 683-691.
- Bereswill R, Golla B, Streloke M, Schulz R.** 2012. Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **146**, 81-92.
- Bert V, Lors C, Ponge JF, Caron L, Biaz A, Dazy M, Masfaraud JF.** 2012. Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: a field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* **169**, 1-11.
- Beulke S, Malkomes HP.** 2001. Effects of the herbicides metazachlor and dinoterb on the soil microflora and the degradation and sorption of metazachlor under different environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 467-471.
- Bidar G, Garçon G, Pruvot C, Dewaele D, Cazier F, Douay F, Shirali P.** 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* **147**, 546-553.
- Bidar G, Pruvot C, Garçon G, Verdin A, Shirali P, Douay F.** 2009. Seasonal and annual



- variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* **16**, 42-53.
- Bittebiere AK.** 2012. La clonalité : un processus majeur de la dynamique spatiale et du fonctionnement des communautés végétales en systèmes prairiaux. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, France.
- Bliss CI.** 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* **26**, 585-615.
- Borin M, Bigon E, Zanin G, Fava L.** 2004. Performance of a narrow buffer strip in abating agricultural pollutants in the shallow subsurface water flux. *Environmental Pollution* **131**, 313-321.
- Borin M, Passoni M, Thiene M, Tempesta T.** 2010. Multiple functions of buffer strips in farming areas. *European Journal of Agronomy* **32**, 103-111.
- Boucard TK, Bardgett RD, Jones KC, Semplea KT.** 2005 Influence of plants on the chemical extractability and biodegradability of 2,4- dichlorophenol in soil. *Environmental Pollution* **133**, 53-62.
- Bouchonnet S.** 2009. La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Ed: Tec and Doc Lavoisier. 196pp.
- Bounias M.** 1999. Traité de toxicologie générale: du niveau moléculaire à l'échelle planétaire. Ed: Springer. 787pp.
- BRGM, Bureau de Recherches Géologiques et Minière.** 2010. Quelles techniques pour quels traitements, Analyse coûts-bénéfices. Rapport final. 401pp.
- Briggs GG, Bromilow RH, Evans AA.** 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science* **42**, 209-222.
- Burken JG, Schnoor JL.** 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology* **32**, 3379-7785.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L.** 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology* **222**, 122-128.
- Calabrese EJ, Blain RB.** 2011. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **61**, 73-81.
- Calamari D, Barg U.** 1993. Hazard assessment of agricultural chemicals by simple simulation models. In: *Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities. Proceedings of the FAO Expert Consultation, Santiago, Chile, 20-23 Oct. 1992. Water Report 1.* FAO, Rome. 207-222.
- Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay MP, Coquet Y.** 2005. Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. Ed : France Agricole. 641pp.
- Campos VM, Merino I, Casado R, Pacios LF, Gómez L.** 2008. Review. Phytoremediation of organic pollutants. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**, 38-47.
- Cao G, Liu Y, Zhang S, Yang X, Chen R, Zhang Y, Lu W, Liu Y, Wang J, Lin M, Wang G.** 2012. A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase shows high glyphosate tolerance in *Escherichia coli* and tobacco plants. *PLoS One* **7**, e38718.
- Cao YR, Chen SY, Zhang JS.** 2008. Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant*



- Signaling and Behavior **3**, 761-763.
- Carabias-Martinez R, Rodriguez Gonzalo E, Fernadez Laespada E, San Roman F.** 2000. Evaluation of surface- and ground-water pollution due to herbicides in agricultural areas of Zamora and Salamanca (Spain). *Journal of Chromatography A* **869**, 471-480.
- Carluer N, Tournebize J, Gouy V, Margoum C, Vincent B, Gril JJ.** 2011. Role of buffer zones in controlling pesticides fluxes to surface waters. *Procedia Environmental Sciences* **9**, 21-26.
- Carpenter D, Boutin C.** 2010. Sublethal effects of the herbicide glufosinate ammonium on crops and wild plants: short-term effects compared to vegetative recovery and plant reproduction. *Ecotoxicology* **19**, 1322-1336.
- Caseley JC, Coupland D.** 1985. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake, movement and activity. In: Grossbard E, Atkinson D. *The Herbicide Glyphosate*. 92-123.
- Cedergreen N, Streibig JC.** 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science* **61**, 1152-1160.
- Cedergreen N, Olesen CF.** 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology* **96**, 140-148.
- Cedergreen N, Svendsen C, Backhaus T.** 2013. Chemical Mixtures: Concepts for Predicting Toxicity. In: Jorgensen SE. *Encyclopedia of Environmental Management*. Ed: Taylor and Francis, New York. 2601-2610.
- Chen J, Ehrenhauser FS, Valsaraj KT, Worna MJ.** 2006. Uptake and UV-photooxidation of gas-phase PAHs on the surface of atmospheric water films. 1. Naphthalene. *The Journal of Physical Chemistry A* **110**, 9161-9168.
- Chen LM, Lin CC, Kao CH.** 2000. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **41**, 99-103.
- Child RD, Evans DE, Allen J, Arnold GM.** 1993. Growth responses in oilseed rape (*Brassica napus* L.) to combined applications of the triazole chemicals triapenthenol and tebuconazole and interactions with gibberellins. *Plant Growth Regulation* **13**, 203-212.
- Child RD, Summers JE, Babij J, Farrent JW, Bruce DM.** 2003. Increased resistance to pod shatter is associated with changes in the vascular structure in pods of a resynthesized *Brassica napus* line. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1919-1930.
- Cho UH, Sohn JY.** 2004. Cadmium induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and lipid peroxidation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology* **47**, 262-269.
- CITEPA.** 2013. Rapport National d'Inventaire. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serres en France - Séries sectorielles et analyses étendues. Format SECTEN. 329pp.
- Claeys H, Van Landeghem S, Dubois M, Maleux K, Inze D.** 2014. What is stress? dose-response effects in commonly used in vitro stress assays. *Plant Physiology* **165**, 519-527.
- Coleman J, Blake-Kalff M, Davies E.** 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* **2**, 144-151.
- Colinet H, Renault D, Charoy-Guével B, Com E.** 2012. Metabolic and proteomic profiling of diapause in the aphid parasitoid *Praon volucre* (P Santos, Ed.). *PLoS One* **7**, e32606.

- Commissariat général au développement durable.** 2013. Contamination des cours d'eau par les pesticides en 2011. Chiffres et statistiques **436**, 7pp.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M.** 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674-3676.
- Conway GR, Pretty JN.** 2013. Unwelcome harvest: agriculture and pollution. Routledge. 676pp.
- CORPEN.** Comité d'Orientation pour les Pratiques agricoles respectueuses de l'ENvironnement. 2007. Les fonctions environnementales des zones tampons. Les bases scientifiques et techniques des fonctions de protection des eaux. 75pp.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 449-459.
- Couée I, Serra AA, Ramel F, Gouesbet G, Sulmon C.** 2013. Physiology and toxicology of hormone-disrupting chemicals in higher plants. *Plant Cell Reports* **32**, 933-941.
- Cox C.** 2001. Atrazine: environmental contamination and ecological effects. *Journal of Pesticide Reform* **21**, 1-9.
- Craine JM, Tilman D, Wedin D, Reich P, Tjoelker M, Knops J.** 2002 Functional traits, productivity and effects on nitrogen cycling of 33 grassland species. *Functional Ecology* **16**, 563-574.
- Cummins I, Bryant DN, Edwards R.** 2009. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Biotechnology Journal* **7**, 807-820.
- Cummins I, Wortley DJ, Sabbadin F, He Z, Coxon CR, Straker HE, et al.** 2013. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **110**, 5812-5817.
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab P, Hsu FC.** 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy* **56**, 55-114.
- Dabney SM, Moore MT, Locke MA.** 2006. Integrated management of in-field, edge-of-field, and after-field buffers. *Jawra Journal of the American Water Resources Association* **42**, 15-24.
- Dan Hess F.** 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* **48**, 160-170.
- Das KC, Das CK.** 2000. Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: Redox independent functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**, 443-447.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779-795.
- Davis LC, Erickson LE, Narayanan M, Zhang, Q.** 2003. Modeling and Design of Phytoremediation. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants* Eds: S. C. McCutcheon and J. L. Schnoor, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 661-694.
- Dazy M, Jung V, Férard JF, Masfaraud JF.** 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* **74**, 57-63.
- Dazy M, Béraud E, Cotellet S, Gréwilliot F, Férard JF, Masfaraud JF.** 2009. Changes in plant

- communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* **77**, 376-383.
- De Baets S, Poesen J, Gyssels G, Knapen A.** 2006. Effect of grass roots on the erodibility of top soils during concentrated flow. *Geomorphology* **76**, 54-67.
- De Jonge H, Mittelmeijer-Hazeleger MC.** 1996. Adsorption of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> on soil organic matter: nature of porosity, surface area, and diffusion mechanisms. *Environmental Science and Technology* **30**, 408-413.
- De Prado R, Lopez-Martinez N, Gonzalez-Gutierrez J.** 2000. Identification of two mechanisms of atrazine resistance in *Setaria faberi* and *Setaria viridis* biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **67**, 114-124.
- De Snoo GR.** 1999. Unsprayed field margins: effects on environment, biodiversity and agricultural practice. *Landscape and Urban Planning* **46**, 151-160.
- Dear BS, Sandral GA, Wilson BCD.** 2006. Tolerance of perennial pasture grass seedlings to pre- and post-emergent grass herbicides. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **46**, 637-644.
- Del Buono D, Ioli G, Scarponi L.** 2011. Glutathione peroxidases in *Lolium multiflorum* and *Festuca arundinacea*: Activity, susceptibility to herbicides and characteristics, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **46**, 715-722.
- Del Rio LA.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**, 330-335.
- DellaPenna D, Pogson BJ.** 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 711-738.
- Délye C, Michel S, Bérard A, Chauvel B, Brunel D, Guillemain JP, Dessaint F, Le Corre V.** 2010. Geographical variation in resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides across the range of the arable weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *New Phytologist* **186**, 1005-1017.
- Délye C.** 2013. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science* **69**, 176-187.
- Deshmukh R, Sonah H, Patil G, Chen W, Prince S, Mutava R, Vuong T, et al.** 2014. Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Frontiers in Plant Science* **5**, 244.
- Desikan R, Soheila A H, Hancock JT, Neill SJ.** 2001. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* **127**, 159-172.
- Desprez T, Vernhettes S, Fagard M, Refregier G, Desnos T, Aletti E, Py N, Pelletier S, Hofte H.** 2002. Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiology* **128**, 482-490.
- Devine MD, Shukla A.** 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection* **19**, 881-889.
- Dias NC, Poole CF.** 2002. Mechanistic study of the sorption properties of Oasis<sup>®</sup> HLB and its use in solid-phase extraction. *Chromatographia* **56**, 269-275.
- Dias PJ, Teixeira MC, Telo JP, Sá-Correia I.** 2010. Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide mancozeb in yeast, as suggested by a

- chemogenomic approach. OMICS A Journal of Integrative Biology **14**, 211-227.
- Dick RE, Quinn JP.** 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. Applied Microbiology and Biotechnology **43**, 545-550.
- Ding W, Reddy KN, Zablotowicz RM, Bellaloui N, Arnold Bruns H.** 2011. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. Chemosphere **83**, 593-598.
- Dixon DP, Edwards R.** 2010. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. Journal of Biological Chemistry **285**, 36322-36329.
- D'Orazio V, Ghanem A, Senesi N.** 2013. Phytoremediation of pyrene contaminated soils by different plant species. Clean-Soil, Air, Water **41**, 377-382.
- Dorioz JM, Wang D, Poulenard J, Trevisan D.** 2006. The effect of grass buffer strips on phosphorus dynamics a critical review and synthesis as a basis for application in agricultural landscapes in France. Agriculture, Ecosystems and Environment **117**, 4-21.
- Dosnon-Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P.** 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. Ecotoxicology and Environmental Safety **72**, 2096-2101.
- Dosskey MG.** 2001. Toward quantifying water pollution abatement in response to installing buffers on crop land. Environmental Management **28**, 577-598.
- Dosskey MG, Helmers MJ, Eisenhauer DE.** 2011. A design aid for sizing filter strips using buffer area ratio. Journal of Soil and Water Conservation **66**, 29-39.
- Duhoux A, Délye C.** 2013. Reference genes to study herbicide stress response in *Lolium* sp.: up-regulation of P450 genes in plants resistant to acetolactate-synthase inhibitors. PLoS One **8**, e63576.
- Duke SO, Powles SB.** 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science **64**, 319-325.
- Duke SO.** 2011. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 5835-5841.
- Duke SO, Lydon J, Koskinen WC, Moorman TB, Chaney RL, Hammerschmidt R.** 2012a. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**, 10375-10397.
- Duke SO, Reddy KN, Bu K, Cizdziel JV.** 2012b. Effects of glyphosate on the mineral content of glyphosate resistant soybeans (*Glycine max*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**, 6764-6771.
- Edwards R, Brazier-Hicks M, Dixon DP, Cummins I.** 2005. Chemical manipulation of antioxidant defences in plants. Advances in Botanical Research **42**, 1-32.
- Edwards R, Dixon DP, Cummins I, Brazier-Hicks M, Skipsey M.** 2011. New Perspectives on the Metabolism and Detoxification of Synthetic Compounds in Plants. In: Organic Xenobiotics and Plants. Ed: Springer, Netherlands, 125-148.
- Fang F, Kanan S, Patterson HH, Cronan CS.** 1998. A spectrofluorimetric study of the binding of carbofuran, carbaryl and aldicarb with dissolved organic matter. Analytica Chimica Acta **373**, 139-151.

- Fantke P, Gillespie BW, Juraske R, Jolliet O.** 2014. Estimating half-lives for pesticide dissipation from plants. *Environmental Science and Technology* **48**, 8588-8602.
- Farrell JD, Byrne S, Paina C, Asp T.** 2014. *De novo* assembly of the perennial ryegrass transcriptome using an RNA-seq strategy. *PLoS One* **9**, e103567.
- Favas PJC, Pratas J, Varun M, D'Souza R, Paul MS.** 2014. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* 485-517.
- Fedtko C.** 1982. Microtubules, in *Biochemistry and physiology of herbicide action*. Ed: Springer Verlag, Berlin. 121-138.
- Fenner K, Scheringer M, Hungerbühler K.** 2003. Joint persistence of transformation products in chemicals assessment: case studies and uncertainty analysis. *Risk Analysis* **23**, 35-53.
- Fenner K, Canonica S, Wackett LP, Elsner M.** 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science* **341**, 752-758.
- Fishbein L.** 1981. Sources, transport and alterations of metal compounds: an overview. I. Arsenic, beryllium, cadmium, chromium, and nickel. *Environmental Health Perspectives* **40**, 43-64.
- Fleeger JW1, Carman KR, Nisbet RM.** 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* **317**, 207-233.
- Foes MJ, Liu L, Tranel PJ, Wax LM, Stoller EW.** 1998. A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. *Weed Science* **46**, 514-520.
- Foes MJ, Liu L, Vigue G, Stoller EW, Wax LM, Tranel PJ.** 1999. A kochia (*Kochia scoparia*) biotype resistant to triazine and ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science* **47**, 20-27.
- Fournier J.** 1988. *Chimie des pesticides*. Ed : Cultures et Techniques. 351pp.
- Fox GA, Muñoz-Carpena R, Sabbagh GJ.** 2010. Influence of flow concentration on parameter importance and prediction uncertainty of pesticide trapping by vegetative filter strips. *Journal of Hydrology* **384**, 164-173.
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ.** 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **17**, 507-523.
- Foyer CH, Noctor G.** 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G.** 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**, 861-905.
- Foyer CH, Noctor G.** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2-18.
- Foyer CH, Noctor G.** 2013. Redox signaling in plants. *Antioxidants and redox signaling* **18**, 2087-2090.
- Franco A, Fu W, Trapp S.** 2009. Influence of soil pH on the sorption of ionizable chemicals: modeling advances. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 458-464.
- Frankart C, Eullaffroy P, Vernet G.** 2002. Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **53**, 439-445.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA.** 1997. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society. 678pp.



- Freemark K, Boutin C.** 1995. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **52**, 67-91.
- Frery N, Saoudi A, Garnier R, Zeghnoun A, Falq G, Guldner L.** 2010. Exposition de la population française aux polluants de l'environnement, Volet environnemental de l'étude nationale nutrition santé, Premiers résultats. Institut de veille sanitaire. 12pp.
- FRTR.** 2014. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, Version 4.0. US Army and EPA, USA. [En ligne] [http://www.frtr.gov/matrix2/section3/3\\_1.html](http://www.frtr.gov/matrix2/section3/3_1.html) [consulté le 20 juillet 2014].
- Fufezan C, Rutherford AW, Krieger-Liszkay A.** 2002. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters* **532**, 407-410.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436-442.
- Fujita M, Fujita Y, Iuchi S, Yamada K, Kobayashi Y, Urano K, Kobayashi M, et al.** 2012. Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **109**, 6343-6347.
- Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schönbrunn E.** 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **103**, 13010-13015.
- Garon D, Richard E, Sage L, Bouchart V, Pottier D, Lebailly P.** 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **54**, 3479-3484.
- Geiger F, Bengtsson J, Berendse F, Weisser WW, Emmerson M, Morales MB et al.** 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology* **11**, 97-105.
- Gerhardt KE, Huang X-D, Glick BR, Greenberg BM.** 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* **176**, 20-30.
- Gessner PK.** 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology* **105**, 161-179.
- Gevao B, Semple KT, Jones KC.** 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* **108**, 3-14.
- Gil Y, Sinfort C.** 2005. Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review. *Atmospheric Environment* **39**, 5183-5193.
- Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J.** 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology* **11**, R86.
- Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Henault-Ethier L, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P.** 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4691-4703.
- Gonzalez-Rodriguez R, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J.** 2008. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap

- mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A* **1196-1197**, 100-109.
- Götz S, Arnold R, Sebastián-León P, Martín-Rodríguez S, Tischler P, Jehl MA, Dopazo J, Rattei T, Conesa A.** 2011. B2G-FAR, a species-centered GO annotation repository. *Bioinformatics* **27**, 919-924.
- Gould KS, McKelvie J, Markham KR.** 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1261-1269.
- Gowland B, Webster L, Fryer R, Davies I, Moffat C, Stagg R.** 2002. Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* **120**, 805-811.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X et al.** 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology* **29**, 644-652.
- Grangeot M, Chauvel B, Gauthier C.** 2006. Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Research* **46**, 152-162.
- Gravot A, Dittami SM, Rousvoal S, Lugan R, Eggert A, Collén J, Boyen C, et al.** 2010. Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytologist* **188**, 98-110.
- Gray J A, Balke NE, Stoltenberg DE.** 1996. Increased glutathione conjugation of atrazine confers resistance in a Wisconsin velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **55**, 157-171.
- Greco WR, Bravo G, Parsons JC.** 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews* **47**, 331-385.
- Gressel J, Regev Y, Malkin S, Kleifeld Y.** 1983. Characterization of an s-triazine-resistant biotype of *Brachypodium distachyon*. *Weed Science* **31**, 450-456.
- Gressel J.** 2002. *Molecular biology of weed control*. CRC Press. 520pp.
- Gressel J.** 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science* **67**, 253-257.
- Grime JP.** 2006. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. Ed: John Wiley and Sons. 419pp.
- Gronwald JW.** 1989. Influence of herbicide safeners on herbicide metabolism. *Crop safeners for herbicides*. Ed: Academic Press, New York, 103-128.
- Gronwald JW.** 1994. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Ed: Lewis Boca Raton, 27-60.
- Grossmann K.** 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*. **66**, 113-120.
- Guerrand D, Prud'homme MP, Boucaud J.** 1996. Fructan metabolism in expanding leaves, mature leaf sheaths and mature leaf blades of *Lolium perenne*. Fructan synthesis, fructosyltransferase and invertase activities. *New Phytologist* **134**, 205-214.
- Gurevitch J, Scheiner SM, Fox GA.** 2002. *The ecology of plants*. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, USA.



- Gyssels G, Poesen J, Bochet E, Li Y.** 2005. Impact of plant roots on the resistance of soils to erosion by water: a review. *Progress in Physical Geography* **29**, 189-217.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, et al.** 2013. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols* **8**, 1494-1512.
- Haby PA, Crowley DE.** 1996. Biodegradation of 3-chlorobenzoated as affected by rhizodeposition and selected carbon substrates. *Journal of Environmental Quality* **25**, 304-310.
- Hannaway D, Fransen S, Cropper J, Teel M, Chaney M., Griggs T, Halse R, et al.** 1999. Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). Pacific Northwest Extension Publications, Oregon State University.
- Hart JJ, DiTomaso JM, Linscott DL, Kochian LV.** 1992. Transport interactions between paraquat and polyamines in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiology* **99**, 1400-1405.
- Hayes VEA, Ternan NG, McMullan G.** 2000. Organophosphate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS Microbiology Letters* **186**, 171-175.
- He ZL, Yang XE, Stoffella PJ.** 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**, 125-140.
- Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K.** 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science* **17**, 569-574.
- Helmers MJ, Isenhardt TM, Dosskey MG, Dabney SM, Strock JS.** 2008. Buffers and vegetative filter strips. Chapter 4 in Upper Mississippi River Sub-basin Hypoxia Nutrient Committee Final Report: Gulf Hypoxia and Local Water Quality Concerns Workshop. American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan.
- Hendry GA.** 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**, 3-14.
- Henner P, Schiavon M, Morel JL, Lichtfouse E.** 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analysis*, EDP Sciences **25**, 56-59.
- Hennion MC.** 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **856**, 3-54.
- Hercegová A, Dömötörövá M, Matisová E.** 2007. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *Journal of Chromatography A* **1153**, 54-73.
- Hertzberg RC, MacDonell MM.** 2002. Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Science of the total environment* **288**, 31-42.
- Hetherington PR, Reynolds TL, Marshall G, Kirkwood RC.** 1999. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1567-1576.
- Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmülling T.** 2012. Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology* **91**, 246-256.
- Hildebrandt A, Lacorte S, Barceló D.** 2009. Occurrence and fate of organochlorinated pesticides and pah in agricultural soils from the Ebro River basin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **57**, 247-255.
- Hincha DK, Livingston DP 3rd, Premakumar R, Zuther E, Obel N, Cacela C, Heyer AG.** 2007. Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during

- drying. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**, 1611-1619.
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K.** 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **101**, 10205-10210.
- Hirayama T, Shinozaki K.** 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal* **61**, 1041-1052.
- Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, Yoshida M, Shimamoto Y, Yamada T.** 2004. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* **167**, 861-868.
- Hisano H, Kanazawa A, Yoshida M, Humphreys MO, Iizuka M, Kitamura K, Yamada T.** 2008. Coordinated expression of functionally diverse fructosyltransferase genes is associated with fructan accumulation in response to low temperature in perennial ryegrass. *New Phytologist* **178**, 766-780.
- Hu C, Ou Y, Zhang D, Zhang H, Yan C, Zhao Y, Zheng Z.** 2012. Phytoremediation of the polluted Waigang River and general survey on variation of phytoplankton population. *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 4168-4175.
- Huang HH, Xu LL, Tong ZK, Lin EP, Liu QP, Cheng LJ, Zhu MY.** 2012. *De novo* characterization of the Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) transcriptome and analysis of candidate genes involved in cellulose and lignin biosynthesis. *BMC Genomics* **13**, e648.
- Huertas IE, Rouco M, López-Rodas V, Costas E.** 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist* **188**, 478-487.
- Hussain S, Siddique T, Arshad M, Saleem M.** 2009. Bioremediation and phytoremediation of pesticides: recent advances. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **39**, 843-907.
- IFEN.** 2007. Les pesticides dans les eaux, Données 2005. 37pp.
- Iimura Y, Ikeda S, Sonoki T, Hayakawa T, Kajita S, Kimbara K, Tatsumi K, Katayama Y.** 2002. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 246-251.
- Inserm.** 2013. Expertise collective. Pesticides, Effets sur la santé. Synthèse et recommandations. Ed: Inserm. 148pp.
- Islam MS, Studer B, Byrne SL, Farrell JD, Panitz F, Bendixen C, et al.** 2013. The genome and transcriptome of perennial ryegrass mitochondria. *BMC Genomics* **14**, e202.
- Jablonowski ND, Köppchen S, Hofmann D, Schäffer A, Burauel P.** 2009. Persistence of <sup>14</sup>C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environmental Pollution* **157**, 2126-2131.
- Jablonowski ND, Hamacher G, Martinazzo R, Langen U, Köppchen S, Hofmann D, Burauel P.** 2010. Metabolism and persistence of atrazine in several field soils with different atrazine application histories. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 12869-12877.
- Jablonowski ND, Schäffer A, Burauel P.** 2011. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental Science and*

- Pollution Research **18**, 328-331.
- Jackson RD**. 1986. Remote sensing of biotic and abiotic plant stress. Annual Review of Phytopathology **24**, 265-287.
- Jamet P, Eudeline V**. 1992. Assessment of the movement of triazole fungicides by soil thin-layer chromatography. Science of the Total Environment **123/124**, 459-468.
- Jasak J, Blanc YL, Speer K, Billian P, Schoening RM**. 2012. Analysis of triazole-based metabolites in plant materials using differential mobility spectrometry to improve LC/MS/MS selectivity. Journal of AOAC International **95**, 1768-1776.
- Jasieniuk M, Brûlé-Babel AL, Morrison IN**. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. Weed Science **44**, 176-193.
- Jonker MJ, Svendsen C**. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. Environmental Toxicology and Chemistry **24**, 2701-2713.
- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme L**. 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. Aquatic Toxicology **76**, 93-110.
- Juraske R, Sanjuán N**. 2011. Life cycle toxicity assessment of pesticides used in integrated and organic production of oranges in the *Comunidad Valenciana*, Spain. Chemosphere **82**, 956-962.
- Jursik M, Holec J, Andr J**. 2009. Biology and control of another important weeds of the Czech Republic: cornflower (*Centaurea cyanus* L.). Listy Cukrovarnické a Řepářské **125**, 90-93.
- Kafarski P, Lejczak B, Forlani G**. 2000. Biodegradation of pesticides containing carbon to phosphorus bond. In: Pesticide biotransformation in plants and microorganisms. Similarities and divergencies, 145-163.
- Kant P, Gordon M, Kant S, Zolla G, Davydov O, Heimer YM, Chalifa-Caspi V, Shaked R, Barak S**. 2008. Functional-genomics-based identification of genes that regulate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. Plant, Cell and Environment **31**, 697-714.
- Kasai F, Takamura N, Hatakeyama S**. 1993. Effects of simetryne on growth of various freshwater algal taxa. Environmental Pollution **79**, 77-83.
- Kawakami A, Sato Y, Yoshida M**. 2008. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. Journal of Experimental Botany **59**, 793-802.
- Kleijn D, Snoeijs GJ**. 1997. Field boundary vegetation and the effects of agro-chemical drift: Botanical change caused by low levels of herbicide and fertilizer. Journal of Applied Ecology **34**, 1413-1425.
- Kloppel, H, W Kordel, and J Haider**. 1994. Herbicides in surface runoff: a rainfall simulation study on small plots in the field. Chemosphere **28**, 649-662.
- Knauert S, Escher B, Singer H, Hollender J, Knauer K**. 2008. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. Environmental Science and Technology **42**, 6424-6430.
- Köhler HR, Triebkorn R**. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science **341**, 759-765.
- Kolbas A, Mench M, Herzig R, Nehnevajova E**. 2009. Potential use of sunflower for the phytoremediation of Cu-contaminated soils at a wood treatment site. In: Uptake, sequestration

- and detoxification, an integrated approach. COST Action **859**, 56-57.
- Komárek M, Čadková E, Chrastný V, Bordas F, Bollinger JC.** 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* **36**, 138-151.
- Kookana RS, Baskaran S, Naidu R.** 1998. Pesticide fate and behavior in australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review. *Australian Journal of Soil Research* **36**, 715-764.
- Koskinen WC, Cox L, Yen P.** 2001. Changes in sorption/bioavailability of imidacloprid metabolites in soil with incubation time. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 546-550.
- Kötschau A, Büchel G, Einax JW, von Tümppling W, Merten D.** 2014. Sunflower (*Helianthus annuus*): phytoextraction capacity for heavy metals on a mining-influenced area in Thuringia, Germany. *Environmental Earth Science* **72**, 2023-2031.
- Kreslavski VD, Lankin AV, Vasilyeva GK, Luybimov VY, Semenova GN, Schmitt FJ, Friedrich T, Allakhverdiev SI.** 2014. Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **81**, 135-142.
- Kretschmann A, Ashauer R, Hitzfeld K, Spaak P, Hollender J, Escher BI.** 2011. Mechanistic toxicodynamic model for receptor-mediated toxicity of diazoxon, the active metabolite of diazinon, in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* **45**, 4980-4987.
- Krutz LJ, Senseman SA, Zablotowicz RM, Matocha MA.** 2005. Reducing herbicide runoff from agricultural fields with vegetative filter strips: a review. *Weed Science* **53**, 353-367.
- Kummerová M, Kmentová E.** 2004. Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* **56**, 387-393.
- Kummerová M, Váňová L, Krulová J, Zezulka Š.** 2008. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere* **71**, 2050-2059.
- Kurt-Karakus PB, Teixeira C, Small J, Muir D, Bidleman TF.** 2011. Current-use pesticides in inland lake waters, precipitation, and air from Ontario, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**, 1539-1548.
- Lacas JG, Voltz M, Gouy V, Carluet N, Gril JJ.** 2005. Using grassed strips to limit pesticide transfer to surface water: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 253-266.
- Lachambre M, Fisson C.** 2007. La contamination chimique: quel risque en estuaire de Seine? Fiche Substance: Introduction Pesticides. Groupement D'intérêt Public, Seine Aval. 6pp.
- Lagator M, Vogwill T, Mead A, Colegrave N, Neve P.** 2013. Herbicide mixtures at high doses slow the evolution of resistance in experimentally evolving populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytologist* **198**, 938-945.
- Lamb DC, Cannieux M, Warrilow AGS, Bak S, Kahn RA, Manning NJ, Kelly DE, Kelly SL.** 2001. Plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase affinity for azole fungicides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**, 845-849.
- Lamberth C, Jeanmart S, Luksch T, Plant A.** 2013. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science* **341**, 742-746.
- Lambrechts T, de Braekeleer C, Fautsch V, Iserentant A, Rentmeesters G, Lutts S, Bielders CL.** 2014a. Can vegetative filter strips efficiently trap trace elements during water erosion events? A flume experiment with contaminated sediments. *Ecological Engineering* **68**, 60-64.
- Lambrechts T, François S, Lutts S, Muñoz-Carpena R, Bielders CL.** 2014b. Impact of plant

- growth and morphology and of sediment concentration on sediment retention efficiency of vegetative filter strips: Flume experiments and VFSSMOD modeling. *Journal of Hydrology* **511**, 800-810.
- Leaper C, Holloway PJ.** 2000. Adjuvants and glyphosate activity. *Pest Management Science* **56**, 313-319.
- Lee H, Rustgi S, Kumar N, Burke I, Yenish JP, Gill KS, von Wettstein D, Ullrich SE.** 2011. Single nucleotide mutation in the barley *acetohydroxy acid synthase (AHAS)* gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **108**, 8909-8913.
- Lee KH, Isenhardt TM, Schultz RC, Mickelson SK.** 2000. Multispecies riparian buffers trap sediment and nutrients during rainfall simulations. *Journal of Environmental Quality* **29**, 1200-1205.
- Lerbs W, Stock M, Parthier B.** 1990. Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes* sp. strain GL. *Archives of Microbiology* **153**, 146-150.
- Levins, R.** 1968. *Evolution in changing environments: some theoretical explorations* (N° 2). Ed: Princeton University Press. 123pp.
- Li B, Adviser-Dewey C.** 2013. Computational analysis of RNA-seq data in the absence of a known genome. PhD Thesis. University of Wisconsin at Madison Madison, WI, USA.
- Li H, Sheng G, Sheng W, Xu O.** 2002. Uptake of trifluralin and lindane from water by ryegrass. *Chemosphere* **48**, 335-341.
- Li J, Zhou B, Shao J, Yang Q, Liu Y, Cai W.** 2007. Influence of the presence of heavy metals and surface-active compounds on the sorption of bisphenol a to sediment. *Chemosphere* **68**, 1298-1303.
- Li KB, Cheng JT, Wang XF, Zhou Y, Liu WP.** 2008 Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. *Pedosphere* **18**, 265-272.
- Li W, Zhang M, Shu H.** 2005. Distribution and fractionation of copper in soils of apple orchards. *Environmental Science and Pollution Research* **12**, 168-172.
- Lichtenthaler H, Wellburn A.** 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts indifferent solvents. *Biochemical Society Transactions* **603**, 591-592.
- Lin CH, Lerch RN, Garrett HE, George MF.** 2004. Incorporating forage grasses in riparian buffers for bioremediation of atrazine, isoxaflutole and nitrate in Missouri. *Agroforestry systems* **63**, 91-99.
- Lin CH, Lerch RN, Goyne KW, Garrett HE.** 2011a. Reducing herbicides and veterinary antibiotics losses from agroecosystems using vegetative buffers. *Journal of Environmental Quality* **40**, 791-799.
- Lin CH, Lerch RN, Kremer RJ, Garrett HE.** 2011b. Stimulated rhizodegradation of atrazine by selected plant species. *Journal of Environment Quality* **40**, 1113-1121.
- Lipok J, Studnik H, Gruyaert S.** 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**, 1681-1688.
- Liu H, Weisman D, Ye Y, Cui B, Huang Y, Colón-Carmona A, Wang Z.** 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **176**, 375-382.



- Liu X, Zhang X, Zhang M.** 2008. Major factors influencing the efficacy of vegetated buffers on sediment trapping: a review and analysis. *Journal of Environmental Quality* **37**, 1667-1674.
- Liu Y, Tam NFY, Guan Y, Yasojima M, Zhou J, Gao B.** 2011. Acute toxicity of nonylphenols and bisphenol A to the embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* **20**, 1233-1245.
- Livingston DP 3rd, Hinch DK, Heyer AG.** 2009. Fructan and its relation ship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2007-2023.
- Loewe S, Muischnek H.** 1926. Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **114**, 313-326.
- Loewus FA.** 1988. Ascorbic acid and its metabolic products. In: *The biochemistry of plants*, Vol. 14. Ed: Carbohydrates Boca Raton, Academic Press, New York, 85-107.
- Londo JP, McKinney J, Schwartz M, Bollman M, Sagers C, Watrud L.** 2014. Sub-lethal glyphosate exposure alters flowering phenology and causes transient male-sterility in *Brassica* spp. *BMC Plant Biology* **14**, 70.
- López-Blanco C, Gómez-Álvarez S, Rey-Garrote M, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J.** 2005. Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME-GC in natural water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**, 557-561.
- López-Pérez GC, Arias-Estévez M, López-Periago E, Soto-González B, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J.** 2006. Dynamics of pesticides in potato crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1797-1803.
- Lorraine-Colwill DF, Powles SB, Hawkes TR, Hollinshead PH, Warner SAJ, Preston C.** 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **74**, 62-72.
- Lothier J, Van Laere A, Prud'homme MP, Van den Ende W, Morvan-Bertrand A.** 2014. Cloning and characterization of a novel fructan 6-exohydrolase strongly inhibited by sucrose in *Lolium perenne*. *Planta* **240**, 629-643.
- Luo S, Levine RL.** 2008. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *The FASEB Journal* **23**, 464-472.
- Lydy M, Belden J, Wheelock C, Hammock B, Denton D.** 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecology and Society* **9**, 1.
- Maila MP, Cloete TE.** 2004. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **3**, 349-360.
- Mamy L, Barriuso E.** 2007. Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *European Journal of Soil Science* **58**, 174-187.
- Marcheterre L, Choudry GG, Webster GRC.** 1988. Environmental photochemistry of herbicides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **10**, 61-126.
- Margni M, Rossier D, Crettaz P, Jolliet O.** 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **93**, 379-392.
- Marrs RH, Frost AJ.** 1997. A microcosm approach to the detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management* **50**, 369-388.
- Marshall G, Kirkwood RC, Martin DJ.** 1987. Studies on the mode of action of asulam, aminotriazole and glyphosate on *Equisetum arvense* L. (field horsetail). II: the metabolism of [ $^{14}\text{C}$ ]asulam, [ $^{14}\text{C}$ ]aminotriazole and [ $^{14}\text{C}$ ]glyphosate. *Pesticide Science* **18**, 65-77.

- Matysik J, Alia , Bhalu B, Mohanty P.** 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* **82**, 525-532.
- Mc Farlane JC.** 1995. Anatomy and physiology of plant conductive systems. In: *Plant contamination - Modeling and stimulation of organic chemical processes*. Ed: Lewis Boca Raton, Florida, 38-68.
- McAllister RS, Haderlie LC.** 1985. Translocation of  $^{14}\text{C}$ -glyphosate and  $^{14}\text{CO}_2$ -labeled photoassimilates in Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Weed Science* **33**, 153-159.
- McCahon CP, Pascoe D.** 1990. Episodic pollution: causes, toxicological effects and ecological significance. *Functional Ecology* **4**, 375-383.
- McMahon TA, Halstead NT, Johnson S, Raffel TR, Romansic JM, Crumrine PW, Rohr JR.** 2012. Fungicide-induced declines of freshwater biodiversity modify ecosystem functions and services. *Ecology Letters* **15**, 714-722.
- McMillan BJ, Bradfield CA.** 2007. The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Molecular Pharmacology* **72**, 487-498.
- Medina VF, Maestri E, Marmiroli M, Dietz AC, McCutcheon SC.** 2003. Plant tolerances to contaminants. In: *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Ed: Wiley-Interscience Inc., New Jersey, 189-232.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M.** 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Mench M, Bes C.** 2009. Assessment of ecotoxicity of topsoils from a wood treatment site. *Pedosphere* **19**, 143-155.
- Mench M, Lepp N, Bert V, Schwitzguébel JP, Gawronski SW, Schröder P, Vangronsveld J.** 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* **10**, 1039-1070.
- Merrington G, Nfa LW, Parkinson R, Redman M, Winder L.** 2002. Agricultural pollution: environmental problems and practical solutions. Ed: CRC Press. 264pp.
- Mersie W, Seybold C, Tsegaye T.** 1999a. Movement, adsorption, and mineralization of atrazine in two soils with and without switchgrass (*Panicum virgatum*) roots. *European Journal of Soil Science* **50**, 343-349.
- Mersie W, Seybold CA, McNamee C, Huang J.** 1999b. Effectiveness of switchgrass filter strips in removing dissolved atrazine and metolachlor from runoff. *Journal of Environmental Quality* **28**, 816-821.
- Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire.** 2014. Catalogue national des usages phytopharmaceutiques e-phy. [En ligne] <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> [consulté le 10 juin 2014].
- Misra JR, Horner MA, Lam G, Thummel CS.** 2011. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes and Development* **25**, 1796-1806.
- Mitchell CE, Agrawal AA, Bever JD, Gilbert GS, Hufbauer RA, Klironomos JN, et al.** 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecology Letters* **9**, 726-740.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F.** 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.



- Møller IM.** 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology* **52**, 561-591.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A.** 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-481.
- Monbet P.** 2004. Dissolved and particulate fluxes of copper through the Morlaix river estuary (Brittany, France): mass balance in a small estuary with strong agricultural catchment. *Marine Pollution Bulletin* **48**, 78-86.
- Mrozik A, Piotrowska-Seget Z, Łabużek.** 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* **12**, 15-25.
- Munkegaard M, Abbaspour M, Cedergreen N.** 2008. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. *Ecotoxicology* **17**, 29-35.
- Muñoz-Carpena R, Parsons JE, Gilliam JW.** 1999. Modeling hydrology and sediment transport in vegetative filter strips. *Journal of Hydrology* **214**, 111-129.
- Muñoz-Carpena R, Zajac Z, Kuo YM.** 2007. Global sensitivity and uncertainty analysis of the water quality model VFSMOD-W. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* **50**, 1719-1732.
- Murphy A, Taiz L.** 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes (correlation with copper tolerance). *Plant Physiology* **109**, 945-954.
- Nandula VK, Poston DH, Eubank TW, Koger CH, Reddy KN.** 2007. Differential response to glyphosate in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations from Mississippi. *Weed Technology* **21**, 477-482.
- Negri MC, Gatliff EG, Quinn JJ, Hinchman RR.** 2004. Root development and rooting at depths. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*, Eds: McCutcheon SC and JL Schnoor, 233-262.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**, 1251-1263.
- Nobels I, Spanoghe P, Haesaert G, Robbens J, Blust R.** 2011. Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *PLoS One* **6**, e24139.
- Noctor G, Arisi AC, Jouanin L, Foyer CH.** 1998a. Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiology* **118**, 471-482.
- Noctor G, Arisi AC, Jouanin L, Kunert KL, Rennenberg H, Foyer CH.** 1998b. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* **49**, 623-647.
- Noctor G, Foyer CH.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, MarquezGarcia B, Queval G, Foyer CH.** 2012. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant Cell Environment* **35**, 454-484.
- Noctor G, Lelarge-Trouverie, C, Mhamdi A.** 2014. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*. doi:10.1016/j.phytochem.2014.09.002.

- Note réglementaire**, Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. 2006. Tébuconazole REG2006-11. 130pp.
- Nsanganwimana F, Pourrut B, Mench M, Douay F**. 2014. Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *Journal of Environmental Management* **143**, 123-134.
- Nyström B, Björnsäter B, Blanck H**. 1999. Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms: growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. *Aquatic toxicology* **47**, 9-22.
- Obata T, Fernie AR**. 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3225-3243.
- ORP**, Observatoire des Résidus de Pesticides, ANSES. 2010. Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Rapport scientifique. 354pp.
- ORP**, Observatoire des Résidus de Pesticides, ANSES. 2014. [En ligne] <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/> [consulté le 10 juin 2014].
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP**. 2013. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **64**, 445-458.
- Otto S, Vianello M, Infantino A, Zanin G, Di Guardo A**. 2008. Effect of a full-grown vegetative filter strip on herbicide runoff: Maintaining of filter capacity over time. *Chemosphere* **71**, 74-82.
- Otto S, Cardinali A, Marotta E, Paradisi C, Zanin G**. 2012. Effect of vegetative filter strips on herbicide runoff under various types of rainfall. *Chemosphere* **88**, 113-119.
- Ouvrard S, Barnier C, Bauda P, Beguiristain T, Biache C, Bonnard M, Caupert C, et al.** 2011. *In situ* assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management. *International Journal of Phytoremediation* **13**, 245-263.
- Ozgur R, Turkan I, Uzilday B, Sekmen AH**. 2014. Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1377-1390.
- Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S**. 2009. Nature and prevalence of non-additive toxic effects in industrially relevant mixtures of organic chemicals. *Chemosphere* **75**, 1429-1439.
- Passeport E, Benoit P, Bergheaud V, Coquet Y, Tournebize J**. 2011. Epoxiconazole degradation from artificial wetland and forest buffer substrates under flooded conditions. *Chemical Engineering Journal* **173**, 760-765.
- Paterson KG, Schnoor, JL**. 1992. Fate of alachlor and atrazine in a riparian zone field site. *Water Environment Research* **64**, 274-283.
- Patty L, Real B, Gril JJ**. 1997. The use of grassed buffer strips to remove pesticides, nitrate and soluble phosphorus compounds from runoff water. *Pesticide Science* **49**, 243-251.
- Pätzold S, Klein C, Brümmer GW**. 2007. Run-off transport of herbicides during natural and simulated rainfall and its reduction by vegetated filter strips. *Soil Use and Management* **23**, 294-305.
- Patzoldt WL, Tranel PJ, Hager AG**. 2002. Variable herbicide responses among Illinois waterhemp (*Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus*) populations. *Crop Protection* **21**, 707-712.

- Pavis N, Chatterton NJ, Harrison PA, Baumgartner S, Praznik W, Boucaud J, Prud'Homme MP.** 2001. Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **150**, 83-95.
- Pavlovic E, Masarovicová K, Kralová J, Kubová.** 2006. Response of chamomile plants (*Matricaria recutita* L.) to cadmium treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **77**, 763-771.
- Peleg Z, Blumwald E.** 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 290-295.
- Penninckx M.** 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stress. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 737-742.
- Peshev D, Vergauwen R, Moglia A, Hideg É, Van den Ende W.** 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* **64**, 1025-1038.
- Petit C, Bay G, Pernin F, Délye C.** 2010a. Prevalence of cross-or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. *Pest Management Science* **66**, 168-177.
- Petit C, Duhieu B, Boucansaud K, Délye C.** 2010b. Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate-synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds. *Plant Science* **178**, 501-509.
- Pflieger M.** 2009. Etude de la dégradation photochimique des pesticides adsorbés à la surface de particules atmosphériques. Thèse de Doctorat. Université de Provence, France.
- Pichon V.** 2000. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A* **885**, 195-215.
- Pichtel J, Salt CA.** 1998. Vegetative growth and trace metal accumulation on metalliferous wastes. *Journal of Environmental Quality* **27**, 618-624.
- Pilon-Smits E.** 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 15-39.
- Pimentel D, Levitan L.** 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *BioScience* **36**, 86-91.
- Pimentel D.** 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **8**, 17-29.
- Pizzutti I, De Kok A, Hiemstra M, Wickert C, Prestes O.** 2009. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4539-4552.
- Poli P, de Mello MA, Buschini A, de Castro VL, Restivo FM, Rossi C, Zucchi TM.** 2003. Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* **540**, 57-66.
- Pollock CJ.** 1984. Sucrose accumulation and the initiation of fructan biosynthesis in *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* **96**, 527-534.
- Pollock CJ, Cairns AJ.** 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 77-101.
- Power AG.** 2010. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 2959-2971.

- Powles SB, Yu Q.** 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 317-347.
- Prasad MNV, Strzalka K.** 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. In *Heavy metal stress in plants*. Ed: Springer Berlin Heidelberg, 117-138.
- Prud'homme MP, Gonzalez B, Billard JP, Boucaud J.** 1992. Carbohydrate content, fructan and sucrose enzyme activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne* L.) as affected by source/sink modification after cutting. *Journal of Plant Physiology* **140**, 282-291.
- Ramade F.** 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Ed : Dunod. 550pp.
- Rama-Krishna K, Philip L.** 2008. Adsorption and desorption characteristics of lindane, carbofuran and methyl parathion on various Indian soils. *Journal of Hazardous Materials* **160**, 559-567.
- Ramel F, Sulmon C, Cabello-Hurtado F, Taconnat L, Martin-Magniette M-L, Renou J-P, El Amrani A, Couée I, Gouesbet G.** 2007. Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in *Arabidopsis thaliana*: novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance. *BMC Genomics* **8**, 450.
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G.** 2009a. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology* **9**, 28.
- Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G et Couée I.** 2009b. Natural variation reveals significant integration of carbohydrate nutritional status and acclimation to xenobiotic stress in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *Annals of Botany* **104**, 1323-1337.
- Ramel F, Sulmon C, Serra AA, Gouesbet G, Couée I.** 2012. Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3999-4014.
- Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I.** 2013. Regulatory effects of atrazine differentially override sucrose repression of amino acid catabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 2329-2337.
- Rapport d'évaluation FAO.** 2011. Tébuconazole. Evaluation de la JMPR. 307-330.
- Rathore HS, Nollet LM.** 2012. Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution. Ed: CRC Press. 659pp
- RECORD.** 2011. Mélange de polluants, toxicité, écotoxicologie et évaluation des risques. Synthèse Etude N° 08-0668/1A. 10pp.
- Reddy KN, Rimando AM, Duke SO.** 2004. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5139-5143.
- Reddy KN, Rimando AM, Duke SO, Nandula VK.** 2008. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2125-2130.
- Reichenberger S, Bach M, Skitschak A, Frede HG.** 2007. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness: A review. *Science of the Total Environment* **384**, 1-35.
- Ren X, Liu T, Dong J, Sun L, Yang J, Zhu Y, Jin Q.** 2012. Evaluating de Bruijn graph assemblers on 454 transcriptomic data. *PLoS One* **7**, e51188.
- Rennenberg H.** 1982. Glutathione metabolism and possible role in higher plants. *Phytochemistry* **21**, 2771-2781.

- Reubens B, Poesen J, Danjon F, Geudens G, Muys B.** 2007. The role of fine and coarse roots in shallow slope stability and soil erosion control with a focus on root system architecture: a review. *Trees* **21**, 385-402.
- Rezek J, in der Wiesche C, Mackova M, Zadrazil F, Macek T.** 2008. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere* **70**, 1603-1608.
- Rhind SM.** 2009. Anthropogenic pollutants: a threat to ecosystem sustainability? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 3391-3401.
- Rial-Otero R, Cancho Grande B, Arias Estévez M, López Periago E, Simal Gándara J.** 2003. Procedure for the measurement of soil inputs of plant-protection agents washed off through vineyard canopy by rainfall. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5041-5046.
- Riechers DE, Kreuz K, Zhang Q.** 2010. Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. *Plant Physiology* **153**, 3-13.
- Roba C, Jimenez C, Baciú C, Beldean-Galea S, Levei E, Cordos E.** 2011. Assessment of different sorbents efficiency for solid phase extraction of aquatic humic acids. *Central European Journal of Chemistry* **9**, 598-604.
- Robert P, Escoufier Y.** 1976. A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV-coefficient. *Applied Statistics* **25**, 257-265.
- Rojano-Delgado AM, Ruiz-Jiménez J, De Castro MDL, De Prado R.** 2010. Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptiometric detection. *Electrophoresis* **31**, 1423-1430.
- Roumet C, Lafont F, Sari M, Warembourg F, Garnier E.** 2008. Root traits and taxonomic affiliation of nine herbaceous species grown in glasshouse conditions. *Plant and Soil* **312**, 69-83.
- Royal Society of Chemistry.** 2014. ChemSpider. [En ligne] <http://www.chemspider.com/> [consulté le 10 juin 2014].
- Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer J, Marvel JT.** 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**, 517-528.
- Sabbagh GJ, Fox GA, Kamanzi A, Roepke B, Tang JZ.** 2009. Effectiveness of vegetative filter strips in reducing pesticide loading: quantifying pesticide trapping efficiency. *Journal of Environment Quality* **38**, 762-771.
- Sabbagh GJ, Muñoz-Carpena R, Fox GA.** 2013. Distinct influence of filter strips on acute and chronic pesticide aquatic environmental exposure assessments across U.S. EPA scenarios. *Chemosphere* **90**, 195-202.
- Sabik H, Jeannot R, Rondeau B.** 2000. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of chromatography A* **885**, 217-236.
- Sajjaphan K, Shapir N, Judd AK, Wackett LP, Sadowsky MJ.** 2002. Novel *psbA1* gene from a naturally occurring atrazine-resistant cyanobacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1358-1366.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I.** 1998. Phytoremediation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 643-668.
- Sandberg CL, Meggitt WF, Penner D.** 1980. Absorption, translocation and metabolism of  $^{14}\text{C}$ -



- glyphosate in several weed species. *Weed Research* **20**, 195-200.
- Sander mann H.** 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 82-84.
- Sander mann H.** 2004. Molecular ecotoxicology of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 406-413.
- Santner A, Estelle M.** 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* **459**, 1071-1078.
- Santner A, Estelle M.** 2010. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant Journal* **61**, 1029-1040.
- Santos FJ, Galceran MT.** 2002. The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **21**, 672-685
- Scandalios JG.** 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 995-1014.
- Schiavon M.** 1988. Studies of the movements and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives and of hydroxyatrazine in soil, using  $^{14}\text{C}$ -ring labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **15**, 55-61.
- Schmitt TJ, Dosskey MG, Hoagland KD.** 1999. Filter strip performance and processes for different vegetation, widths, and contaminants. *Journal of Environmental Quality* **28**, 1479-1489.
- Schmitz J, Schäfer K, Brühl CA.** 2013. Agrochemicals in field margins - assessing the impacts of herbicides, insecticides, and fertilizer on the common buttercup (*Ranunculus acris*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**, 1124-1131.
- Schnoor JL.** 1997. Phytoremediation. Technology Evaluation Report TE-98-01. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. 37pp.
- Schreiber L.** 2005. Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany* **95**, 1069-1073.
- Schröder P, Collins C.** 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* **4**, 247-265
- Schuette J.** 1998. Environmental Fate of Glyphosate. Environmental Monitoring And Pest Management. 13pp.
- Schwitzguébel JP, Comino E, Plata N, Khalvati M.** 2011. Is phytoremediation a sustainable and reliable approach to clean-up contaminated water and soil in Alpine areas? *Environmental Science and Pollution Research* **18**, 842-856.
- Seinfeld JH, Pandis SN.** 1998. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change (2nd Edition). Ed: John Wiley and Sons. 1232pp.
- Serra AA, Nuttens A, Larvor V, Renault D, Couée I, Sulmon C, Gouesbet G.** 2013. Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2753-2766.
- Seybold C, Mersie W, Delorem D.** 2001. Removal and degradation of atrazine and metolachlor by vegetative filter strips on clay loam soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **32**, 723-737.
- Shah PV, Tasheva M.** 2008. Triazole fungicide metabolites. Pesticide residues in food. Toxicological evaluations (Part II). 437-490.



- Sharma YK, Davis KR.** 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine* **2**, 480-488.
- Shaw LJ, Burns RG.** 2004. Enhanced mineralization of [U-<sup>14</sup>C] 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in soil from the rhizosphere of *Trifolium pratense*. *Applied and environmental microbiology* **70**, 4766-4774.
- Shen B, Jensen RC, Bohnert HJ.** 1997a. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology* **113**, 1177-1183.
- Shen B, Jensen RC, Bohnert HJ.** 1997b. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* **115**, 527-532.
- Shipitalo MJ, Malone RW, Owens LB.** 2008. Impact of glyphosate-tolerant soybean and glufosinate-tolerant corn production on herbicide losses in surface runoff. *Journal of Environment Quality* **37**, 401-408.
- Shore RF, Crocker DR, Akcakaya HR, Bennett RS, Chapman PF, Clook M, Crane M, et al.** 2005. Case study part 1: how to calculate appropriate deterministic long-term toxicity to exposure ratios (TERs) for birds and mammals. *Ecotoxicology* **14**, 877-893.
- Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R.** 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* **132**, 199-208.
- Siedlecka A, Baszyński T.** 1993. Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiologia Plantarum* **87**, 199-202.
- Singh BK, Walker A.** 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 428-471.
- Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Forzani C, Hirt H, Vangronsveld J, Cuypers A.** 2013. The role of the kinase OXI1 in cadmium-and copper-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **36**, 1228-1238.
- Smith D.** 1967. Carbohydrates in grasses. II. Sugar and fructosan composition of the stem bases of brome grass and timothy at several growth stage, and in different plant parts at anthesis. *Crop Science* **7**, 62-70.
- Smith J, Potts P, Eggleton P.** 2008. The value of sown grass margins for enhancing soil macrofaunal biodiversity in arable systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **127**, 119-125.
- Sørensen H, Cedergreen N, Skovgaard IM, Streibig JC.** 2007. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics* **14**, 383-397.
- Spark KM, Swift RS.** 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Science of the Total Environment* **298**, 147-161.
- Sprague JB.** 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research* **4**, 3-32.
- Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne JLCM, Svendsen C, Swain S, Stürzenbaum SR.** 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of the Total Environment* **408**, 3725-3734.
- Stoate C, Boatman ND, Borralho RJ, Carvalho CR, De Snoo GR, Eden P.** 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* **63**, 337-365.

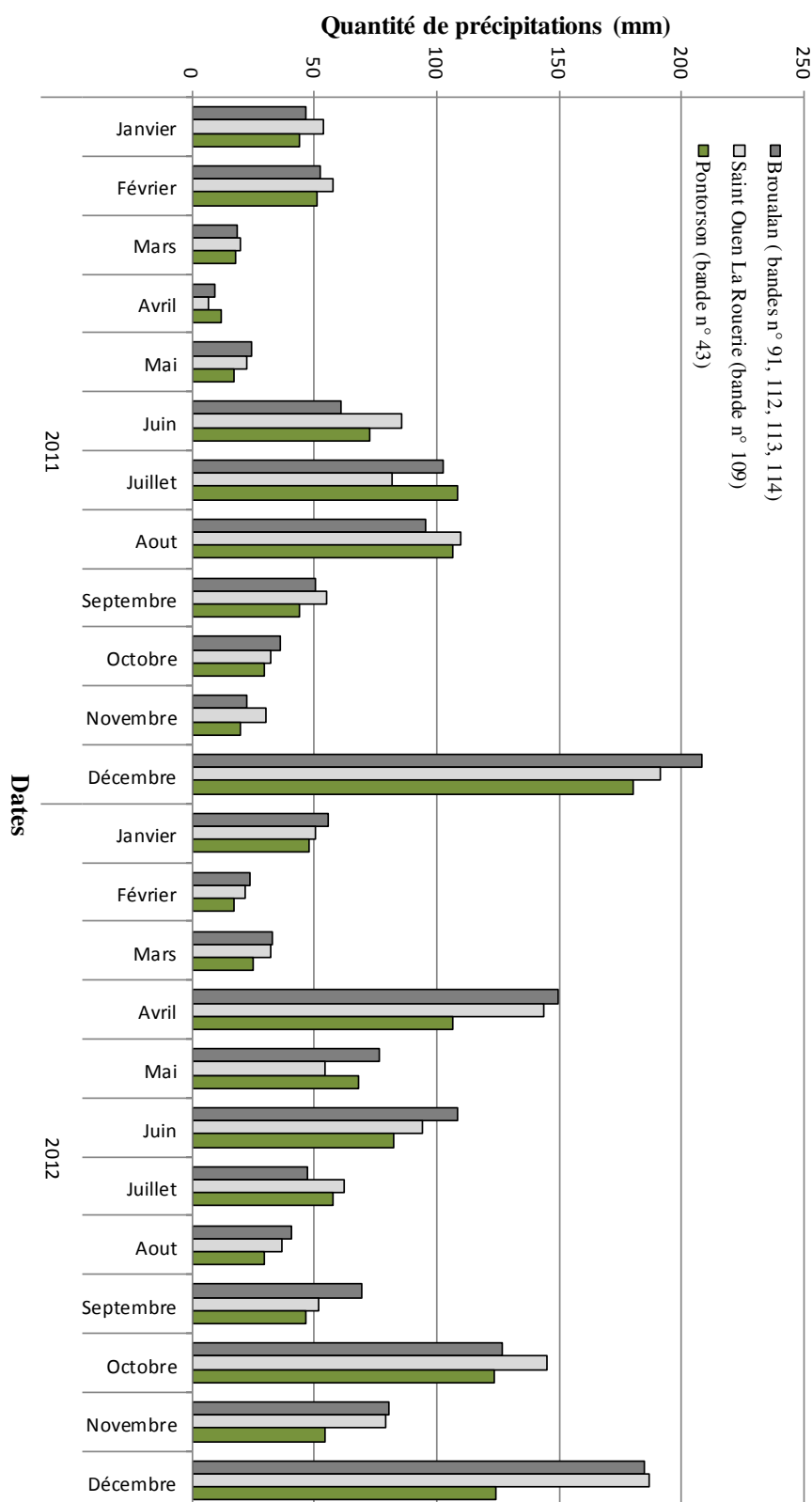
- Studer B, Byrne S, Nielsen RO, Panitz F, Bendixen C, Islam MS, Pfeifer M, Lübberstedt T, Asp T.** 2012. A transcriptome map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC genomics* **13**, 140.
- Sulmon C, Gouesbet G, Couée I, El Amrani A.** 2004. Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. *Plant Science* **167**, 913-923.
- Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A, Couée I.** 2006. Sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis* seedlings involves activation of oxidative and xenobiotic stress responses. *Plant Cell Reports* **25**, 489-498.
- Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A, Couée I.** 2007a. Involvement of the ethylene-signalling pathway in sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1083-1092.
- Sulmon C, Gouesbet G, Binet F, Martin-Laurent F, El Amrani A, Couée I.** 2007b. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* **145**, 507-515.
- Sulmon C, Gouesbet G, Ramel F, Cabello-Hurtado F, Penno C, Bechtold N, Couée I, El Amrani A.** 2011. Carbon dynamics, development and stress responses in *Arabidopsis*: involvement of the APL4 subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase (starch synthesis). *PLoS One* **6**, e26855.
- Sulmon C, Ramel F, Gouesbet G, Couée I.** 2014. Improvement of environmental remediation by on-site phytoremediating greenhouses. *Environmental Science and Technology* **48**, 6055-6056.
- Susarla S, Medina VF, McCutcheon SC.** 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18**, 647-658.
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R.** 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**, 32-43.
- Syversen N, Bechmann M.** 2004. Vegetative buffer zones as pesticide filters for simulated surface runoff. *Ecological Engineering* **22**, 175-184.
- Székiács A, Darvas B.** 2012. Forty years with glyphosate. *Herbicides-properties, synthesis and control of weeds*. Ed: InTech, Croatia, 247-284.
- Taguchi G, Ubukata T, Nozue H, Kobayashi Y, Takahi M, Yamamoto H, Hayashida N.** 2010. Malonylation is a key reaction in the metabolism of xenobiotic phenolic glucosides in *Arabidopsis* and tobacco: Phenolic-xenobiotics metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**, 1031-1041.
- Tani FH, Barrington S.** 2005. Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environmental Pollution* **138**, 548-558.
- Taylor M, Feyereisen R.** 1996. Molecular biology and evolution of resistance of toxicants. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 719-734.
- Taylor NL, Tan YF, Jacoby RP, Millar AH.** 2009. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *Journal of Proteomics* **72**, 367-378.
- Teixeira MC, Duque P, Sá-Correia I.** 2007. Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends in Biotechnology* **25**, 363-370.

- Tian X, Darmency H.** 2006. Rapid bidirectional allele-specific PCR identification for triazine resistance in higher plants. *Pest Management Science* **62**, 531-536.
- Topp E, Vallaeyes T, Soulas G.** 1997. Pesticides Microbial Degradation and Effects on Microorganisms. *Modern Soil Microbiology*, Eds: Van Elsas, J.D., J.T. Trevors and E.M.H. Wellington, 547-575.
- Trapp S, Matthies M, McFarlane C.** 1994. Model for uptake of xenobiotics into plants: validation with bromacil experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**, 413-422.
- Trebst A, Draber W.** 1978. Structure activity correlations of recent herbicide in photosynthetic reactions. In: *Advance in Pesticide Science*. Ed: Pergamon Press, London. 223pp.
- Tu Y, Rochfort S, Liu Z, Ran Y, Griffith M, Badenhorst P, et al.** 2010. Functional analyses of caffeic acid O-Methyltransferase and Cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant Cell* **22**, 3357-3373.
- UIPP.** 2012. Rapport d'activité 2011-2012. 43pp.
- Ulrich RG.** 2003. The toxicogenomics of nuclear receptor agonists. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 505-510.
- USDA-NRCS.** 2000. Conservation buffers to reduce pesticide losses. USEPA. 21pp.
- Van Breusegem F, Dat JF.** 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* **141**, 384-390.
- Van den Ende W.** 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-11.
- Van der Werf HMG.** 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **60**, 81-96.
- Velini ED, Alves E, Godoy MC, Meschede DK, Souza RT, Duke SO.** 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science* **64**, 489-496.
- Verma JP, Jaiswal DK, Sagar R.** 2014. Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **13**, 429-466.
- Vianello M, Vischetti C, Scarponi L, Zanin G.** 2005. Herbicide losses in runoff events from a field with a low slope: Role of a vegetative filter strip. *Chemosphere* **61**, 717-725.
- Vila-Aiub MM, Balbi MC, Distéfano AJ, Fernández L, Hopp E, Yu Q, Powles SB.** 2012. Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Management Science* **68**, 430-436.
- Vranova E, Van Breusegem F, Dat J, Bells-Boix E, Inzé D.** 2002. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Signal Transduction* **38**, 45-73.
- Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E.** 2002. Determination of triazine and chloroacetanilide herbicides in soils by microwave-assisted extraction (MAE) coupled to gas chromatographic analysis with either GC-NPD or GC-MS. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **50**, 5026-5033.
- Wagner D.** 2004. The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **306**, 1183-1185.
- Wang J, Zhan X, Zhou L, Lin Y.** 2010. Biological indicators capable of assessing thermal treatment efficiency of hydrocarbon mixture-contaminated soil. *Chemosphere* **80**, 837-844.
- Ward JA, Ponnala L, Weber CA.** 2012. Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany* **99**, 267-276.

- Warne MSJ, Hawker DW.** 1995. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **31**, 23-28.
- Watanabe T.** 2002. Transcuticular penetration of foliar-applied pesticides its analysis by a logistic-kinetic penetration model. In: *Herbicide classes in development*. Ed: Springer-Verlag, Berlin, 319-340.
- Waters Corporation.** 2008. Oasis HLB Cartridges.
- Waters Corporation.** 2012. QuEChERS Simplified, DisQuE.
- Wauchope RD, Yeh S, Linders JB, Kloskowski R, Tanaka K, Rubin B, Katayama A, et al.** 2002. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science* **58**, 419-445.
- Weisman D, Alkio M, Colón-Carmona A.** 2010. Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signaling pathways. *BMC Plant Biology* **10**, 59.
- Wendt-Rasch L, Van den Brink PJ, Crum SJH, 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**, 383-398.
- White MJ, Arnold JG.** 2009. Development of a simplistic vegetative filter strip model for sediment and nutrient retention at the field scale. *Hydrological Processes* **23**, 1602-1616.
- Wild A.** 1993. *Soils and the Environment*. Ed: Cambridge University Press. 293pp.
- Xie X, Zhou Q, He Z, Bao Y.** 2010. Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 922-928.
- Yang RY, Tang JJ, Yang YS, Chen X.** 2007. Invasive and non-invasive plants differ in response to soil heavy metal lead contamination. *Botanical Studies* **48**, 453-458.
- Zang Y, Zhong Y, Luo Y, Kong ZM.** 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* **108**, 271-278.
- Zezulka S, Kummerová M, Babula P, Váňová L.** 2013. *Lemna minor* exposed to fluoranthene: growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic Toxicology* **140-141**, 37-47.
- Zimmerman LR, Schneider RJ, Thurman EM.** 2002. Analysis and detection of the herbicides dimethenamid and flufenacet and their sulfonic and oxanilic acid degradates in natural water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1045-1052.

## **~ Annexes ~**

**Annexe 1.** Précipitations en 2011 et 2012 sur le site des bandes enherbées expérimentales de la ZAA (données Météo-France)





**Annexe 2.** Temps de rétention et ions caractéristiques (rapport m/z) des pesticides analysés par GC-MS

Molécule	Temps de rétention (min)	Ion 1	Ion 2
Atrazine	15,35	200	215
Diméthénamide-P	17,03	154	230
Acétochlore	17,15	162	223
S-métolachlore	18,64	162	238
Flufénacet	19,04	151	211
Pendiméthaline	19,92	162	252
Thiaméthoxame	20,01	182	247
Prothioconazole	22,75	125	274
Diflufénican	26,44	266	394
Epoxiconazole	26,95	192	138
Metconazole	28,6	125	250
Prochloraze	32,42	180	308
Cyperméthrine 1	34,03	127	163
Cyperméthrine 2	34,31	127	163
Cyperméthrine 3	34,41	127	163
Cyperméthrine 4	34,53	127	163

**Annexe 3.** Rendement global d'extraction/purification (pourcentage) pour chaque pesticide, obtenu après dopage de sols par un mélange de pesticides à des gammes de concentrations connues

Concentration attendue (µg/mL)	Pourcentage (%) de rendement global d'extraction/purification								
	Atrazine	Thiaméthoxame	Diméthénamide -P	Flufénacet	Acétochlore	S-métolachlore	Epoxiconazole	Metconazole	Prochloraze
<b>0.25</b>	64	64	132,8	<LD	107,9	130,3	44	88	48
<b>0.50</b>	60	120	95,3	<LD	79,9	85,5	77,1	107,8	40
<b>0.75</b>	97,1	66,9	91,1	<LD	76,1	77,7	63,5	69,4	82,6
<b>2.50</b>	80,6	96,1	83,1	84,8	52,1	53,4	38,7	29,8	28,7
<b>5</b>	69,7	71,5	62,9	67,9	44,2	42,7	26,3	20,1	16,3
<b>10</b>	75,9	89,1	75,1	72	53,4	48,5	28,6	22,2	12,5

**Annexe 4.** Moyennes (A) et valeurs d'erreur standard (SEM) (B) des teneurs en chlorophylles des espèces végétales des bandes enherbées expérimentales selon les années (unité arbitraire)

Bande enherbée	Espèce	Ray-grass anglais		Agrostis stolonifère		Trèfle violet		Fleole des prés		Lotier corniculé		Anthemis des teinturiers		Bleuet	
		06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12
		Zone													
91	A	25,11	35,96	33,72	33,18	49,98	40,80	34,15	37,60	51,48	43,25	7,57	NA	29,71	NA
	B	27,90	NA	29,87	NA	45,44	NA	31,04	NA	50,89	NA	8,54	NA	13,65	NA
	C	32,28	41,55	26,66	34,8	50,00	40,75	30,71	35,89	48,04	45,06	7,32	NA	9,24	NA
112	A	39,74	42,62	37,28	35,33	43,74	NA	36,54	43,22	40,67	NA	NA	NA	29,56	NA
	B	42,04	NA	41,14	NA	52,05	NA	38,96	NA	39,60	NA	7,63	NA	17,72	NA
	C	38,88	34,85	38,22	25,02	40,05	NA	36,08	35,46	41,24	NA	10,42	NA	9,42	NA
113	A	43,50	43,84	40,01	42,38	45,88	34,79	40,92	35,69	36,30	44,65	6,16	NA	27,90	NA
	B	41,72	NA	35,24	NA	48,48	NA	31,89	NA	42,09	NA	10,10	NA	29,16	NA
	C	34,32	40,96	33,48	35,22	43,77	34,80	29,69	40,05	47,33	41,12	7,18	NA	31,38	NA
114	A	37,18	43,35	35,76	35,58	45,92	52,45	40,67	43,66	41,24	40,78	6,60	NA	16,13	NA
	B	35,53	NA	34,54	NA	55,22	NA	40,38	NA	45,61	NA	8,10	NA	19,54	NA
	C	39,60	44,01	32,10	41,4	49,90	39,53	41,80	43,07	44,75	38,41	9,09	NA	18,80	NA
43	A	33,80	NA	29,79	NA	48,86	NA	33,34	NA	45,86	NA	11,92	NA	26,91	NA
	B	29,14	NA	29,53	NA	51,07	NA	31,16	NA	44,80	NA	10,33	NA	16,40	NA
	C	30,45	NA	30,15	NA	47,90	NA	35,06	NA	47,30	NA	11,72	NA	23,04	NA
109	A	35,83	37,16	29,94	38,82	48,31	NA	34,96	41,18	42,08	NA	18,26	NA	40,04	NA
	B	37,93	NA	35,75	NA	47,66	NA	30,31	NA	44,55	NA	16,38	NA	28,63	NA
	C	38,70	40,1	31,08	37,93	48,10	NA	29,96	43,21	38,68	NA	32,65	NA	26,38	NA

Bande enherbée	Espèce	Ray-grass anglais		Agrostis stolonifère		Trèfle violet		Fleole des prés		Lotier corniculé		Anthemis des teinturiers		Bleuet	
		06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12	06/11	06/12
		Zone													
91	A	6,49	4,93	2,67	2,77	1,55	3,47	1,7	0,73	2,64	2,62	1,78	NA	2,41	NA
	B	1,19	NA	1,46	NA	3,8	NA	1,6	NA	2,47	NA	1,45	NA	4,94	NA
	C	1,04	2,89	1,21	3,91	2,26	2,56	3,71	2,18	3,21	1,44	1,2	NA	5,78	NA
112	A	1,05	1,91	1,91	3,8	3,45	NA	1,95	1,36	1,65	NA	NA	NA	1,83	NA
	B	1,65	NA	1,51	NA	3,45	NA	1,8	NA	1,17	NA	3,5	NA	7,36	NA
	C	4,07	1,85	1,47	1,09	11,98	NA	1,29	3,77	4,14	NA	3,31	NA	5,84	NA
113	A	4,46	1,74	1,22	0,92	2,81	1,45	1,64	1,39	9,18	1,95	1,91	NA	6,55	NA
	B	2,5	NA	2,39	NA	2,49	NA	0,93	NA	2,28	NA	1,95	NA	3,10	NA
	C	4,47	0,64	2,82	1,75	1,55	1,26	2,53	2,44	3,34	2,27	0,85	NA	1,88	NA
114	A	2,06	2,21	2,42	1,33	2,46	1,37	2,48	1,27	1,95	1,40	2,08	NA	4,10	NA
	B	2,22	NA	3,61	NA	1,44	NA	2,57	NA	2,99	NA	2,11	NA	4,02	NA
	C	1,26	1,64	1,94	3,73	2,01	0,78	3,49	3,06	1,61	2,57	0,74	NA	2,43	NA
43	A	1,89	NA	1,33	NA	0,73	NA	1,67	NA	1,69	NA	1,45	NA	1,84	NA
	B	3,27	NA	1,22	NA	2,58	NA	2,23	NA	1,23	NA	0,99	NA	1,76	NA
	C	2,81	NA	2,41	NA	2,79	NA	1,66	NA	2,19	NA	1,0	NA	1,45	NA
109	A	1,66	5,59	0,7	2,61	1,97	NA	1,08	1,78	2,05	NA	1,81	NA	3,78	NA
	B	1,05	NA	0,93	NA	0,44	NA	0,34	NA	1,35	NA	2,98	NA	1,20	NA
	C	0,82	NA	2,96	3,96	1,53	NA	2,61	2,79	1,46	NA	1,42	NA	2,83	NA

## Annexe 5. Liste des 500 pesticides recherchés dans la biomasse végétale par le laboratoire d'analyse phytosanitaire Phytocontrol (Nîmes)

Pesticides		
Multirésidus GC 250		
2-Phenylphenol*	Diallate	Fluvalinate (Tau)
3,4-dichloroaniline	Diazinon	Folpet
Acephate	Dichlobenil	Fonofos*
Acetochlore	Dichlofenthion*	Formothion
Acibenzolar-S-methyl	Dichlofluanide	Furalaxyl
Acionifen	Dichlorvos	Furathiocarbe
Acrinathrine	Diclofop-methyl*	Haloxypop-2-ethoxyethyl
Alachlore	Dicofol(Σ des isomères)	Haloxypop-methyl(R+S)
Ametryn	Dieldrin(+Aldrin)	HCB*
Atrazine	Diethofencarb	HCH gamma
Benalaxyl dont Benalaxyl-M*	Difenoconazole*	HCH(α+β+δ)*
Bendiocarb	Diflufenican	Heptachlore(+epoxyde)
Benfluraline	Dimetachlor	Heptenophos
Benoxacor	Dinitramine	Hexaconazole
Bifenox	Diphenylamine*	Hexazinone
Bifenthrine*	Disulfoton	Iodofenphos
Biphenyl	Ditalimfos	Iprodione
Bitertanol*	Edifenphos	Isobenzan
Bromacil	Endosulfan (α+β+sulfate)	Isodrine
Bromocyclen	Endrin	Isofenphos-ethyl
Bromophos-ethyl	Endrin-ketone	Isofenphos-methyl*
Bromophos-methyl	EPN	Isoxadifen-ethyl
Bromopropylate*	EPTC	Isoxaflutole
Butachlor	Ethalfuraline	Malathion(+Malaoxon)*
Butraline	Ethiofencarb	Mepanipyrim*
Captafol	Ethion	Mepronil*
Captan	Ethofumesate	Metalaxyl dont Metalaxyl-M
Carbaryl	Ethoprophos*	Metazachlor
Carbofuran(+3-hydroxy)	Ethoxyquine	Methacrifos
Carbophenothion	Etofenprox	Methamidophos
Carfentrazone-ethyl*	Etridiazole	Methidathion
Chlorbenside	Etrinfos	Methiocarbe
Chlordane(cis+trans)	Famoxadone	Methoxychlore
Chlorfenapyr	Famphur	Metolachlore dont S-Metolachlor
Chlorfenson	Fenamiphos	Metribuzine
Chlorfenvinphos*	Fenarimol*	Mevinphos
Chlorobenzilate*	Fenazaquin	Mirex*
Chlorothalonil	Fenchlorphos(+oxon)*	Monalide
Chlorprophame(+3-Chloroanilin	Fenhexamide*	Monocrotophos
Chlorpyrifos*	Fenitrothion	Myclobutanil*
Chlorpyrifos-methyl*	Fenobucarbe	Napropamide
Chlorthal dimethyl*	Fenoxaprop-ethyl	Nitrofen
Chlorthiophos	Fenoxycarbe	Nitrothal isopropyle
Chlozolinate	Fenpropathrine	Norflurazon
Clodinafop-propargyl	Fenpropidine	Oxadiazon*
Clomazone	Fenpropimorphe	Oxadixyl*
Coumaphos	Fensulfthion(+sulfone)	Oxyfluorfen
Cyfluthrine (β+γ)	Fenthion(+sulfone+sulfoxide)*	Parathion-ethyl
Cyhalofop-butyl	Fenvalerate (RR + SS)	Parathion-methyl*
Cyhalothrine(lambda)*	Fenvalerate (RS + SR)	PCB 028*
Cymiazole	Fipronil(+sulfone)	PCB 052*
Cypermethrine(α+β+θ+ζ)	Fipronil-desulfinyl	PCB 101*
Cyproconazole*	Fluazifop-p-butyl	PCB 118*
Cyprodinil*	Fluchloralin	PCB 136*
DDT(Σ des isomères)*	Flucythrinate	PCB 153*
Deltamethrine	Fludioxonil*	PCB 180*
Demeton-S-methyl	Flufenacet	Penconazole*
Dialifos	Fluopicolide	Pendimethaline
	Flurochloridone	Pentachloroanisole*
	Fluoroxypyr-methylheptyl ester	Permethrine(cis + trans)
	Flusilazole*	Perthane*
	Flutolanil	Phenothrine
	Flutriafol	Phenthoate

Valifenalate  
Vindolozoline(+3,5-dichloroaniline  
Zoxamide

**Multirésidus LC 250**

2,4 D(acide libre)  
2,4 DB  
2,4,5-T  
6-Benzyladenine  
Abamectine(Σ B 1 a et B 1 b)  
Acephinocyl  
Acetamipride\*  
Aldicarb(+sulfoxide)  
Ametoctradine  
Amidosulfuron  
Amitraze(+2,4 diméthylaniline)  
Atrazine-desethyl(+deisopropyl)  
Azacónazole\*  
Azimsulfuron  
Azinphos-ethyl  
Azinphos-methyl  
Azoxytrobine\*  
Beflubutamide  
Benfuracarbe  
Bensulfuron-methyl\*  
Bentazone(+Bentazone 8-OH)  
Benthiavalicarb-isopropyl  
Bifenazate  
Bispyribac-sodium  
Bixafen  
Boscalide\*  
Bromoxynil  
Bromuconazole\*  
Bupirimate  
Buprofezin  
Butafenacil\*  
Buturon\*  
Cadusafos  
Carbendazime(+Benomyl)\*  
Carbetamide  
Carbosulfan  
Carboxine  
Chlorantraniliprole  
Chloridazon  
Chlorotoluron  
Chloroxuron  
Chloroxynil  
Chlorsulfuron  
Chromafenozide  
Cinidon-ethyl  
Cinosulfuron  
Clethodim+Sethoxydim  
Clodinafop(Σ des isomeres)  
Clofentezine  
Cloquintocet-mexyl\*  
Cyanazine\*  
Cyazofamide\*  
Cycloxydim  
Cycluron\*  
Cyflufenamid  
Cymoxanil

Forchlorfenuron	Paclobutrazol*	Triflumuron
Formetanate(hydrochlorure de)	Paraoxon-ethyl	Triflusaluron-methyl*
Fosthiazate	Pencycuron	Triforine
Fuberidazole	Penoxsulame	Triticoonazole*
Furmecycloz	Phenmedipham*	Tritosulfuron
Halosulfuron-methyl	Phosmet(+oxon)	Vamidothion
Haloxypop(acide libre)	Phosphamidon	Warfarin*
Hexaflumuron	Phoxim*	
Hexythiazox*	Picloram	
Imazalil	Picolinafen*	
Imazamox	Picoxystrobine*	
Imazaquin	Pinoxadene	
Imidachlopride	Pirimicarb-desmethyl	
Indoxacarb*	Propamocarbe	
Iodosulfuron-methyl	Propaquizafop*	
Ioxynil	Propargite	
Ipoonazole	Propoxur	
Iprovalicarbe*	Propoxycarbazon	
Isazofos	Prosulfuron	
Isocarbophos	Prothioconazole	
Isoprocarb	Prothioconazole-desthio	
Isopropaline	Pymetrozine	
Isoprothiolane*	Pyraclostrobine*	
Isoproturon*	Pyraflufen-ethyl*	
Isoprazam	Pyridate(+metabolite)	
Isoxaben	Pyroxsulam	
Isoxathion*	Quinmerac	
Kresoxim-methyl	Quizalofop(acide libre)	
Lenacil*	Rimsulfuron	
Linuron*	Rotenone*	
Lufenurone	Silthiofam	
Mandipropamide	Simazine	
MCPA+MCPB	Spinetoram(Σ des isomères)	
Mecarbam	Spinosad(Σ des isomères)	
Mecoprop(dont Mecoprop-p)	Spirodiclofen*	
Mefenacet	Spiromesifen	
Mesosulfuron-methyl	Spirotetramate(+4 metabolites)	
Metaflumizone	Spiroxamine*	
Metaldéhyde	Sulfosulfuron	
Metamitron	TCMTB	
Metconazole	Tebufenozide*	
Methabenzthiazuron*	Tebutam	
Methiocarbe-sulfoxide(+sulfone)	Teflubenzuron	
Methomyl(+Thiodicarb)*	Tepraloxydim	
Methoxyfenozide*	Terbufos-sulfone(+sulfoxide)	
Metobromuron	Terbumeton	
Metoxuron*	Tetraconazole*	
Metrafenone*	Thiabendazole	
Metsulfuron-methyl	Thiachlopride	
Milbemectin A4	Thiamethoxam(+Clothianidine)	
Molinate	Thiencazone-methyl	
Monolinuron*	Thifensulfuron-methyl	
Monuron*	Thiobencarb	
NAD(1-naphtyl acetamide)	Thiophanate-methyl*	
Neburon*	Thirame	
Nicosulfuron	Triazamate	
Nitenpyram	Trichlorfon	
Novaluron	Triclopyr	
Nuarimol	Tricyclazole	
Orthosulfamuron	Tridemorphe	
Oryzalin	Trifloxystrobine*	
Oxamyl	Trifloxysulfuron	
Oxasulfuron	Triflumizole*	



Les pollutions par les xénobiotiques, en particulier les pesticides, et les métaux lourds issus des activités agricoles présentent une grande complexité de composition chimique et de dynamique spatio-temporelle. La présence de bandes enherbées entre les parcelles cultivées et les cours d'eau permet une limitation de la diffusion de ces pollutions résiduelles vers les milieux naturels. Le compartiment végétal de ces bandes enherbées peut jouer de multiples rôles dans ce contexte de protection environnementale. L'étude comparative réalisée *in situ* et en conditions contrôlées de laboratoire a permis de mettre en évidence le rôle biologique du compartiment végétal avec son implication directe dans les processus *in planta* d'absorption, de stockage et/ou de dégradation au moins partielle. Un tel rôle phytoremédiateur est dépendant de la capacité des plantes à se maintenir sur ces milieux pollués, qui diffère selon l'espèce considérée et structure ainsi les communautés végétales des bandes enherbées. L'étude intégrative en conditions contrôlées des réponses des plantes aux interactions avec les xénobiotiques à faibles doses, à différentes échelles de complexité du fonctionnement végétal, a permis de montrer les effets de ces stress chimiques chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et chez l'espèce prairiale *Lolium perenne*. Les xénobiotiques et les métaux lourds à des doses subtoxiques ont induit d'importants bouleversements métaboliques et moléculaires chez ces espèces, avec des effets cryptiques de ces polluants et de leurs produits de dégradation. L'analyse en conditions de multi-pollution, qui reflètent de manière réaliste les pollutions péri-agricoles, a montré la complexité et la difficulté de prédiction des interactions entre les effets des contaminants en mélange. Ces mécanismes de réponses diffèrent selon l'espèce et le polluant et laissent supposer des divergences en termes de perception et/ou de transport des polluants, ou de coordination des réponses moléculaires et métaboliques. *Arabidopsis* a ainsi présenté une coordination de ses réponses orientée vers une augmentation des métabolites de stress, et une diminution des métabolites carbonés (sucres solubles), en parallèle de modifications de l'expression de gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, les défenses contre les stress xénobiotiques, ou dans la dynamique des phytohormones. Le stress chimique a entraîné chez *Lolium* des modifications majeures du métabolisme azoté, ainsi qu'un remaniement des processus de photorespiration. L'analyse transcriptomique de cette espèce a de plus montré que la majorité des gènes induits sont impliqués dans des voies de transduction de signal, montrant ainsi la complexité des mécanismes de réponse et les couplages qui existent entre les signaux métaboliques, en particulier liés aux sucres, les voies de signalisation associées aux phytohormones, les signaux de stress et la photosynthèse. Ces réorganisations générales du fonctionnement végétal induites par les stress chimiques subtoxiques peuvent expliquer le développement de tolérance chez certaines espèces et leur maintien sur des milieux contenant des pollutions résiduelles. Les différents mécanismes mis en évidence peuvent donc servir à définir des biomarqueurs de tolérance et d'efficacité en phytoremédiation ou en analyse de risque environnemental.

Mots-clés : *Arabidopsis thaliana*, bandes enherbées, expression génétique, *Lolium perenne*, pesticides, pollutions résiduelles, profil métabolomique, protection environnementale, réponses aux stress, séquençage transcriptomique, voies de signalisation, xénobiotiques.