



**HAL**  
open science

# Potentialité de phytoremédiation de matrices polluées par des organochlorés : fonctionnalité de la rhizosphère

Claire Blondel

► **To cite this version:**

Claire Blondel. Potentialité de phytoremédiation de matrices polluées par des organochlorés : fonctionnalité de la rhizosphère. Biologie végétale. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENS032 . tel-01557556

**HAL Id: tel-01557556**

**<https://theses.hal.science/tel-01557556v1>**

Submitted on 6 Jul 2017

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Modèles, Méthodes et Algorithmes en biologie, santé et environnement (MBS)**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Claire BLONDEL**

Thèse dirigée par **Muriel RAVETON**

préparée au sein du **Laboratoire d'Ecologie alpine (LECA)**  
dans l'**École Doctoral Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE)**

# Potentialité de phytoremédiation de matrices polluées par des organochlorés. Fonctionnalité de la rhizosphère.

Thèse soutenue publiquement le **15 décembre 2014**,  
devant le jury composé de :

**Bruno COMBOURIEU**

Professeur à l'Université de Lyon, Rapporteur

**Michel COUDERCHET**

Professeur à l'Université de Reims, Rapporteur

**François LAURENT**

Chargé de Recherche à l'INRA de Toulouse, Examineur

**Christian MOUGIN**

Chargé de Recherche à l'INRA de Versailles-Grignon, Examineur

**Valérie BERT**

Ingénieur Etude et Recherche, INERIS de Verneuil en Halatte, Examineur

**Muriel RAVETON**

Maître de conférence à l'Université de Grenoble, Directrice de thèse





## Table des matières

Avant-propos .....	4
Remerciements .....	5
Résumé .....	9
Abstract .....	11
Liste des abréviations .....	13
Liste des figures .....	15
Liste des tableaux .....	17
Chapitre 1 : Introduction générale.....	21
1. Les pesticides .....	21
1.1. Généralités sur les pesticides .....	21
1.2. Les pesticides organochlorés .....	22
1.2.1. Le lindane .....	23
1.2.1.1. Synthèse et propriétés physico-chimique du lindane .....	24
1.2.1.2. Impact du lindane sur la santé humaine.....	25
1.2.2. La chlordécone .....	26
1.2.2.1. Synthèse et propriétés chimiques de la chlordécone .....	26
1.2.2.2. Historique de l'utilisation de la chlordécone .....	27
1.2.2.3. Impact de la chlordécone sur la santé humaine .....	28
2. La pollution des sols par les organochlorés et son impact sur l'environnement .....	29
2.1. Contamination de l'environnement.....	29
2.2. Etat des lieux de la contamination des sols par le lindane et la chlordécone.....	31
2.3. Ecotoxicité des organochlorés .....	35
3. Phytotoxicité des pesticides .....	37
3.1. Cycle cellulaire chez les plantes .....	37
3.2. Métabolisme des racines .....	39
3.3. Stress oxydant et mort cellulaire/apoptose chez les plantes .....	45
4. Solutions biologiques pour dépolluer les sols contaminés par des organochlorés .....	47
5. La phytoremédiation .....	48
5.1. Généralités .....	48
5.2. Transfert des organochlorées du sol à la plante .....	51
6. La bioremédiation .....	52



6.1.	Généralités .....	52
6.2.	Biodégradation du lindane et du chlordécone par les bactéries .....	53
6.3.	La Rhizodégradation .....	55
7.	La fonctionnalité de la rhizosphère .....	57
7.1.	Les relations plante-microorganismes-environnement .....	57
7.2.	Allocation des ressources (carbone/azote) .....	60
8.	Objectifs de la thèse .....	62
8.1.	Le modèle biologique : le maïs .....	63
8.2.	Plan de l'étude doctorale .....	65
Chapitre 2 : Phytotoxicité des pesticides organochlorés sur les racines de maïs ( <i>Zea mays</i> ) ..		69
1.	Introduction .....	69
2.	Matériels et méthodes .....	70
2.1.	Culture des plantules de maïs en condition stériles en présence d'OCPs .....	70
2.2.	Evaluation de la phytotoxicité des OCPs sur les racines de maïs .....	72
2.3.	Impact des OCPs sur le métabolisme racinaire .....	73
3.	Résultats et discussions .....	74
3.1.	Evaluation de la phytotoxicité des OCPs sur les racines de maïs .....	74
3.1.1.	Publication I .....	74
3.2.	Impact des OCPs sur le métabolisme racinaire .....	86
3.2.1.	Publication II .....	86
4.	Conclusion .....	115
Chapitre 3 Allocation des ressources et fonctionnalité de la rhizosphère .....		121
1.	Introduction .....	121
2.	Matériels et méthodes .....	122
2.1.	Schéma expérimental des expériences .....	122
2.2.	Analyses Carbone/Azote, traits fonctionnels .....	123
3.	Résultats et discussion .....	124
3.1.	Fonctionnalité de la rhizosphère de <i>Zea mays</i> en présence de lindane .....	124
3.1.1.	Publication III .....	124
3.2.	Fonctionnalité de la rhizosphère de <i>Zea mays</i> en présence de chlordécone .....	146
3.2.1.	Publication IV .....	146
4.	Conclusion .....	171
Chapitre 4: Capacités d'absorption du lindane par <i>Zea mays</i> .....		177
1.	Introduction .....	177
2.	Matériels et méthodes .....	178

2.1. Conditionnement des sols .....	178
2.2. Ajout du lindane marqué ( <sup>14</sup> C-γHCH) et extraction du <sup>14</sup> C.....	178
3. Résultats .....	180
3.1. Comportement du lindane par rapport à la matière organique de la rhizosphère en absence de plante .....	180
3.2. Distribution du lindane dans un système plante-rhizosphère.....	182
4. Discussion .....	186
5. Conclusion.....	188
Discussion générale.....	191
1. Définir le niveau de phytotoxicité du lindane (γHCH) et de la chlordécone (CLD) sur la plante au niveau des racines. ....	191
2. Analyser les changements de dynamique du carbone et de l'azote et les modifications cataboliques des microorganismes au niveau rhizosphérique en présence d'OCPs.....	193
3. Efficacité de l'uptake des OCPs par les plants de <i>Zea mays</i> .....	194
Perspectives.....	197
1. Définir le niveau de phytotoxicité du lindane (γHCH) et de la chlordécone (CLD) sur les racines. ....	197
2. Analyser les changements de dynamique du carbone et de l'azote et des modifications cataboliques des microorganismes au niveau rhizosphérique en présence d'OCPs.....	198
3. Efficacité de l'absorption des OCPs par les plants de maïs. ....	198
Annexe 1 : Données supplémentaires de la publication I .....	203
Annexe 2 : Données supplémentaires de la publication II .....	212
Annexe 3 : Données supplémentaires de la publication III.....	214
Annexe 4 : Données supplémentaires de la publication IV.....	217
Annexe 5 : communications de congrès.....	224
Bibliographie.....	227

## Avant-propos

Ce projet de thèse multidisciplinaire commencé en octobre 2011 a été financé par la Région Rhône-Alpes.

Ce travail a donné lieu à la rédaction de 5 articles (1 publié, 1 soumis, 3 en préparation), 3 communications de congrès (1 poster et 2 communications orales, Annexe 5) et l'encadrement de trois stagiaires.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai également eu la chance de participer au label R2I (Recherche, Industrie, Innovation) et donc d'accompagner la création d'InnovDoc la « Junior entreprise » des doctorants de l'Université de Grenoble. Celle-ci m'a permis de réaliser une mission pour Roche Diagnostics France.

## Remerciements

Je remercie en premier lieu **Irène Till-Bottraud**, directrice du Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier **Stéphane Reynaud** directeur de l'équipe P3E du LECA pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

J'adresse mes plus vifs remerciements à ma directrice de thèse **Muriel Raveton**. Merci de m'avoir offert la chance de découvrir la biologie végétale. Grâce à toi, j'ai eu la chance de réaliser une thèse pluridisciplinaire dans de très bonnes conditions mais aussi de rencontrer un très grand nombre de chercheurs. J'ai énormément appris durant ces trois ans et je t'en suis très reconnaissante. Merci pour ton aide, ta disponibilité et ta gentillesse. Je suis sûre que lors de mes futures expériences professionnelles, je me demanderai toujours avant de rendre un rapport ou faire une présentation « Qu'est ce que Muriel améliorerait ? ».

J'aimerais également remercier les membres de mon jury de thèse. Merci à **Valérie Bert, Bruno Combourieu, Michel Couderchet, François Laurent, Christian Mougin** d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner mon travail de thèse.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu avoir lieu sans les personnes qui gèrent les « plateformes techniques » du laboratoire, m'ont formé et apporté de nombreuses fois leurs aides. Je remercie **Sophie Sroda**, arrivée au cours de ma thèse et dont les discussions scientifiques ou non étaient toujours très constructives. Merci également pour ta gestion de la plateforme BIOME. Je remercie également **Delphine Rioux, Ludovic Gielly, Frederic Boyer, Carole Poillot** et **Pierre Taberlet** qui gèrent la plate-forme MarMol. Je remercie tout particulièrement **Christian Miquel** qui m'a souvent offert des fonds de tubes de réactifs comme la protéinase K et qui a fait un travail énorme pour limiter les nuisances des travaux dans le laboratoire.

Je remercie également les deux techniciens de l'équipe P3E. Merci à **Sylvie Veyrenc** pour m'avoir formé au marquage TUNEL et à l'utilisation du microtome. Tu étais toujours de bons conseils pour trouver pourquoi une expérience ne marchait pas. Merci à **Thierry Gaude** pour ton aide et ta disponibilité. Tu as souvent incroyablement bien solutionné des problèmes

techniques sur les expériences avec deux bouts de ficelles. Merci d'avoir toujours répondu présent quand un besoin urgent d'azote liquide se manifestait. Je remercie également **Mathieu Faure**, ingénieur au laboratoire lors de mon début de thèse. Tu étais un peu notre rayon de soleil, notre roi du DIY et une des rares personnes à savoir où ce trouvait tel ou tel matériel.

Ce travail n'aurait pas été le même sans l'aide précieuses de mes stagiaires. Merci à **Farid Khelalfa**, **Loïc Briset** et **Olivier Tarpin**. Je remercie également **Marc Méléсан** qui a débuté mon travail de thèse lors de son stage de master 2. Je pense aussi aux deux stagiaires incroyables ayant travaillé dans l'équipe P3E, **Johanna Marçais** et **Jessica Roux**

Je remercie également mes collègues de bureau avec qui j'ai partagé de bons moments. C'est grâce à vous que même dans les moments de doutes, venir au laboratoire tous les matins était un réel bonheur :

Je remercie **Asam Riaz** que j'ai furtivement croisé lors de mon arrivée. Malgré le bouclage de ton manuscrit tu avais toujours un sourire ou un mot gentil pour moi. Je remercie également **Angélique San Miguel** qui m'a « transmis le relais » et bien accompagnée à mon arrivée dans le laboratoire en me donnant toutes ses astuces accumulées au cours de sa thèse.

Merci à **Fred Fauçon** pour avoir animé notre bureau avec des expériences de bricolage et des lianes grimpantes au plafond et son aide pour les expériences de biologie moléculaire.

Je remercie également, **Christophe Regnault** (même si techniquement il était exilé dans un autre bureau au fond du couloir), pour son aide lors de certaines expériences, sa gentillesse et son humour légèrement caustique.

Je suis également très heureuse d'avoir partagé mon bureau avec **Sophie Prud'homme** qui est devenue une amie au cours de cette thèse. Je suis très impressionnée par ton travail de thèse et surtout ta ténacité. Je ne te remercie pas pour m'avoir transmis le virus de la couture par contre car je suis une véritable accro maintenant!

Notre bureau n'aurait pas été le même sans la tornade **Idir Akhouayri**. Je te remercie pour tes bons conseils et aussi certaines conversations loufoques.

Je tiens également à remercier **Myriam Régent-Kloeckner** (elle aussi techniquement exilée au fond du couloir) pour nos très nombreuses discussions scientifiques ou non.

Merci également à **Theresia Nkya**, souriante doctorante venu nous apporter un peu de chaleur de sa Tanzanie natale au lors des deux derniers hivers grenoblois.

Enfin, je remercie **Alexia Chandor-Proust** pour son aide lors de certaines expériences, sa gentillesse et son amitié (et ses fromages de chèvres). Je te souhaite de la réussite et beaucoup de bonheur dans tes nouvelles aventures !

Je remercie aussi la « team champignon » de l'équipe P3E c'est-à-dire **Lucile Sage, Mouhamadou Bell, Sophie Perigon** pour vos précieux conseils et votre gestion du plateau BMF. J'associe également **Frederic Laporte** à ces remerciements pour son rôle de responsable de la rtq-PCR. Bravo pour ta gestion, pour ton aide et ton sens du consensus pour déterminer la température de la salle de culture de plantes.

Je tiens également à remercier la « team Bti ». Merci à **Guillaume Tétreau** pour nos discussions sur l'avenir de la recherche et tes envolés lyriques sur les sujets qui te tiennent à cœur. Merci aussi **Renault Stalinski** pour son humour caustique, son aide lors de certaines expériences et sa constante bonne humeur.

Je remercie également les responsables des thématiques « papillons » et « moustiques » **Laurence Després Jesus Mavarez** et **Jean-Philippe David**, pour avoir élargi mes connaissances sur ces petites bêtes

Je tenais à remercier également mes deux mentor d'extraction d'ARN et l'ADN de bactéries des sols, respectivement **Tarfa Mustafa** et **Johan Pansu**, pour m'avoir formée à ces techniques.

Je ne peux pas remercier les membres de l'équipe P3E sans remercier **Michel Tissut**, bienveillant chercheur retraité du laboratoire venant encore de temps en temps nous « embaumer » l'air avec ses expériences. Je crois que mes coupes de racines de maïs n'ont jamais été aussi belles que lorsque tu leurs racontais mai 68 sur le campus de Grenoble.

Je remercie les chercheurs avec qui j'ai collaboré et qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire. Merci à **Mylène Pezet, John Willison, Zahare Haichar** et plus particulièrement à **Florence Fauvelle** avec qui je travaille depuis mon stage de M2.

J'ai également travaillé avec les membres de l'équipe « FYSE ».

Je remercie **Jean-Christophe Clément** pour m'avoir aidé lors de certaines expériences notamment sur Lyon et surtout pour l'analyse des résultats « C : N ». J'en profite également

pour remercier **Frank Poly** qui nous a très gentiment accueilli au laboratoire d'écologie microbienne de Lyon.

Je remercie **Cindy Arnoldi**, grande prêtresse du CHN devenue mon amie pour m'avoir aidé dans la réalisation de certaines expériences et avoir toujours répondu à mes questions. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite et surtout dans les prochains mois !

J'ai passé également de très bons moments avec mon amie **Maud Mouchet**, post-doctorante pendant une période de ma thèse devenue maître de conférence à Paris pour mon plus grand bonheur.

Je suis très reconnaissant aussi de l'aide et des bons moments passés avec la plupart des membres de l'équipe « FYSE » : **Marie-Pascale Colace, Amélie Saillard, Emilie Crouzat, Pierre Gos, Caroline Devaux, Coline Byczek, Lionel Bernard, Nicolas Legay et Adeline Bierry.**

Le bon déroulement de cette thèse a été possible aussi grâce à l'aide précieuse des secrétaires du laboratoire, **Florence Sagnimorte, Kim Pla et Nancy Iacono.** Merci également à **Olivier Lontin** protecteur de nos ordinateurs pour sa disponibilité et sa gentillesse.

La dernière partie de cette longue liste de remerciement revient à ma famille et à mes proches. Tout d'abord, merci à mes parents qui m'ont permis de réaliser des études et m'ont toujours poussé pour faire ce que j'aime. Merci à mes grands-parents qui m'ont également beaucoup soutenu et notamment par de nombreux appels téléphoniques ces derniers mois. Je ne peux pas écrire ces lignes et oublier Saphire à qui je récite mes leçons depuis l'enfance et qui m'a soutenu durant toute cette rédaction en se couchant sur mes genoux. Je pense aussi à ma petite sœur Marie-Anne qui m'a accueilli lors de mes nombreux aller-retour Paris-Lyon-Grenoble. Ta présence à Grenoble avec moi pendant ces trois années m'a également beaucoup aidé. Je termine ces remerciements par la personne qui m'a sûrement entendu le plus dire « Attention, j'ai du lindane ! ». Merci à Antoine pour ton soutien, ta compréhension dans ces derniers moments intenses et pour tout le bonheur et la force que tu m'apportes.

## Résumé

L'activité humaine est responsable de pollutions diffuses des sols entraînant des dommages sur l'écosystème. Afin d'éviter des déséquilibres importants comme la diminution de la biodiversité ou bien la contamination des chaînes trophiques par des polluants, il est nécessaire de restaurer les écosystèmes. Les différentes techniques utilisées à l'heure actuelle sont coûteuses, diminuent la fertilité du sol et ont un effet négatif sur la fonctionnalité des écosystèmes. A contrario, la phytoremédiation ou dépollution grâce aux plantes, apparaît comme une solution digne d'intérêt. Néanmoins, elle nécessite d'être améliorée puisque de nombreux mécanismes restent inexpliqués. L'originalité de notre travail est d'étudier la fonctionnalité de la rhizosphère du maïs (*Zea mays*) exposée à des pesticides organochlorés (OCPs), le lindane et la chlordécone, interdits respectivement en 1998 et 1993 et persistants dans l'environnement. Cette étude a été réalisée en présence ou absence de microorganismes afin de préciser les mécanismes mis en jeu par les microorganismes et les matrices végétales.

Ce travail a mis en évidence les mécanismes impliqués dans la phytotoxicité des deux organochlorés sur les cellules racinaires. Les réponses cellulaires sont dose-dépendantes et montrent un effet des OCPs sur le cycle cellulaire (induction de l'endoréplication et de la ploïdie) et la mort cellulaire (induction de ROS, du calcium cytosolique, des caspase-3-like, de l'apoptose) lors d'expositions extrêmes (correspondant à des cas particuliers comme les friches industrielles). A de plus faibles expositions ayant une réalité environnementale, les racines exposées montrent une perturbation importante de leur métabolome primaire. Ces modifications mesurées sur la production des sucres, des acides organiques, des acides aminés et des lipides peuvent être induites par le stress oxydant produit par les OCPs. Par ailleurs, de tels changements dans le métabolome peuvent provoquer une modification de la composition des exsudats racinaires, jouant sur la relation plante/microorganismes de la rhizosphère. Nos résultats montrent que la fonctionnalité globale de la rhizosphère (allocation des ressources en carbone et azote, catabolisme des microorganismes) n'est pas modifiée sur le long terme en présence des OCPs. Enfin, nous avons démontré l'implication de la rhizosphère (rétention/métabolisation des OCPs) sur l'absorption des OCPs par *Zea mays*. Le lindane semble être en partie minéralisé par la microflore rhizosphérique puis les métabolites libérés sont absorbés par les racines, où ils sont majoritairement bioconcentrés. Ces connaissances fondamentales mettent en évidence l'adaptation de la rhizosphère à la pression



chimique des OCPs et montrent que la rhizosphère reste fonctionnelle en présence de matrices contaminées par les OCPs.

Mots-clés :

Phytoremédiation, *Zea mays*, Organochlorés, Phytotoxicité, Métabolomique, Allocation des ressources, Rhizosphère, Phytoextraction

## Abstract

Human activities lead to diffuse pollution causing damages to the ecosystem. To avoid major disturbances such as biodiversity loss or contamination of trophic chains by pollutants it is necessary to restore these ecosystems. The classical techniques used in depollution are expensive, reduce soil fertility and have a negative effect on ecosystem functionality. In contrast, the use of plants to clean up soils called phytoremediation seems to be a more effective solution. However, it needs to be improved because many biological mechanisms remain unexplained. The originality of our work is to study the functionality of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) exposed to organochlorine pesticides (OCPs), lindane and chlordane, banned in 1998 and 1993 respectively and persistent in the environment. This study will be conducted in the presence or absence of microorganisms to clarify the relationships between microorganisms and plant matrices.

In this study, the mechanisms involved in the phytotoxicity of OCPs in root cells were analyzed. The cytotoxicity was dose-dependent and showed effects on the cell cycle (induction of endoreduplication and level of ploidy) and on cell death (induction of ROS, cytosolic  $Ca^{2+}$ , caspase-3-like, apoptosis) under higher doses of exposure (particular case of former industrial sites). Lower exposures usually detected in the environment showed great disturbances in the root metabolome. These changes in sugars, organic acids, amino acids and lipids syntheses could be induced by oxidative stress provided by OCPs. Moreover, metabolome changes might cause modifications in root exudate composition which is involved in plant-microbe relationships. Ours results demonstrate that the overall rhizosphere functionality (resource allocation, carbon and nitrogen contents and microorganism's catabolism) was not disturbed by OCPs long-term exposure. Finally, we demonstrated rhizosphere positive impact on uptake of OCPs by *Zea mays*. Lindane seems to be partially mineralized by rhizospheric microorganisms. Then, these produced metabolites were uptaken by roots where they were bioconcentrated. These findings highlighted the rhizosphere adaptation to chemical pressure by OCPs and showed the good rhizosphere functionality despite of the OCPs contamination.

Keywords:

Phytoremediation, *Zea mays*, Organochlorines, phytotoxicity, Metabolomics, Resource Allocation, Rhizosphere, Phytoextraction

## Liste des abréviations

ACL : L'ATP-citrate lyase

ACP : Analyse en composante principale

ACS : L'acetyl-CoA synthétase

AG : Acide gras

APC : Anaphase Promoting Complex

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BCF : Facteur de Bioconcentration

Bp : paires de base

C : Carbone

CAK : CDK-activating kinase

CDC : Cell Division Cycle

CDK : Kinase cycline-dépendante

CEIP : Centre on Emission Inventories and Projections

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

DDD : Dichlorodiphényldichloroéthane

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DGGE : Denaturing gradient gel electrophoresis

DREAL : Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Rhône-Alpes

DT50 : Temps de demi-vie

ECM : the extracellular matrix

EPA : Agence Américaine de Protection de l'Environnement

FAO : Food and agriculture organization

FDA : Fluorescéine

FW : Fresh weight ou masse fraîche (MF)

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GAD : glutamate décarboxylase

GDH : Glutamate déshydrogénase

GRPs : Glycine-riche protéines

GS : Glutamine synthétase

HMDB : Human Metabolome DataBase

HRMAS : High resolution magic angle spinning

InVS : Institut de Veille Sanitaire

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

IP : Iodure de propidium

IPCS : International Programme on Chemical Safety

mPTP : mitochondrial permeability transition pore

N : Azote

NO : Oxyde nitrique

NOEC : No-Observed-Effect Concentrations

NOS: Oxyde nitrique synthase

OGDHC : 2-oxoglutarate déshydrogénase complexe

OGM : Organismes génétiquement modifiés

OPLS-DA : Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis

P : Phosphore

P.c. : Poids corporel

pH : Potentiel d'hydrogène

PCD : Mort cellulaire programmée (Programmed cell death)

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PM : plasma membrane

PNM : Minéralisation potentielle de l'azote

RB : Retinoblastoma-related protein

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)

SAU : Surface agricole utile

SOD : Superoxide dismutase

TCA : Cycle de l'acide carboxilic (Cycle de Krebs)

TDN : Total Dissolved Nitrogen

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UNEP : United Nations Environment Programme

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

## Liste des figures

Figure 1. Formules développées des pesticides organochlorés interdits par la Convention de Stockholm. _____	22
Figure 2. Le lindane et ses principaux isomères (INERIS). _____	23
Figure 3. Synthèse du lindane (INERIS) _____	24
Figure 4. Structure chimique de la chlordécone _____	26
Figure 5. Mouvement des pesticides dans la biosphère (Ramade et al., 1998) _____	31
Figure 6. Prédiction (a) et intervalle de confiance à 95% (b) de la concentration de lindane dans le sol en France ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (d'après Orton et al., 2013). _____	32
Figure 7. La fréquence (en %) de détection des OCPs dans les horizons de surface (0-30cm) des sols du nord de la France (ANSES, programme POP-RMQS, 2009) _____	33
Figure 8. Cartographie de la teneur en chlordécone des sols de la Martinique en 2012 (ARS, 2012) _____	33
Figure 9. Simulation de l'évolution des teneurs en chlordécone de la couche de surface des sols de bananeraies du sud de Basse Terre, Guadeloupe entre 2002 (A) et 2200 (B) (Cabidoche, 2011). _____	34
Figure 10. Illustration de la différence de comportement dans les sols du lindane et de la chlordécone (Cabidoche et al., 2009) _____	34
Figure 11. Bioaccumulation des OCPs dans les vers de terres (Šmídová & Hofman, 2014). _____	35
Figure 12. Comparaison des valeurs moyennes des facteurs de bioamplification des pesticides organochlorés chez les pélicans (Albanis et al., 1995). _____	36
Figure 13. Comparaison des concentrations de la chlordécone et des niveaux de contamination de la chaîne trophique dans les rivières durant la saison des pluies. (Coat et al., 2011) _____	36
Figure 14. A. Cycle cellulaire en condition normale chez les plantes. B. Endocycle (adapté de Vigneault, 2009). _____	38
Figure 15. Les différents niveaux « omic » à l'échelle cellulaire (Nielsen & Olivier, 2005). _____	39
Figure 16. Schéma synthétique du métabolisme des racines (Kushalappa et al., 2013) _____	40
Figure 17. Intensité relative des pics de dipeptides dans les tissus racinaires chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Moussaieff et al., 2013) _____	41
Figure 18. Métabolites secondaires isolés d'exsudats racinaires d' <i>Arabidopsis thaliana</i> , d' <i>Ocimum basilicum</i> , d' <i>Oxalis tuberosa</i> and de <i>Centaurea maculosa</i> (adapté de Bais et al., 2004). _____	42
Figure 19. Abondance des phénylpropanoïdes dans les tissus de racines de <i>A. thaliana</i> _____	43
Figure 20. Schématisation d'une racine en croissance et des sites de rhizodéposition. _____	43
Figure 21. Impact cellulaire d'un stress abiotique (Hossain et al., 2012). _____	45
Figure 22. Comparaison morphologique entre une mort cellulaire sous stress (a) et programmée (b) chez les plantes (Lam et al., 2004) _____	46
Figure 23. Voie de signalisation proposée pour la mort cellulaire programmée sur des cultures cellulaires de <i>Populus euphratica</i> . (Sun et al. 2012) _____	47
Figure 24. Représentation schématique des processus de phytoremédiation de polluants organiques (Vrchatová et al., 2013) _____	49
Figure 25. Relation entre la teneur en chlordécone d'ignames et celle de trois types de sols (a), et la teneur en chlordécone biodisponible (b) (en solution dans un volume élémentaire de sol) (adapté cabidoche et al., 2012) _____	52
Figure 26. Dégradation du lindane en anaérobie par les bactéries (Lal et al. 2010). _____	54
Figure 27. Dégradation aérobie du lindane par les bactéries (Lal et al., 2010) _____	54
Figure 28. Mobilisation et dégradation des contaminants organiques par les racines de plantes et les microorganismes associés (Fester et al., 2014) _____	56
Figure 29. Aspect de la rhizosphère autour des racines de l'orge ( <i>Hordeum vulgare</i> ) (Hinsinger et al., 2009) _____	57
Figure 30. Fonctionnement de la rhizosphère. A) Echanges de molécules chimiques entre les racines et le milieu environnant du sol (Gerhardt, 2009). B) Interactions biologiques entre les racines végétales et les organismes du sol (Bais et al., 2006) _____	58
Figure 31. Cycle de l'azote et du carbone au sein de la rhizosphère (Raynaud et al., 2006) _____	60
Figure 32. Simulation de distribution des nitrates au niveau du sol et de la rhizosphère de plants de maïs âgés de 40 jours (Postma et al., 2014) _____	61

Figure 33. A. Architecture racinaire de plants de <i>Z. mays</i> âgés de 40 jours (Postma et al., 2014). B. Chronologie des gradients radiaux et longitudinaux d'absorption d'eau (potentiels hydriques) par les racines de maïs ( <i>Z. mays</i> ) cultivées sur terreau. (Hinsinger et al., 2009)	64
Figure 34. Dispositif permettant la croissance du maïs en condition stérile en présence d'OCPs	70
Figure 35. Schéma expérimental de la croissance des plantules permettant ensuite la réalisation des tests de phytotoxicité.	71
Figure 36. Schéma expérimental des manipulations pour évaluer la phytotoxicité des OCPs sur les racines de <i>Zea mays</i> .	72
Figure 37. Schéma expérimental des manipulations pour évaluer l'impact des OCPs sur le métabolisme des racines.	73
Figure 38. Modèle schématique des mécanismes moléculaires d'endoréplication induits par les OCPs dans les racines de <i>Zea mays</i> .	115
Figure 39. Schéma hypothétique des effets cytotoxiques des OCPs sur les cellules racinaires de <i>Zea mays</i> .	116
Figure 40. Schéma hypothétique des mécanismes de biosynthèse impliquant certains métabolites identifiés par RMN 1H-HRMAS (en gras) dans les racines de maïs exposées au lindane.	116
Figure 41. Modèle schématique des mécanismes moléculaire pour la PCD dans les racines de <i>Zea mays</i> .	117
Figure 42. Schéma expérimental des manipulations pour évaluer l'allocation des ressources et la fonctionnalité de la rhizosphère de <i>Zea mays</i> exposé aux OCPs.	122
Figure 43. Equations des traits foliaires et racinaires	123
Figure 44. Schéma bilan de l'impact du lindane ( $\gamma$ HCH) et de la chlordécone (CLD) sur l'allocation des ressources et la fonctionnalité de la rhizosphère de <i>Zea mays</i> .	173
Figure 45. Schéma expérimental de l'expérience d'uptake du lindane chez <i>Zea mays</i> .	179
Figure 46. Distribution du $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ HCH dans les lots sans plante. (A) Analyse statistique de la distribution temporelle du $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ HCH pour chaque condition (Solution, Peat/control, Peat/ $\gamma$ HCH). (B) Pourcentage de $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ HCH dans les différents compartiments (solution nutritive, tourbe, volatilisation de $^{14}\text{C}$ ) des pots contenant de la solution nutritive, des pots contenant de la tourbe témoin (Peat/control) et des pots contenant de la tourbe acclimatée pendant 59 jours avec du $\gamma$ HCH (Peat/ $\gamma$ HCH)..	181
Figure 47. Pourcentage de $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ HCH dans les différents compartiments (solution nutritive, tourbe, racines, feuilles) des pots avec plantes Sterile plant (A), Plant/control rhizosphere (B) et Plant/ $\gamma$ HCH rhizosphere (C)	184
Figure 48. Schéma bilan des résultats obtenus	196

## Liste des tableaux

<i>Tableau I. Tableau des propriétés physicochimiques du lindane (adapté de Calvelo Pereira, 2006)</i>	25
<i>Tableau II. Tableau des propriétés physicochimiques de la CLD</i>	27
<i>Tableau III. Concentrations ubiquitaires du lindane en 2002 (INERIS)</i>	31
<i>Tableau IV. Liste des composés organiques décrits dans les exsudats racinaires (Campbell et al, 1997)</i>	44
<i>Tableau V. Points positifs et négatifs de la phytoremédiation.</i>	48
<i>Tableau VI. Enzymes de plantes et de la microflore jouant un rôle dans la dégradation de composés organiques. B, bactéries ; F, espèce fongiques (Gerhardt et al., 2009)</i>	55
<i>Tableau VII. Concentrations en équivalent <sup>14</sup>C-γHCH dans la solution et la tourbe des lots contenant des plantules. Le test statistique Mann Whitney est utilisé pour comparer deux à deux les concentrations entre les différents lots (Sterile plant, Plant/control rhizosphere, Plant/γHCH rhizosphere) pour chaque temps d'exposition. Les lettres a,b indiquent les différences significatives (P &lt; 0.05).</i>	183
<i>Tableau VIII. Concentrations en équivalent <sup>14</sup>C-γHCH dans les racines et les feuilles des lots contenant des plantules. Le test statistique Mann Whitney est utilisé pour comparer deux à deux les concentrations entre les différents lots (Sterile plant, Plant/control rhizosphere, Plant/γHCH rhizosphere) pour chaque temps d'exposition. Les lettres a,b,c indiquent les différences significatives (P &lt; 0.05).</i>	185





# Chapitre 1: Introduction générale



## Chapitre 1 : Introduction générale

### 1. Les pesticides

#### 1.1. Généralités sur les pesticides

Les pesticides, dont le terme est dérivé de l'anglais « pest » (ravageurs), sont des substances ou préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries (Observatoire des résidus de pesticides). Ce terme comprend les produits phytopharmaceutiques destinés à la protection des végétaux et les biocides permettant la protection des habitations et des animaux domestiques depuis la directive 94/37/CE du 22 juillet 1994 de l'Union Européenne.

Les pesticides sont utilisés par l'Homme depuis des millénaires puisque les propriétés insecticides de l'arsenic sont connues depuis l'antiquité comme l'attestent les descriptions de Pline. En Chine, dès le XVI<sup>ème</sup> siècle, le tabac et les racines de *Derris* et de *Lonchocarpus* sont utilisées pour leurs actions insecticides. Les progrès de la chimie minérale au XIX<sup>ème</sup> siècle permettent la découverte de traitements fongicides à base de sulfate de cuivre (comme la bouillie bordelaise) ou de mercure. L'arsénite de cuivre et de plomb sont quant à eux utilisés pour leurs propriétés insecticides (Observatoire des résidus de pesticides). C'est lors de la seconde guerre mondiale, avec l'essor de la chimie organique de synthèse lié au développement d'armes chimiques, que ces nouveaux produits se sont avérés être de très bons insecticides. L'utilisation du DDD (dichlorodiphényldichloroéthane) et du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) marquent le commencement de l'utilisation intensive des pesticides pour garantir de fort rendement aux productions agricoles et pour lutter contre les moustiques responsables de nombreuses maladies comme la malaria (Observatoire des résidus de pesticides). L'utilisation des pesticides diminue depuis plusieurs années mais on estime que depuis 2009, 63 000 tonnes seraient utilisées en France chaque année (Union des Industries de la Protection des Plantes, UIPP).

Les principales classes d'insecticides de synthèse sont les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates, les benzoylurées et les pyréthrinoïdes (Chopra et al., 2011).

## 1.2. Les pesticides organochlorés

Les pesticides organochlorés (OCPs) sont des molécules organiques de synthèse comportant au moins un atome de chlore dont les plus connus sont le DDT, le lindane ( $\gamma$ HCH,  $\gamma$ hexachlorohexane) et la dieldrine (1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-époxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-endo-1,4-exo5,8, diméthanonaphtalène). Les OCPs sont des insecticides de contact et/ou ingestion et ont un spectre d'action large. Ils ont été intensivement utilisés de 1940 à 1970 puis leur utilisation a subi une très nette régression.

Les phénomènes rapides de résistance aux OCPs chez les Diptères et leur importante persistance dans l'environnement ont conduit à leur interdiction dans de nombreux pays (Décision 2006/507/CE de la Convention de Stockholm, Union Européenne, 2004). Ces molécules font l'objet d'une chrono-surveillance de présence quantitative, de propagation et de devenir chimique dans environnement (Figure 1).

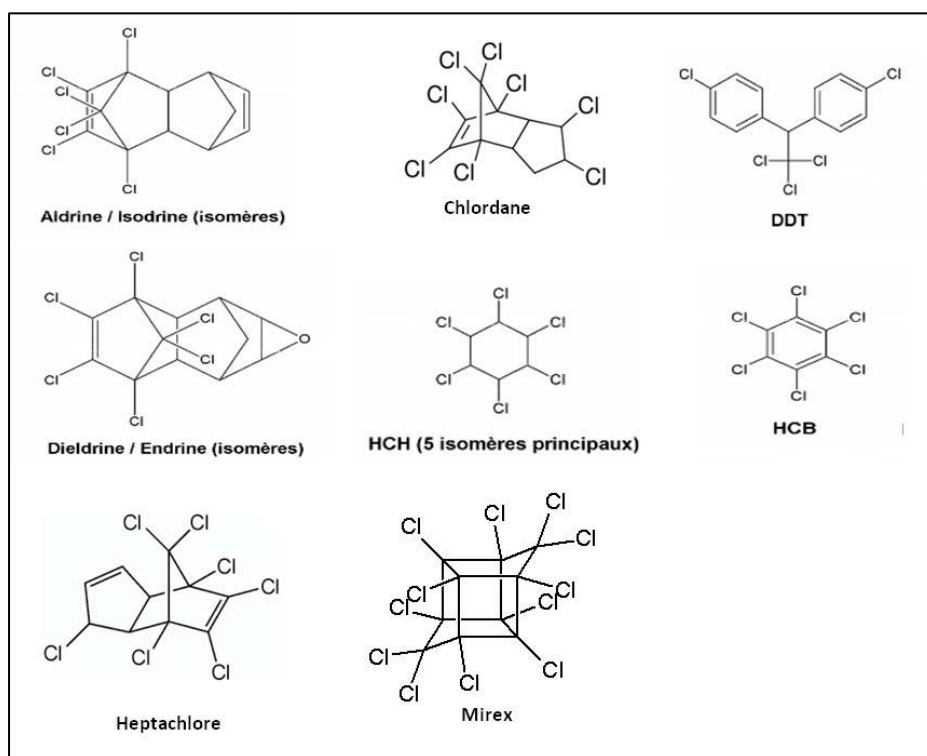


Figure 1. Formules développées des pesticides organochlorés interdits par la Convention de Stockholm.

## 1.2.1. Le lindane

Le lindane (nom commercial) désigne un produit constitué à 99.5% de  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ HCH ;  $C_6H_6Cl_6$ ). Les autres 0.5% sont constitués principalement des isomères  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\delta$ -HCH (Figure 2). La formation des isomères  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\delta$ -HCH est inhérente à la fabrication du lindane (les autres isomères  $\lambda$ ,  $\epsilon$  et  $\nu$  sont obtenus en quantité traces). Le  $\gamma$ HCH est le seul isomère qui a une grande activité insecticide (Kutz et al., 1991).

*Caractéristiques de l'hexachlorocyclohexane et de ses principaux isomères  
(d'après Fabre et al., 2005).*

Principaux isomères*	N° CAS	N° EINECS	Formule développée
$\alpha$ -HCH (67-70%)	319-84-6		
$\gamma$ -HCH (13%) (lindane ; $C_6H_6Cl_6$ )	58-89-9	602-043-00-6	
$\beta$ -HCH (5-6%)	319-85-7		
$\delta$ -HCH (6%)	319-86-8		
HCH technique (mélange d'isomères)	640-19-7		

*(\*les pourcentages indiqués correspondent aux proportions des isomères lors de la  
synthèse de l'hexachlorocyclohexane par photochloration du benzène).*

Figure 2. Le lindane et ses principaux isomères (INERIS).

Le lindane était utilisé en agriculture française depuis 1938 pour lutter contre les insectes ravageurs des cultures céréalières, oléagineuses, maraîchères, fourragères et arboricoles du fait de ses propriétés insecticides à large spectre. Par ailleurs, le lindane était également utilisé pour traiter les parasites chez les humains ou les animaux (gales, tiques, puces, poux) (Fabre et al., 2005). Il agit au niveau du récepteur du neurotransmetteur GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) des insectes (réduction du flux de chlore et perturbation de l'activité synaptique) conduisant à leur mort par hyperexcitation (Wafford et al, 1989). Il est interdit depuis le 1<sup>er</sup> juillet 1998 en France (J.O. du 15 février 1997) et dans le reste de l'Union Européenne depuis une dizaine d'années (UNEP, 2007). La Chine a interdit le lindane en 1983 sauf pour lutter contre les acridiens et le moucheron du blé (*Sitodi plosis mosellana* Gehih) (UNEP, 2007). En 2006, l'Inde et la Roumanie étaient encore les seuls pays à produire du lindane (INERIS).

### 1.2.1.1. Synthèse et propriétés physico-chimique du lindane

Le HCH a été synthétisé pour la première fois en 1825 par photochloration du benzène (Metcalf et al., 1955). On obtient en première fraction de synthèse du HCH technique contenant les différents isomères. Les étapes de précipitation et de distillation permettent de séparer l' $\alpha$  et le  $\beta$ -HCH du  $\gamma$ HCH (Figure 3).

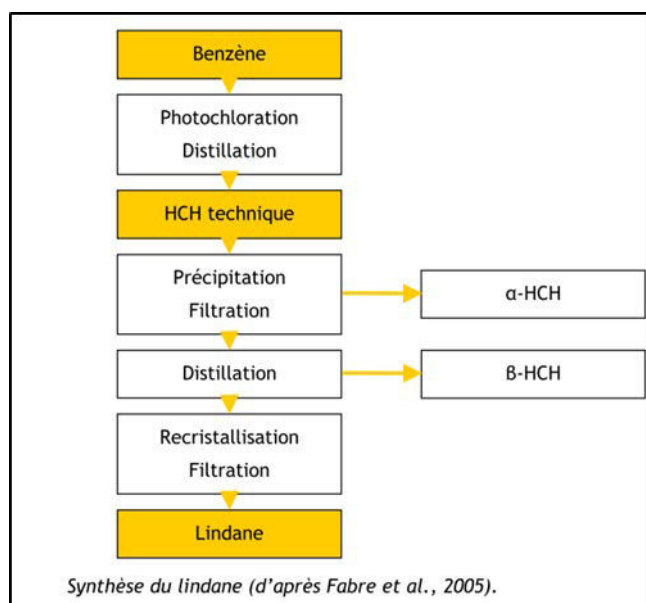


Figure 3. Synthèse du lindane (INERIS)

Le  $\gamma$ HCH (masse molaire de  $290.85 \text{ g. mol}^{-1}$ ) se présente sous la forme d'un solide blanc cristallin ayant une faible odeur de « moisissures » (Tableau I). Il est peu soluble dans l'eau (Tomlin, 1994 ; Roberts et al., 1996) avec une demi-vie par volatilisation estimée à 191 jours (Mackay et Leinonen, 1975), mais présente une bonne solubilité dans les solvants ( $435 \text{ g. l}^{-1}$  dans l'acétone). La stabilité chimique du lindane dans l'eau est estimée entre 28 jours à 1 an (Riwa, 1998). Il est considéré comme volatil (Constante d'Henry de  $0.13 \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ ). Son exposition aux UVs entraîne une dégradation chimique par photooxydation (temps de demi-vie : 270 jours) (INERIS). Le  $K_{oc}$  ( $1080\text{-}4000 \text{ l.kg}^{-1}$ ) montre une forte adsorption du lindane sur la matière organique, conférant une faible mobilité de cette molécule dans les sols (Tableau I) (Cardwell et al., 1985). Le temps de demi-vie (DT50) du lindane dans le sol est estimé à 42 jours (Federal Ministry of Agriculture and Forestry, 1998). Le DT50 dans les sédiments est estimé entre 40 jours à 162 jours (Federal Ministry of Agriculture and Forestry of Austria).

Tableau I. Tableau des propriétés physicochimiques du lindane (adapté de Calvelo Pereira, 2006)

<b>Solubilité dans l'eau (mg l<sup>-1</sup>)</b>	7.3
<b>Point de fusion (°C)</b>	112-113
<b>Densité (Kg l<sup>-1</sup>, 20°C)</b>	1.85
<b>Pression de vapeur (mm Hg, 20°C)</b>	9.4 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Constante d'Henry ( Pa.m<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>)</b>	0.13
<b>K<sub>oc</sub> (l.kg<sup>-1</sup>)</b>	1080-4000
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3.61-3.72

Le log K<sub>ow</sub> du lindane est situé entre 3.61 et 3.72 ce qui en fait une molécule de lipophilie intermédiaire. Le lindane s'accumule donc principalement dans les lipides des organismes (membranes, tissus adipeux,...) et présente un fort potentiel de bioaccumulation. Le lindane est stable chimiquement jusqu'à 165°C (Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles, INRS, 2014).

#### 1.2.1.2. Impact du lindane sur la santé humaine

L'InVS (Institut de Veille Sanitaire) a mis en évidence lors d'une étude sur l'imprégnation des pesticides dans la population française que 7% des individus avait du lindane dans le sérum et les urines (Vijaya Padma et al., 2011). En outre, le lindane après ingestion est métabolisé dans le foie. Angerer et al. (1983) ont montré qu'après plusieurs réactions enzymatiques (déshydrochloration, déshydrogénation, hydroxylation), le lindane est transformé en un grand nombre de métabolites dont les trichlorophénols et les tétrachlorophénols. Ils sont excrétés sous formes libres ou conjuguées (glucuro- ou sulfo-conjugaison) dans les urines et les fèces (INRS).

L'INRS a listé les risques et les mesures de sécurité à prendre en cas d'utilisation ou d'exposition au lindane, l'estimant comme toxique pour la santé humaine et animale, ainsi que pour l'environnement (R23/24/25 Toxique par inhalation, par contact et par ingestion ; R36/38 Irritant pour les yeux et la peau ; R50/53 Très toxique pour les organismes aquatiques). Les intoxications aiguës au lindane provoquent des atteintes du système nerveux central se traduisant par des céphalées, des troubles de l'équilibre et des angoisses. Les systèmes cardio-vasculaire, respiratoire et rénal peuvent aussi être impactés. De plus, l'ingestion de lindane provoque des troubles digestifs comme des vomissements, des diarrhées et des douleurs abdominales. Le lindane est aussi décrit comme un produit irritant



pour la peau et les muqueuses (INRS). L'intoxication chronique de travailleurs exposés provoque des neutropénies, des hépatites chroniques et des cirrhoses (Parent-Massin et al., 1994), (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1997). Il est classé cancérigène possible pour l'homme (classe 2B) par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) et par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA). Cependant, aucun effet génotoxique du lindane n'a été démontré chez l'Homme (INERIS). De plus, le lindane a été décrit comme perturbateur endocrinien (Tiemann 2008 ; Chopra et al., 2011).

### 1.2.2. La chlordécone

La chlordécone (CLD) est un insecticide de la famille des organochlorés de formule  $C_{10}Cl_{10}O$  (Figure 4). Cette molécule appartient également à la famille chimique des homocubanes, caractérisée par une structure en cage.

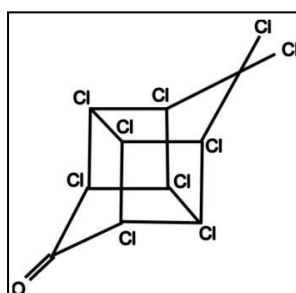


Figure 4. Structure chimique de la chlordécone

#### 1.2.2.1. Synthèse et propriétés chimiques de la chlordécone

La CLD est produite par réaction de l'hexachlorocyclopentadiène et du sulfure trioxide par chauffage en présence d'antimoine pentachlorure comme catalyseur (Brevet déposé pour la synthèse de la chlordécone par Gilbert & Giolito, 1952). La réaction obtenue est hydrolysée avec de l'eau alcaline et neutralisée avec de l'acide. On obtient ensuite la CLD par centrifugation et séchage à l'air chaud (UNEP).

Tableau II. Tableau des propriétés physicochimiques de la CLD

<b>Solubilité dans l'eau (mg l<sup>-1</sup>)</b>	0.35-1.3
<b>Point de fusion (C°)</b>	350
<b>Densité (g cm<sup>3</sup>)</b>	1.60
<b>Pression de vapeur (mm Hg, 20°C)</b>	2.5 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Constante d'Henry ( Pa.m<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>)</b>	0.0025
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	4.5 -5.4
<b>K<sub>oc</sub> (l kg<sup>-1</sup>)</b>	2000-17500

La CLD de forme cristalline blanche (masse molaire de 490,64 g mol<sup>-1</sup>) est peu soluble dans l'eau (3 mg L<sup>-1</sup>). La CLD est très peu volatile et très stable chimiquement. De par sa forme cubique et son nombre élevé de chlore, la CLD est une molécule très lipophile (LogK<sub>ow</sub> = 4.5-5.4) conférant un fort potentiel de bioaccumulation chez les organismes au niveau de leurs zones lipidiques. La CLD est une molécule fortement adsorbée dans les sols, non ionisable et présente une forte affinité pour la matière organique (Dawson et al., 1979, Achard et al., 2008). Une telle rétention au niveau des sols confère une stabilité (voire persistance) très forte. Sa DT50 dans les sols est estimé à 30 ans (Cabidoche et al., 2009).

#### 1.2.2.2. Historique de l'utilisation de la chlordécone

C'est la société américaine « Allied Chemical » qui fabriquait la CLD sous le nom commercial de « Képone ». En 1975, un accident sur la chaîne de production eu lieu dans l'usine d'Hopewell en Virginie (Etats-Unis) provoquant une fuite de CLD et une pollution importante. Cet événement a mis en évidence la toxicité aiguë de cette molécule puisque les ouvriers de l'usine ont développé des maladies comme des troubles neurologiques, des atteintes testiculaires et des tremblements, regroupés sous le terme de « syndrome kepone » (Cannon et al., 1978). La constatation des effets d'une exposition aiguë à la CLD a entraîné l'arrêt de la production et l'interdiction d'utilisation de la CLD en 1976 aux Etats-Unis.

Cependant, malgré de fortes présomptions sur sa dangerosité, la CLD a été utilisée de 1972 à 1993 en Guadeloupe et en Martinique pour lutter contre le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*) sous formulation commerciale de Képone puis de Curlone. Cela est dû à son efficacité bien plus importante que le HCH« technique » (lindane et ses isomères) utilisé précédemment dans les années 1960 et 1970. En effet, il fallait appliquer sur les bananeraies de l'ordre de 350 kg/ha/an de HCH technique pour lutter efficacement contre le charançon mais 100 fois moins de CLD (Cabidoche, 2011). Du fait des propriétés chimiques

de la molécule et de son utilisation massive, il en résulte une forte pollution des sols, des eaux de rivières et de sources entraînant une contamination des réseaux trophiques (Levillain *et al.*, 2012 ; Cabidoche *et al.*, 2009).

Suite à des études environnementales-épidémiologiques, le Ministère de l'Agriculture a interdit la vente du Curlone en date du 1<sup>er</sup> février 1990 (article L. 626 et R. 5149 à R. 5170). Malgré cette interdiction, la législation a permis la vente encore un an après le retrait d'homologation. En février 1992, une dérogation a été accordée aux planteurs de bananiers pour un délai supplémentaire jusqu'au 30 septembre 1993 pour permettre l'écoulement des stocks de Curlone.

### 1.2.2.3. Impact de la chlordécone sur la santé humaine

La source majeure d'exposition de la population à la CLD est la consommation de légumes-racines tropicaux, de poissons et de crustacés (Dubuisson *et al.*, 2007 ; Coat *et al.*, 2011 ; Cabidoche & Lesueur-Jannoyer, 2012). La tranche d'âge de la population des Antilles française la plus exposée correspond aux enfants de 3 à 5 ans présentant une valeur de 0,267 µg/g poids corporel/jour (hypothèse haute) (INVS, bulletin de veille sanitaire, n°4, Avril 2012). Une étude épidémiologique dans les Antilles françaises a montré que 20% de la population étudiée présentaient des taux sanguins supérieur à 1 µg.l<sup>-1</sup> en CLD et que 66,8 % présentaient des concentrations médianes de 0,44-0,40 µg.l<sup>-1</sup> (Multigner *et al.*, 2010).

L'exposition de rongeurs à la CLD provoque une toxicité neurologique, rénale et hépatique ainsi que des effets sur la spermatogenèse, le développement intra-utérin et une cancérogénicité (Faroon *et al.*, 1995). Chez l'Homme, la CLD est considérée comme cancérogène possible (classification 2B par le CIRC) mais non génotoxique. Il s'agit en outre, d'une molécule perturbant le système endocrinien (Hammond, *et al.*, 1979; Petersen *et al.*, 2007, Goldman *et al.*, 2000). Certaines études épidémiologiques montrent aussi un impact sur la fertilité masculine, (Multigner *et al.*, 2006.), une augmentation du cancer de la prostate (Multigner *et al.*, 2010), et une augmentation du risque de naissance d'enfants prématurés (Kadhel *et al.*, 2014). Il s'agit de présomptions de liens car peu d'études confirment ces risques et les hypothèses mécanistiques associées sont encore inconnues sauf pour le cancer de la prostate (INSERM, Multigner *et al.*, 2006). L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a défini des valeurs toxicologiques de référence pour l'homme fixées à 0,0005 mg.kg<sup>-1</sup> poids corporel (p.c.)/jour pour une exposition chronique et 0,01 mg.kg<sup>-1</sup> p.c. pour une exposition aiguë (INVS, 2012). L'INRS affiche les risques et les mesures de sécurité

suivantes pour la CLD : R24/25 Toxique par contact avec la peau et par ingestion ; R40 Effet cancérigène suspecté: preuves insuffisantes ; R50/53 Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

## 2. La pollution des sols par les organochlorés et son impact sur l'environnement

### 2.1. Contamination de l'environnement

La pollution de l'environnement par les pesticides est due (1) à une pollution ponctuelle c'est-à-dire qu'il s'agit d'un accident déversant des pesticides dans un lieu restreint, dans un laps de temps court et un nombre de produits limité à des concentrations élevées, et/ou (2) une pollution diffuse correspondant à de faibles concentrations de polluants régulièrement émises sur de grandes surfaces (Barriuso et al., 1996).

Les OCPs sont reconnus comme étant des molécules persistantes et ubiquistes qui sont répandues à l'échelle de la biosphère. Leur introduction dans l'environnement est due à leurs émissions industrielles (Barber et al., 2005) et leurs épandages agricoles (Chevreuil et al., 1996). Lors des traitements agricoles une fraction de matière active n'atteint pas sa cible et se retrouve dans l'environnement selon différents mécanismes dépendant de la nature du pesticide, de sa dose et de sa fréquence d'utilisation (Barriuso et al., 1996) (Figure 5):

- Contamination de l'atmosphère: Les plus grandes concentrations de pesticides passent dans l'atmosphère après les épandages aériens. Lors d'épandage classique sous forme liquide (poudre mouillable, flow) la formation d'embruns (gouttes d'eaux contenant le pesticide en suspension dans l'air) contamine alors l'atmosphère (Millet et al., 1997). Le lindane ainsi appliqué peut être distribué jusqu'à une distance de 5 km du lieu d'application (Scheyer et al., 2003). Par ailleurs, selon les propriétés physico-chimiques des OCPs, notamment leur caractère volatile, la volatilisation (forme gazeuse) est possible lors de l'application du pesticide ou bien à partir de la fraction déposée sur une surface (Grover et al., 1985 ; FAO : Food and agriculture organization). Certains pesticides présents dans le sol peuvent aussi se retrouver dans l'atmosphère par érosion éolienne (Larney et al., 1999). Une fois dans l'atmosphère, ils seront transportés par le vent.
- Contamination des eaux de surface: La déposition atmosphérique représente la voie principale de contamination des écosystèmes aquatiques exceptée une introduction directe (Warren et al., 2003). Les OCPs présents dans l'atmosphère retombent au sol ou dans les cours d'eau par des processus secs (sédimentation, déposition sèche) ou humides

(précipitations) (Messing et al., 2013). Une autre voie de contamination des eaux de surface est décrite lorsque les sols agricoles reçoivent une quantité d'eau importante (irrigation, précipitations atmosphériques) dépassant la capacité au champ. Le sol de surface et les pesticides sont emportés par les eaux de ruissellement puis déversés dans les rivières (Ramade, 1998). La contamination des eaux continentales entraîne, par transfert au sein du réseau hydrique de surface, une contamination des eaux marines. Il semble que l'océan représente un réservoir important des polluants organiques persistants comme le  $\gamma$ HCH (Jantunen et Bidleman, 1998 ; Guglielmo et al., 2009). Les OCPs étant hydrophobes avec une forte capacité à s'adsorber sur la matière organique (Tableau I, II) contaminent particulièrement les sédiments (Guzzella et al., 2005). En considérant la grande stabilité chimique de ces molécules, il s'agit là d'une contamination à long terme des milieux aquatiques. Dans les écosystèmes aquatiques, les OCPs se redistribuent continuellement entre les interfaces des compartiments air-eau, eau-eau, eau-sédiment.

- Contamination du sol et des eaux souterraines : Les sols sont contaminés par les OCPs directement (traitements...), par dépôts atmosphériques et plus rarement par des eaux contaminées. L'adsorption, le transfert et la persistance des OCPs dans les sols a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (Galiulin et al., 2002 ; Barth et al., 2009 ; Ali et al., 2014). Les OCPs déposés sur le sol vont se solubiliser dans l'eau du sol (au prorata de leur solubilité Tableau I & II). Cette fraction mobile s'insère ainsi dans les macro- et micro-pores du sol.

Les OCPs entrent en contact avec les complexes argilo-humiques et peuvent alors s'adsorber et/ou se fixer dans ces matrices (Cf.  $K_{oc}$  Tableau I & II). Les apports d'eau au niveau du sol vont chroniquement modifier les équilibres de répartition des OCPs entre la partie solide et la phase mobile du sol. Ainsi, le transfert vertical qui est la migration des OCPs présents dans la phase mobile du sol vers les horizons pédologiques profonds peut entraîner une contamination des eaux souterraines (lixiviation) (Gouy et al., 1999).

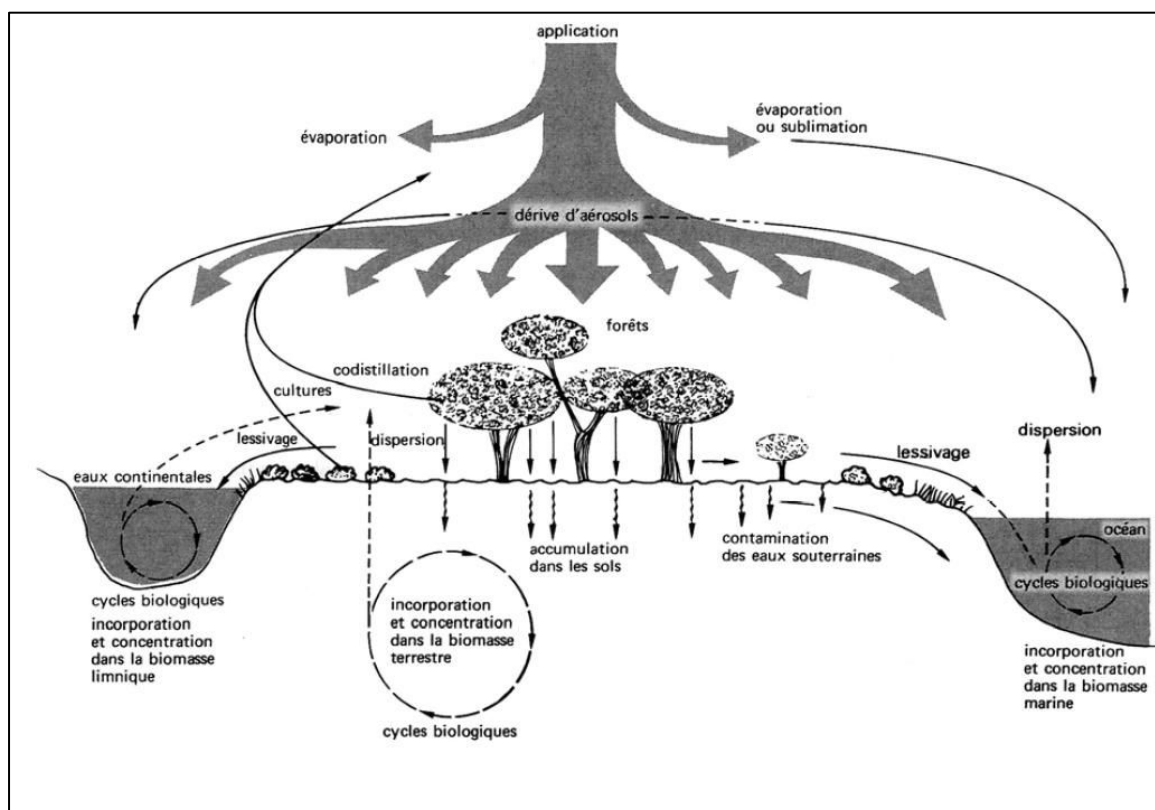


Figure 5. Mouvement des pesticides dans la biosphère (Ramade et al., 1998)

## 2.2. Etat des lieux de la contamination des sols par le lindane et la chlordécone

En Europe, le devenir du  $\gamma$ HCH dans les compartiments de l'écosphère a été particulièrement étudié afin d'évaluer les émissions et de collecter des données de surveillance (CEIP Centre on Emission Inventories and Projections, 2009). Malgré son interdiction en 1998, le  $\gamma$ HCH est encore retrouvé dans les différents compartiments de l'environnement en 2002 (Tableau III).

Tableau III. Concentrations ubiquitaires du lindane en 2002 (INERIS)

Milieu	Concentration
Air	< 0.2 ng/m <sup>3</sup>
Rivières (eaux de surface)	< 50 ng/l
Mers (eaux de surface)	0.2 ng/l
Eaux de pluie	200 ng/l
Sol	0.1 à 1 µg/kg
Sédiments	0.1 à 1 µg/kg

En 2009, le total des émissions européennes en lindane avait significativement diminué. Cependant, les sols sont particulièrement contaminés par le  $\gamma$ HCH avec des valeurs moyennes

comprises entre 0.1 à 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  avec des zones de contamination plus élevées sur sols agricoles (Figure 6 ; Villanneau et al., 2009 ; Orton et al., 2013).

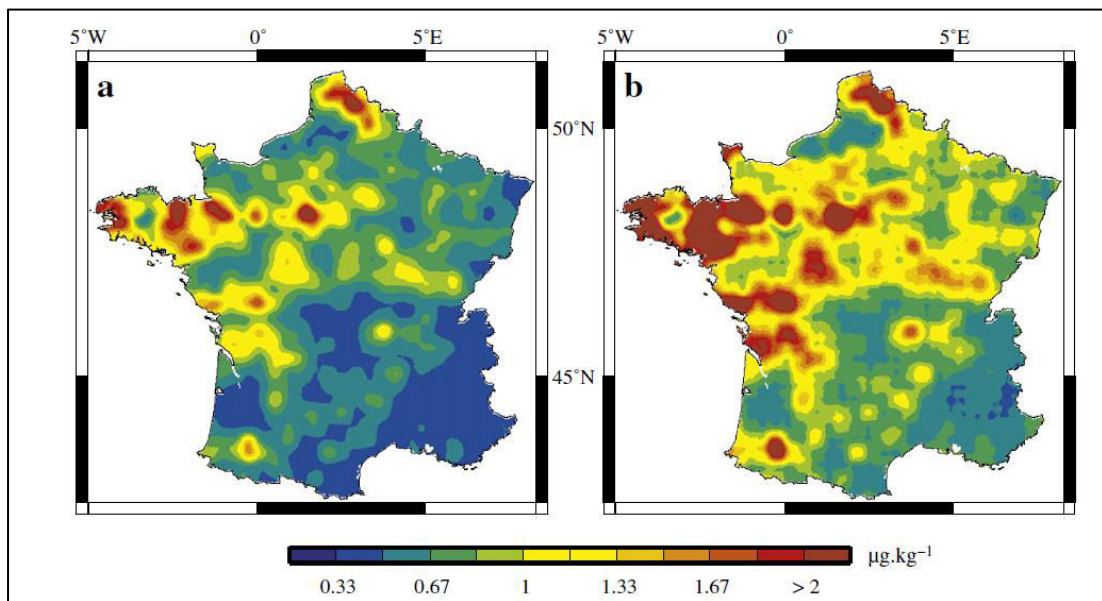


Figure 6. Prédications (a) et intervalle de confiance à 95% associé(b) de la concentration de lindane dans le sol en France ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (d'après Orton et al., 2013).

Comme la majorité des OCPs, le  $\gamma$ HCH est fréquemment détecté dans les sols. En France il est le premier en fréquence de détection suivi de près par les DDE-DDT (Mikes et al., 2009, Figure 7). La persistance du lindane au niveau des sols peut s'expliquer par sa forte adsorption aux complexes argilo-humiques ( $KOC = 1080-4000$ , Tableau I) et sa stabilité chimique ( $DT_{50\text{sol}} = 42$  jours) (Lyman et al., 1982). Les résidus liés représentent plus de 75% des résidus  $\gamma$ HCH retrouvés dans les sols contaminés (Agnihotri et al. 1996). Les isomères totaux du HCH ont été détectés dans les sols de l'ordre de 4 à 125.280  $\text{mg kg}^{-1}$ . Les valeurs extrêmes correspondent à d'anciens sites d'évacuation de déchets industriels (Miglioranza et al., 2003, Abhilash & Singh, 2009). Cependant, même si la mobilisation par lessivage dans le sol du lindane reste faible (OMS IPCS, 1991), en 2005, cinq isomères HCH (concentrations  $< 1 \mu\text{g.l}^{-1}$ , notamment le  $\beta$  et  $\epsilon$ -HCH) sont détectés dans les eaux souterraines de la région Rhône-Alpes (DREAL, 2008). Des niveaux de contamination élevés (730  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) ont pu être mesurés dans des eaux de nappes situées à proximité d'un ancien site industriel en Allemagne (Ricking & Schwarzbauer, 2008).



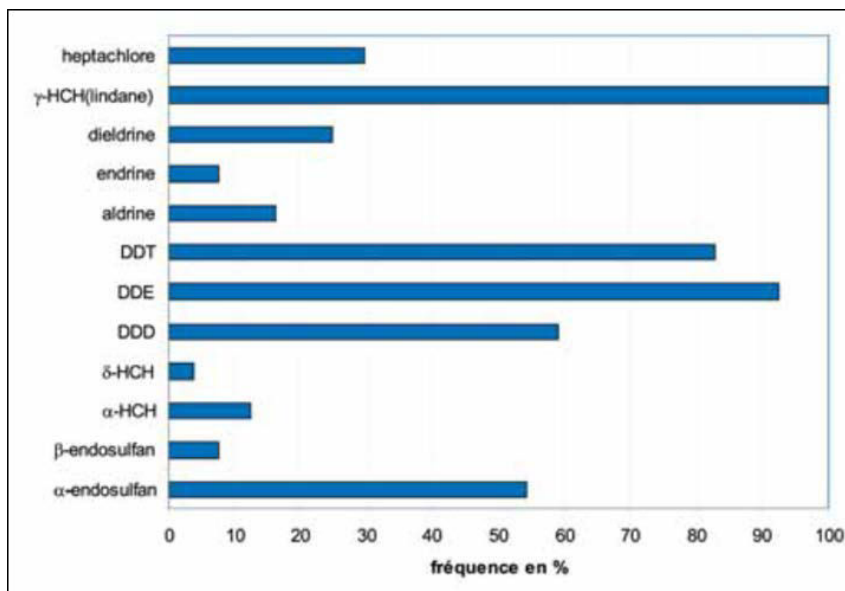


Figure 7. La fréquence (en %) de détection des OCPs dans les horizons de surface (0-30cm) des sols du nord de la France (ANSES, programme POP-RMQS, 2009)

La CLD montre une très forte rémanence dans les sols avec des concentrations extrêmes de  $10 \text{ g.kg}^{-1}$  mesurées sur les anciens sites industriels de synthèse (Epstein, 1978). Aux Antilles, le risque environnemental lié à la CLD est particulièrement étudié, où on estime que l'apport cumulé en CLD de 1973 à 1993 était de  $60 \text{ kg.ha}^{-1}$  (ou  $6\text{g/m}^2$ ) (Cabidoche et al., 2011). On estime la contamination actuelle des sols agricoles antillais par la CLD de l'ordre de  $1.8\text{-}15 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Cabidoche et al., 2009 ; Luellen et al., 2006 ; Levillain et al., 2012.) En 2011, la surface agricole utile (SAU) polluée par la chlordécone représente respectivement  $1/5^{\text{e}}$  et  $2/5^{\text{e}}$  de la SAU totale en Guadeloupe et en Martinique (Cabidoche et al., 2011). A la Martinique, les études de suivi de la pollution montre qu'elle a peu diminuée de 2009 à 2012 (Figure 8).

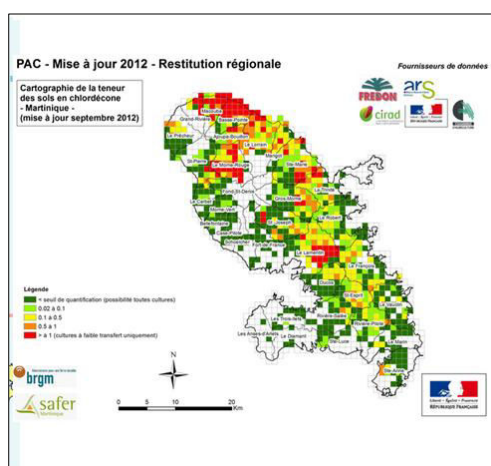


Figure 8. Cartographie de la teneur en chlordécone du sol de la Martinique en 2012 (ARS, 2012)



Il en est de même en Guadeloupe où les simulations montrent encore une pollution comprise entre 1 et 5 mg.kg<sup>-1</sup> de sol en 2200 (Figure 9). Les modélisations basées sur le comportement des OCPs dans les sols et leur stabilité chimique illustre la différence de rémanence de la CLD et du  $\gamma$ HCH aux Antilles (Figure 10). Le  $\beta$ HCH devrait disparaître sur un pas de temps d'environ 50 ans alors que Cabidoche et al. (2006) estime que la pollution causée par la CLD sera rémanente sur plusieurs siècles (> 700 ans) dans l'environnement (Figure 10).

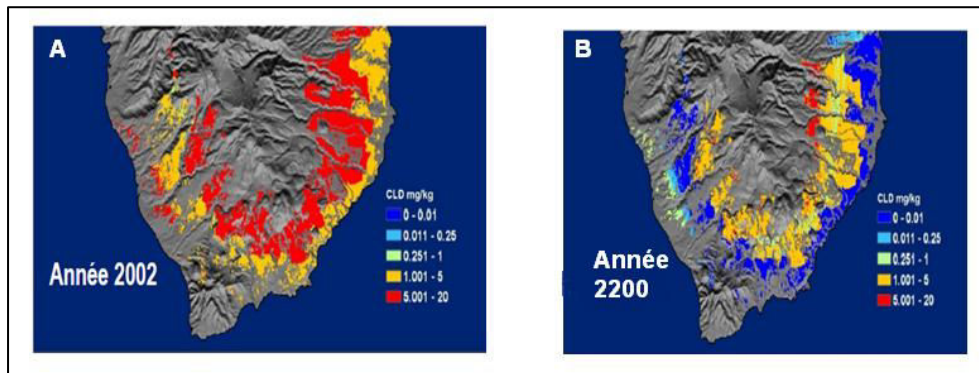


Figure 9. Simulation de l'évolution des teneurs en chlordécone de la couche de surface des sols de bananeraies du sud de Basse Terre, Guadeloupe entre 2002 (A) et 2200 (B) (Cabidoche, 2011).

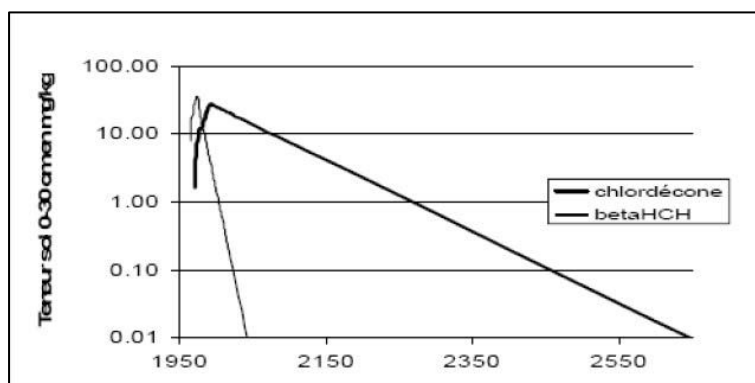


Figure 10. Illustration de la différence de comportement dans les sols du lindane et de la chlordécone (Cabidoche et al., 2009)

Malgré une adsorption importante de la CLD sur la matière organique du sol, dans certains cas comme les sols de bananeraies, 70 à 80% du stock de CLD peut être entraîné par lessivage (Cattan et al., 2007 ; Cattan et al., 2012). Entre 2003-2008, la Direction Régionale de l'Environnement a communiqué que la CLD a été détectée dans 63% des prélèvements d'eau du réseau étudié. Les eaux de Rivière Grande Anse montrent des concentrations en CLD supérieures à 0,1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  avec une concentration maximale de 6  $\mu\text{g.l}^{-1}$  en novembre 2004 (Rapport du Sénat N°487, 2009).

### 2.3. Ecotoxicité des organochlorés

Les OCPs hautement lipophiles sont communément décrits comme molécules bioconcentrables et bioaccumulables. Le sol reste un milieu très important pour le transfert des OCPs dans le biota. Certaines études ont montré que la pédofaune bioaccumule le  $\gamma$ HCH, comme les vers de terre (Šmídová & Hofman, 2014 ; Figure 11), les Enchytrides (Amorim et al., 2002), les Collemboles (Lock et al., 2002). L'autre compartiment central pour la contamination du biota est le milieu aqueux. Depuis les années 70s, la bioconcentration/bioaccumulation des OCPs dans la faune aquatique est largement décrite chez les poissons, les oiseaux de mer et les mammifères vivant en arctique (Streit, 1992). On estime que les facteurs de bioconcentration (BCF) sont de 170, 442 et 1246 respectivement chez *Mytilus edulis*, *Salmo trutta fario* et *Pseudorasbora parva* (INERIS, 2005).

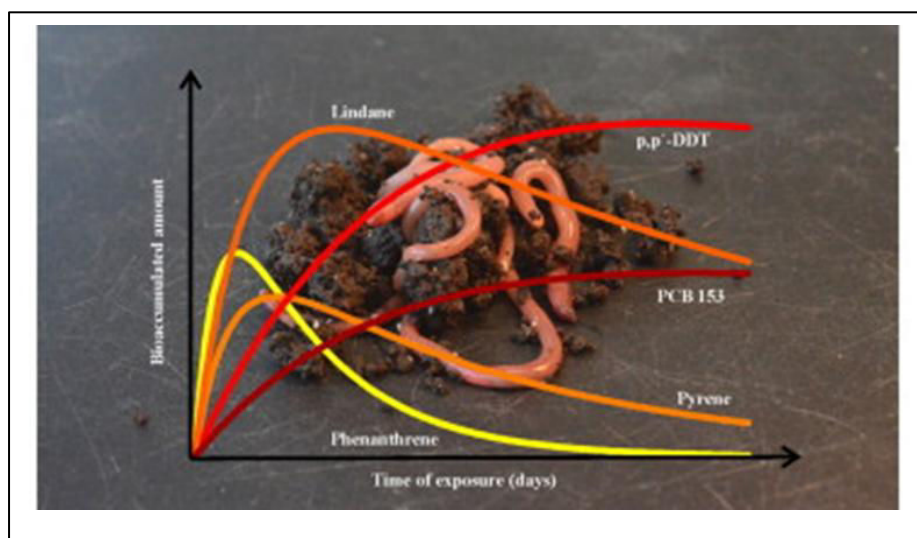


Figure 11. Bioaccumulation des pesticides dans les vers de terres (Šmídová & Hofman, 2014).

Concernant la CLD, les crevettes et les poissons d'eaux douces aux Antilles sont hautement contaminées avec des valeurs atteignant respectivement de 3 000 à 5 000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  poids frais et de 5 000 à 10 000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  poids frais (Cabidoche et al., 2011). On estime les facteurs de bioaccumulation de la CLD dans les algues, les invertébrés et les poissons respectivement de 6000, 21600 et 60200 (UNEP, 2005). Depuis les années 1960, avec le cas d'école du DDT, les OCPs sont reconnus comme étant des molécules bioamplifiables au sein des chaînes alimentaires (Carson, 1962 ; Roche et al., 2009). La bioamplification du  $\gamma$ HCH a largement été décrite au sein de divers types de réseaux trophiques atteignant par ce transfert les carnivores de niveau trophique élevé (oiseaux, mammifères) (Albanis et al., 1995 ; Hoekstra

et al., 2003 ; Figure 12). La bioamplification de la CLD a récemment été décrite par Coat et al. (2011, Figure 13).

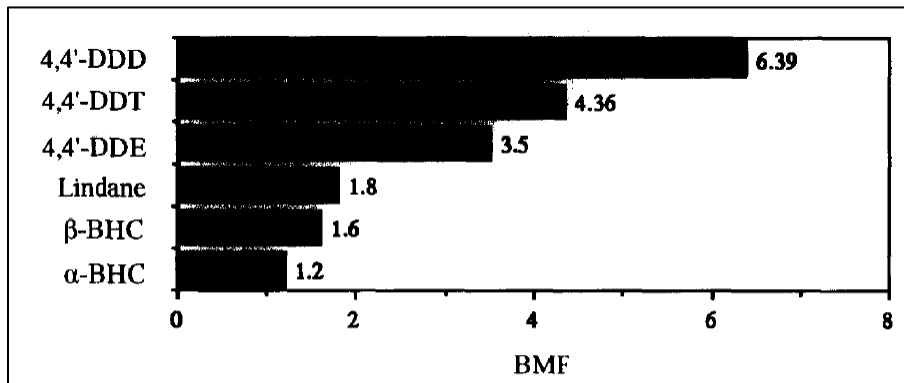


Figure 12. Comparaison des valeurs moyennes des facteurs de bioamplification des pesticides organochlorés chez les pélicans (Albanis et al., 1995).

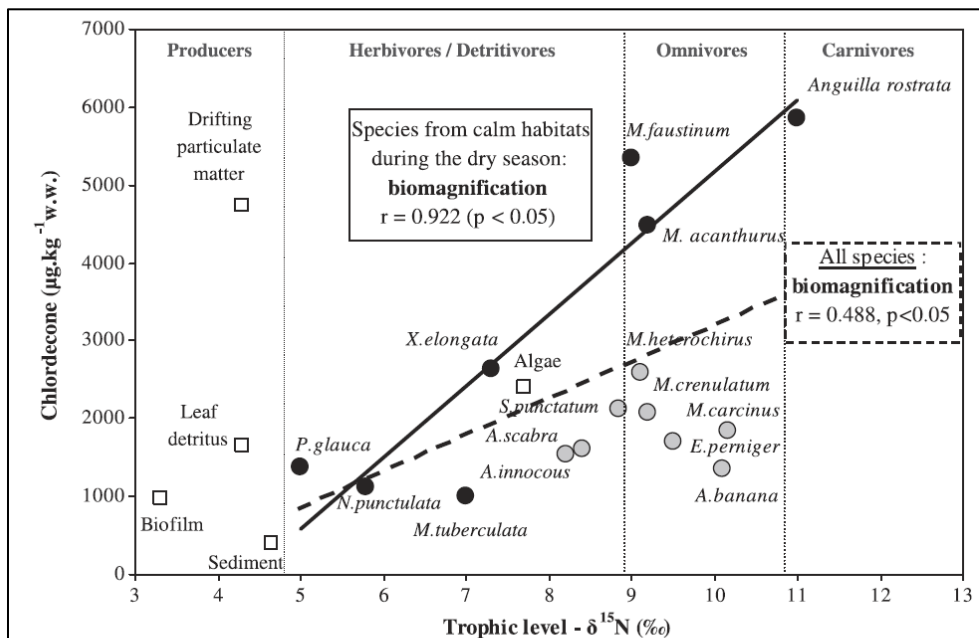


Figure 13. Comparaison des concentrations de la chlordécone et des niveaux de contamination de la chaîne trophique dans les rivières durant la saison des pluies. La ligne hachurée représente la régression linéaire pour l'ensemble du biota (les cercles). La ligne pleine représente la régression linéaire tenant compte uniquement des espèces vivant dans les habitats calmes (cercles noirs). Aucune relation n'est observée pour les espèces vivant dans les eaux rapides (cercles gris). (Coat et al., 2011)

L'omniprésence des OCPs dans les milieux et les réseaux trophiques peuvent provoquer des effets nocifs sur les systèmes biologiques. La toxicité des OCPs est variable en fonction des différents caractères chimiques (structure chimique, forme moléculaire, groupes fonctionnels...), de l'environnement abiotique (dose, température...) et de la sensibilité des organismes exposés. Les effets toxiques des contaminants sur les organismes englobent divers changements (comportementaux, physiologiques, interactions biotiques) qui entraînent des modifications dans la composition des populations et des communautés (Brown et al., 2000 ; Fleeger et al., 2003). Le DDT est connu pour amincir la coquille des œufs des oiseaux, les

rendant ainsi plus fragiles et empêchant une bonne reproduction (Holm et al., 2006). Cela démontre que certains OCPs ont un effet sur le déclin des capacités de reproduction des animaux qui pourrait entraîner une diminution de la population et dans les cas extrêmes une extinction des espèces (Tomza-Marciniak et al., 2014).

### 3. Phytotoxicité des pesticides

De nombreuses études ont montré un effet létal des OCPs sur la germination et le développement de nombreuses familles végétales comme les *Brassicaceae*, *Leguminoceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae* et *Poaceae* (Kumar et al., 1995; Arkhipchuk et al., 2000; Bidlan et al., 2004; Bueno et al., 2004; Kidd et al. 2008; Abhilash & Singh, 2010; Li et al., 2011; Chouychai & Lee, 2012). Par ailleurs, certaines espèces végétales sont capables de tolérer des expositions élevées aux OCPs dont le maïs (*Zea mays*) (Chouychai & Lee, 2012; Somtrakoon & Pratumma, 2012). Cependant malgré certaines évidences morphologiques ou physiologiques de toxicité, les mécanismes métaboliques, biochimiques et moléculaires impliqués dans ces effets toxiques sont encore mal connus.

#### 3.1. Cycle cellulaire chez les plantes

Les symptômes décrits lors de précédentes études ont mis en évidence les effets perturbateurs des OCPs sur la croissance des plantes avec des effets sur les racines : hypertrophie et absence de différenciation cellulaire, induction des aberrations chromosomiques, de la polyploïdie et des malformations des parois cellulaires (Vaarama, 1947; Charnets et al., 1973; Anderegg et al., 1977; Grant, 1978; Jeanne et al., 1979; Kumar et al., 1995). Le DDT et le  $\gamma$ HCH semblent réduire la synthèse d'ADN (Anderegg et al., 1977; Lal & Saxena, 1980). Le DDT a été décrit comme inhibiteur du cycle cellulaire au stade G1 avec comme hypothèse une perturbation du transport des précurseurs de synthèse (thymidine) des acides nucléiques (Lal & Saxena, 1980; Lal & Saxena, 1981).

Chez les plantes, les mécanismes moléculaires exacts impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire sont largement méconnus (Ohno et al., 2011). Le cycle cellulaire mitotique possède 4 phases (Figure 14A): G1 la phase de croissance de la cellule, S la phase de réplication de l'ADN, G2 la phase prémitotique de croissance de la cellule et de synthèse de protéines, et M la phase de division de la cellule mère en deux cellules filles (mitose/cytokinèse). La progression du cycle cellulaire est régulée au niveau de 'checkpoints' orchestrés par

l'assemblage et l'activation de complexes protéiques formés par des cyclines (CYC) et des kinases cycline-dépendante (CDK) (De Veylder et al., 2007; De Veylder et al., 2011).

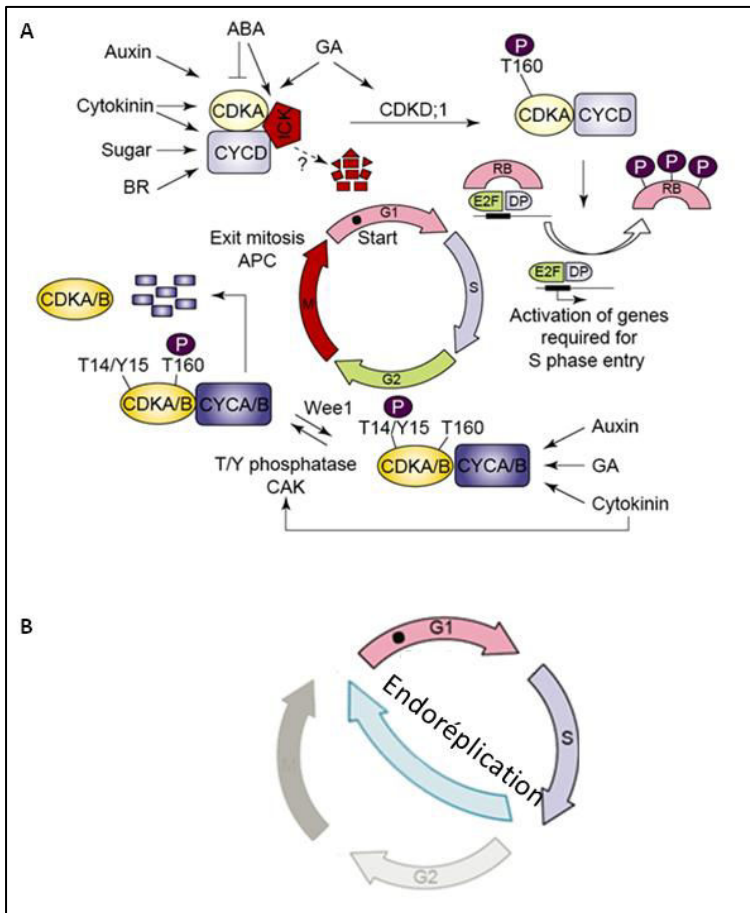


Figure 14. A. Cycle cellulaire en condition normale chez les plantes. B. Endocycle (adapté de Vigneault, 2009).

Cinq types de cycline sont décrites chez les plantes : les cyclines A apparaissant au début de la phase S et responsables de sa progression puis inactivées lors de la transition de la phase G2 à M . Les cyclines B apparaissant lors de la phase G2 et contrôlent la transition G2/M puis sont inactivées quand les cellules entrent en anaphase (Weingartner et al., 2003). Les cyclines D contrôlent la progression de la phase G1 à la phase S (Buendia-Monrea et al, 2011). Les cyclines E activent le passage de la phase G1 à S après l'activation des cyclines D. Les cyclines H activent les cyclines B (Dewitte et al., 2003). Certaines autres protéines ont aussi un rôle dans la progression et le contrôle du cycle cellulaire. Il peut s'agir de protéines déphosphorylante comme CDC25 (Cell Division Cycle) ou phosphorylante comme CAK (CDK-activating kinase) ou WEE-1. WEE-1 code par exemple pour une protéine kinase qui peut stopper le cycle cellulaire en phase G2 (De Schutter et al, 2007).

L'APC (Anaphase Promoting Complex) une ubiquitine ligase est active lorsqu'elle est associée à la protéine CDC2. Son rôle est de détruire la sécurine qui inhibe la séparase, enzyme de séparation des chromatides-sœurs lors de l'anaphase tant que les chromosomes

métaphasiques ne sont pas correctement attachés au fuseau par leurs kinétochores (assemblage supramoléculaire de protéines au niveau des régions centromériques des chromosomes mitotiques). L'APC active aussi la cycline B ce qui permet la sortie de la mitose (Cebolla, et al, 1999).

Enfin, un facteur de transcription, E2F, active les gènes nécessaires à la phase S. Il se trouve sous la forme inactive dans le cytoplasme des cellules en G0. C'est la protéine RB (retinoblastoma-related protein) qui peut l'activer une fois qu'elle-même a été activée par le complexe cycline D/CDK4 (Borghini et al., 2010). E2F peut ainsi activer la transcription de la cycline E (Menges et al., 2005).

Chez les plantes, il est répandu dans les tissus végétaux que certaines cellules doublent leur matériel génétique sans réaliser de mitose/cytokinèse (Bourdon et al., 2011; Li et al., 2012). Ce phénomène appelé endoréplication provoque une polyploïdie des cellules (Figure 14B, De Veylder et al., 2011 ; John et al., 2008).

### 3.2. Métabolisme des racines

La compréhension des réponses biologiques aux stress biotiques ou abiotiques, a fait l'objet de nombreuses études avec le développement de nouveaux outils comme la transcriptomique (Kreps et al. 2002), la protéomique (Bae et al., 2003), la métabolomique (Bino et al., 2004) et la fluxomique (analyse des flux métaboliques) (Ratcliffe & Shachar-Hill et al., 2006). Le métabolome est une réponse intégrative des régulations et/ou perturbations qui ont lieu en amont au niveau génétique, transcriptomique et protéomique (Figure 15).

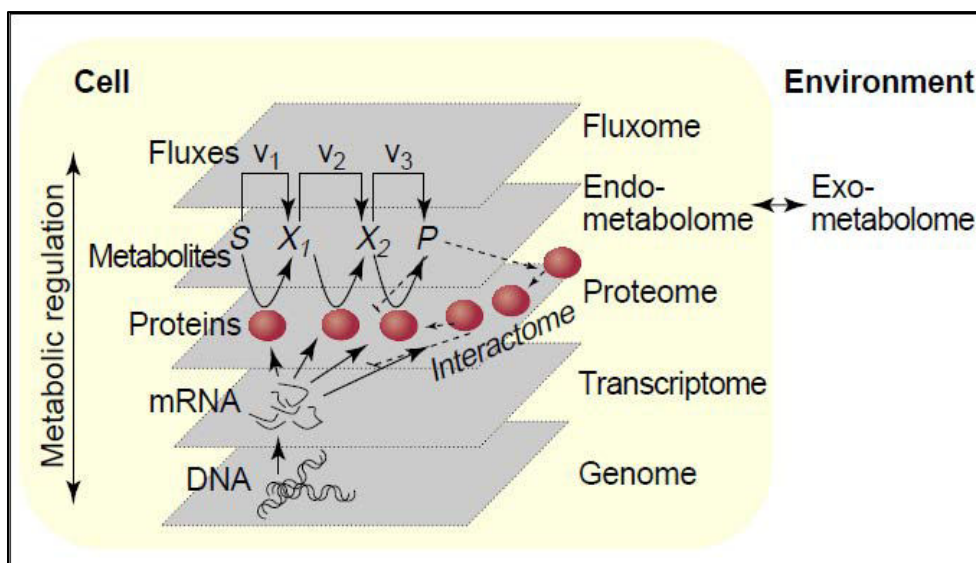


Figure 15. Les différents niveaux « omic » à l'échelle cellulaire (Nielsen & Olivier, 2005).



La métabolomique constitue un outil performant pour caractériser les phénotypes métaboliques en relation aux stress environnementaux : biotiques (Kushalappa & Gunnaiah, 2013), sécheresse, salinité, température et nutrition (Sardans et al., 2011; Rodziewicz et al., 2014). Peu de travaux ont étudié le métabolome des plantes en réponse aux polluants organiques (Aranibar et al., 2001; Aliferis et al., 2009; Kluender et al., 2009; Thi et al., 2009; Trenkamp et al., 2009; Lubbe et al., 2012). Ces études montrent que la modulation du métabolome lié à ce type de stress ne concerne pas uniquement la production de métabolites spécifiquement impliqués dans la mise en place de la tolérance (ou de la lutte) contre ce stress chimique, mais aussi une modification du métabolisme primaire et secondaire. Il s'avère que les pesticides peuvent perturber l'état énergétique (métabolisme des carbohydrates) et induire un enrichissement d'un certain nombre d'acides aminés du réseau métabolique des plantes (Sardans et al., 2011). A ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'a mesuré l'impact des OCPs sur le métabolisme végétal par une étude de métabolomique.

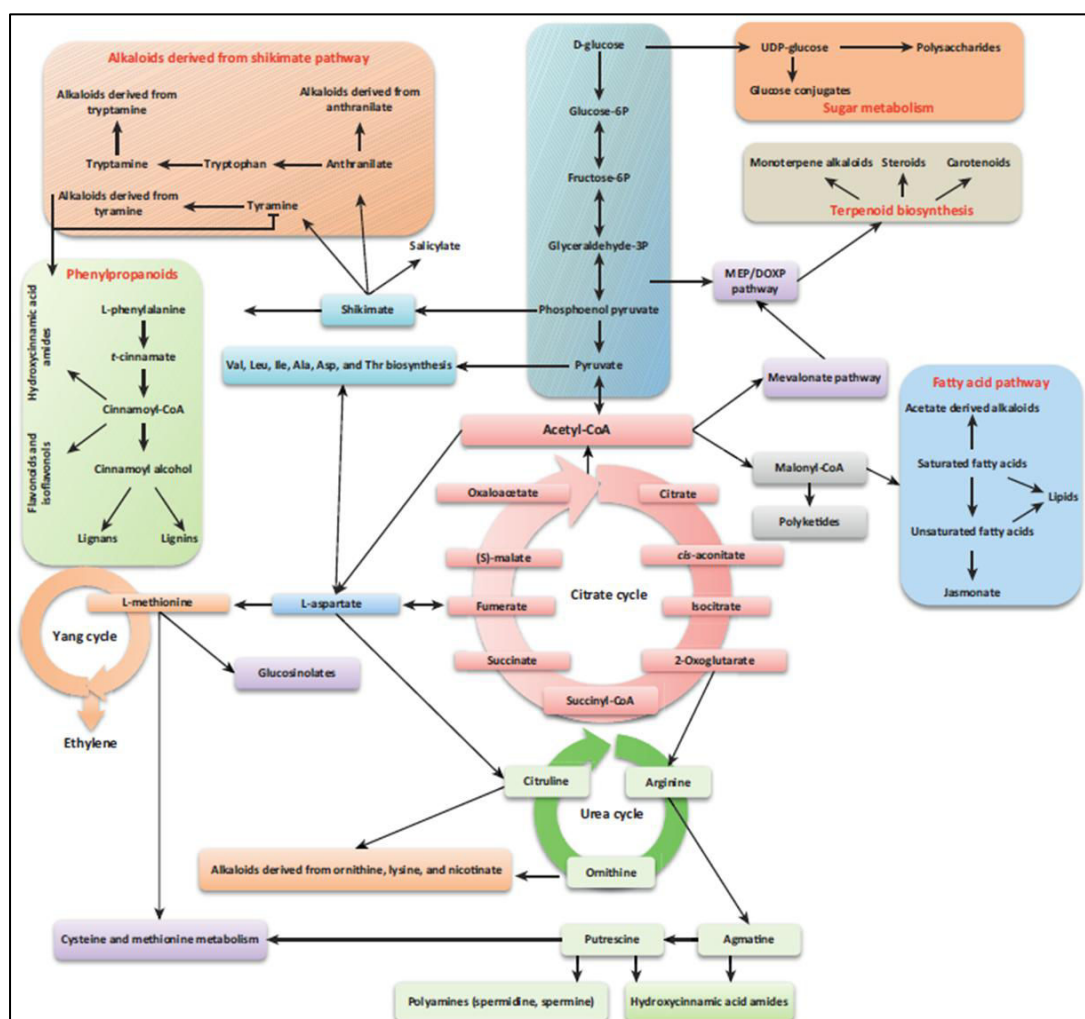


Figure 16. Schéma synthétique du métabolisme des racines (Kushalappa et al., 2013)

Chez les plantes, les cellules racinaires sont des cellules hétérotrophes c'est-à-dire qu'elles dépendent des cellules autotrophes des feuilles pour obtenir des molécules organiques (majoritairement des carbohydrates) nécessaires à leur métabolisme (Stitt, 2013). Chez la majorité des plantes, le saccharose est le sucre principalement (> 95%) transporté dans le flux phloémien (Schultz et al., 2013). Les plantes peuvent stocker des sucres solubles ou de l'amidon pour assurer en cas de stress la respiration cellulaire et l'activation des voies métaboliques impliquées dans la réponse physiologique au stress (Stitt, 2013). La glycolyse qui a lieu partiellement dans le cytosol et les plasmides est une voie métabolique qui oxyde le glucose en pyruvate, produisant des molécules énergétiques ATP (Van Dongen et al., 2011). La décarboxylation oxydative du pyruvate (complexe pyruvate déshydrogénase) fournit l'acétyl-CoA, substrat utilisé au niveau mitochondrial pour l'amorçage du cycle de Krebs (Tovar-Méndez et al., 2003). L'acétyl-CoA et le cycle de Krebs sont la plaque tournante du métabolisme racinaire permettant de réguler le métabolisme des acides aminés, des sucres et des lipides (Figure 16, Rawsthorne, 2002 ; Oliver et al., 2009). La régulation et la combinaison de ces différentes voies métaboliques sont très flexibles permettant ainsi à la plante de s'adapter aux besoins physiologiques et aux stress environnementaux (van Dongen et al., 2011).

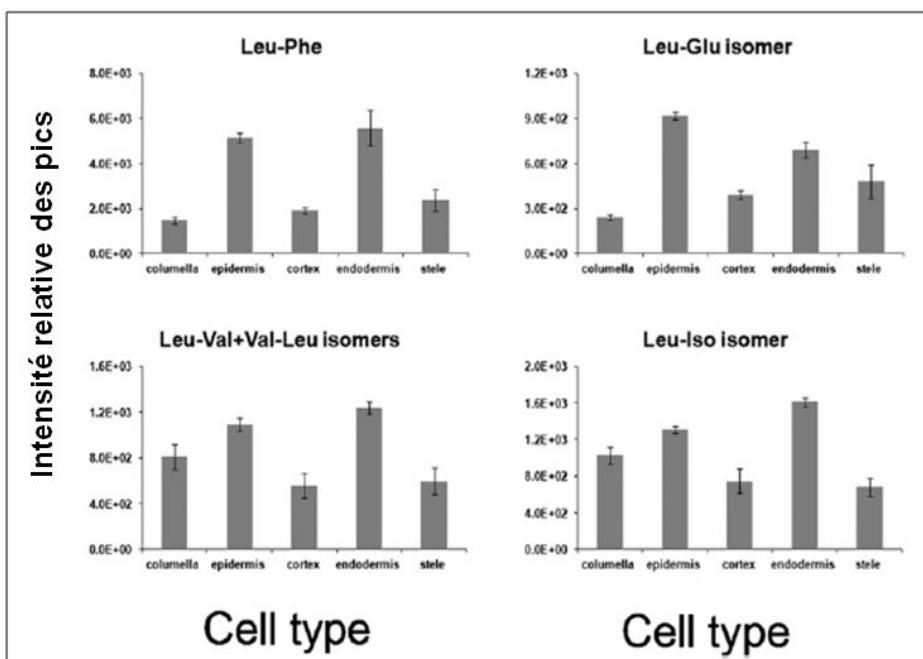


Figure 17. Intensité relative des pics de dipeptides dans les tissus racinaires chez *Arabidopsis thaliana* (Moussaieff et al., 2013)



De plus chez les plantes, il est démontré que les spécificités du métabolisme varient d'un tissu à l'autre et que le coût énergétique de la maintenance cellulaire est variable entre les cellules (Sweetlove et al., 2010 ; Sweetlove et al. 2014 ). Moussaieff et al. (2013) ont démontré les différences du métabolome entre les plusieurs tissus constitutifs des racines de *A. thaliana*. Par exemple, la majorité des dipeptides (nécessaires pour la croissance des plantes) analysées sont principalement composés d'acides aminés ramifiées (leucine, isoleucine) et sont abondants dans l'épiderme et l'endoderme (Figure 17).

Ces différences métaboliques complexifient la compréhension des flux de distribution à l'échelle de l'organe. Par ailleurs, les racines peuvent synthétiser une grande variété de métabolites secondaires. Il s'agit de métabolites présents en faible quantité et appartenant aux 3 grandes familles que sont les phénols (tanins, lignine, flavonoïdes), les terpènes (molécules entre 5 carbones à plus de 40 ; gibbérellines, huiles essentielles) et les alcaloïdes (quinine, morphine) (Bourgaud et al. 2001, Figure 18)

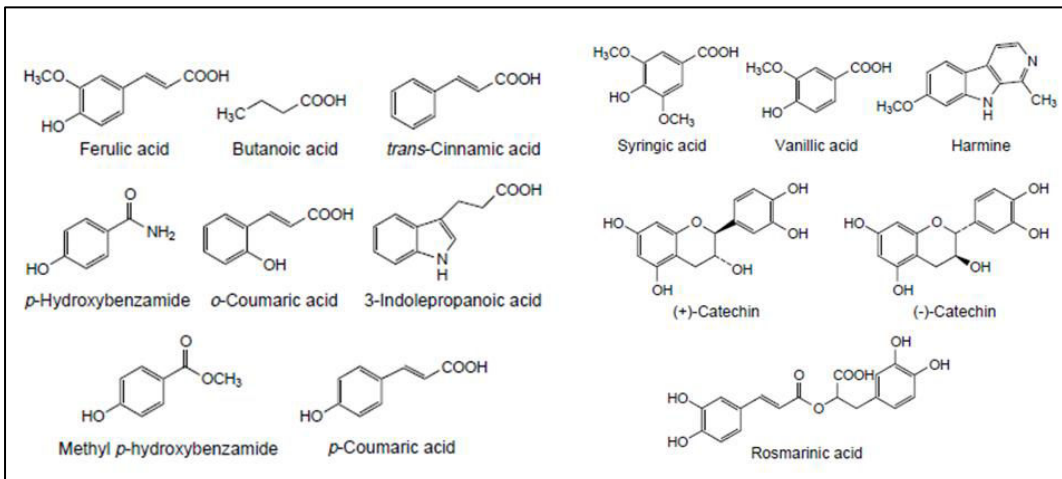


Figure 18. Métabolites secondaires isolés d'exsudats racinaires d'*Arabidopsis thaliana*, d'*Ocimum basilicum*, d'*Oxalis tuberosa* et de *Centaurea maculosa* (adapté de Bais et al., 2004).

Ces métabolites secondaires sont la plupart du temps impliqués dans les relations entre la plante et l'environnement (allélopathie, défenses contre les attaques, attraction des pollinisateurs...) (Neilson et al., 2013). Comme précédemment, le métabolisme secondaire est spécifique à chaque type cellulaire comme l'illustre la Figure 19, où les phénylpropanoïdes sont présents dans plusieurs types cellulaires mais plus abondant dans les cellules corticales (Moussaieff et al., 2013).

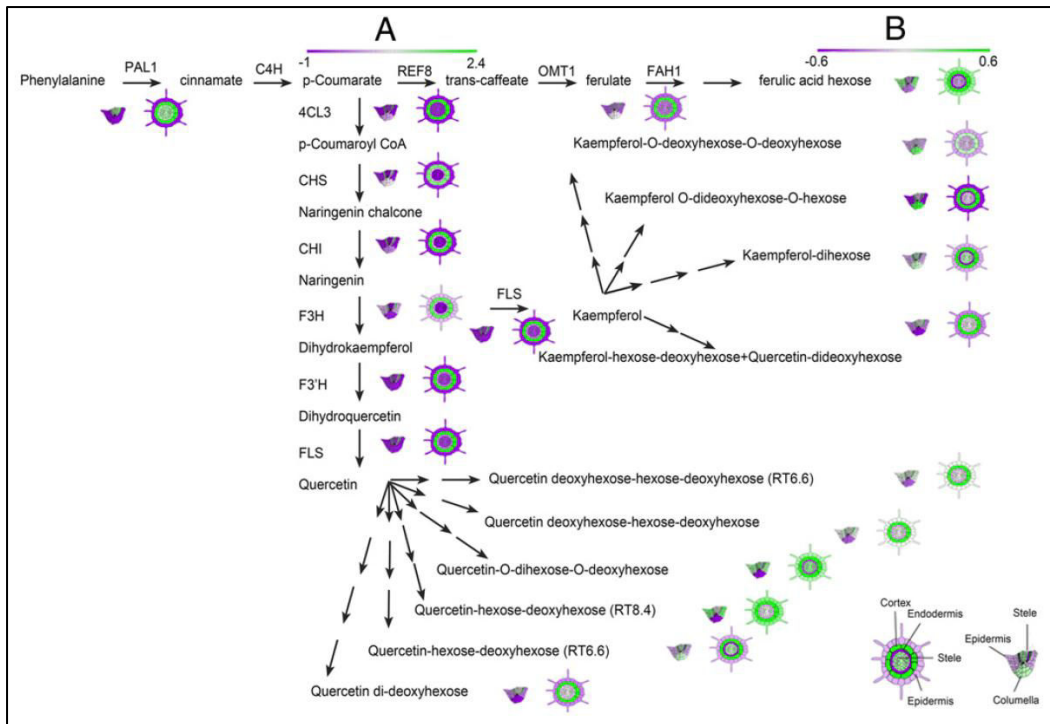


Figure 19. Abondance des phénylpropanoïdes dans les tissus de racines de *A. thaliana* (Moussaieff et al., 2013)

Enfin, les racines produisent aussi des exsudats qui sont des molécules sécrétées dans le sol par les racines ayant un rôle important dans les interactions sol-plante (cf. section 7.1. Les relations plante-microorganismes-environnement). Plusieurs sites de rhizodéposition sont décrits (Figure 20) libérant différents types de molécules organiques (Jones et al., 2004 ; Baetz & Martinoia, 2014).

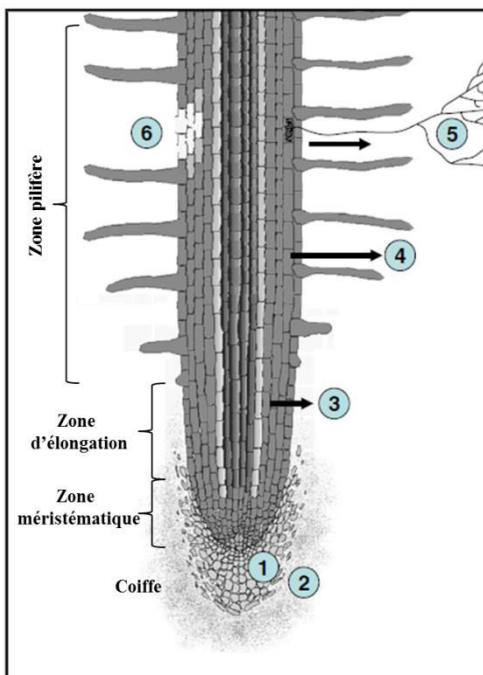


Figure 20. Schématisation d'une racine en croissance et des sites de rhizodéposition. 1, coiffe ; 2, production de mucilage ; 3, libération d'exsudats racinaires solubles ; 4, libération de composés organiques volatiles ; 5, échanges de matières carbonées avec les symbiontes ; 6, pertes de produits organiques par mort ou lyse cellulaire (épiderme, cortex). D'après Jones et al. (2009).

Le mucilage est composé principalement de polysaccharides (excrétés par exocytose), de protéines et de phospholipides (Jones et al., 2004). Les exsudats sont de petites molécules perdues par diffusion passive par les cellules racinaires dont l'intensité dépend des conditions environnantes (perméabilité membranaire, du gradient de concentration plante-sol, climat...). Ces exsudats sont généralement des sucres, acides aminés et des acides organiques (Tableau IV, Campbell et al., 1997).

Tableau IV. Liste des composés organiques décrits dans les exsudats racinaires (Campbell et al, 1997)

Carbohydrates	Carboxylic acids	Amino acids	Phenolic acids	Long chain aliphatic acids
<i>A</i>				
arabinose	acetic acid	L-alanine	hydroxy benzoic acid*	oleic acid*
D-fructose	citric acid	L-alanyl-glycine	ferulic acid*	palmitic acid*
D-galactose	alpha-hydroxy butyric acid	L-asparagine	coumaric acid*	stearic acid*
alpha-D-glucose	alpha-keto valeric acid	L-aspartic acid	sinapic acid*	linolenic acid*
maltose	malonic acid	hydroxy L-proline	caffeic acid*	
D-raffinose	propionic acid	L-leucine	chlorogenic acid*	
L-rhamnose	succinic acid	L-ornithine	protocatechuic acid*	
sucrose	fumaric acid*	L-phenylalanine		
ribose*	oxalic acid*	L-serine		
xylose*	glycolic acid*	L-threonine		
	tartaric acid*	gamma-amino butyric acid		
	malic acid*	tryptophan*		
	oxaloacetic acid *	methionine*		
		lysine*		
		arginine*		
		glycine*		
		valine*		

Certains processus actifs d'excrétion ont été décrits pour les solutés chargés et parfois l'utilisation de canaux spécifiques (Jones et al., 2004). Des métabolites secondaires (phénols) sont aussi sécrétés pouvant jouer différents rôles (mobilisation de certains nutriments, relation avec l'environnement biologique) (Bais et al., 2004). D'autres molécules comme des protéines de défense (glucanases, chitinases, protéines d'inactivation ribosomale...) sont libérées par les racines (Bais et al., 2009). En résumé, les racines peuvent libérer dans le sol des métabolites primaires et secondaires, les exsudats étant caractéristiques pour chaque espèce végétale. Enfin, les racines sont capables d'ajuster leur métabolisme en réponse à un stress biotique ou abiotique (Flores et al., 1999 ; Figure 21).

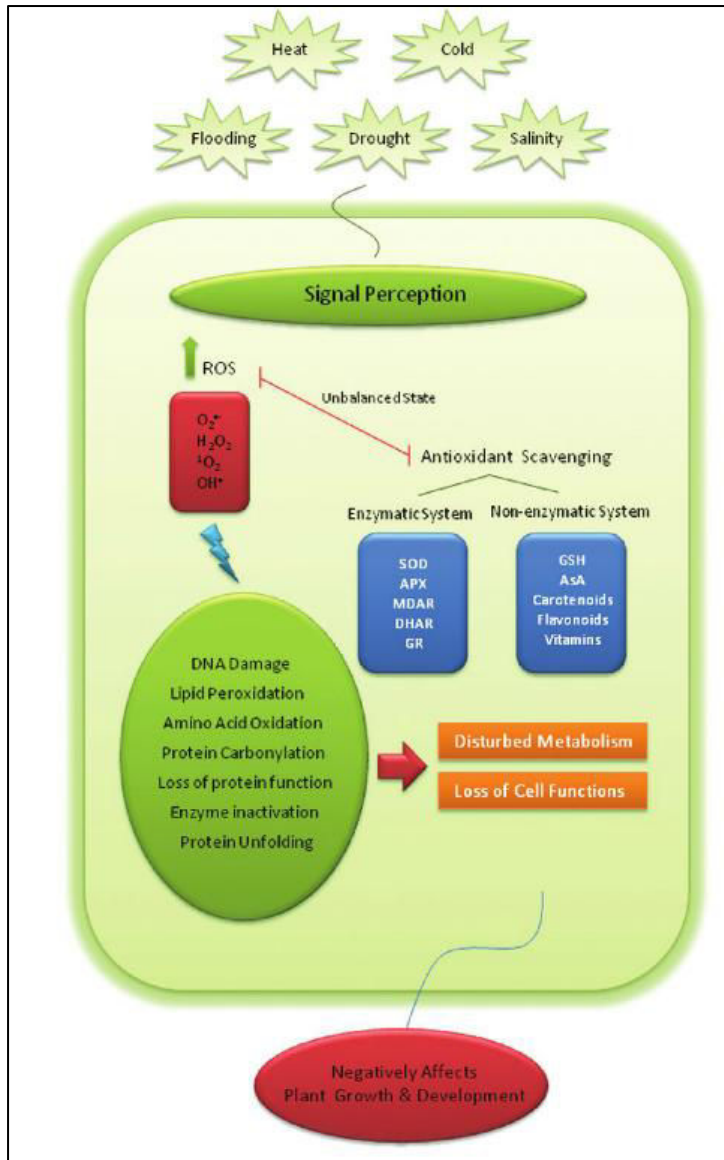


Figure 21. Impact cellulaire d'un stress abiotique (Hossain et al.,2012).

### 3.3. Stress oxydant et mort cellulaire/apoptose chez les plantes

Certaines études précédentes ont démontré que les pesticides organophosphorés (Liu et al., 2005 ; Parween et al., 2012), les chlorobenzènes (San Miguel et al., 2013) et les OCPs (Menone et al., 2008 ; Faure et al., 2012 ; Zhang et al.,2013) induisent un stress oxydant chez les plantes. Le stress oxydant est décrit comme étant un déséquilibre entre les systèmes prooxydants (respiration cellulaire, radiation, xénobiotique) et antioxydants (enzymes, vitamines, pigments...) en faveur des premiers (Siess, 1991). Ce type de stress est caractérisé par la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS, Reactive Oxygen Species) qui sont des formes partiellement réduite de l'oxygène. Les ROS peuvent être des espèces radicalaires (radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$ ) ou non radicalaires

(peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , hydroperoxyde  $HO_2^-$ ). Chacune de ces espèces possède une réactivité différente (Winterbourn et al., 2008). Le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), en se dismutant, forme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui génère l'espèce la plus toxique pour la cellule, le radical hydroxyle ( $HO\bullet$ ) (Imlay et al., 2008).  $H_2O_2$  est l'espèce réactive de l'oxygène (ROS) la plus préminente et montre une viabilité cellulaire assez longue, ce qui en fait le modulateur principal de la réponse cellulaire aux stress (Mittler et al., 2004 ; Foyer & Noctor, 2005 ; Zimmermann & Zentgraf, 2005). Ces ROS sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même. Ils sont à l'origine du processus de stress oxydant (Imlay et al., 2008). Il existe chez les plantes un ensemble de molécules (vitamines, chélateurs...) et un bagage enzymatique (superoxydes dismutases, catalases, peroxydases, glutathion réductases) très varié pour gérer la formation de ROS (Mittler et al., 2004; Foyer & Noctor, 2005; Zimmermann & Zentgraf, 2005). Les ROS influencent le signal cellulaire modulant ainsi de nombreux processus moléculaires responsables de la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire (Dudits et al., 2011 ; De Pinto et al., 2012). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'induction observée de l'apoptose-like ou la mort cellulaire programmée (PCD) par les ROS dont l'une des possibilités est l'induction de l'apoptose (Gadjev et al., 2008). La PCD peut être distinguée de la mort accidentelle par des critères morphologiques comme la rétraction de la cellule, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et cellulaire, et la phagocytose des corps apoptotiques (Danon A., 2000 ; Xiong et al., 2006) (Figure 22).

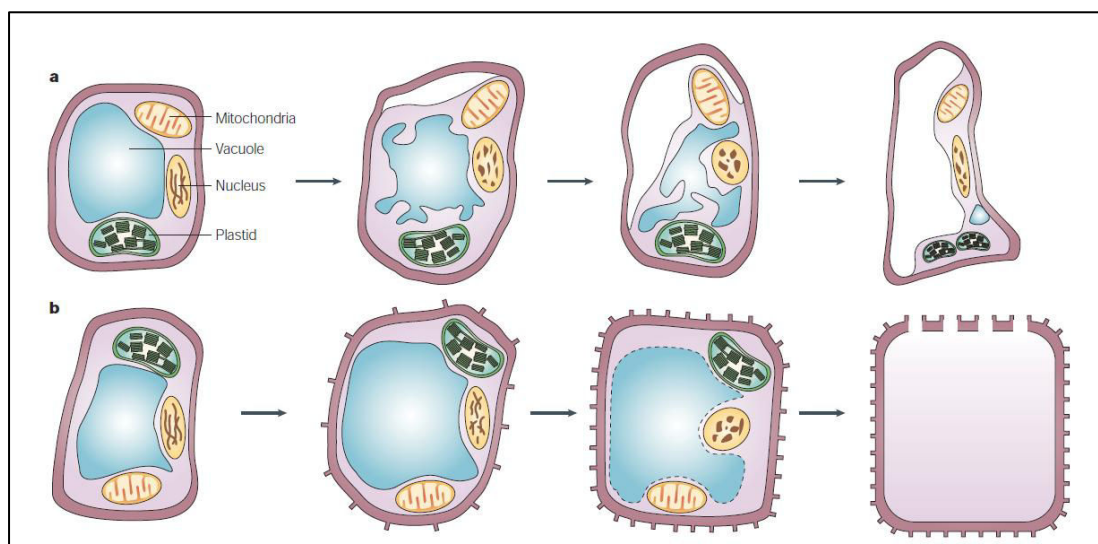


Figure 22. Comparaison morphologique entre une mort cellulaire sous stress (a) et programmée (b) chez les plantes (Lam et al., 2004)

Il existe aussi un critère biochimique qui est la présence d'oligonucléotides multiples de 180 bp causés par la « caspase-activatedDNase » qui dégrade l'ADN durant l'apoptose. Le stress induisant une mort cellulaire est associé à une signalisation cellulaire incluant les flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , la production de NO et l'induction des activités caspases (Figure 23 ; Gadjev et al., 2008 ; Sun et al., 2012). Sharada et al. (1992) ont démontré que le  $\gamma\text{HCH}$  pouvait moduler la calmoduline (protéine ubiquitaire formant un complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline), perturbant potentiellement l'abondance de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$ .

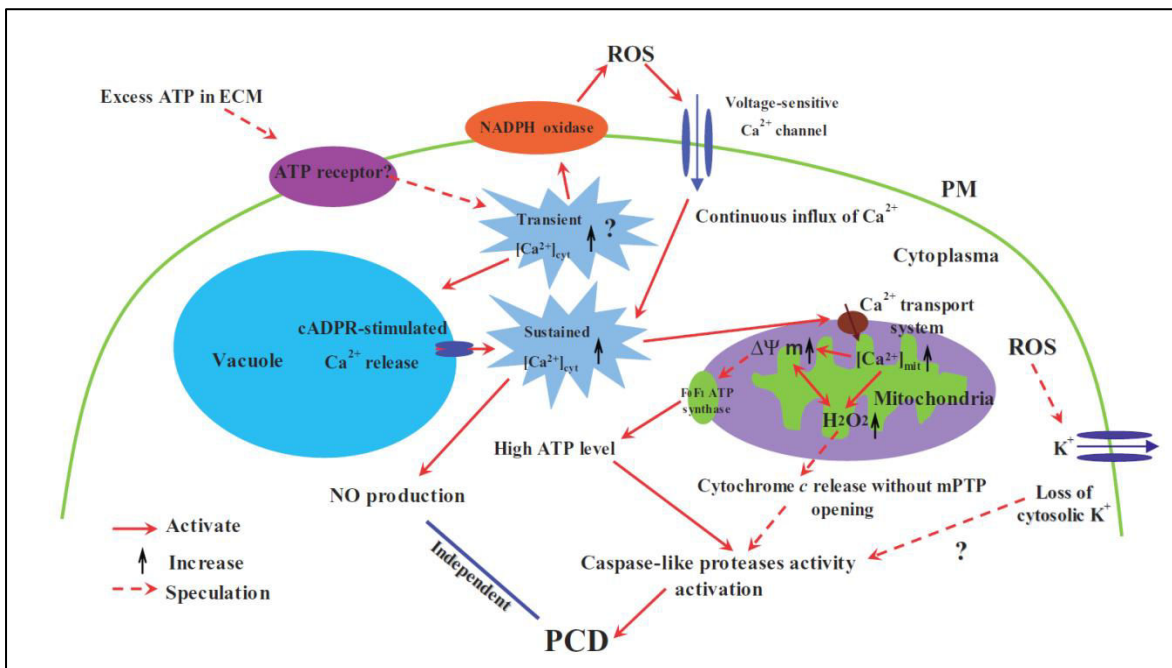


Figure 23. Voie de signalisation proposée pour la mort cellulaire programmée sur des cultures cellulaires de *Populus euphratica*. ECM: matrice extracellulaire. ROS: Espèces Réactives de l'Oxygène. PM: Membrane plasmique. PCD: Mort cellulaire programmée. mPTP: Pore de transition de perméabilité mitochondriale (Sun et al. 2012)

#### 4. Solutions biologiques pour dépolluer les sols contaminés par des organochlorés

Les techniques de réhabilitation doivent être adaptées à la nature chimique des polluants et peuvent correspondre à la limitation de la mobilité des polluants (flux électrique, vitrification *in situ*...) ou à l'élimination partielle ou totale de la pollution en utilisant des procédés chimiques, thermiques, physiques ou biologiques (Chaudhry et al., 2002). Souvent ces méthodes sont écologiquement destructrices (excavation et export des matrices, introduction d'autres produits chimiques) rendant ces matrices non fonctionnelles. En France, 75% des sites pollués (friches industrielles, zones urbaines) sont traités par ces techniques (ADEME,



2008). Cependant, lorsque les surfaces polluées sont de grande ampleur (plusieurs milliers d’hectares comme le cas des Antilles et de la CLD), ces solutions ne peuvent s’appliquer (limitation par le tonnage des excavations, coût trop important, destruction écologique trop importante). Les techniques de remédiation *in situ*, représentant environ 26% des cas de dépollution en France, sont alors une solution plus adéquate (ADEME, 2008). Les techniques de dépollution biologique en constante évolution et développement, sont envisageables avec un faible coût de réalisation et de gestion et peuvent s’appliquer sur de grandes surfaces ou volumes.

## 5. La phytoremédiation

### 5.1. Généralités

La phytoremédiation exploite les processus physiologiques naturels des plantes dans le but de dépolluer les sols et de restaurer les écosystèmes. (Schwitzguébel et al., 2011). Cette technique est avantageuse d’un point de vue économique et écologique mais présente une efficacité sur du long-terme (Tableau V).

Tableau V. Points positifs et négatifs de la phytoremédiation.

Points positifs	Points négatifs
Peu coûteuse	L’absorption et la translocation des polluants organiques du sol aux racines et des racines aux feuilles peuvent être limitées (Chaudhry et al., 2002).
« Environmental friendly »	Il est difficile de prévoir les variations environnementales naturelles comme les variations de température, de nutriments, de composition des sols, les précipitations, la présence de plantes pathogènes (Vangronsveld et al., 2009).
Biomasse produite est utilisable comme énergie renouvelable (Schwitzguébel et al., 2011). La biomasse obtenue par l’utilisation de maïs serait rémunérée à hauteur d’environ 31 euros par tonnes de maïs (Vangronsveld et al., 2009).	La biodisponibilité du polluant (Megharaj et al., 2011).
Amélioration de la sécurité alimentaire par élimination de métaux et de contaminants organiques potentiellement présents dans les sols (Schwitzguébel et al., 2011).	Le temps effectif de la dépollution (souvent au-delà d’une dizaine d’années)

La phytoremédiation des contaminations organiques est optimale lorsque les contaminants sont biodisponibles et possèdent les caractéristiques physico-chimiques suivantes : masse moléculaire suffisamment faible ( $PM < 500$ ), lipophilie intermédiaire ( $1,5 < \log K_{ow} < 3,5$ ) et de préférence non ionisable aux pH biologiques ( $4,5 < pH < 8,5$ ) (Aajoud et al., 2003; Marcacci et al., 2005; Aajoud et al., 2006; San Miguel et al., 2013). Par ailleurs, le succès de la phytoremédiation repose sur des plantes candidates présentant certaines qualités requises pour une efficacité optimale. Il s'agit d'une hypertolérance aux concentrations du polluant à traiter, d'une adaptation optimale au climat, d'un développement racinaire et foliaire important, d'un fort pouvoir d'immobilisation, d'extraction, de transport des polluants ainsi qu'une capacité à détoxifier les polluants (Chaudhry et al., 2002).

Les polluants peuvent être extraits des matrices contaminées, stockés, transférés, détoxifiés par différents mécanismes qui peuvent intervenir soit espacés dans le temps, soit conjointement (résumé Figure 24) :

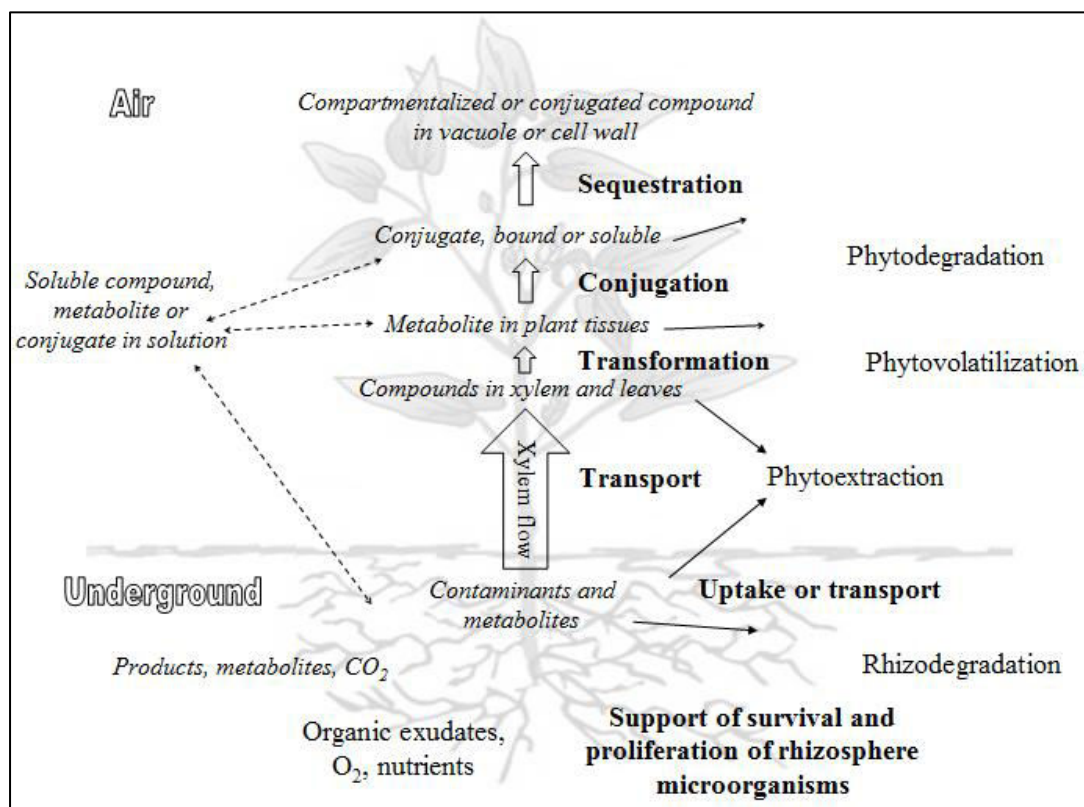


Figure 24. Représentation schématique des processus de phytoremédiation de polluants organiques (Vrchotová et al., 2013)

- La phytostabilisation : C'est l'immobilisation des contaminants par implantation d'un couvert végétal avec des plantes tolérantes à la pollution mais non accumulatrices. Le



but est de réduire l'érosion éolienne, le ruissellement des eaux et la lixiviation du sol vers les nappes phréatiques (Schwitzguébel et al., 2011). Il ne s'agit pas réellement d'une technologie pour nettoyer les sols contaminés mais plutôt d'une stratégie de management des contaminants potentiellement toxiques par stabilisation (inactivation) (Vangronsveld et al., 2009).

- La rhizodégradation : Il s'agit de la décomposition des contaminants du sol grâce à l'activité microbienne dans la zone des racines des plantes (Gaskin et al., 2010). La rhizosphère est une zone de croissance microbienne et d'échanges (sol-microorganismes-plante) (Curl & Truelove, 1986 ; Cf. 7 La fonctionnalité de la rhizosphère). Les activités microbiennes de cette zone rhizosphérique peuvent agir sur l'absorption et la biodégradation des polluants facilitant l'absorption ultérieure des polluants primaires et secondaires par la plante.
- La phytoextraction : C'est l'absorption des contaminants par les racines, dont une fraction est transférée vers les parties aériennes (Schwitzguebel et al., 2011). La plante idéale pour la phytoextraction doit tolérer le toxique aux concentrations présentes dans l'environnement, croître rapidement, être capable d'accumuler le toxique et facilement récoltable (Vangronsveld et al., 2009).
- La phytodégradation ou phytotransformation : Un contaminant peut être dégradé chimiquement par les systèmes enzymatiques des plantes (phase I et II) catalysant des réactions d'oxydation, d'hydrolyse et/ou de conjugaison. Les capacités de détoxification des polluants chez les plantes génèrent des métabolites qui sont non ou moins toxiques que les composés initiaux (Schwitzguebel et al., 2011).
- La phytovolatilisation : Lorsque les plantes sont utilisées pour remédier des polluants à caractère volatile, il est possible d'obtenir (après phytoextraction et transport vers les feuilles) une perte des polluants et/ou de leurs métabolites au niveau foliaire (Schröder et al., 2002 ; Barac et al., 2004; Taghavi et al., 2005). Ce processus est négatif en terme de phytoremédiation puisque la pollution se trouve déplacée d'un compartiment à un autre sans pour autant diminuer la charge polluante.

Pour améliorer l'efficacité et la rapidité du processus de phytoremédiation, certains auteurs préconisent l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) même si la législation française n'autorise pas à ce jour leurs utilisations (loi n°2008-595 du 25 juin 2008). En effet, certaines plantes modifiées peuvent surexprimer des gènes de dégradation des polluants. Par

exemple, le *Liriodendron tulipifera* pouvant exprimer le gène du mercure reductase des bactéries retient 10 fois plus de mercure que *L. tulipifera* sauvage (Rugh et al., 1998). Augmenter l'expression des gènes des cytochromes comme CYP1A1 permettant la remédiation de l'atrazine est aussi un axe de recherche envisageable (Kawahigashi et al., 2006).

## 5.2. Transfert des organochlorées du sol à la plante

Des mesures *in situ* ont montré que le taux de résidus  $\Sigma$ HCH dans le sol est plus important dans les parcelles non cultivées que dans des parcelles cultivées (Singh et al., 1991; Chaudhry et al., 2002; Abhilash & Singh, 2009). De nombreuses études ont démontré le transfert des OCPs de la phase soluble du sol vers les végétaux, notamment avec une forte adsorption/absorption sur les tissus racinaires (Kohli et al., 1976; Karanth et al., 1983; Westcott et al., 1985; Bhatnagar et al., 1998; Madan et al., 2000; Gonzalez et al., 2003; Waliszewski et al., 2004 ; Sinha, 2002; Miglioranza et al., 2004; Pereira et al., 2006; San Miguel et al., 2013). La bioaccumulation des OCPs semble être corrélée au taux de contamination du sol ou des eaux, aux caractéristiques anatomiques/physiologiques des plantes et au contenu lipidique dans les tissus végétaux (San Miguel et al., 2013). Les plantes peuvent accumuler le  $\gamma$ HCH dans les racines principalement par un processus passif de diffusion et partition, puis dans les feuilles par un transfert xylémien dont l'intensité dépend du flux transpiratoire (Li et al., 2005; Pereira et al., 2006; Waliszewski et al., 2008; Olivella et al., 2012; San Miguel et al., 2013). Les OCPs sont détectés dans les racines, notamment des espèces végétales à tubercules (carottes, pommes de terres, betteraves) (Miglioranza et al., 1999 ; Falco et al., 2004 ; Barriada-Pereira et al., 2005 ; Zohair et al., 2006 ; Darnerud et al., 2006 ; Bai et al., 2006). Après le traitement avec du  $\gamma$ HCH, des concentrations d'environ 4 mg.kg<sup>-1</sup> ont été trouvées dans les carottes (Miglioranza et al., 1999). Le  $\gamma$ HCH a été détecté également dans des fruits à des taux qui varient entre 0,003-0,15 mg.kg<sup>-1</sup> (Duggan & Corneliussen, 1972). Plusieurs études ont montré que les OCPs sont présents le plus souvent à l'état de traces dans les céréales (blé, maïs, tournesol). Par exemple, le  $\gamma$ HCH est détecté de l'ordre de 0,27-0,29 mg.kg<sup>-1</sup> jusqu'à 9.53 mg.kg<sup>-1</sup> chez le maïs (Sonchieu et al., 2010 ; Falco et al., 2004 ; Bai et al., 2006).

En ce qui concerne la CLD, son absorption par les plantes est plus modeste que celle mesurée pour le  $\gamma$ HCH (Topp et al., 1986; Hulster et al., 1994; Cabidoche et al., 2012). La concentration en CLD dans les tubercules (par exemple l'igname) est corrélée à la concentration dans le sol (Figure 25, Cabidoche 2012) et de l'ordre de 0,011-0,014 mg.kg<sup>-1</sup> dans les carottes (Dubuisson et al., 2007). Dans les fruits, le taux de la CLD varie entre 0,001-0,005 mg.kg<sup>-1</sup> (melon, tomate, courge) et en dessous du seuil de détection (banane, citron, ananas) (Dubuisson et al., 2007 ; Seurin et al., 2012). Chez les Poacées (canne à sucre, herbe à éléphant, herbe de Guinée, sorgho), il a été mesuré un gradient de concentration en CLD décroissant dans le sens racines-bases de tige-sommets de tige-feuilles (i.e. <130  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> MF en bas de tige de la canne à sucre et <1  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> MF dans les feuilles) (Achard et al., 2008 ; Cabidoche et al., 2012).

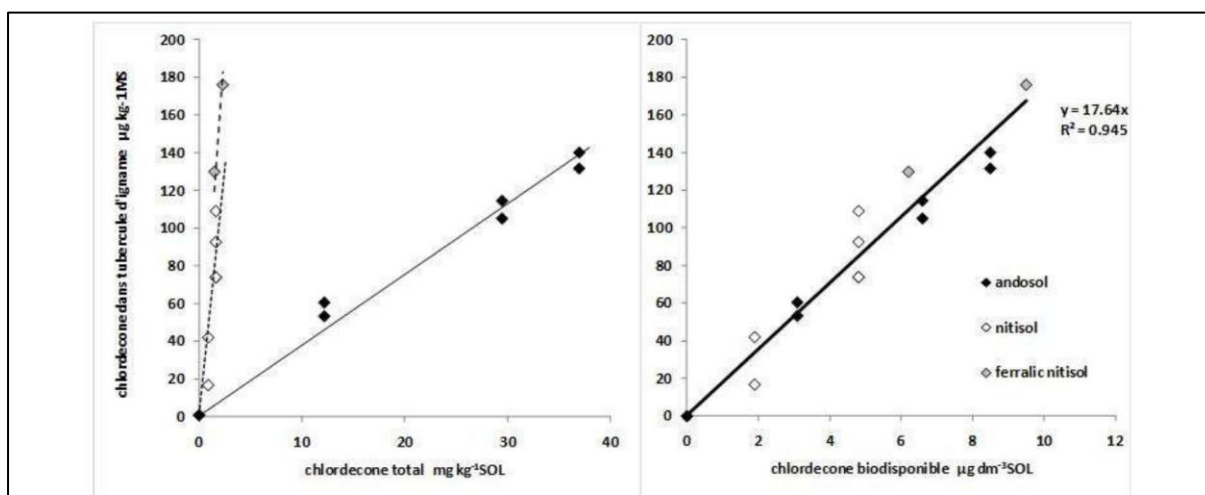


Figure 25. Relation entre la teneur en chlordécone d'ignames et celle de trois types de sols (a), et la teneur en chlordécone biodisponible (b) (en solution dans un volume élémentaire de sol) (adapté cabidoche et al., 2012)

## 6. La bioremédiation

### 6.1. Généralités

Les microorganismes (bactéries et champignons) sont ubiquitaires dans la biosphère, avec une estimation de 10<sup>6</sup> espèces bactériennes et 4.10<sup>30</sup> cellules microbienne (De Roy et al., 2014). Leur diversité génétique et physiologique compose un potentiel métabolique de première ampleur contribuant entre autres aux cycles biogéochimiques (nitrate, oxygène, carbone, soufre, phosphore) au niveau local et global. Cet arsenal métabolique peut être mis à

contribution en utilisant les microorganismes afin d'absorber et de biotransformer les contaminants. Il s'agit de la bioremédiation (Glazer & Nikaido, 1995). Cette technique s'applique dans un environnement hétérogène dans lequel la plupart du temps, les contaminants sont présents en association avec des particules du sol, dissous dans la solution du sol, en milieu oxygéné et anoxique. De plus, le potentiel de dégradation des contaminants organiques varie selon les microorganismes et la dose de toxique. Il faut aussi tenir compte des différentes communautés microbiennes avec leurs synergies et leurs antagonismes (Megharaj et al., 2011).

Il existe deux sortes de procédés de bioremédiation : « *in situ* » correspondant au traitement d'un site pollué au sein même de celui-ci et « *ex situ* » impliquant une extraction du sol pour le traiter ailleurs (Aggarwal et al., 1990). Cependant, la bioremédiation *in situ* est préférable afin de permettre la restauration écologique d'un environnement (Megharaj et al., 2011).

Ces traitements « *in situ* » visent à activer les processus de biodégradation, et à améliorer l'accessibilité des microorganismes à l'oxygène :

- La biostimulation : Le principe est d'augmenter la dégradation de produits chimiques par l'addition d'eau, de nutriments, d'accepteurs ou de donneur d'électrons. On peut ainsi accélérer l'action des bactéries en modifiant les sources de carbone, d'azote, de phosphore, la température, l'oxygène disponible, le pH du sol (Ye et al., 2014).
- La bioaugmentation : Il s'agit d'ajouter des microorganismes dégradant ou transformant les polluants (Madsen et al., 1991). Les bactéries sont présélectionnées pour être capables de vivre dans un environnement pollué. Cependant, il faut néanmoins être prudent avec l'introduction de nouvelles espèces dans un environnement car cela pourrait avoir un impact sur la faune et la flore autochtones. La modification génétique des microorganismes est aussi une piste possible. En effet, il est possible d'optimiser les enzymes et les voies de dégradation des bactéries (Megharaj et al., 2011).

## 6.2. Biodégradation du lindane et du chlordécone par les bactéries

Le  $\gamma$ HCH est dégradé en anaérobiose par les microorganismes suivants : *Clostridium rectum*, *Clostridium sphenoids*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Citrobacter freundii*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio africanus*, *Desulfococcus multivorans* et

*Dehalobacter sp.* (Lal et al., 2010). Le  $\gamma$ HCH est plus rapidement dégradé que les autres isomères (Lal et al., 2010; Figure 26).

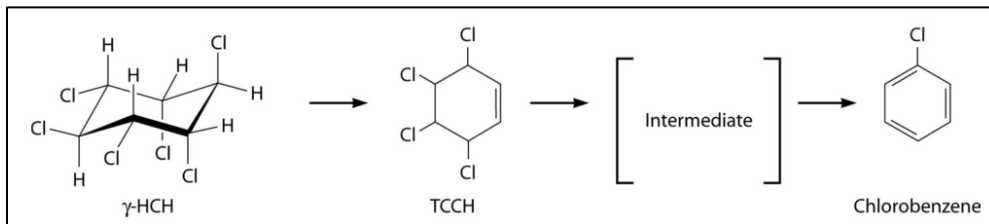


Figure 26. Dégradation du lindane en anaérobie par les bactéries (Lal et al. 2010).

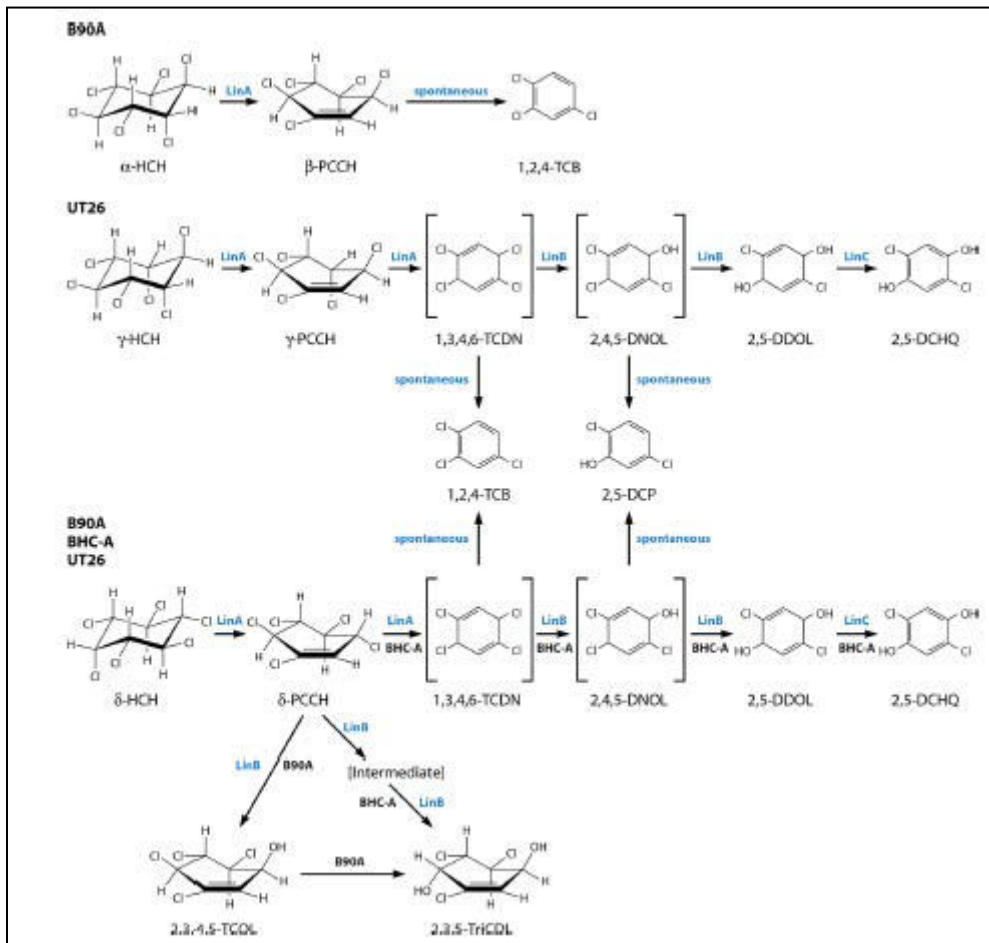


Figure 27. Dégradation aérobie du lindane par les bactéries (Lal et al., 2010)

La dégradation aérobie du  $\gamma$ HCH est réalisée principalement par les bactéries de la famille des *Sphingomonadaceae* (Figure 27). Il existe différentes voies de dégradation en fonction des bactéries qui n'aboutissent pas forcément à la même molécule. De nombreuses bactéries de la famille des *Sphingomonadaceae* peuvent être sélectionnées, isolées et cultivées (Lal et al., 2010). Les gènes de dégradation du  $\gamma$ HCH par les bactéries nommés « *lin* » ont été mis en évidence. Il s'agit de *linA* codant pour une déhydrochlorinase, *linB* codant pour une haloalkane-déhalogénase, *linC* codant pour une déhydrogénase, *linD* codant pour une déchlorinase, *linE/linEb* codant pour une « ring cleavage oxygenase », *linF* codant pour une

maléyl acétate réductase, *linGH* code pour une acyl-CoA transférase, *linJ* codant pour une thiolase et *linR/linI* qui sont des régulateur de gènes (Lal et al., 2010 ; Figure 27).

De plus, le  $\gamma$ HCH peut être dégradé aussi par certains champignons comme *Rhizopusoryzae biomass* (Ghosh et al., 2009).

La CLD est stable dans les sols et ne semble pas se dégrader naturellement. Certains microorganismes ont la capacité de supprimer un ou deux chlore de la molécule (production de monohydro-chlordécone et dihydro-chlordécone (George & Claxton, 1988) mais pour le moment aucune étude n'a prouvé de façon péremptoire la minéralisation de la CLD par les microorganismes (Fernández-Bayo et al., 2013).

### 6.3. La Rhizodégradation

Au niveau du volume racinaire, l'action conjointe des plantes et des microorganismes peut jouer un rôle essentiel dans l'efficacité de remédiation des contaminants (Hinsinger, 2001). La rhizodégradation correspondant à la dégradation des contaminants organiques est réalisée par les enzymes exsudées par les racines (oxydases, hydrolases) et en majorité par la microflore qui possède des capacités métaboliques importantes comme la rupture de cycle aromatique (laccases), la coupure de groupements cyanides (nitrilases), la coupure de groupements phosphates comme dans le cas des insecticides organophosphorés (phosphatases), l'élimination de chlore (déhalogénase) et des oxydations (monoxygénases P450) (Tableau VI).

**Tableau VI. Enzymes de plantes et de la microflore jouant un rôle dans la dégradation de composés organiques. B, bactéries ; F, espèce fongiques (Gerhardt et al., 2009)**

Enzyme family	Catalytic action	Examples
Various plant enzymes for uptake, transport, sequestration and degradation	General uptake and degradation	All plants
Dehalogenase	Hydrolyzes chlorine and fluorine from halogenated aliphatic hydrocarbons (e.g., trichloroethylene) and aromatic hydrocarbons (e.g., PCBs, DDT)	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (B) Hybrid poplar ( <i>Populus</i> spp.) <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> (B)
Laccase	Degradation of various aromatic compounds	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) <i>Trametes versicolor</i> (F) <i>Coriolopsis polyzona</i> (F)
Dioxygenase	Degradation of various aromatic compounds	<i>Pseudomonas</i> sp. (B) <i>Mycobacterium</i> sp. (B)
Peroxidase	Degradation of various aromatic compounds; reductive dehalogenation of aliphatic hydrocarbons	Horseradish ( <i>Armoracia rusticana</i> ) <i>Phanerochaete chrysosporidium</i> (F) <i>Phanerochaete laevis</i> (F) Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )
Nitrilase	Cleaves cyanide groups from aromatic and aliphatic nitriles	Willow ( <i>Salix</i> spp.) <i>Aspergillus niger</i> (F)
Nitroreductase	Reduces nitro groups on nitroaromatic compounds (e.g., 2,4,6-trinitrotoluene); removes N from ring structures	<i>Comamonas</i> sp. (B) <i>Pseudomonas putida</i> (B) Hybrid poplar ( <i>Populus</i> spp.)
Phosphatase	Cleaves phosphate groups from organophosphates (e.g., pesticides)	Giant duckweed ( <i>Spirodela polyrhiza</i> )
Cytochrome P450 monoxygenase	Hydroxylation of aromatic and aliphatic hydrocarbons	Most aerobic bacteria, all fungi and all plants



Des études récentes ont démontré l'augmentation significative de la disparition et/ou de la minéralisation des polluants organiques persistants au niveau de l'interface racines-sol (Kuiper et al. 2004; Krutz et al. 2005; Kidd et al. 2008; Gerhardt et al. 2009 ; Figure 28). Les flavonoïdes et autres exsudats libérés par les racines peuvent stimuler l'activité biodégradante des bactéries vis-à-vis des PCBs ou des HAPs (Chaudhry et al. 2005 ; Ferro et al., 1999 ; Corgie et al. 2004 ; Leigh et al. 2006 ; Abhilash & Singh 2009). Les OCPs semblent agir sur la structure communautaire des bactéries rhizosphériques puisque certains genres semblent particulièrement sensibles (*Hevizibacter*, *Acidovorax*) et d'autres apparaissent tolérants (*Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*) (San Miguel et al., 2014). Certaines souches bactériennes (*Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Devosia* sp., *Sphingobium* sp.) isolées à partir de la rhizosphère de *Withania somnifera*, *Solanum torvum*, *Erianthus munja* et *Lantana camera* sont capables de biodégrader le  $\gamma$ HCH ou d'autres OCPs (Kidd et al., 2008 ; Lal et al., 2008 ; Abhilash & Singh 2010 ; Akshi & Kumar, 2012 ; San Miguel et al., 2014). Quelques travaux ont aussi démontré l'effet positif des champignons rhizosphériques sur la dégradation des OCPs (Katayama & Matsumura, 1993 ; Sainz et al., 2006).

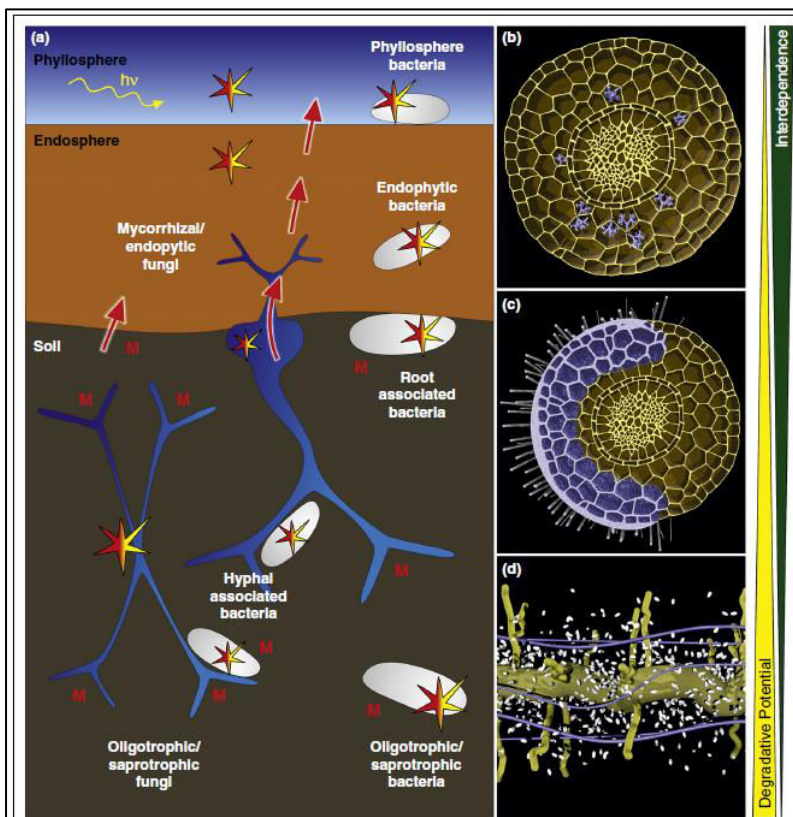


Figure 28. Mobilisation et dégradation des contaminants organiques par les racines de plantes et les microorganismes associés (en blanc). Schéma résumant les échanges. →, transferts des contaminants ; M, mobilisation des contaminants. (b-d) Illustrations d'interactions typiques entre les tissus racinaires et les microorganismes. (b) Exemple des champignons micorhiziens arbusculaires. (c) Cas des champignons ectomycorhiziens. (d) Représentation des microorganismes étroitement associés à la surface des racines. (Fester et al., 2014)

Par ailleurs, les contaminants dégradés peuvent être plus facilement absorbés par les plantes ou alors, les activités microbiennes peuvent libérer à proximité des tissus racinaires des protons et/ou anions et/ou des chélateurs qui peuvent moduler localement les propriétés chimiques du sol. Ces éléments peuvent faciliter la phytoextraction (Abhilash & Singh, 2009). Par ailleurs, Alvarez et al. (2012) ont démontré que les exsudats de maïs améliorent l'absorption du  $\gamma$ HCH par certaines souches bactériennes (*Streptomyces*).

## 7. La fonctionnalité de la rhizosphère

La rhizosphère est défini comme 'le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire' (Jones & Darrah, 1993). Pour les éléments peu mobiles, la rhizosphère se limite au(x) premier(s) millimètre(s) de sol situé(s) autour des racines (Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2009). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, la densité du système racinaire et ses propriétés de surface et les propriétés physico-chimiques du sol (Abhilash & Singh, 2009) (Figure 29).



Figure 29. Aspect de la rhizosphère autour des racines de l'orge (*Hordeum vulgare*) (Hinsinger et al., 2009)

### 7.1. Les relations plante-microorganismes-environnement

La rhizosphère est une zone densément peuplée dans laquelle les racines des plantes interagissent avec les systèmes racinaires des plantes voisines pour l'espace, l'eau, et les minéraux (Bais et al., 2004) (Figure 30). Les racines absorbent de l'eau et des sels minéraux qui sont nécessaires à la nutrition de la plante. Le volume d'eau absorbé dépend de plusieurs



paramètres (météorologie, physicochimie du sol, taux de transpiration, surface foliaire de la plante, espèce végétale,...) et ce prélèvement permet d'assurer une partie du drainage de l'eau dans le sol. L'absorption des ions par les poils absorbants racinaires s'effectue généralement contre une dépense d'énergie à l'aide de pompes à protons. Cette sortie d'éléments du sol vers la plante, ainsi que l'expulsion de protons par la pompe, peuvent modifier certains paramètres physico-chimiques du sol, comme le pH (Hinsinger et al., 2006) (Figure 30 A).

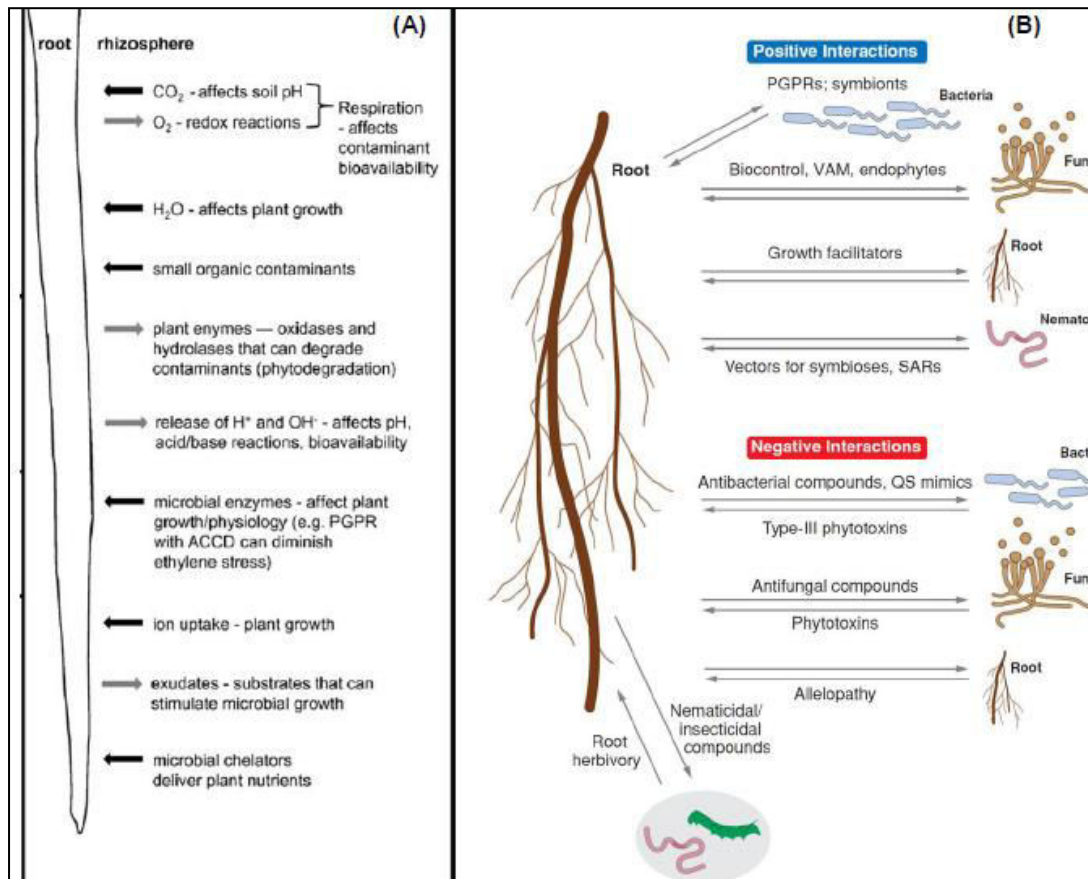


Figure 30. Fonctionnement de la rhizosphère. A) Echanges de molécules chimiques entre les racines et le milieu environnant du sol (Gerhardt, 2009). B) Interactions biologiques entre les racines végétales et les organismes du sol (Bais et al., 2006)

Par ailleurs, la rhizosphère est une interface où il s'établit une relation fonctionnelle : l'effet des racines sur leur environnement et l'interaction avec les microorganismes (bactéries et champignons) (Bais et al., 2004). Les interactions entre les plantes et les microorganismes sont influencées par des facteurs édaphiques qui sont les facteurs écologiques liés aux caractéristiques physiques et chimiques du sol (Bais et al., 2004). L'effet physique de la croissance des racines permet par exemple de faciliter les mouvements de fluides ( $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ) et d'assister la migration des microorganismes dans le sol (Gaskin et al., 2010).

De plus, les racines jouent un rôle majeur dans la fonctionnalité de la rhizosphère *via* les rhizodépôts qui sont de deux sortes : les exsudats et les débris racinaires (Gobat et al., 2010). Les débris racinaires sont composés de cellules détachées, du contenu de cellules lysées ou de morceaux de racines mortes. Les exsudats sont constitués en majorité de sucres, d'acides aminés et d'acides carboxyliques diffusant passivement des racines vers le sol (Jones et al., 1999 ; Cf. chapitre 3.2 Métabolisme des racines). Les exsudats racinaires peuvent donc modifier la structure et l'activité des communautés microbiennes. En effet, les exsudats racinaires peuvent attirer par chimiotactisme certaines bactéries symbiotiques ou au contraire éloigner les microorganismes pathogènes pour la plante (Biais et al., 2006). La microflore, fortement stimulée par l'activité racinaire, va jouer différents rôles au sein du milieu rhizosphérique (Gobat et al., 2010). Celle-ci est capable de concentrer les ions dans l'environnement proche des racines et de faciliter la disponibilité de certains éléments comme l'azote ou encore le phosphore au bénéfice de toute la communauté rhizosphérique. Les microorganismes du sol peuvent également sécréter des substances dans leur milieu proche, comme des enzymes, capables de dégrader des exsudats racinaires très complexes, mais aussi des hormones ou encore des facteurs de croissance. Cela procure à la plante un bénéfice, de manière directe (stimulation de la croissance racinaire) ou bien indirecte (défense contre les pathogènes). Par exemple, les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) synthétisent des phytohormones de croissance auxin-like améliorant directement la croissance végétale mais pouvant également synthétiser des substances antifongiques limitant le développement d'agents pathogènes protégeant les tissus végétaux (Benizri et al., 2001). Cependant, certaines interactions peuvent être négatives lorsque les microorganismes ou plantes voisines libèrent des substances (phytotoxines) pouvant par exemple affecter la croissance des plantes (Paterson et al., 2007).

La rhizosphère représente donc une interface complexe, biologiquement très active, et essentielle entre le sol et la plante. Ce micro-environnement dispose de sa propre fonctionnalité et peut être potentiellement perturbé par l'introduction de facteurs exogènes. Dans le cas de polluants organochlorés, la présence de ces contaminants dans le milieu rhizosphérique induit un réarrangement des communautés microbiennes (San Miguel et al., 2014).

## 7.2. Allocation des ressources (carbone/azote)

L'azote sous forme gazeux  $N_2$  est présent à 78% dans l'atmosphère. Les organismes utilisent l'azote pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques mais rare sont ceux qui peuvent l'utiliser directement sous forme  $N_2$ . On distingue l'azote organique lié à des molécules organiques de l'azote inorganique (ou minéral) correspondant aux nitrates, nitrites et l'ammonium. Dans le sol, l'azote est présent à plus de 90% sous forme organique (Mengel, 1996). La transformation de l'azote organique en azote minéral (minéralisation) et réciproquement (réorganisation ou immobilisation) est réalisée par les microorganismes et leurs enzymes. Cela va déterminer en grande partie la disponibilité de la forme minérale assimilable par la plante.

L'approche intégrée du fonctionnement de la rhizosphère s'intéresse à l'allocation du carbone (C) et de l'azote (N) entre les racines et la flore microbienne. Dans la rhizosphère, le cycle de l'azote est intimement lié au cycle du carbone pendant les processus de minéralisation et d'immobilisation (Raynaud et al., 2006 ; Figure 31).

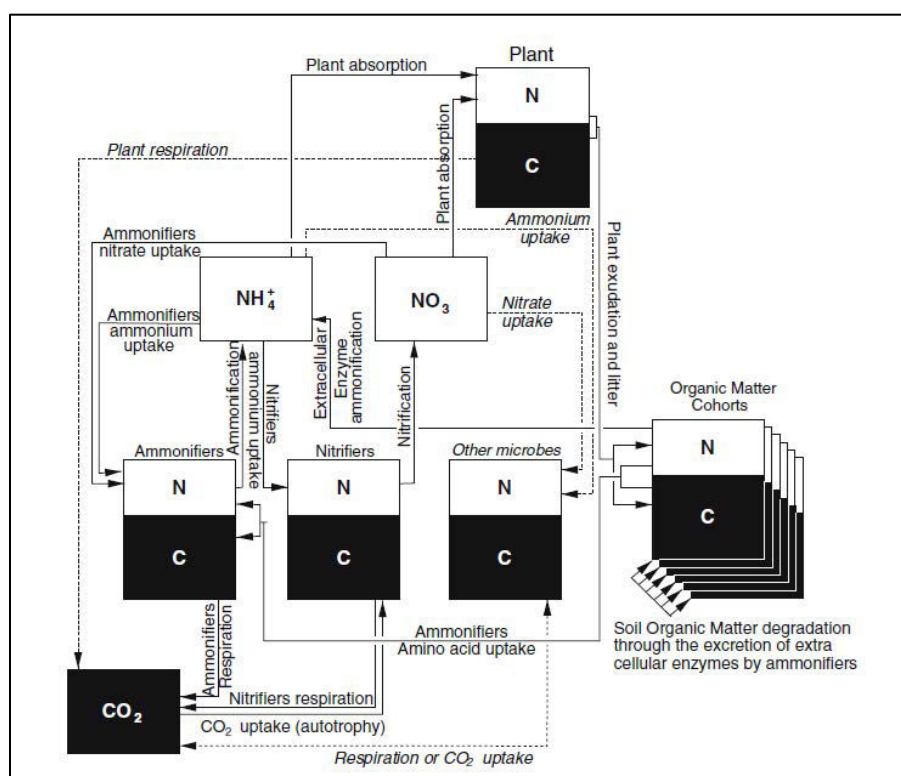


Figure 31. Cycle de l'azote et du carbone au sein de la rhizosphère (Raynaud et al., 2006)

La qualité des rhizodépôts (précédemment décrite dans le chapitre 3.2 « Métabolisme des racines ») sont constitués majoritairement de matières carbonées (sucres, acides organiques) et plus modestement de matières azotées (acides aminés, peptides, Tableau IV). En présence de maïs et de ses rhizodépôts, les concentrations en C, N et S sont 3 à 10 fois supérieures à

celles des sols non plantés (Melnitchouck et al., 2005). L'ordre de grandeur des apports rhizosphériques journaliers en C est estimé à environ 50-100  $\mu\text{g/g}$  sol (Baudoin et al., 2003) et correspondrait à 2-10% du C net fixé par la plante (Farrar et al., 2003 ; Jones et al., 2004). En ce qui concerne l'azote, la rhizodéposition azotée est évaluée à 8-40 kg/ha en culture de blé (Merbach et al., 1999) et correspondrait à 18-33% du N assimilé par les plants de blé (Janzen, 1990). Certains auteurs ont estimé un ratio C/N moyen  $>70$  pour les exsudats et  $\sim 65$  pour les mucilages (Jones & Darrah, 1993 ; Mary et al., 1993). Cependant, la quantification de la rhizodéposition carbonée et azotée reste difficile à mesurer.

Les rhizodépôts riche en C fournissent l'énergie nécessaire à la croissance des microorganismes hétérotrophes (Hodge et al., 2000). La rhizosphère est un lieu intense de turnover du C (Kuzyakov et al., 2003). Les microorganismes participent à la dynamique du N dans les sols en transformant les matières organiques azotées (immobilisation/ minéralisation) (Raynaud et al., 2006). Les plantes et les microorganismes sont en compétition pour leur nutrition azotée (notamment si le C/N est élevé) car ils absorbent majoritairement du N minéral présent dans la solution du sol ( $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ ) (Figure 31) (Korsaeth et al., 2001), et beaucoup plus modestement de petits composés organiques azotés (Jones & Hodge, 1999). Un gradient de concentration en N décroissant est mesuré des racines vers le sol (Figure 32; Postma et al., 2014). Par contre, un gradient de concentration inverse est observé pour le contenu carboné (Raynaud et al., 2006).

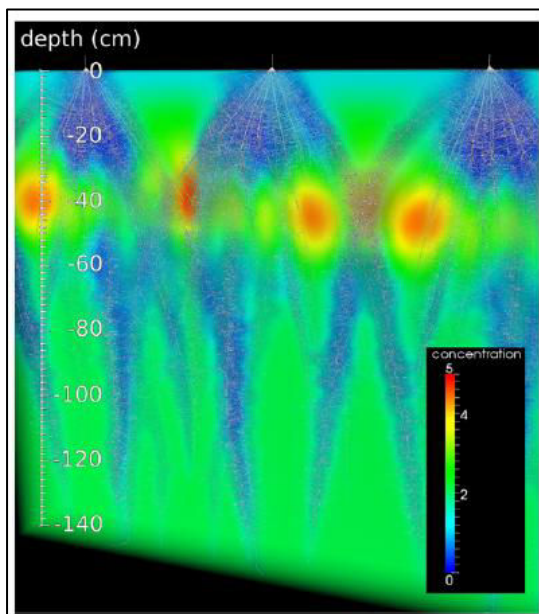


Figure 32. Simulation de distribution des nitrates au niveau du sol et de la rhizosphère de plants de maïs âgés de 40 jours (Postma et al., 2014) Autour des racines (blanc) une diminution des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  est observée (bleu) alors que dans les zones de compétition entre racines, les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  sont plus élevées (rouge)

De plus, les plantes et les bactéries ammonifiantes maintiennent des relations mutualistes (Hodge et al., 2000). Par exemple, les plantes fournissent d'importantes sources de C pour les microorganismes (petites molécules organiques facilement assimilables) et les microorganismes libèrent de l'azote minéral (dégradation des matières organiques) disponible pour les plantes (Kuzyakov et al., 2003). La représentation de ces interactions est figurée par la 'boucle microbienne' du sol, qui englobe la dynamique des nutriments carbonés et azotés et la biomasse microbienne (Raynaud et al., 2006 ; Moore et al., 2003). Des études ont démontré une décomposition de la matière organique du sol 3 fois plus forte et une minéralisation azotée 30% plus importante lorsque le sol est planté (Cheng et al., 2003 ; Van der Krift et al., 2001). Par exemple, dans la rhizosphère de plants d'orge, on observe une stimulation de la nitrification (Klemedtsson et al., 1987). Au vu du rôle joué par les exsudats racinaires sur la dynamique de l'N dans la rhizosphère, le ratio C/N des rhizodépôts apparaît comme un facteur clé du cycle azoté. Ainsi tous facteurs biotiques ou abiotiques influençant la physiologie de la plante (âge, climat, stress) peuvent modifier le ratio C/N et induire des perturbations de la dynamique de l'azote dans le sol.

## 8. Objectifs de la thèse

L'activité humaine est responsable de pollutions diffuses des eaux, des sols et de l'atmosphère qui entraînent des dommages sur l'écosystème. Afin d'éviter des déséquilibres importants comme la diminution de la biodiversité ou bien la contamination des chaînes trophiques par des contaminants, il est nécessaire de restaurer les écosystèmes. Différentes options de gestion des milieux sont possibles comme l'atténuation naturelle, la remédiation physique ou l'action combinée de remédiation physique et biologique (Burger et al., 2008). Face à des situations environnementales contaminées par les OCPs (Lee et al., 2000; Meharg et al., 2000; Miglioranza et al., 2004; Marvin et al., 2004; Ricking & Schwarzbauer, 2008; Abhilash & Singh 2009; Turgut et al., 2010), la phytoremédiation apparaît comme une solution digne d'intérêt. C'est une technique peu coûteuse, peu contraignante en terme de phyto-management et n'ayant pas d'effet négatif sur la fonctionnalité des systèmes (sol, sédiments, eaux). Enfin, la phytoremédiation a prouvé son efficacité comme lors d'un essai grandeur nature dans les Alpes montrant l'efficacité de la culture alternée de maïs et d'ivraie pour réduire les hydrocarbures présents dans le sol (Schwitzguébel et al., 2011) ou encore la diminution des résidus ΣHCH dans les sols avec un couvert végétal (céréales) (Abhilash & Singh, 2009). L'équipe P3E (Pollution-Environnement-Ecotoxicologie-Ecoremédiation) du LECA

(Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5551) a déjà activement participé à des projets permettant de comprendre les processus physiologiques impliqués dans les techniques de phytoremédiation afin d'améliorer ces procédés (Projets MEDD (2003-2006), AXELERA-VALORSITES (2008-11), collaboration avec Phytorestore).

Dans ce contexte, de nombreuses études se sont intéressées au rendement de disparition des contaminants, aux processus physiologiques au sein d'un organisme acteur, du devenir du stress chimique mais peu ont abordé le réseau d'échanges métaboliques existant entre les différents acteurs. L'originalité de notre travail est d'étudier les mécanismes fonctionnels mis en jeu au niveau rhizosphérique lors d'un processus de phytoremédiation. Cette approche intégrée du fonctionnement rhizosphérique a été abordée sous stress chimique en présence d'OCPs ( $\gamma$ HCH, CLD) et sous différents aspects scientifiques, (i) les perturbations du métabolisme racinaire (métabolome), (ii) les modifications cataboliques des microorganismes, (iii) les changements de dynamique du C et du N au niveau rhizosphérique, et (iv) l'efficacité de l'uptake en présence de la rhizosphère. Pour cela, nous avons sélectionné une espèce végétale qui peut être placée en conditions contrôlées de culture et dont la tolérance aux OCPs est importante (Chouychai & Lee, 2012; Somtrakoon & Pratumma, 2012). Il s'agit du maïs (*Zea mays*).

### 8.1. Le modèle biologique : le maïs

Le maïs est une plante tropicale herbacée annuelle de la famille des *Poaceae*, originaire d'Amérique centrale. De nos jours, cette plante est cultivée pour l'alimentation humaine et l'élevage d'animaux sur tous les continents, en raison de sa tolérance à différents climats et son rendement important jusqu'à 120 q.ha<sup>-1</sup> par an pour les graines (Tasli et al., 1996), ce qui en fait la céréale la plus cultivée au niveau mondial. Le maïs présente une biomasse végétale conséquente puisque (i) les parties aériennes peuvent atteindre 3 m de hauteur à maturité (14-22 feuilles) et assurent un flux transpiratoire important (de l'ordre de 4 mm.d<sup>-1</sup> ; Alberto et al., 2014), et (ii) le réseau racinaire est extrêmement dense atteignant quelques mètres de long (Figure 33A) permettant de prélever d'importantes quantités d'eau au niveau du sol (Figure 33B) (Hinsinger et al., 2009 ; Postma et al., 2014). Ainsi, ces caractéristiques font de cette plante une bonne candidate pour l'application de procédés de phytoremédiation (capacités de phytoextraction importantes), d'autant plus que sa production de biomasse permettrait son utilisation pour la production d'énergie renouvelable, on parle même 'd'énergie maïs' (Thewys et al., 2010). Par ailleurs cette plante présente plusieurs avantages :



(i) sa physiologie est connue et sa culture en conditions stériles ou non est maîtrisée, (ii) son génome est séquencé (Friso et al., 2010), (iii) la nature de ses exsudats a été largement étudiée (Schönwitz et al., 1989; Schilling et al., 1998) et (iv) son utilisation en métabolomique de la rhizosphère est possible (Alonso et al., 2007a et b). Les communautés bactériennes de la rhizosphère du maïs ont été particulièrement étudiées (Baudoin et al., 2001; Chelius & Triplett, 2001; Aira et al., 2010; Castellanos et al., 2009; Dohrmann et al., 2013). Ces travaux démontrent que les communautés rhizosphériques sont sélectionnées en fonction des caractéristiques du sol, du génotype (cultivar), des gestions agricoles (fertilisants) et du stade de développement. Li et al. (2014) ont montré que la rhizosphère du maïs est préférentiellement colonisée par les *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*. Certains auteurs ont pu caractériser l'activité catabolique de ces microorganismes au sein de la rhizosphère montrant des activités invertase et phosphatase plus intenses que celles du sol (Kandeler et al., 2002). L'état des connaissances scientifiques et les potentialités d'utilisation de cette espèce végétale (*Z. mays*) en phytoremédiation en fait une plante modèle idéale pour cette étude.

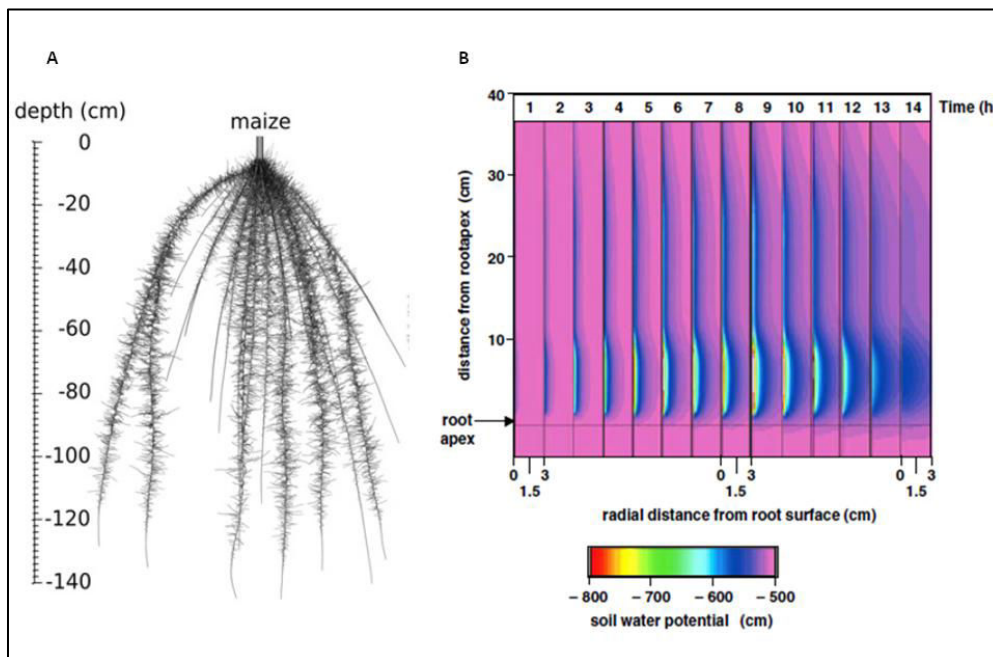


Figure 33. A. Architecture racinaire de plants de *Z. mays* âgés de 40 jours (Postma et al., 2014). B. Chronologie des gradients radiaux et longitudinaux d'absorption d'eau (potentiels hydriques) par les racines de maïs (*Z. mays*) cultivé sur terreau. (Hinsinger et al., 2009)

## 8.2. Plan de l'étude doctorale

### **Chapitre 2 : Phytotoxicité des pesticides organochlorés sur les racines de maïs (*Zea mays*)**

Des travaux précédents ont mis en évidence que des plantes dites 'très tolérantes' aux stress chimiques pouvaient toutefois, montrer une réponse phytotoxique dépendant de la dose d'exposition (Faure et al., 2012 ; San Miguel et al., 2012). Dans un premier temps, l'effet phytotoxique du  $\gamma$ HCH et de la CLD a été évalué selon un gradient d'exposition, en culture hydroponique et en conditions stériles. Les mécanismes moléculaires (transcriptomiques) et cellulaires (molécules « signal », apoptose) modifiés/induits par l'exposition aux OCPs ont été étudiés (**Publication I**). Ensuite, les effets des OCPs sur le métabolisme des racines ont pu être caractérisés par une analyse  $^1\text{H}$  RMN-HRMAS (**Publication II**).

### **Chapitre 3 : Allocation des ressources et fonctionnalité de la rhizosphère**

Les perturbations fonctionnelles de la rhizosphère en présence des OCPs ont été établies grâce à des approches complémentaires comme l'analyse de l'empreinte catabolique microbienne (Biolog), des flux carbonés et azotés et des traits morphologiques des plantes (**Publications III et IV**).

### **Chapitre 4 : Capacité d'absorption du lindane par *Zea mays***

Les capacités de phytoextraction du  $\gamma$ HCH ont été mesurées chez les plants de maïs pendant 1 mois d'exposition en milieu hydroponique. L'absorption du  $\gamma$ HCH a pu être mesurée grâce à un traceur radioactif ( $^{14}\text{C}$ ). Pour représenter le rôle important de la rhizosphère dans ce processus de phytoextraction, des plants de maïs en conditions stériles ont été comparés à des plants possédant une rhizosphère.





# Chapitre 2:

## Phytotoxicité des pesticides organochlorés sur les racines de maïs (*Zea mays*)



## Chapitre 2 : Phytotoxicité des pesticides organochlorés sur les racines de maïs (*Zea mays*)

### 1. Introduction

Dans ce chapitre, l'impact phytotoxique de deux pesticides organochlorés (OCPs), le lindane ( $\gamma$ HCH) et la chlordécone (CLD), sur les plants de maïs (*Zea mays*) a été abordé. L'analyse de différents paramètres anatomo-morphologiques au niveau foliaire et racinaire, nous a permis de mettre en évidence un impact visible des OCPs sur la morphologie et la taille des racines. Des coupes transversales de racines de maïs ont mis en évidence une modification de la taille des cellules en présence des OCPs. Ce résultat nous a conduit à explorer les perturbations du cycle cellulaire qui pourraient être à l'origine du changement de taille des cellules en analysant la transcription des gènes clés du cycle cellulaire (cyclines, facteurs de transcription) ainsi que la ploïdie des cellules par cytométrie en flux. En parallèle, nous avons étudié la viabilité des cellules racinaires pouvant aussi être une conséquence de la perturbation du cycle cellulaire. Pour ce faire, nous avons évalué les phénomènes d'apoptose par la technique de marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), de mortalité cellulaire (marquage fluorescent avec de l'iodure de propidium et de la fluorescéine), et de signalisation cellulaire (calcium, ROS, NO) pouvant intervenir dans ces phénomènes (**Publication I**). Par ailleurs, nous avons souhaité préciser les effets des OCPs sur le métabolisme des racines de maïs. En effet, une modification du métabolisme cellulaire pourrait entraîner une perturbation du développement végétal, de l'allocation énergétique et des exsudats racinaires, ces derniers jouant un rôle important dans les interactions plante et microorganismes du sol au sein de la rhizosphère (Cf. Chapitre 1 ; 7). Nous avons choisi une approche de métabolomique par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) *high resolution magic angle spinning* (HRMAS) du proton permettant d'étudier quantitativement, simultanément et avec une petite quantité de tissus racinaires (1mm à partir de l'apex) les sucres, les acides aminés et les lipides présents dans les racines sans préparation de l'échantillon ni phases d'extractions (**Publication II**).

## 2. Matériels et méthodes

Afin d'obtenir des réponses reproductibles, les plantules de maïs ont été cultivées en milieu hydroponique (afin que les OCPs soient biodisponibles), stérile (afin que les réponses mesurées soient uniquement celles des plantes) et en conditions contrôlées (facteurs abiotiques stables). Pour optimiser l'analyse des mécanismes physiologiques, nous avons choisi de travailler avec la racine principale de chaque plantule et dans une zone anatomique racinaire où il y a une forte division cellulaire (apex) et des cellules peu différenciées.

### 2.1. Culture des plantules de maïs en condition stériles en présence d'OCPs

Une gamme de concentration est réalisée directement dans le milieu de culture qui permettra l'exposition des caryopses aux OCPs. La concentration maximale en lindane et en chlordécone est respectivement de 7 et 1 mg.l<sup>-1</sup> correspondant à leur limite de solubilité dans l'eau. Les concentrations similaires à celles retrouvées dans l'environnement sont 0.7 mg.l<sup>-1</sup> pour le lindane et 0.04 mg.l<sup>-1</sup> pour la chlordécone. Les autres concentrations testées sont 0.07 et 3.5 mg.l<sup>-1</sup> pour le lindane et 0.008 et 0.2 mg.l<sup>-1</sup> pour la chlordécone.

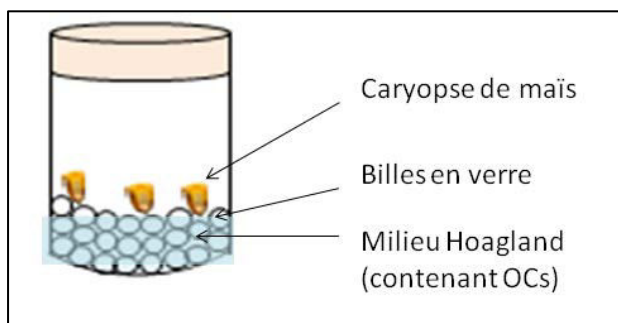


Figure 34. Dispositif permettant la croissance du maïs en condition stérile en présence d'OCPs

Le milieu de culture contenant les OCPs est placé dans un pot de verre permettant de garantir la stérilité de notre plantation. Des billes de verre stériles sont introduites dans les pots servant ainsi de support inerte à la croissance des caryopes (Figure 34).

Les caryopses (*Zea mays* L., Golden Bantam; Graines Baumaux, France) de maïs sont stérilisés avec des lavages de 30s à l'éthanol 80% et de 2min avec de l'eau de Javel 5% suivi de rinçages avec de l'eau distillée stérile.

Trois caryopses sont introduits dans un pot et les plantules sont ainsi cultivées pendant 7 jours à l'obscurité et avec une température de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Au bout de ce laps de temps, l'apex des racines principales est isolé pour être utilisées pour les expériences suivantes (Figure 35).

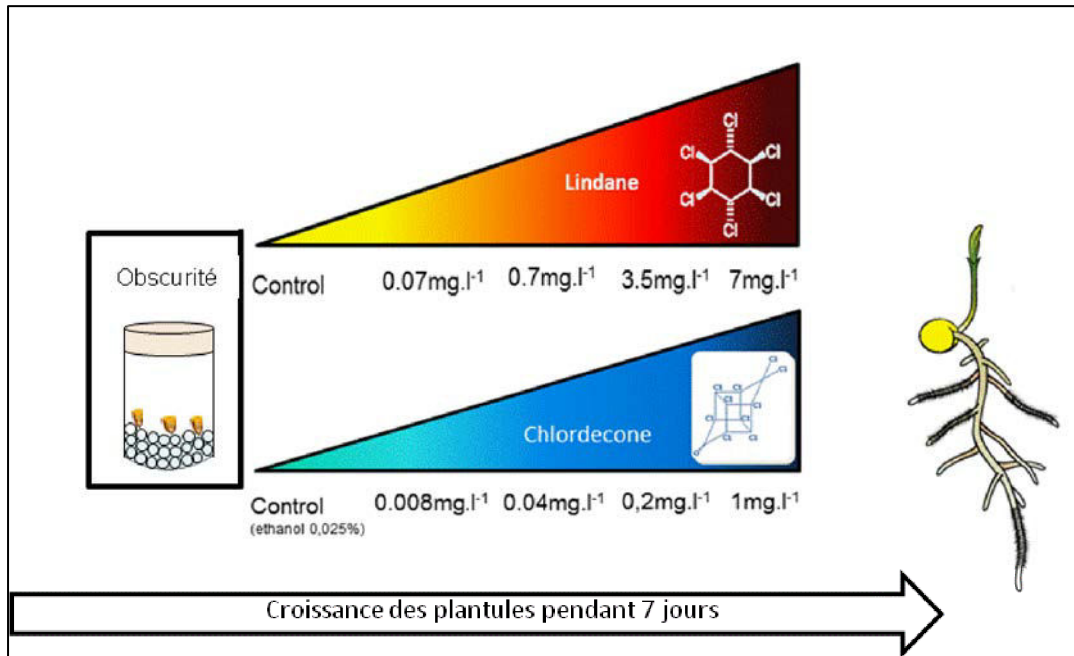


Figure 35. Schéma expérimental de la croissance des plantules permettant ensuite la réalisation des tests de phytotoxicité.

## 2.2. Evaluation de la phytotoxicité des OCPs sur les racines de maïs

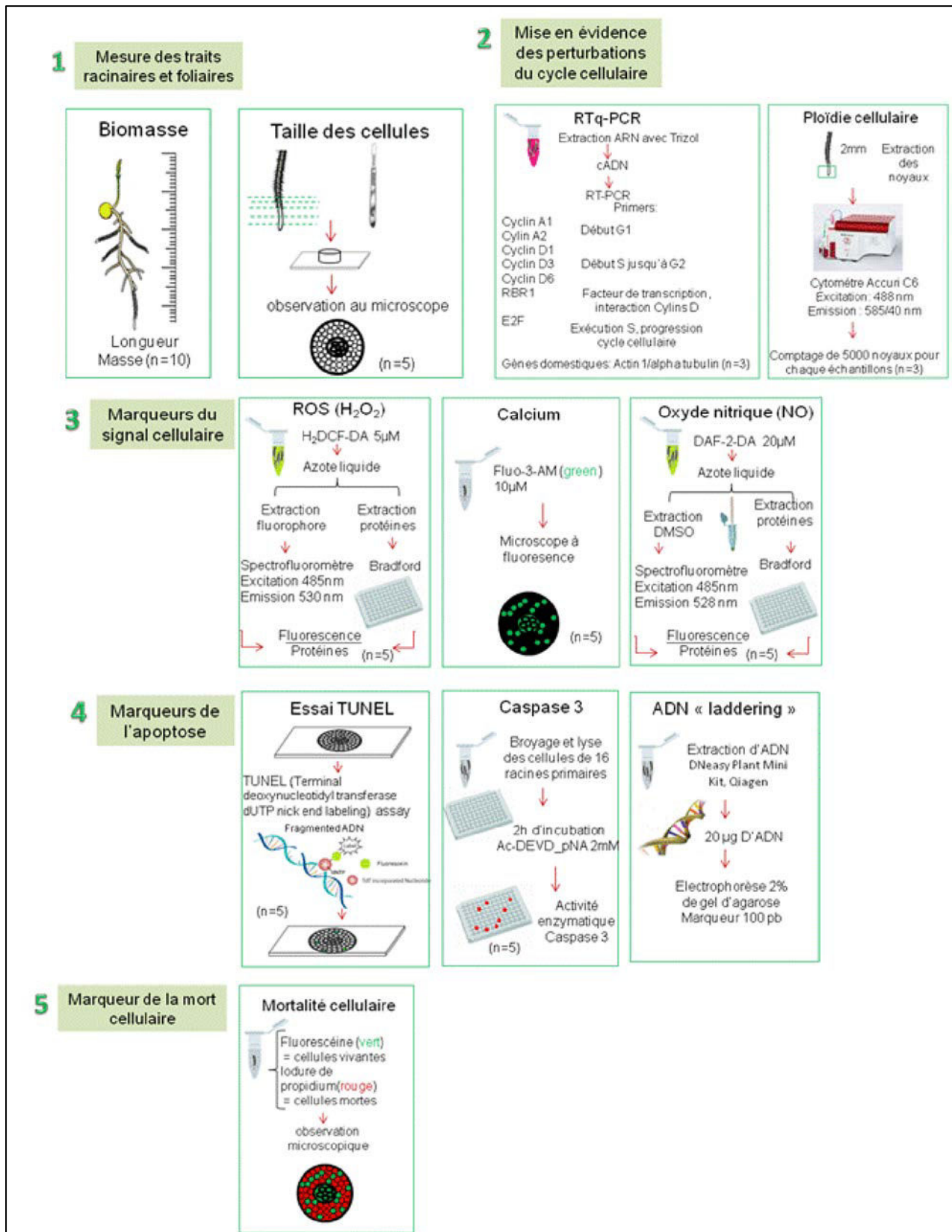


Figure 36. Schéma expérimental des manipulations pour évaluer la phytotoxicité des OCPs sur les racines de *Zea mays*.

## 2.3. Impact des OCPs sur le métabolisme racinaire

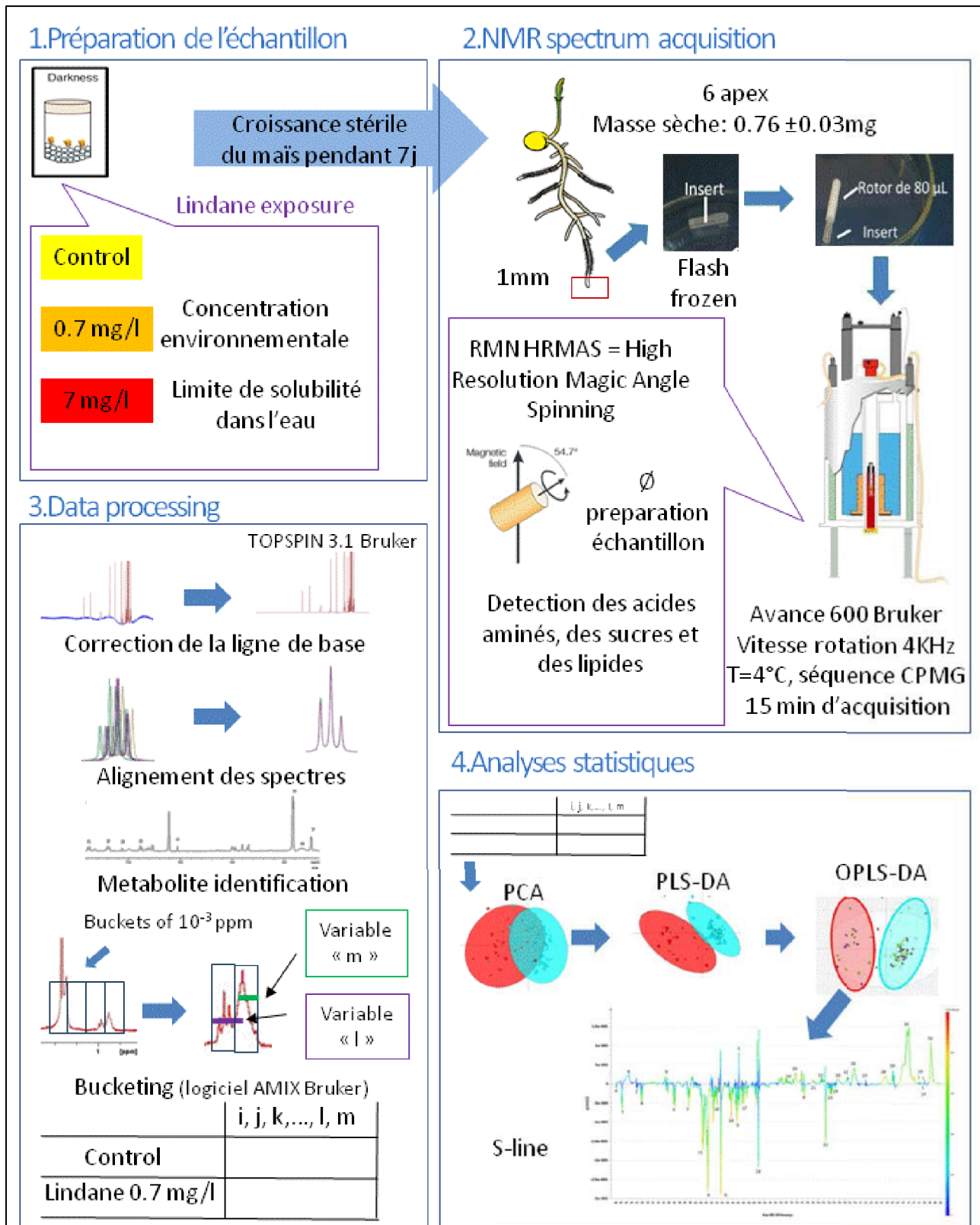


Figure 37. Schéma expérimental des manipulations pour évaluer l'impact des OCPs sur le métabolisme des racines.



### 3. Résultats et discussions

#### 3.1. Evaluation de la phytotoxicité des OCPs sur les racines de maïs

##### 3.1.1. Publication I

**Publication I:** Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots

**Auteurs:** Claire Blondel, Marc Melesan, Angélique San Miguel, Sylvie Veyrenc, Patrick Meresse, Mylène Pezet, Stéphane Reynaud, Muriel Raveton

**Participation:** Réalisation des expériences, Analyses des résultats, Réalisation des figures, Rédaction

**Publication acceptée dans Journal of Hazardous Materials**

**Supplementary data en Annexe 1**



## Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots



Claire Blondel<sup>a,b</sup>, Marc Melesan<sup>a,b</sup>, Angélique San Miguel<sup>a,b</sup>, Sylvie Veyrenc<sup>a,b</sup>, Patrick Meresse<sup>b,c</sup>, Mylène Pezet<sup>d</sup>, Stéphane Reynaud<sup>a,b</sup>, Muriel Raveton<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France

<sup>b</sup> Université de Grenoble – Alpes, France

<sup>c</sup> Centre Universitaire de Biologie Expérimentale, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France

<sup>d</sup> Centre de Recherche Inserm/UJF U823, Institut Albert Bonniot, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 09, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 March 2014  
Received in revised form 13 May 2014  
Accepted 15 May 2014  
Available online 23 May 2014

#### Keywords:

Apoptosis  
Chlordecone  
Endoreduplication  
Lindane  
Maize

### ABSTRACT

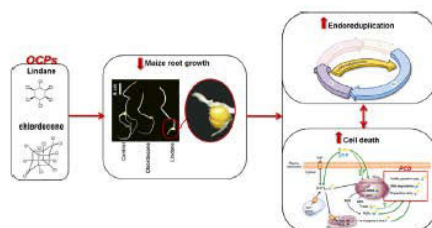
Organochlorine pesticides (OCPs) are widespread environmental pollutants; two of them are highly persistent: lindane ( $\gamma$ HCH) and chlordecone (CLD). Maize plants cope with high levels of OCP-environmental pollution, however little is known about cellular mechanisms involved in plant response to such OCP-exposures. This research was aimed at understanding the physiological pathways involved in the plant response to OCPs in function of a gradient of exposure. Here we provide the evidences that OCPs might disrupt root cell cycle leading to a rise in the level of polyploidy possibly through mechanisms of endoreduplication. In addition, low-to-high doses of  $\gamma$ HCH were able to induce an accumulation of  $H_2O_2$  without modifying NO contents, while CLD modulated neither  $H_2O_2$  nor NO production.  $[Ca^{2+}]_{cytosolic}$ , the caspase-3-like activity as well as TUNEL-positive nuclei and IP-positive cells increased after exposure to low-to-high doses of OCPs. These data strongly suggest a cascade mechanism of the OCP-induced toxic effect, notably with an increase in  $[Ca^{2+}]_{cytosolic}$  and caspase-3-like activity, suggesting the activation of programmed cell death pathway.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### HIGHLIGHTS

- This study was set up to explore cytotoxicity of OCPs on maize root cells.
- Cell hypertrophy and transcription misregulation of cell cycle markers were observed.
- Rise in cell polyploidy confirmed OCP-induction of endoreduplication.
- OCPs trigger the rise of  $[Ca^{2+}]_{cytosolic}$  and caspase-3-like, signals of apoptosis/PCD.
- Dose-dependent damages to DNA signify the toxic potential of OCPs to plants.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### 1. Introduction

Organochlorine pesticides (OCPs) are organic compounds with high persistence in the terrestrial ecosystems, and are suspected to be carcinogenic and endocrine disruptors [1,2]. Amongst the most extensively used OCPs, lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane,

\* Corresponding author at: Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.  
Tel.: +33 476 51 46 80; fax: +33 476 51 44 63.

E-mail address: [muriel.raveton@ujf-grenoble.fr](mailto:muriel.raveton@ujf-grenoble.fr) (M. Raveton).

$\gamma$ HCH) and chlordecone (decachloropentacyclodecan-5-one, CLD) still contaminate large areas even though their use in French agriculture was halted long ago, 1998 and 1993 respectively (Fig. S1). The contamination with  $\gamma$ HCH and CLD is heterogeneous, with hot spots (agricultural and former industrial sites) containing between 900 and 4000 mg/kg and 10–300 mg/kg [3], respectively [4,5]. Furthermore, CLD was shown to be strongly resistant to biotic and abiotic degradations, while some microbial dehalogenation reactions have been described for  $\gamma$ HCH [4,6]. These behaviors have resulted in a long-term contamination of soils but the persistence of OCPs was found to be higher in open soils compared with cropped soils [3,4,7,8]. It was demonstrated that plants constitute an important sink for these OCPs, as they are able to maintain a richness of microbial communities in their rhizosphere capable of bioaccumulating/biodegrading OCPs [9,10] and retaining them efficiently in their different tissues mainly by partition/diffusion processes [11–19]. Such positive observations corroborate remediation of polluted sites by using plants. A prerequisite for the successful application of such technologies is the selection of tolerant plant species, since the phytotoxicity of OCPs can inhibit plant performance, reducing the overall efficiency of the remediation process [20]. Many studies have shown that germination and seedling growth of most of Brassicaceae, Leguminosae, Malvaceae, Solanaceae and Poaceae plants were affected by OCPs [21–24].

Some species are able to cope with excessive levels of OCPs, one of them being maize [18,25].

Despite an extensive literature on the toxicity of OCPs, we still know little about the underlying molecular mechanisms involved in their cytotoxicity. Studies exploring this knowledge gap would be useful for a better understanding of plant-OCPs interactions. Early studies described the effects of OCPs on plant roots, namely cell enlargement without differentiation, spindle inactivation, induction of chromosomal abnormalities, incomplete wall formation and cell cycle arrest [26–28]. The cell cycle arrest is a prerequisite for the induction of cell signaling cascades that trigger defense plant responses and programmed cell death (PCD) [29]. Some former studies have shown that  $\gamma$ HCH could modulate  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-binding proteins, potentially disturbing the abundance of cytosolic calcium ions ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) [30]. Other studies suggested that  $\gamma$ HCH stimulated the generation of reactive oxygen species (ROS) in plants [17,18]. Many abiotic stress factors like pollutants or UV-light, can cause the spatial and temporal modulation of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  and ROS, subsequently leading to PCD [31–34]. However, further studies are still needed to draw a comprehensive picture of the plant-OCPs interactions at the molecular or physiological level.

In this paper, the molecular mechanisms underlying the process of stress-induced PCD following OCP exposures were investigated

on *Zea mays* roots. We used two OCP molecules: one as a reference model  $\gamma$ HCH owing to the extensive work already conducted on this molecule, and CLD as our molecule of interest, suspected of being a powerful prostate carcinogen. The study was conducted using a range of concentrations for each OCP, ranging from environmentally relevant concentrations to the limit of their solubility. Root tips in hydroponic conditions were collected at 7-days in order to investigate the expressions of cell cycle regulatory genes and the cell ploidy level in response to OCP stress. We also attempted to determine whether  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO and caspases contributed to apoptosis/PCD. These findings provide a better understanding of molecular OCP-induced stress in cells of root tips.

## 2. Experimental

The chemicals, chlordecone (CLD) and lindane ( $\gamma$ HCH), were purchased at Sigma–Aldrich (Germany) as pure standards (99% of purity).

### 2.1. Plant material, growth conditions and OCP toxicity assays

Maize seeds (*Zea mays* L., Golden Bantam; Graines Baumaux, France) were surface sterilized [18]. Seeds were then germinated in sterile pots (3 seeds/pot) containing Hoagland nutritive solution ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mM,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.55 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.65 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mM,  $\text{KCl}$  0.2 mM,  $\text{FeCl}_3$  0.1 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  0.2  $\mu\text{M}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{MgO}_7$  0.24 0.01  $\mu\text{M}$ ) and (i) 0.025% of ethanol (OCP solutizer) for controls, (ii)  $\gamma$ HCH at the following concentrations, 7 mg/L (water solubility), 3.5 mg/L, and environmentally relevant concentrations of 0.7 and 0.07 mg/L and, (iii) CLD at the following concentrations, 1 mg/L (water solubility), 0.2 mg/L and environmentally relevant concentrations of 0.04 and 0.008 mg/L. The sterile hydroponic conditions used for plant growth was characterized for water–organic pollutants that may influence plant growth and optimized their bioavailability [9,17–19]. All plants were cultivated 7 days under controlled conditions (obscurity;  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). At this indicated time, the fresh weight, the length and the morphology of the whole plantlet, of the roots and of the leaves were measured ( $n = 10$  independent experiments).

### 2.2. Determination of root cell size

Root tips of the primary root (2 mm in height from the apex) were collected. After freehand cross sections, cells were then observed under a light microscope (Nikon E600). The length of 1500–2000 cells (3–4 root tips) were measured for one replicate ( $n = 10$  independent experiments) per concentration using MideBMP software (Almeria, Spain).

### 2.3. Total RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

The total RNA from of at least 120 mg of maize roots was extracted using Trizol (Invitrogen, USA). 4  $\mu\text{g}$  of total RNA were treated with DNase I (20 min,  $20^\circ\text{C}$ ), and used for cDNA synthesis with Superscript III and oligo-dT20 primer (60 min,  $50^\circ\text{C}$ ) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). Resulting cDNAs were diluted 100 times for qPCR reactions. Real-time quantitative PCR reactions of 25  $\mu\text{L}$  were performed in triplicates on an iQ5 system (BioRad, USA) using MesaGreen Supermix (Eurogentec, Belgium), 0.3  $\mu\text{M}$  of each primer and 5  $\mu\text{L}$  of diluted cDNA. Primers used for real-time quantitative PCR are listed in Table S1. For each gene, a cDNA serial dilution over 5–logs was performed in order to assess PCR efficiency. Data analysis was performed according to the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method taking into account PCR efficiency [35] and using the housekeeping genes encoding the  $\alpha$ -tubulin (NM.001174192.1) and the actin-1 (NM.001155179) for a dual-gene normalization

[36]. The transcription of genes of key core cell cycle regulators were analyzed as G2→M marker: *CYCA1*; mitotic marker, *CYCB2*; G1→S marker: *CYCD3;1*; G1→S markers: *E2F* transcription factor, retinoblastoma-related protein (*RBR1*); S phase marker: proliferating cell nuclear antigen (*PCNA1*); inhibition cell division markers: Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome (*APC/C*), *AURORA*; and G2 arrest marker: *WEE1* [29,37–39]. Comparison of basal expression of genes was based on normalized expression levels obtained from control root apex ( $n = 3$  independent experiments). Genes were considered significantly under-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $<0.5$ -fold, or over-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $>2$ -fold when compared to control values.

### 2.4. Cellular ploidy

Intact nuclei were collected from freshly root tips (10 segments of 2 mm in length) as described previously [40]. The DNA content



was analyzed by flow cytometry on Accuri C6 cytometer (excitation 488 nm, emission 585/40 nm) (Becton Dickinson, USA). Data were collected in slow flow rate (14  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) on a total count of 5000 nuclei for each sample ( $n=3$  independent experiments).

### 2.5. $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO and calcium detection in roots

The roots (4–5 primary root segments, 5 mm in height from the apex, 40 mg) were collected, washed with sterile water and incubated in the appropriate stain reagents over 7 replicates.

$\text{H}_2\text{O}_2$  production in maize roots was measured using  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) as described previously [18]. The production of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured using a Varioskan-flash spectrofluorometer (excitation 485 nm, emission 530 nm). The fluorescence intensity (RFU<sub>530</sub>) normalized to the protein content was used to express  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation.

Intracellular NO levels were measured using DAF-2-DA (4,5-diaminofluorescein diacetate) as described previously [41]. NO concentrations were calculated using a calibration curve built with  $\text{NaNO}_2$  (0.025–0.250 mM) reacting with DAF-2 and normalized to the protein content.

Intracellular free cytosolic calcium was detected by using fluo-3-AM (Sigma-Aldrich, Germany) at 10  $\mu\text{M}$  with 1 h incubation in the dark at 25 °C [42]. Then, roots were collected, washed with water and freehand cross sections of these roots were performed and observed under a fluorescence microscope (Olympus SZX12; excitation 450–490 nm, emission 520 nm). The intensity of the fluorescent calcium probe was measured using the GIMP software and normalized to the average fluorescence intensity of each root section.

### 2.6. Caspase-3-like activity assay

The roots (15–16 primary root segments, 5 mm in height from the apex, 250 mg;  $n=5$  independent experiments) were collected, washed with PBS, and grinded in a lysis buffer to measure caspase-3-like activity as described previously [43].

### 2.7. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) assays

The apoptotic cells were counted using an adapted protocol from Deng et al. (2010) [42]. The roots (10 primary roots) were collected, embedded within Tissue-Tek OCT 4583 (Sakura Finetek, USA) and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . At a maximum length of 1 mm from the apex, transverse sections (20  $\mu\text{m}$ ) were produced using a freezing microtome (Reichert-Jung Cryocut 1800) and were mounted on Super-Frost Gold slides (Labonor). Frozen sections were fixed in FAE (50% ethanol, 5% acetic acid, 4% formaldehyde; 1 h, room temperature). The sections were then treated with a solution of 0.1% Triton X-100 and 0.1% of sodium citrate (2 min, 4 °C). Then, they were digested with 0.3  $\mu\text{g}/\text{L}$  proteinase K (30 min, 37 °C). Afterwards, the sections were saturated with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 20% of BSA (Bovine serum albumin). As positive controls, some sections were incubated (40 min, 37 °C) in a solution of 3 units/mL DNaseI (Invitrogen, USA). Finally, the apoptotic nuclei were labeled with fluorescein (TUNEL assays) according to the manufacturer's instructions (*In Situ* Cell Death Detection kit, Roche Diagnostics GmbH, Germany). The sections were observed under a fluorescence microscope (Olympus SZX12; excitation 450–490 nm, emission 520 nm). The percentage of TUNEL-positive nuclei (green fluorescence) was estimated on 600 cells per root tip, for one replicate per concentration ( $n=5$  independent experiments).

### 2.8. Detection of cell viability

Root segments (10 primary root segments;  $n=5$  independent experiments) were collected for viability measurements as described previously [44].

### 2.9. DNA laddering

Samples (20 mg) from root tips of maize seedlings were used for DNA extraction. The total genomic DNA was extracted according to manufacturer's instructions (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). 20  $\mu\text{g}$  of extracted DNA was subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and captured under UV light (100 bp DNA molecular marker XIV, Roche diagnostics, Germany).

### 2.10. Protein content

The protein content of the samples was determined according to the method described by Bradford, using BSA as a standard (96-well plate assay protocol, Sigma Aldrich). All spectrophotometric analyses (595 nm) were conducted using a Varioskan-flash spectrophotometer.

### 2.11. Statistics

The Gaussian distribution of the data was analyzed using a Shapiro–Wilk test (R 2.14.1). Mann–Whitney tests were adjusted to each parameter measured (biomass,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ ...) in order to estimate the effects of OCP exposures on root maize seedlings. Thus, we report results as the mean  $\pm$  SE values in control samples and in OCP exposures.

## 3. Results and discussion

### 3.1. OCPs induce growth inhibition of maize roots

$\gamma\text{HCH}$  and CLD inhibited the growth of maize seedlings (Fig. 1A and F). At 7-days post- $\gamma\text{HCH}$ -exposure, fresh weight and length of shoot were reduced in a dose-dependent manner (Fig. 1B). The most striking growth disturbance was the root morphology, which displayed a significant shortening of the root length (2-fold max.; Fig. 1C), a reduction in the formation of secondary roots and in root hairs, a shortening and swelling of the elongation zone alongside with a hypertrophy of cortical cells (2-fold max.; Fig. 1D and E), while the number of cells per root section was not significantly different compared to controls ( $P=0.294$ ). Seedlings exposed to CLD showed no-significant differences in shoot and root morphology (Fig. 1G and H); however, reduction in

the formation of secondary roots and in root hairs was observed (Fig. 1F). Root diameters were similar regardless of the treatment applied, but cortical cell length was significantly decreased (20% max.) in a CLD dose-dependent manner (Fig. 1I and J). Similarly to exposures to  $\gamma\text{HCH}$ , the number of cells per root section was statistically similar to controls ( $P=0.999$ ). The transcription of cytoskeleton markers did not show significant misregulation, except for a tendency of the gene *MAP65-1* (microtubule-associated proteins) to be over-transcribed after exposure to high-dose of OCPs (Fig. S2A and B). Overall, these results revealed a disruption in the root length and the shape of cortical cells after exposure of plants to OCPs suggesting that cell cycle was impacted.

### 3.2. OCPs inhibit cell cycle in roots

To determine whether OCPs can disrupt root cell cycle, we monitored the way in which OCP-dose exposures affected the

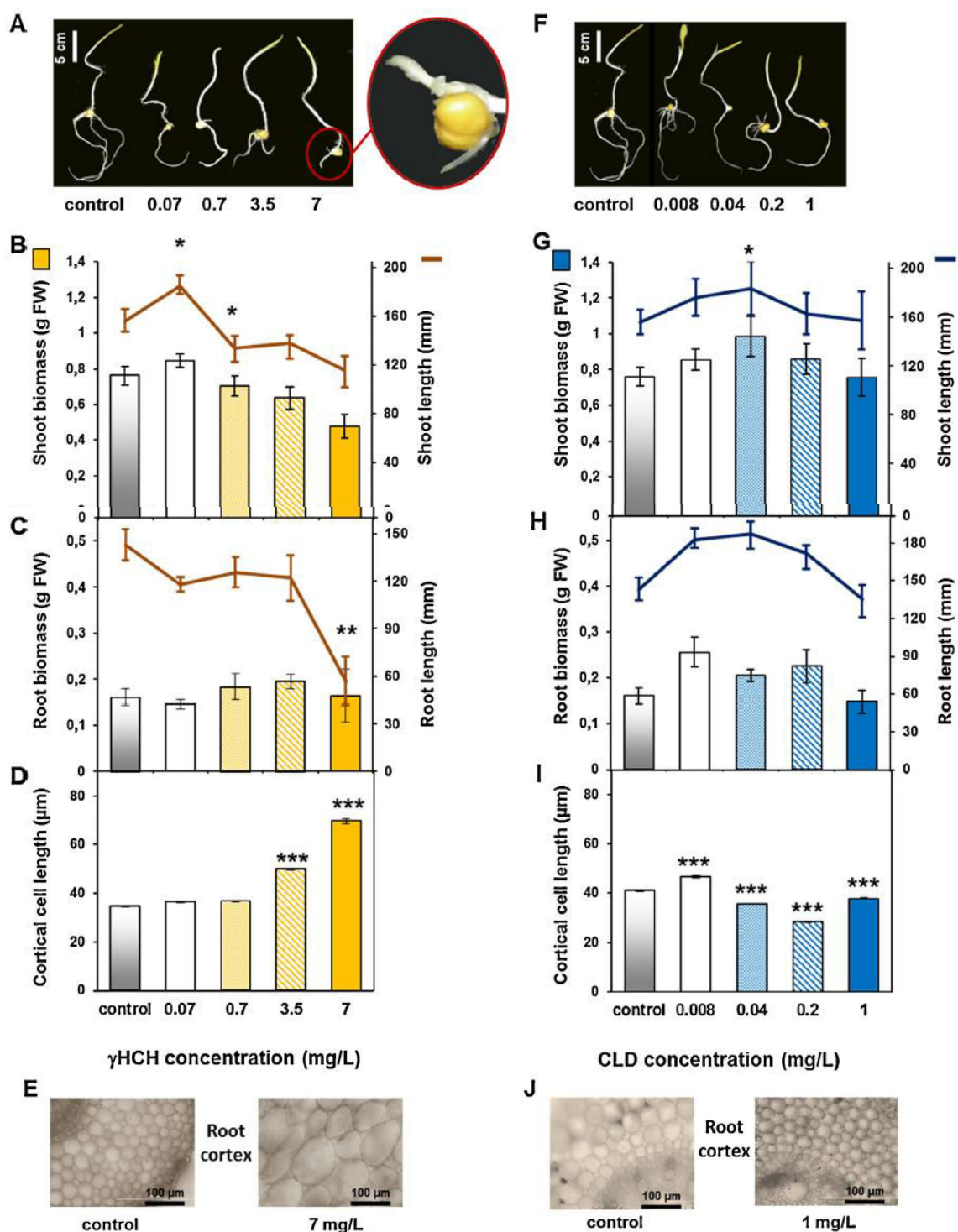


Fig. 1. Growth of 7-day-old *Zea mays* seedlings exposed to hydroponic solutions containing  $\gamma$ HCH (A–E) and CLD (F–J). Appearance of seedlings after 7 days of growth in solutions contaminated by lindane (A) and chlordane (F). Biometric measurements (fresh weights (FW); length) according to concentrations of  $\gamma$ HCH (B and C) and CLD (G and H) in shoot (B and G) and root (C and H). Length (D and I) and appearance (E and J) of cortical root cells according to concentrations of  $\gamma$ HCH (D and E) and CLD (I and J). Error bars represent mean  $\pm$  SE values of 10 replicates. Statistical analysis was performed with Mann–Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.0001$ .

expression of key core cell cycle regulators. Exposures to OCPs did not significantly modulate the transcription of *CYCA1*, *AURORA* and *PCNA1* but lead to a dose-dependent expression response of the other cell cycle regulator genes (Fig. 2A–C). The transcription of *RBR1* and *CYCD3;1* was down-regulated (10-fold) at low-dose of  $\gamma$ HCH (0.07–0.7 mg/L). Upon exposure of increasing levels of CLD, the transcriptions of *RBR1*, *CYCD3;1*, *CYCB2* were significantly

down-regulated (21, 4 and 25-fold, respectively). The down-regulation of *CYCD3;1* (an over-transcription denotes progression through the G1-to-S phase) [45] and *CYCB2* (an over-transcription of which only occurs during a short time lapse until mid-prophase mitosis) [46] by CLD and low concentrations of  $\gamma$ HCH seems to prevent entry into the S-phase of the cell cycle (Fig. 2A and C). Nevertheless, when we compared these results to those obtained

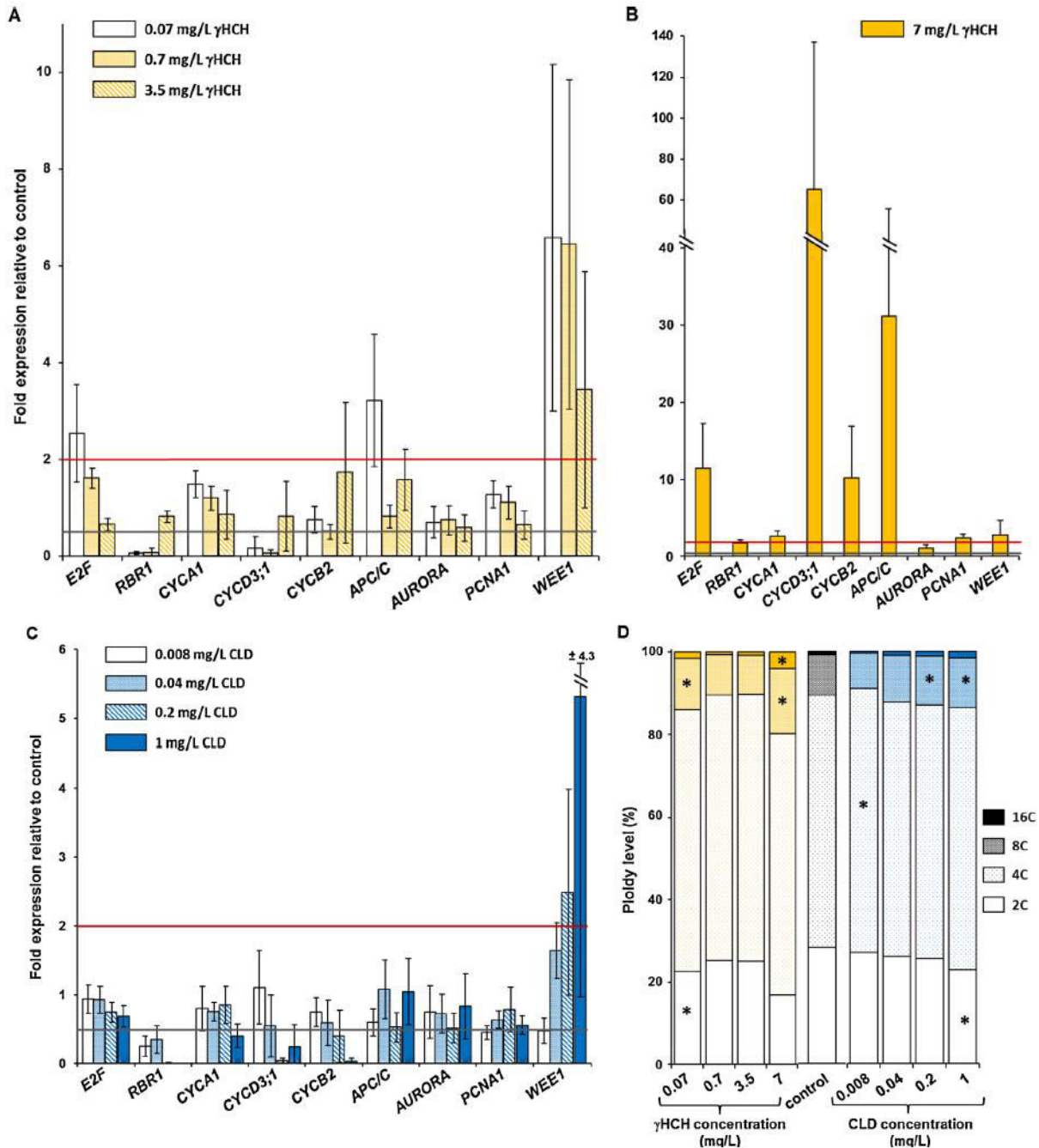


Fig. 2. Comparative real-time quantitative RT-PCR analysis of the differential transcription of genes involved in the cell cycle progression (A–C) and ploidy level (D) in root apex (*Z. mays*). Gene transcription values are indicated as fold expression in root apex exposed to different concentrations of  $\gamma$ HCH [(A): 0.07, 0.7, 3.5 mg/L; (B): 7 mg/L] and CLD [(C): 0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg/L] to unexposed roots (controls). Genes were considered significantly under-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $<0.5$ -fold or over-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $>2$ -fold. Horizontal lines indicate respectively a 2-fold over-expression and 2-fold under-expression in OCP-exposed roots comparatively to controls. (D) Histograms show the DNA levels in root tip cells of control plants and OCP-exposed plants. The C value indicates the mean number of genome copies (2C DNA level: diploid state). Statistical analysis was performed with Mann–Whitney test ( $n = 3$ ). Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \* $P < 0.05$ .



following exposures to high-doses (7 mg/L) of  $\gamma$ HCH (Fig. 2B), the cell cycle progression actually seemed to pass through G1-to-S phases with an over-transcription of *CYCD3;1*. At the same time, *CYCB*-type transcriptions were induced, which may be due to the over-transcription of *CYCD3;1* and resulted in not only in an increase in mitosis, but also in endoreduplication [47]. Moreover, the first observed *RBR1* down-regulation following exposures to CLD and lower concentrations of  $\gamma$ HCH disrupted cell division patterns. In the non-phosphorylated state, *RBR1* represses the action of the transcription factor *E2F*, which, in turn, activates the expression of many genes required for DNA replication [48]. Previous studies have shown that the down-regulation of *RBR1* and overexpression of *E2F* (12-fold at 7 mg/L  $\gamma$ HCH exposure in Fig. 2B) is consistent with the induction of endoreduplication [39]. Inhibition of mitotic cell division can be achieved through multiple mechanisms; firstly through the over-expression of *WEE1* gene that codes for a kinase protein, the plant growth is thereafter inhibited

by cell division arrest in the G2-phase of the cell cycle by *WEE1* [37]. Following exposures to the lower concentrations of OCPs, *WEE1* was over-transcribed (6.5-fold at low-dose exposure to  $\gamma$ HCH in Fig. 2A and 5.3-fold (however not statistically significant) at CLD exposure in Fig. 2C) suggesting a cell cycle arrest in the G2 phase. Secondly, the degradation of mitotic cyclins by the *APC/C* can also play a role in cell division arrest [49]. The *APC/C* is an E3 ubiquitin ligase complex that controls cell cycle progression from the M-to-S phase and leads to the degradation of various cell cycle proteins. Our results showed that exposures to high doses of  $\gamma$ HCH induced an over-transcription of *APC/C* (32-fold) and a down-transcription of *WEE1* (similar to control) (Fig. 2B). Transcription of both *WEE1* and *APC/C* genes seemed to be complementary and, therefore, confirmed the endoreduplication hypothesis. Endoreduplication is a widespread process, which corresponds to the amplification of the genome in the absence of mitosis and cytokinesis from diploid cells having 2C or 4C DNA content (C: haploid). Before and just after

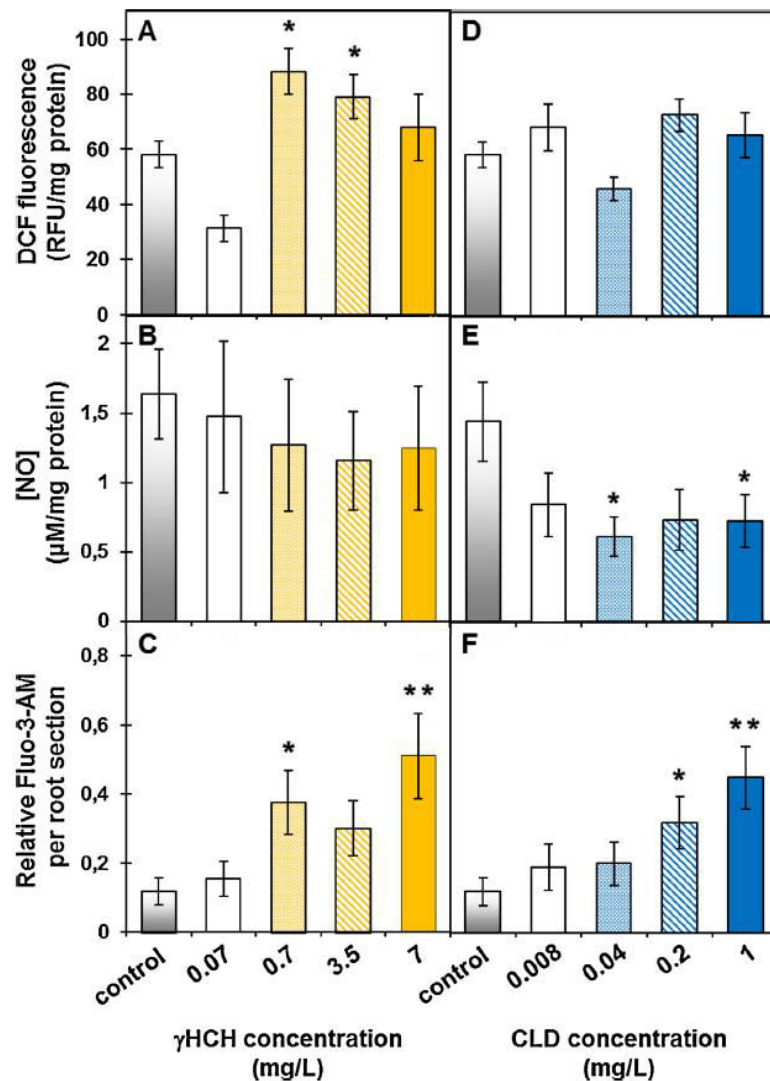


Fig. 3. Cell signaling markers hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ; A and E), nitrogen monoxide (NO; B and F) and calcium cytosolic ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ; C and G) in *Zea mays* root tips exposed to  $\gamma$ HCH (A–C) and CLD (E–G). Error bars represent mean  $\pm$  SE values of 7 replicates. Statistical analysis was performed with Mann–Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

the S-phase, consecutive endoreduplication cycles generate 8C, 16C, 32C DNA contents [50]. In plants, a strong correlation between cell size (cell number per unit of tissue proportionally decreasing, while cell size proportionally increasing) and polyploidy has been reported in a broad range of species [51]. Our hypothesis that OCPs induce endoreduplication in root cells is supported by the reduction of the length of the roots, the cell hypertrophy notably in roots exposed to  $\gamma$ HCH at high concentrations and the level of cell ploidy in roots exposed to OCPs. Indeed in our study, polyploidy increased progressively after exposures to low-to-high doses of OCPs (Fig. 2C).  $\gamma$ HCH, especially, seemed to raise significantly the 8C and 16C cell population. After exposure to 7 mg/L of  $\gamma$ HCH, the fold change of root cell populations compared to control was 0.63-fold for 2C, 1.09-fold for 4C, 1.88-fold for 8C and 5.69-fold for 16C. CLD predominantly enhanced the 8C cell population; for exposure at 1 mg/L CLD, the fold change of root cell populations compared to control was 0.74-fold for 2C, 0.94-fold for 4C, 1.23-fold for 8C and

1.77-fold for 16C. For the first time,  $\gamma$ HCH and CLD were described as cell-cycle disruptors in plant roots in a dose-dependent way.

3.3. OCPs induce cell death through  $Ca^{2+}$ /caspase-like pathway

To monitor whether there was any activation in the cell signaling pathways upon OCP exposure, the levels of oxidative stress markers were determined. The data revealed the basal content of  $H_2O_2$  was 60 RFU/mg protein in control (Fig. 3A and S4A); most of  $H_2O_2$  was detected in fragile tissues (root hairs, root cap cells). The disturbance of the cellular redox balance after exposure to  $\gamma$ HCH is reflected by the dose-dependent increase in  $H_2O_2$  levels in roots. The  $H_2O_2$  root content was significantly increased upon exposure of 0.7 mg/L to  $\gamma$ HCH (rise of 1.5-fold) and decreased slightly at 7 mg/L (hormesis phenomenon). This is correlated to the dose-dependent induction by  $\gamma$ HCH of the *SOD4* (cytosolic superoxide dismutase) gene transcription (Fig. S5A). At the same time,

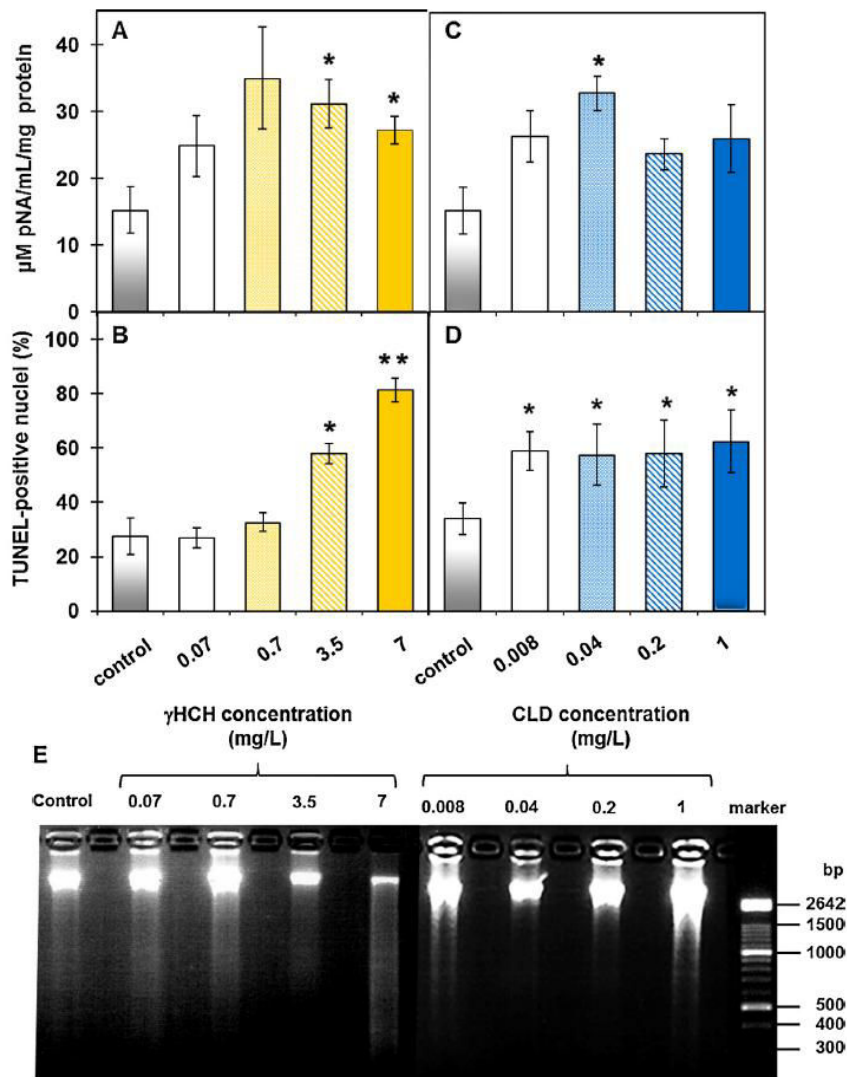


Fig. 4. Measurements of Caspase-3-like activity (A and C) and TUNEL-positive cells (B and C) in *Zea mays* root tips exposed to  $\gamma$ HCH (A and B) and CLD (C and D), and analysis of nuclear DNA damages (E). Error bars are mean  $\pm$  SE values of 5 replicates. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



the gene transcription of *NOS* was also over-transcribed but not followed by increased production of NO (Fig. 3B, S4C and S5A). By contrast, in roots exposed to CLD,  $H_2O_2$  content and *SOD4* transcripts were detected at the same level as the ones measured in control (Fig. 3D, S4B and S5B). The NO content decreased in roots at a concentration of 0.04 mg/L CLD onwards (Fig. 3E and S4D). This NO

depletion was significantly lower (2-fold) than the control, while *NOS* gene expression was similar to the control values (Fig. S5B). Interestingly, each one of those two molecules ( $H_2O_2$  and NO) was able to inhibit the production of the other [52]. Our hypothesis is that  $\gamma$ HCH induces early  $H_2O_2$  accumulation that triggers the PCD cell signaling at the expense of NO second messenger signaling.

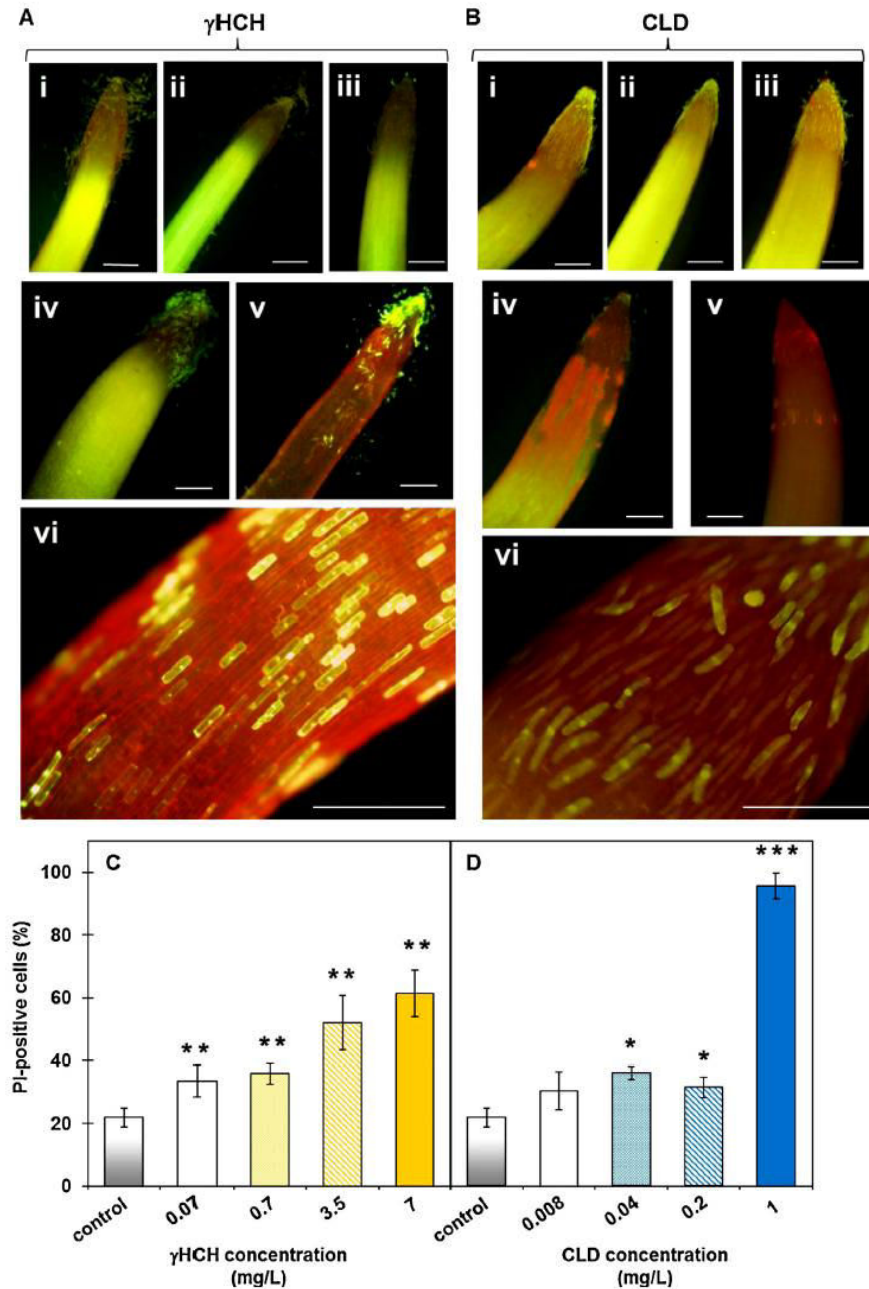
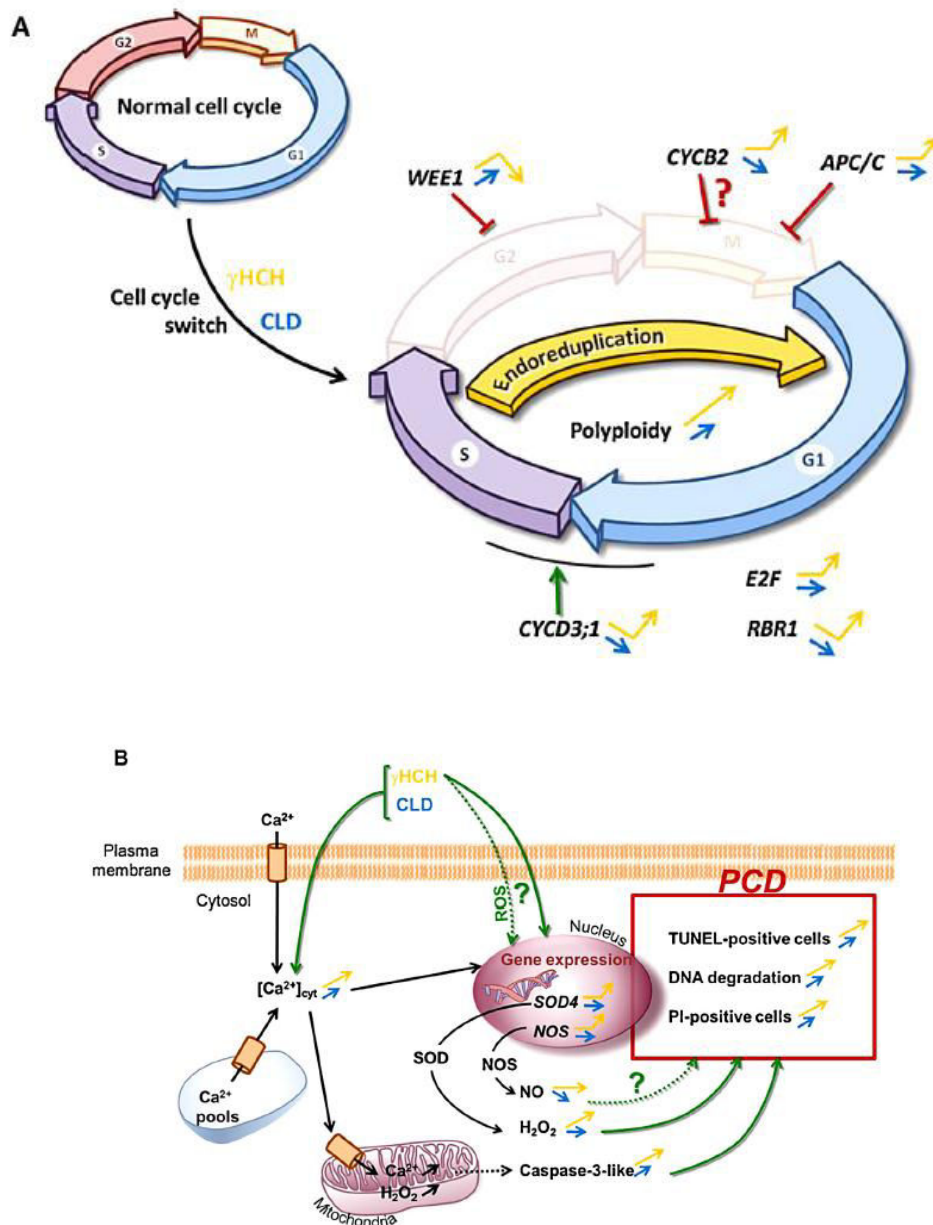


Fig. 5.  $\gamma$ HCH (A and C) and CLD (B and D) induced cell death as visualized by *in situ* staining of live (green, fluorescent probe fluorescein diacetate) and dead (red, fluorescent probe propidium iodide) cells in the primary root tips of *Zea mays*. (A) Seedlings were cultivated in sterile conditions for the control (i) and the treated plants were exposed to 0.07 (ii), 0.7 (iii), 3.5 (iv) or 7 mg/L (v and vi) of  $\gamma$ HCH. (B) Seedlings were cultivated in sterile conditions for the control (i) and the treated plants were exposed to 0.008 (ii), 0.04 (iii), 0.2 (iv) or 1 mg/L (v and vi) of CLD. Bars = 1 mm. (C and D) PI-positive cells in *Zea mays* root tips exposed to  $\gamma$ HCH (C) and CLD (D). Error bars represent mean  $\pm$  SE values of 5 replicates. Statistical analysis was performed with Mann–Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

CLD, even at similar concentrations to  $\gamma$ HCH, did not induce the same cell signaling, since  $H_2O_2$  and NO were not accumulated and transcriptions of *SOD4* and *NOS* were similar to control values. Overall, NO appeared to have no effect on OCP-induced cell death, but  $H_2O_2$  might be involved in  $\gamma$ HCH-induced PCD.

In this study, it is clear that a critical and early signal occurring upon OCP perception is an elevation in cytosolic calcium ions ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) in a dose-dependent trend (Fig. S6). There was no fluorescence detected in root cortex in controls, while epidermal and hypodermal tissues were slightly fluorescent. Exposures to  $\gamma$ HCH and CLD led to significant increases in the intensity of the Fluo-3-AM fluorescent signal. Indeed, an apparently higher  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  concentration was observed in the epidermal, hypodermal, endodermal and cortical cells. Thus, measurements of the relative fluorescence was performed in the cortex tissue in roots control and exposed to both OCPs (Fig. 3C and F). The intracellular

$[Ca^{2+}]_{cyt}$  levels were significantly higher compared to control values following exposure to 0.7 mg/L of  $\gamma$ HCH onwards and to 0.2 mg/L of CLD onwards. In both cases  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  showed a maximal rise of 2.5-fold. Elevated  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  was described to be capable of triggering downstream signaling events essential for PCD, such as  $Ca^{2+}$  release from interior stores, external  $Ca^{2+}$  entry through ROS-activated non-selective cation channels [53], and mitochondrial  $H_2O_2$  bursts [29]. Mitochondrial hyperpolarization facilitates the release of cytochrome c in a  $H_2O_2$ -dependent pathway. The release of cyt c from mitochondria to the cytosol plays an important role in initiating the caspase cascade of the intrinsic PCD pathway in plants [53]. The caspase-3-like activity measured in cytosolic fractions of maize root tips revealed, after exposures to any of the OCPs, an induction with a typical hormesis shape according to the concentrations of the pollutants (Fig. 4A and C). The roots exposed to 0.07, 0.7, 3.5 or 7 mg/L of  $\gamma$ HCH showed 1.7, 2.3, 2.1 and 1.8-fold increase



**Fig. 6.** Schematic model of the molecular mechanism and the signaling pathways for OCP-induced endoreduplication (A) and PCD (B) in *Zea mays* root tip cells. (A) Hypothetical induction of endoreduplication after exposure to OCPs. Orange arrows, results obtained with  $\gamma$ HCH. Blue arrows, results obtained with CLD. Green arrows, OCP induction. Red arrows, OCP inhibition. (B) Hypothetical mechanisms of PCD induced by OCPs. Orange arrows, results obtained with  $\gamma$ HCH. Blue arrows, results obtained with CLD. Green arrows, OCP-induced molecular mechanisms. Black arrows, PCD-molecular mechanisms published in Gadjev et al. [29] and Sun et al. (2012) [53]. SOD, superoxide dismutase. NOS, nitric oxide synthase. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



in the caspase-3-like activity, respectively. Similarly, roots exposed to CLD (0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg/L) revealed the same pattern in their caspase-3-like activity with a rise of 1.8, 2.2, 1.6 and 1.7-fold, respectively. Elevated caspase-3-like activities result in DNA and protein lyses and are considered to be the “point-of-no-return” in apoptotic signaling cascade [29,53]. Although no genomic evidence is yet available proving the existence of caspase genes in plants, plants undergoing PCD do show caspase-3-like activity [33,52,53].

Thus, in this study, the significantly higher activity of caspase-3 obtained followed by the treatment with OCPs confirmed its potential

role in triggering the apoptotic pathway in a plant system. In order to validate if root tip cells exposed to OCPs underwent PCD, DNA fragmentation through specific endonuclease cleavages (apoptosis process) was analyzed using the TUNEL assay on whole-mount tissue samples (Fig. S7). Very few TUNEL-positive nuclei were detected in the root tips of control seedlings, and were mostly detected in epidermal and central stele, which is most probably a reflection of natural apoptotic phenomena underway in such tissues. In sharp contrast there was an increase in the number of TUNEL-positive nuclei in cortical cells of root tips exposed to both  $\gamma$ HCH and CLD. After exposure to  $\gamma$ HCH, a dose-dependent rise of the amount of TUNEL-positive nuclei was observed (Fig. 4B). Indeed, (i) exposure to 0.07 and 0.7 mg/L of  $\gamma$ HCH did not induce DNA fragmentation compared to control, but (ii) higher  $\gamma$ HCH concentrations (3.5 and 7 mg/L) significantly increased the number of TUNEL-positive nuclei of 2- and 3-fold, respectively, with a maximal level of 80% of positive nuclei. Exposures to CLD showed a different pattern of DNA fragmentation (Fig. 4D). Exposure to the lowest concentration of CLD increased the level of TUNEL-positive nuclei by 2-fold compared to that of control, and this level of DNA damage remained similar regardless of the concentration applied, with a level of 54% of positive nuclei. This observation suggested that OCPs, through signaling molecules, activated apoptotic pathways, as previously described in animal cells [54]. Nevertheless, DNA ladder profiles analyzed by gel electrophoresis (Fig. 4E) showed extensive DNA smearing in root tips exposed to 3.5, and especially, to 7 mg/L of  $\gamma$ HCH. However, no clear ‘laddering’ of DNA degradation into internucleosomal fragments (multimers of ~180 bp) was detected. DNA isolated from roots exposed to CLD showed slight DNA smears following exposures to all concentrations, however DNA cleavage into 180-bp multimers was still not detected. Comparing these results with the TUNEL assays, we conclude that the amount of nucleosomal DNA fragmentation was not sufficient to be detected by gel electrophoresis. Moreover, it should be reminded that the physiologically heterogeneous state of the cells in the root tip tissues is a significant parameter influencing the ability to perceive triggering signals for PCD [55]. In several other well-known examples of developmentally regulated PCD, cells die progressively in a spatio-temporal pattern [56]. Therefore, PCD might progressively spread toward the cells of the roots, from the bottom (tips in long contact with OCPs) to the top. In addition to these measurements, the integrity of the plasma membrane was also examined using propidium iodide (PI), which highlights red-damage cells, and using a fluorescent probe (FDA), which highlights green-living cells (Fig. 5 and S8). Similarly to the previous results, PI- and FDA-staining showed that exposures to OCPs led to obvious dose-dependent cell death in the root tips. A stronger red fluorescence was noticed at the highest concentrations in all root tissues (epidermis, hypodermis, endodermis, cortex). Indeed, exposures to 0.07, 0.7, 3.5 and 7 mg/L of  $\gamma$ HCH induced a significant rise of PI-positive cells by 1.5, 1.6, 2.3 and 2.8-fold, respectively, reaching a maximum of 60% of PI-positive cells (Fig. 5A and C). A similar pattern was obtained in root tips exposed to CLD with a significant increase in PI-positive cells exposed to 0.04 mg/L of CLD onwards (Fig. 5B and D). The PI-positive cells in roots exposed to 0.04, 0.2 and 1 mg/L CLD increased by 1.6, 1.4 and 4.3-fold, respectively,

compared to control levels. Following exposure to the highest concentration of CLD, 95% of cortical cells were PI-positive. Therefore, DNA smears detected in cell roots treated with OCPs were coherent with PI-cell viability tests. Overall, these results strongly suggest that OCPs were inducers of cell death, partially through apoptotic phenomena but also through other pathways leading to a high level of cells with damaged plasma membranes.

#### 4. Conclusions

This study analyzed the dose-dependent effects of the phytotoxicity of OCPs on *Z. mays* roots. We demonstrate for the first time that the adverse effect of OCPs on cell division and growth of maize is, at least, partially due to their action as cell cycle disruptors (Fig. 6A). Analyses of the transcriptome responses and polyploidy levels showed that the root growth inhibitory response to OCPs might be explained by the induction of endoreduplication. With increasing doses of OCP-exposure, an increase in the level of cytotoxicity was measured. Besides, the *in situ* potential increase in ROS levels, the increase in intracellular  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , induction of caspase-3-like activity and increases in TUNEL-positive nuclei/IP-positive cells all were prerequisite for an OCP-induced PCD (Fig. 6B). The study provides direct evidence at a molecular level to show that exposure to OCP relevant environmental concentrations could induce slight phytotoxicity on young maize root growth, which could induce seedling growth disturbances in a longer exposure period or aging.

#### Acknowledgements

Funding for this project was provided by a grant from the Rhône-Alpes Région. The authors wish to thank Brigitte Manship for correcting their proofreading.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.048>.

#### References

- [1] D.J. Huang, S.Y. Wang, H.C. Chen, Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*), *Chemosphere* 57 (2004) 1621–1627.
- [2] U. Tiemann, *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review, *Reprod. Toxicol.* 25 (2008) 316–326.
- [3] P.C. Abhilash, N. Singh, Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (2009) 727–740.
- [4] Y.M. Cabidoche, R. Achard, P. Cattani, C. Clermont-Dauphin, F. Massat, J. Sansoulet, Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1697–1705.
- [5] D.R. Luellen, G.G. Vadas, M.A. Unger, Kepone in James River fish: 1976–2002, *Sci. Total Environ.* 358 (2006) 286–297.
- [6] T.M. Phillips, A.G. Seech, H. Lee, J.T. Trevors, Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms, *Biodegradation* 16 (2005) 363–392.
- [7] R. Calvelo Pereira, M. Camps-Arbestain, B.R. Garrido, F. Macias, C. Monterroso, Behaviour of alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site, *Environ. Pollut.* 144 (2006) 210–217.
- [8] T. Woignier, P. Fernandes, A. Soler, F. Clostre, C. Carles, L. Rangon, M. Lesueur-Jannoyer, Soil microstructure and organic matter: keys for chlordecone sequestration, *J. Hazard. Mater.* 262 (2013) 357–364.
- [9] A. Alvarez, M.L. Yanez, C.S. Benimeli, M.J. Amoroso, Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 66 (2012) 14–18.
- [10] A. San Miguel, J. Roy, J. Gury, A. Monier, E. Coissac, P. Ravanel, R.A. Geremia, M. Raveton, Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 4257–4266.



- [11] V.K. Madan, R. Singh, B. Kumari, J.S. Naresh, T.S. Kathpal, Dissipation of lindane and fenvalerate residues in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Indian climatic conditions, *Ecotox. Environ. Safe.* 46 (2000) 163–166.
- [12] M. Gonzalez, K.S.B. Miglioranza, J.E.A. de Moreno, V.J. Moreno, Organochlorine pesticide residues in leek (*Allium porrum*) crops grown on untreated soils from an agricultural environment, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5024–5029.
- [13] C. Dubuisson, F. Heraud, J.C. Leblanc, S. Gallotti, C. Flamand, A. Blateau, P. Quenel, J.L. Volatier, Impact of subsistence production on the management options to reduce the food exposure of the Martinican population to Chlordecone, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 49 (2007) 5–16.
- [14] S.M. Waliszewski, O. Carvajal, S. Gomez-Arroyo, O. Amador-Munoz, R. Villalobos-Pietrini, P.M. Hayward-Jones, R. Valencia-Quintana, DDT and HCH isomer levels in soils, carrot root and carrot leaf samples, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81 (2008) 343–347.
- [15] P. Caicedo, A. Schroder, N. Ulrich, U. Schroter, A. Paschke, G. Schuurmann, I. Ahumada, P. Richter, Determination of lindane leachability in soil-biosolid systems and its bioavailability in wheat plants, *Chemosphere* 84 (2011) 397–402.
- [16] Y.M. Cabidoche, M. Lesueur-Jannoyer, Contamination of harvested organs in root crops grown on chlordecone-polluted soils, *Pedosphere* 22 (2012) 562–571.
- [17] M. Faure, A. San Miguel, P. Ravanel, M. Raveton, Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*, *Environ. Pollut.* 164 (2012) 188–194.
- [18] A. San Miguel, M. Faure, P. Ravanel, M. Raveton, Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes, *Ecotoxicology* 21 (2012) 315–324.
- [19] A. San Miguel, P. Ravanel, M. Raveton, A comparative study on the uptake and translocation of organochlorines by *Phragmites australis*, *J. Hazard. Mater.* 244 (2013) 60–69.
- [20] C. Becerra-Castro, A. Prieto-Fernandez, P.S. Kidd, N. Weyens, B. Rodriguez-Garrido, M. Touceda-Gonzalez, M.J. Acea, J. Vangronsveld, Improving performance of *Cytisus striatus* on substrates contaminated with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers using bacterial inoculants: developing a phytoremediation strategy, *Plant Soil* 362 (2013) 247–260.
- [21] R. Bidlan, M. Afsar, H.K. Manonmami, Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination, *Chemosphere* 56 (2004) 803–811.
- [22] M. Bueno, M.F. Fillat, R.J. Strasser, R. Maldonado-Rodriguez, N. Marina, H. Smienk, C. Gomez-Moreno, F. Barja, Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena* – Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP(+) reductase, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11 (2004) 98–106.
- [23] P.S. Kidd, A. Prieto-Fernandez, C. Monterroso, M.J. Acea, Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species, *Plant Soil* 302 (2008) 233–247.
- [24] H.S. Li, W.F. Ling, C.X. Lin, Effects of different treatments on soil-borne DDT and HCH dynamics and plant uptake, *J. Environ. Sci. Health B: Pestic. Contam. Agric. Wastes* 46 (2011) 608–614.
- [25] W. Chouychai, H. Lee, Phytotoxicity Assay of crop plants to lindane and alphasulfonamide contaminants in alkaline Thai soil, *Int. J. Agric. Biol.* 14 (2012) 734–738.
- [26] R. Lal, D.M. Saxena, Effect of DDT on cell population growth, cell division, and DNA synthesis in *Stylosanthes notophora* (Stokes), *Arch. Environ. Con. Tox.* 9 (1980) 163–170.
- [27] D. Kumar, S.P. Sinha, Threshold dose of cytogenetic toxicity of lindane, malathion and metacid in *Allium cepa* root-tip cells, *Cytologia (Tokyo)* 54 (1989) 547–552.
- [28] D. Kumar, P.K. Khan, S.P. Sinha, Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 309–314.
- [29] I. Gadjev, J.M. Stone, T.S. Gechev, Chapter 3: programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide, in: W.J. Kwang (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press, 2008, pp. 87–144.
- [30] K. Sharada, B.P. Salimath, H.S. Shetty, N.G.K. Karanth, Indol-3-ylacetic acid-regulated and calmodulin-regulated  $Ca^{2+}$ -ATPase, a target for the phytotoxic action of hexachlorocyclohexane, *Pestic. Sci.* 35 (1992) 315–319.
- [31] M.C. De Pinto, V. Locato, L. De Gara, Redox regulation in plant programmed cell death, *Plant Cell Environ.* 35 (2012) 234–244.
- [32] W. Cui, C. Gao, P. Fang, G. Lin, W. Shen, Alleviation of cadmium toxicity in *Medicago sativa* by hydrogen-rich water, *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 715–724.
- [33] M. Faisal, Q. Saquib, A.A. Alatar, A.A. Al-Khedhairi, A.K. Hegazy, J. Musarrat, Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death, *J. Hazard. Mater.* 250–251 (2013) 318–332.
- [34] M. Petriccione, V. Forte, D. Valente, C. Ciniglia, DNA integrity of onion root cells under catechol influence, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 4859–4871.
- [35] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001).
- [36] L.B. Pena, R.A. Barcia, C.E. Azpilicueta, A.A.E. Mendez, S.M. Gallego, Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings, *Plant Sci.* 196 (2012) 1–7.
- [37] K. De Schutter, J. Joubes, T. Cools, A. Verkest, F. Corellou, E. Babychuk, E. Van Der Schueren, T. Beeckman, S. Kushnir, D. Inze, L. De Veylder, *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint, *Plant Cell* 19 (2007) 211–225.
- [38] L. De Veylder, T. Beeckman, D. Inze, The ins and outs of the plant cell cycle, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 655–665.
- [39] L. De Veylder, J.C. Larkin, A. Schnittger, Molecular control and function of endoreplication in development and physiology, *Trends Plant Sci.* 16 (2011) 624–634.
- [40] J. Dolezel, J. Bartos, Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size, *Ann. Bot.* 95 (2005) 99–110.
- [41] H. Wang, W.D. Xiao, Y.F. Niu, C.W. Jin, R.S. Chai, C.X. Tang, Y.S. Zhang, Nitric oxide enhances development of lateral roots in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under elevated carbon dioxide, *Planta* 237 (2013) 137–144.
- [42] X.Y. Deng, J.W. Li, Z.Q. Zhou, H.Y. Fan, Cell death in wheat roots induced by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Plant Soil* 328 (2010) 45–55.
- [43] L.R. Zhang, Q.X. Xu, D. Xing, C.J. Gao, H.W. Xiong, Real-Time detection of caspase-3-like protease activation *in vivo* using fluorescence resonance energy transfer during plant programmed cell death induced by ultraviolet C overexposure, *Plant Physiol.* 150 (2009) 1773–1783.
- [44] Y. Sunohara, H. Matsumoto, Quinlorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue, *Phytochemistry* 69 (2008) 2312–2319.
- [45] M. Buendia-Monreal, I. Renteria-Canett, O. Guerrero-Andrade, C.E. Bravo-Alberto, L.P. Martinez-Castilla, E. Garcia, J.M. Vazquez-Ramos, The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns, *Physiol. Plant.* 143 (2011) 297–308.
- [46] M. Weingartner, H.R. Pelayo, P. Binarova, K. Zwerger, B. Melikant, C. de la Torre, E. Heberle-Bors, L. Bogre, A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 487–498.
- [47] X.D. Li, E. Yu, C.C. Fan, C.Y. Zhang, T.D. Fu, Y.M. Zhou, Developmental, cytological and transcriptional analysis of autotetraploid *Arabidopsis*, *Planta* 236 (2012) 579–596.
- [48] L. Borghi, R. Gutzat, J. Futterer, Y. Laizet, L. Hennig, W. Gruißem, *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production, *Plant Cell* 22 (2010) 1792–1811.
- [49] A. Cebolla, J.M. Vinardell, E. Kiss, B. Olah, F. Roudier, A. Kondorosi, E. Kondorosi, The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants, *EMBO J.* 18 (1999) 4476–4484.
- [50] P.C.L. John, R. Qi, Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 121–127.
- [51] M. Bourdon, O. Coriton, J. Pirrello, C. Cheniclet, S.C. Brown, C. Poujol, C. Chevalier, J.P. Renaudin, N. Frangne, In planta quantification of endoreduplication using fluorescent *in situ* hybridization (FISH), *Plant J.* 66 (2011) 1089–1099.
- [52] J. Zhao, K. Fujita, K. Sakai, Reactive oxygen species, nitric oxide, and their interactions play different roles in *Cupressus lusitanica* cell death and phytoalexin biosynthesis, *New Phytol.* 175 (2007) 215–229.
- [53] J. Sun, C.L. Zhang, S.R. Deng, C.F. Lu, X. Shen, X.Y. Zhou, X.J. Zheng, Z.M. Hu, S.L. Chen, An ATP signalling pathway in plant cells: extracellular ATP triggers programmed cell death in *Populus euphratica*, *Plant Cell Environ.* 35 (2012) 893–916.
- [54] N. Zucchini-Pascal, G. de Sousa, J. Pizzol, R. Rahmani, Molecular investigation of the effects of lindane in rat hepatocytes: microarray and mechanistic studies, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 3128–3135.
- [55] F. Lo Schiavo, B. Baldan, D. Compagnin, R. Ganz, P. Mariani, M. Terzi, Spontaneous and induced apoptosis in embryogenic cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) in different physiological states, *Eur. J. Cell Biol.* 79 (2000) 294–298.
- [56] C. Giuliani, G. Consonni, G. Gavazzi, M. Colombo, S. Dolfini, Programmed cell death during embryogenesis in maize, *Ann. Bot.* 90 (2002) 287–292.

## 3.2. Impact des OCPs sur le métabolisme racinaire

### 3.2.1. Publication II

**Publication II** : Effect of organochlorine exposure on the maize root metabolome using high-resolution magic-angle spinning 1H-NMR spectroscopy

**Auteurs:** Claire Blondel\*<sup>a,b</sup>, Farid Khelalfa<sup>a,b</sup>, Muriel Raveton<sup>a,b</sup>, Florence Fauvelle<sup>c</sup>

**Participation:** Réalisation des expériences, Analyses des résultats, Réalisation des figures, Rédaction

**Publication soumise à Metabolomics**

**Supplementary data en Annexe 2**

<sup>a</sup>Laboratoire Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>b</sup>Université de Grenoble - Alpes, France

<sup>c</sup>IRBA, France, Bretigny sur Orge

\*Author for correspondence:

Laboratoire Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Tel: 00 33 476 51

Fax: 00 33 476 51 44 63

E-mail: blondel.claire@yahoo.fr

## **Abstract**

<sup>1</sup>H-HRMAS NMR-based metabolomics was used to better understand maize root tip toxicity after exposure to the persistent organic pollutant lindane ( $\gamma$ HCH). Maize seedlings were exposed to 0.7 mg/L  $\gamma$ HCH (mimicking basic environmental contamination) and 7 mg/L  $\gamma$ HCH (mimicking hot contaminated spots) during 7 days. The <sup>1</sup>H-HRMAS NMR-based metabolomic profiles provided detail of the changes in carbohydrate, amino acid, tricarboxylic acid cycle intermediate and fatty acid with a significant separation between the control and  $\gamma$ HCH-exposed root tips (OPLS-DA). The overall data indicated that the heightened effect of  $\gamma$ HCH on primary metabolism would have broader physiological consequences on root development. First of all, energy was consumed to ensure cell defense mechanisms with activation of the GABA shunt pathway and the fatty acid biosynthesis. Secondly, disturbances in the amino acid composition reflect a new distribution of internal nitrogen compounds under  $\gamma$ HCH stress. Some changes in metabolites such as fumarate, citrate, acetate, GABA, asparagine, leucine and isoleucine might be identified as potential indicators of  $\gamma$ HCH and  $\gamma$ HCH-induced oxidative stress. Thirdly, the increase in asparagine, branched-chain amino acid and fatty acid contents explained root morphology adaptation to  $\gamma$ HCH-stress. Finally,  $\gamma$ HCH exposure caused a marked rise in oxidized fatty acids, which might indicate failures in cell integrity and vitality. Therefore, these results indicate that <sup>1</sup>H-HRMAS NMR-based plant root metabolomics has great potential for use in phytotoxicity assessments of contaminated soils.

**Keywords:** Metabolomic, Maize, Roots, Lindane, <sup>1</sup>H-HRMAS NMR

## **Abbreviations**

CPMG Carr–Purcell–Meiboom–Gill

CV-ANOVA Cross-validation ANalysis Of VAriance

$\gamma$ HCH  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane

GABA 4-aminobutyrate

HRMAS High resolution-magic angle spinning

OCPs Organochlorine pesticides

OCs Organochlorines

PCA Principal Component Analysis

OPLS-DA Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis

TSP Trimethylsilyl propionate

## 1 Introduction

Organochlorine pesticides (OCPs) have been extensively used in agriculture across the world for pest control.  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ HCH), better known as lindane, was very commonly used due to its low cost and high effectiveness (Vijgen *et al.* 2011). However, this compound is both stable and highly lipophilic leading to its accumulation and persistence in the environment, despite it having been banned for several decades in many countries (Abhilash and Singh 2009). This widespread contamination has impacted on the functionality of ecosystems with  $\gamma$ HCH bioamplification affecting trophic webs (Chopra *et al.* 2011). Human health may also be impacted as  $\gamma$ HCH is described as an endocrine disrupter and a carcinogen (Chopra *et al.* 2011). Since 2009,  $\gamma$ HCH has been listed under the Stockholm Convention as a persistent organic pollutant (Vijgen *et al.* 2011). Although the use of OCPs is strictly prohibited in Europe, many are still used in Asia and Africa (Mansour 2009; Qiu *et al.* 2009).  $\gamma$ HCH contamination is heterogeneous, with hot spots (former industrial and agricultural sites) where levels are between 900 to 4000 mg/kg (Abhilash and Singh 2009). Numerous studies have been conducted on different plant species to determine the adverse effects of exposure to high concentrations of  $\gamma$ HCH (Bueno *et al.* 2004; Li *et al.* 2011; Faure *et al.* 2012; Blondel *et al.* 2014). However these studies, focused on the elucidation of the toxic mode of action of  $\gamma$ HCH, have not evaluated its sub-lethal effects on primary metabolism. OCP exposure in the environment can be monitored by studying the metabolite fluxes of various organisms as has been demonstrated in various animals (McKelvie *et al.* 2009; Tuffnail *et al.* 2009; Aslund *et al.* 2012; Yuk *et al.* 2012). It is therefore essential to develop reliable and reproducible analytical methods that are capable of assessing plant responses to chemical environmental exposures. Metabolomics provide an exhaustive profiling of all metabolites present in a target organism and therefore to explore its response to environmental stressors (reviewed in Lankadurai *et al.* 2013). Metabolomic approaches



have been successfully used to study a variety of plant-environmental biotic interactions (reviewed in Kushalappa and Gunnaiah 2013) and abiotic environmental stressors such as drought, salt, temperature and nutrients (reviewed in Sardans *et al.* 2011; Rodziewicz *et al.* 2014). However, few studies have investigated the plant metabolome's response to environmental contaminants (Aranibar *et al.* 2001; Aliferis *et al.* 2009; Kluender *et al.* 2009; Thi *et al.* 2009; Trenkamp *et al.* 2009; Dubey *et al.* 2010; Lubbe *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013). Most of these metabolomic studies have used gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid nuclear magnetic resonance (NMR) technology. The present study aimed to investigate OCP effects on plant roots with an overview of adaptive processes. The method used was a non-targeted metabolic profiling method  $^1\text{H}$ -HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) NMR, which analyses metabolites that become partially/truly soluble and simultaneously detects lipids, sugars and amino acids with a resolution comparable to liquid NMR (Thi *et al.* 2009). Moreover,  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectroscopy is a non-destructive technique using small amounts of intact tissue without prior treatments, thus avoiding long sample extraction procedures.

Our objective was to better understand the impacts of  $\gamma\text{HCH}$  concentration exposures on root plants at two doses: a low dose mimicking basic environmental contamination and a higher dose mimicking hot contaminated spots. For this purpose, we used maize (*Zea mays*) which is one of the main crops worldwide and can cope with excessive levels of OCPs (Mo *et al.* 2008; Chouychai and Lee 2012; Mukherjee and Kumar 2012; San Miguel *et al.* 2012; Somtrakoon and Pratumma 2012; Gheju and Stelescu 2013; Shahsavari *et al.* 2013; Blondel *et al.* 2014). In this study, a  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectroscopy method using root tips was developed and validated with respect to repeatability. After peak identification, the method was used to study the metabolic change patterns in maize roots caused by  $\gamma\text{HCH}$  at different levels of exposure. Multivariate analyses were used to evaluate the variation patterns for significantly changed

metabolites relative to interaction with  $\gamma$ HCH exposure. Here, we report the evidence showing the large-scale metabolic changes including carbohydrates, amino acids, tricarboxylic acid cycle intermediates and fatty acids. These findings improve the understanding of metabolome  $\gamma$ HCH-induced stress in root tips.

## 2 Materials and methods

Lindane ( $\gamma$ HCH) was purchased from Sigma-Aldrich (Germany) as pure standards (99% purity).

### 2.1 Plant growth conditions and $\gamma$ HCH exposure tests

Maize seeds (*Zea mays* L. Golden Bantam; Graines Baumaux, Nancy, France) were surface sterilized in ethanol:water (v/v 8:2) for 30s and then in sodium hypochlorite:water (w/v 5:100) for 2 min before washing several times in sterilized distilled water (San Miguel *et al.* 2012). Seeds were then germinated in sterile pots (3 seeds/pot) containing Hoagland nutritive solution with (i) 1% of ethanol (used to dissolve OCPs) for control plants, (ii)  $\gamma$ HCH environmentally relevant concentration (0.7mg/L) and (iii) high  $\gamma$ HCH exposure (at its water limit solubility: 7 mg/L). All plants were grown under controlled conditions (obscurity, 25 $\pm$  2°C). Seedlings were harvested for the different analyses after 7 days of exposure to  $\gamma$ HCH.

### 2.2 Sample Preparation

The root tips (1mm from the apex, 6 independent first roots) of 7-day maize seedlings were collected, washed with deuterium oxide water (D<sub>2</sub>O), pooled in one disposable insert and flash frozen with liquid nitrogen. Ten independent experiments were performed to constitute each of the three groups: control, 0.7, and 7 mg/L  $\gamma$ HCH exposures. The samples were then stored at -80°C. Just before the <sup>1</sup>H-HRMAS NMR analysis, 10 $\mu$ L of D<sub>2</sub>O phosphate buffer

(100mM, pH 7) containing trimethylsilylpropionate (TSP, 1 mM) as the internal standard was added to the sample in the disposable insert, which was sealed and inserted into a 80  $\mu$ L zirconium rotor. After the  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR experiments, the disposable inserts were collected, flash-frozen in liquid nitrogen, lyophilized and the dry weight of each sample was then measured.

For two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HRMAS spectra, plant root extractions were performed as described in Piccioni *et al.* 2009. Thirty maize roots (1 cm from the apex,  $\approx$  500 mg fresh weight) were flash-frozen in liquid nitrogen and then ground into a fine powder. The samples were extracted with 4 mL of cool  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$  (v/v 2:2) followed by 1mL of cool water. The extract was centrifuged at 10,000  $\times$  g for 20 min at 4°C. The supernatant was collected and dried under  $\text{N}_2$  flow and stored at -80°C. Just before the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HRMAS analysis, 50  $\mu$ L of  $\text{D}_2\text{O}$  phosphate buffer (100 mM, pH 7) containing TSP (1 mM) was added to the sample and inserted into a 80  $\mu$ L zirconium rotor (Piccioni *et al.* 2009).

### 2.3 $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectroscopy

$^1\text{H}$ -NMR spectra were acquired using a Bruker Avance III 600 spectrometer (BrukerBiospin, Wissembourg, France) at the IRBA Grenoble laboratory using a  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  4 mm HRMAS probe-head (proton frequency 600.13 MHz). The samples were spun at 4,000 Hz and the temperature was maintained at 4°C for all experiments. 1D-spectra were acquired with a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence synchronized with the spinning rate (inter-pulse delay 125  $\mu$ s, total spin echo time 30 ms). The 90° pulse was calibrated on each sample. The acquisition of one  $^1\text{H}$ -NMR spectrum consisted of 256 scans lasting 16 min. The residual water signal was pre-saturated during the 2 s relaxation delay.

The assignment of resonances was based on the literature (MeryB database, HMDB database, Piccioni *et al.* 2009) and on standard 2D experiments on liquid extracts (homonuclear  $^1\text{H}$ -

<sup>1</sup>HTOSCY (Total Correlation Spectroscopy) and heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>CHSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence sequences). The identification of some metabolites (alanine, asparagine, glutamate, glutamine, histidine, malate, phenylalanine, proline, pyruvate, tyrosine, succinate) were confirmed by adding a true solution of chemical reference substances to the root samples after the first acquisition using <sup>1</sup>H-HRMAS NMR as described above.

## 2.4 Spectra pre-processing

All pre-processing steps were performed using the TOPSPIN 3.1 Bruker software (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany). The spectra were aligned to the TSP signal at zero ppm and phase corrected. A five order polynome was systematically applied for the baseline correction.

All spectra from 6.54 to 0.31 ppm were divided into intervals or buckets equal to 10<sup>-3</sup> ppm using the AMIX software program (Bruker). Each bucket was normalized to the total spectrum amplitude. Regions corresponding to residual water signal or with reproducibility problems, even in the control group, were excluded from the analysis (Table S1, Supplementary data, Annexe 2).

## 2.5 Statistical Analysis

The buckets were then imported into the SIMCA V13 software application (UmetricsAB, Umea, Sweden) for multivariate statistical analysis. The buckets were mean centered, scaled to unit variance (i.e., weighted by 1/standard deviation for a given variable) and submitted for a principal component analysis (PCA) to ensure the homogeneity of data and to exclude outliers where required. To this end the data were visualized as score plots, where each point represents a NMR spectrum and thus a sample. Supervised analyses including orthogonal partial least square discriminant analyses (OPLS-DA) were performed, using the group

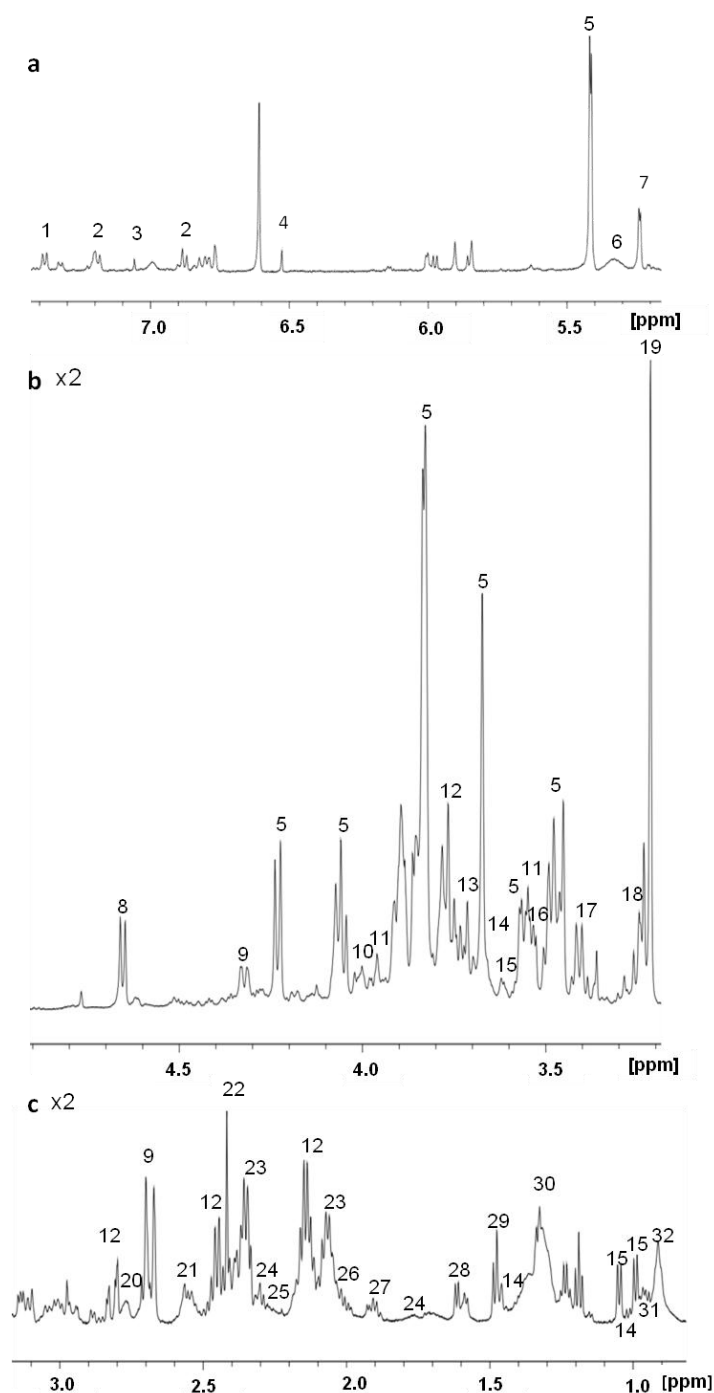
(control or exposed) as the Y matrix. Compared to PLS-DA, the orthogonal filtering separates systemic intra-class variations in X (variable matrix) that are unrelated to Y (orthogonal) from linear variations in X that are related to Y (inter-class variations). The number of components was determined using the cross validation procedure that produces R<sup>2</sup><sub>Y</sub> and Q<sup>2</sup> factors (> 0.5). Moreover, the reliability of our OPLS-DA model was assessed using a CV-ANOVA test. The results were visualized by plotting the scores for individuals relative to the first two components of the model. The S-lines were examined in order to highlight the metabolites that are the most distinct between the control and the exposed groups. This plotting shows in a single graph, mimicking a NMR spectrum, the covariance (peak intensity) and correlation (peak color) between the exposed and control groups. Moreover, the signs of S-line peaks give an indication of the direction of change of metabolites in the exposed group which increased (positive peaks) or decreased (negative peaks) relative to the control.

All the metabolites identified in the S-line were integrated (sum of the buckets for one isolated peak for each metabolite, Table S2 Supplementary data, Annexe 2) for univariate statistics. A t-test was then performed using the Xlstat software (Yuk *et al.* 2012).

### **3 Results**

In the present study, maize roots were used due to their direct contact to contaminants in soils and their crucial metabolome for the physiological state of the whole plant. Roots have a complex internal structure and some roots, or parts of roots, become specialized for physiological purposes. Therefore, in order to maximize the homogenization of the metabolome data, the root apex (1 mm from the root tips) of the radicle composed of undifferentiated cells in division was collected. Despite the use of such a small sample mass (mean dry weight of 6 apices:  $0.76 \pm 0.03$  mg), the mean S/N ratio was 1,000 in the [4.4-3.2] ppm spectral region and 250 in the [3.0-0.8] ppm region. A good level of repeatability was obtained with these parameters. This <sup>1</sup>H-HRMAS NMR method supplied very rich spectra

(Fig. 1) from which numerous metabolites were assigned (Table S3 Supplementary data, Annexe 2).



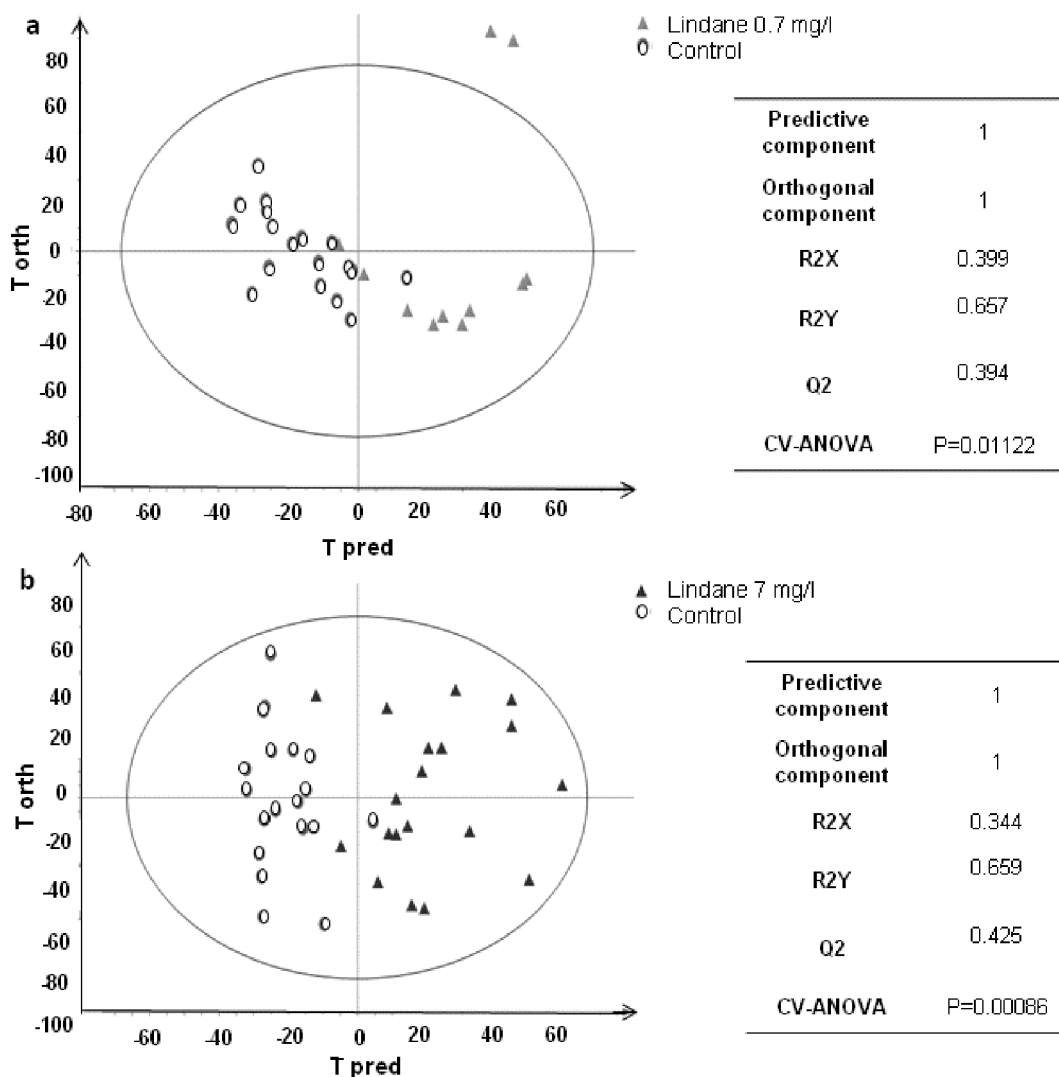
**Fig. 1** Representative one-dimensional  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectrum of the *Zea mays* root metabolome in the range of (a)  $\delta 7.4$ - $\delta 5.2$ , (b)  $\delta 4.9$ - $\delta 3.2$  and (c)  $\delta 3.2$ - $\delta 0.8$ .

Number key for metabolites: 1 phenylalanine, 2 tyrosine, 3 histidine, 4 fumarate, 5 sucrose, 6 Fatty Acid (FA) -CH=CH-, 7  $\alpha$ -glucose, 8  $\beta$ -glucose, 9 malate, 10 asparagine, 11 cysteine, 12 glutamine, 13 leucine, 14 isoleucine, 15 valine, 16 glycine, 17 proline, 18 arginine, 19 choline, 20 FA =CH-CH<sub>2</sub>-CH=, 21 citrate, 22 succinate, 23 glutamate, 24 GABA, 25 FA -CH<sub>2</sub>-COOR, 26 FA -CH<sub>2</sub>-CH=CH-, 27 acetate, 28 FA -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOR, 29 alanine, 30 FA (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, 31 leucine/isoleucine, 32 FA -CH<sub>3</sub>

Thirty metabolites were identified based on database matches, 11 of which were also validated using chemical standards. The identified metabolites were then sorted into the following chemical classes: carbohydrates, amino acids, tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates, fatty acids and others.

### 3.2 Metabolic impact of exposure to $\gamma$ HCH

Unsupervised principal components analyses (PCA) were first conducted using the  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectra observations (18 observations for control samples and 28 observations for exposed samples). The PCA score plots did not show any clear clustering. Therefore, supervised orthogonal partial least square discriminant analyses (OPLS-DA) were performed to determine the strength and significance of the relationship between exposed and control maize root metabolomes. Score plots showed significant separation between the controls and the samples exposed to  $\gamma$ HCH at 0.7 mg/L. The OPLS-DA model with  $R^2X$  of 0.399 was well fitted ( $R^2Y = 0.66$ ), but showed insufficient predictability ( $Q^2Y = 0.39$ ) ( $R2X_{\text{pred}}=17\%$  and  $R2X_{\text{orth}}=23\%$ ). However, the CV-ANOVA test was significant ( $p = 0.011$ ) (Fig. 2a). For 7 mg/L  $\gamma$ HCH exposure, the OPLS-DA model obtained was slightly more robust ( $R^2Y = 0.659$ ,  $Q^2Y = 0.43$ ,  $R2X_{\text{pred}}=17\%$  and  $R2X_{\text{orth}}=17.5\%$ ) with a highly significant CV-ANOVA test ( $p = 0.001$ ) (Fig. 2b).



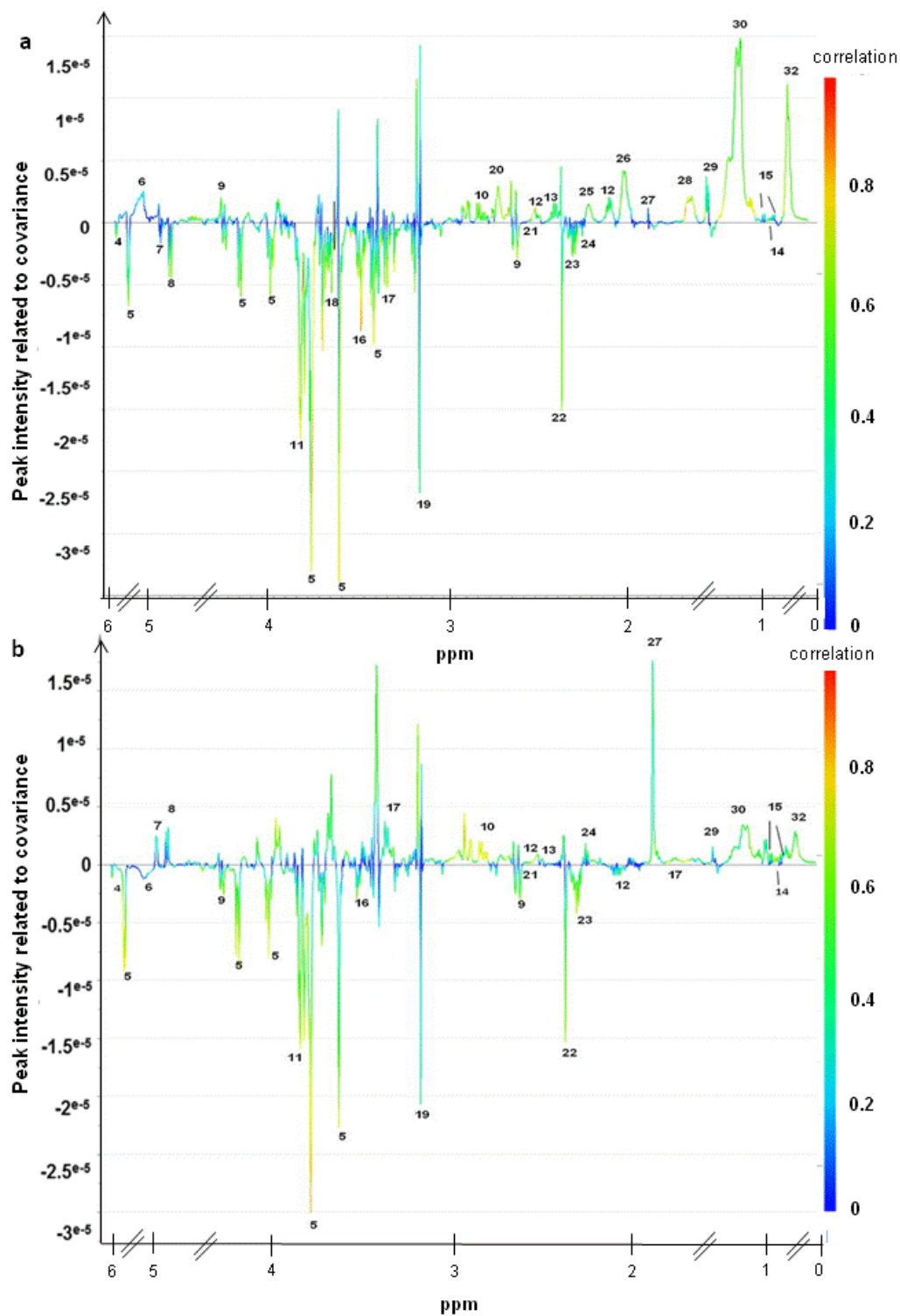
**Fig. 2** Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA) scores on <sup>1</sup>H-HRMAS NMR spectra of maize root tip controls, exposed to (a) 0.7 mg/L  $\gamma$ HCH and (b) 7 mg/L  $\gamma$ HCH.

Then, in order to identify which metabolites are responsible for the separation between the control and  $\gamma$ HCH exposed maize roots, S-lines were plotted for each  $\gamma$ HCH dose (Fig. 3). The peaks in the S-line give a direct indication of the direction of change in the corresponding metabolite. Positive peaks indicate an increased quantity of compound in the exposed roots compared to the control and conversely, negative peaks show a decreased quantity of the compound while the peak colors indicate variable contributions (red for the most significant



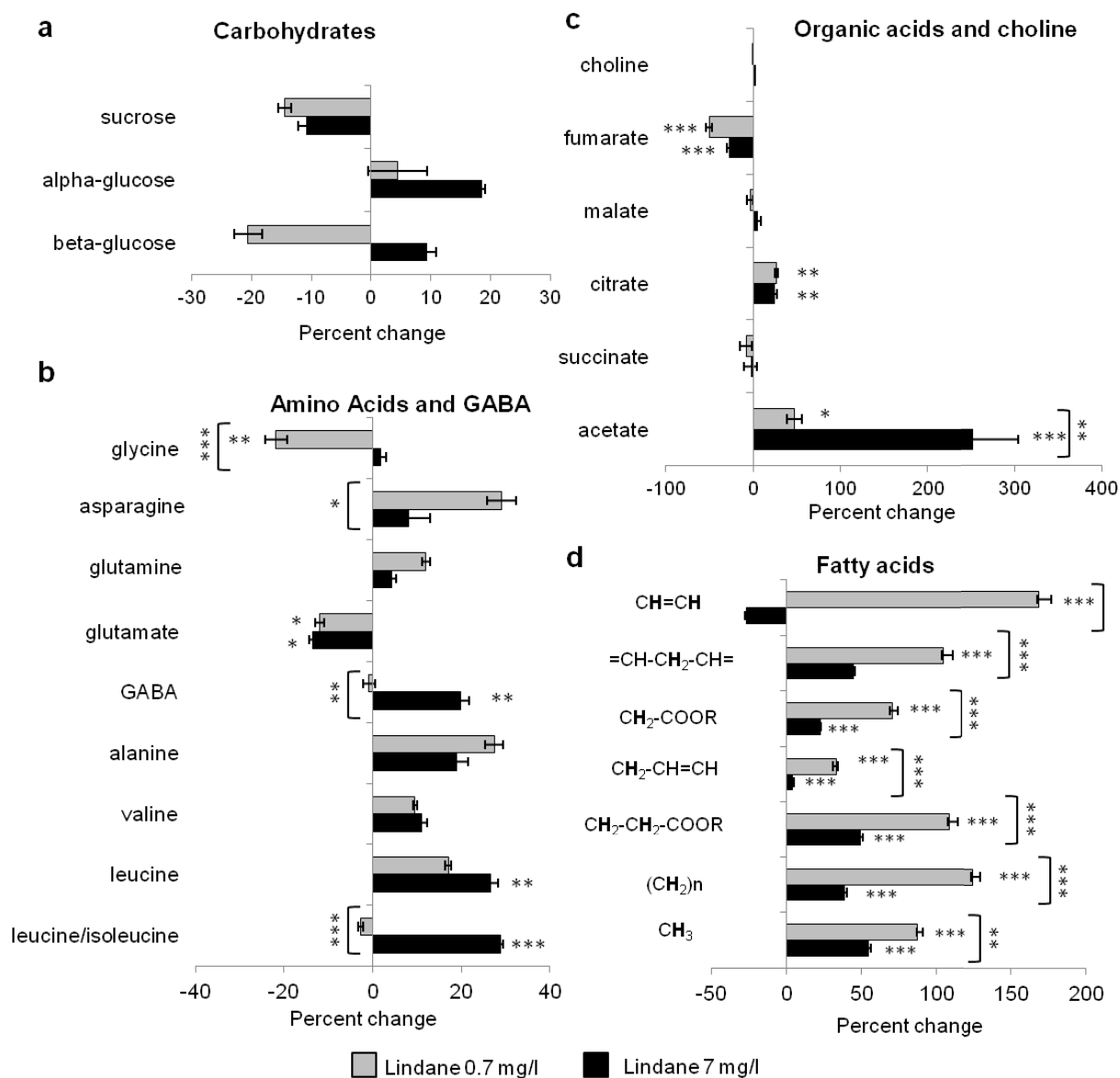
contributions with a correlation  $> 0.9$  and dark blue for less significant contributions with a correlation  $< 0.1$ ).

Based on the S-line, the 3.00-4.00 ppm region of the  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectra appeared as having been clearly modified in response to  $\gamma\text{HCH}$  exposure, whatever the level of exposure (Fig. 3a, b). However, we could not unambiguously assign all the peaks due to resonance overlapping in this region. The metabolites identified on the S-line were: carbohydrates (sucrose, n°5;  $\alpha$ -glucose, n°7;  $\beta$ -glucose, n°8), amino acids (asparagine, n°10; cysteine, n°11; glutamine, n°12; leucine, n°13; isoleucine, n°14; valine, n°15; glycine, n°16; proline, n°17; arginine, n°18; glutamate, n°23; alanine, n°29), organic acids of TCA cycle (fumarate, n°4; malate, n°9; citrate, n°21; succinate, n°22; acetate, n°27) and others (choline, n°19; 4-aminobutyrate (GABA), n°24). The 0.50-3.00 ppm region of the  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectra showed significant changes in the non-polar metabolites such as saturated long-chain fatty acids ( $\text{CH}_3$ , n°30;  $(\text{CH}_2)_n$ , n°32), unsaturated long-chain fatty acids ( $\text{CH}=\text{CH}$ , n°6;  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ , n°20;  $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ , n°26) and oxidized fatty acids ( $\text{CH}_2-\text{COOR}$ , n°25;  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$ , n°28).



**Fig.3 OPLS-DA S-line for (a) 0.7 mg/L  $\gamma$ HCH and (b) 7 mg/L  $\gamma$ HCH showing the metabolites that were major contributors to the changes observed in exposed maize root tips compared to controls by mimicking NMR spectrum. The peak intensity is determined by the covariance and the peak color by the correlation. The positive peaks are the ones which increased and the negative ones are those which decreased on exposed roots relative to the controls. For number coding see legend fig 1.**

In addition, the percent changes in discernible metabolite bucket intensities were calculated to quantify the fluctuations in the maize root metabolites exposed to  $\gamma$ HCH compared to the controls (Fig. 4).



**Fig. 4 Percentage (%) changes in the sum of bucket of metabolites identified on the S-line of  $\gamma$ HCH-exposed root tips compared to the controls. (a) carbohydrates, (b) amino acids and GABA, (c) organic acids and choline, (d) fatty acids. Bars represent mean  $\pm$  SE values for 10 replicates. The statistical analysis was performed using a t-test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values or between the two  $\gamma$ HCH-dose exposure values: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ .**

A t-test was performed for each percent change in metabolites, in order to identify any metabolites which significantly increased or decreased relative to the control (confirming the S-line results). The lower and higher doses of  $\gamma$ HCH were also compared. The carbohydrates showed different fluctuations since  $\alpha$ -glucose and  $\beta$ -glucose vary (although not significantly) while sucrose seemed to decrease, but not significantly under both the 0.7 and 7 mg/L  $\gamma$ HCH exposures (-14% and -11%, respectively (Fig. 4a) and a correlation of 0.7 in the S-line in Fig. 3). Unfortunately, in the group of amino acids, the peaks of cysteine, proline and arginine were overlaid with unknown metabolites and the S-line could not be confirmed using t-test analyses. However, the levels of asparagine, glutamine, alanine and valine showed a non-significant increase when the roots were exposed to both 0.7 and 7 mg/L  $\gamma$ HCH (Fig. 4b).

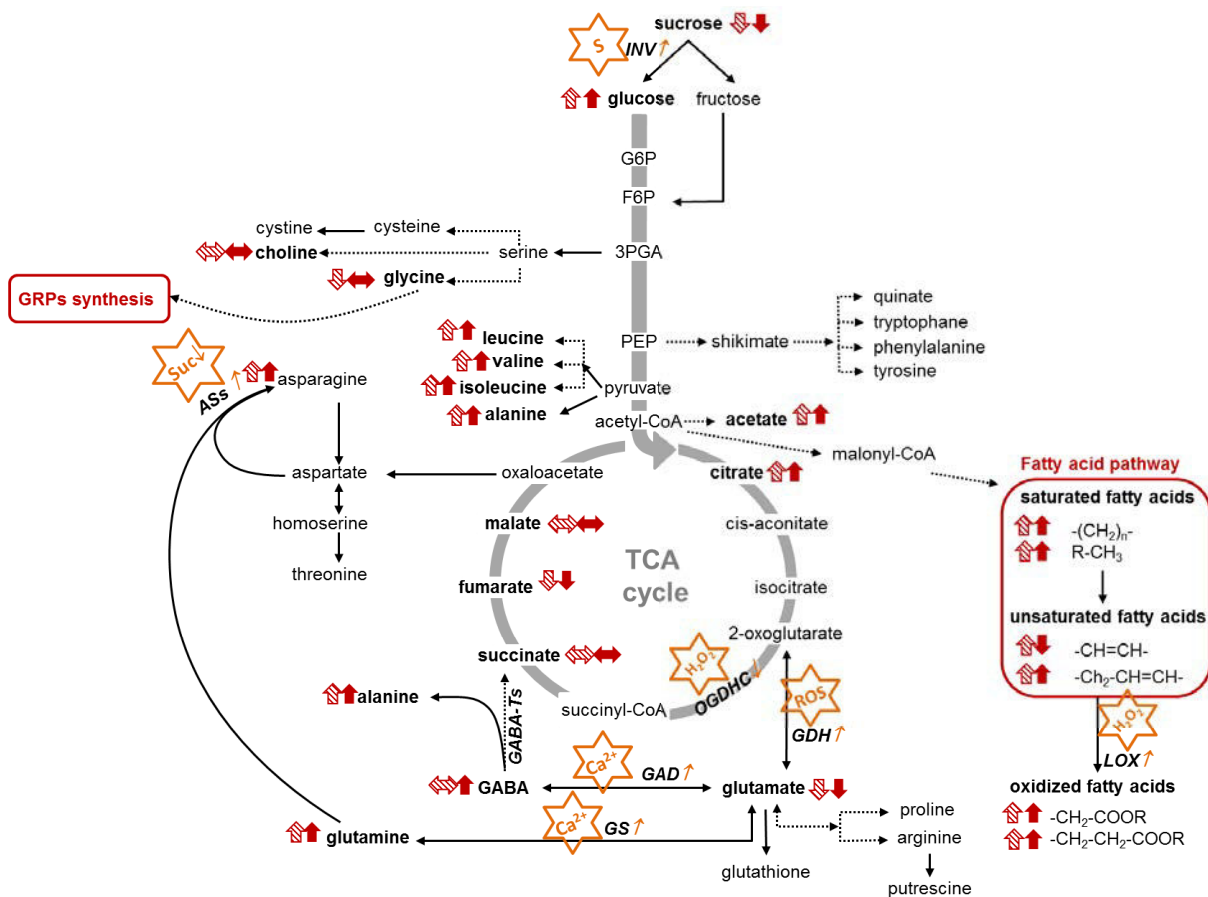
Leucine showed a similar pattern with a significantly higher level (17% and 27%, respectively at 0.7 and 7 mg/L and a correlation of 0.7 in the S-line in Fig. 3). Interestingly, glutamate significantly decreased in exposed roots at both the 0.7 and 7 mg/L  $\gamma$ HCH exposures (11% and 21%, respectively), which was corroborated by its correlation of 0.5 in the S-line (Fig. 3 and 4b). The glycine, leucine/isoleucine and GABA levels were significantly concentration-dependent (Fig. 4b), with a decrease at low  $\gamma$ HCH exposure (respectively -22%, correlation >0.8; -3%, correlation 0.2 and -1%, correlation 0.6, Fig. 3) and an increase at high  $\gamma$ HCH exposure (respectively 2%, correlation 0.5; 29%, correlation 0.5 and 20% correlation 0.5 Fig. 3). The TCA intermediates such as succinate and malate showed no significant changes compared to the control whatever the level of  $\gamma$ HCH exposure (Fig. 4c). In contrast, fumarate significantly decreased (-51% and -28% for both 0.7 and 7 mg/L  $\gamma$ HCH respectively, with a correlation of 0.5 in the S-line in Fig. 3) while the level of citrate significantly increased (26% and 24% for both 0.7 and 7 mg/L  $\gamma$ HCH respectively, corroborated by the correlation of 0.8 in the S-line in Fig. 3). The level of  $\gamma$ HCH exposure significantly affected the acetate level with an increase of 47% and 250%, at 0.7 and 7 mg/L

$\gamma$ HCH exposure respectively (corroborated by the correlation of 0.5 in the S-line in Fig. 3). The fatty acid levels were particularly markedly increased by  $\gamma$ HCH exposures compared to the controls (correlation of 0.6 on the S-line for all fatty acids) and showed significant concentration-dependent fluctuations (Fig. 4d). Roots exposed to the lower dose of  $\gamma$ HCH contained higher levels of saturated fatty acids (87% of  $\text{CH}_3$ , 124% of  $(\text{CH}_2)_n$ ), unsaturated fatty acids (168% of  $\text{CH}=\text{CH}$ , 104% of  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ , 33% of  $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ ) and oxidized fatty acids (70% of  $\text{CH}_2-\text{COOR}$ , 108% of  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$ ) compared to control fatty acid contents. For all fatty acid metabolites, a significant, marked decrease was measured in the roots exposed to the high level of  $\gamma$ HCH compared to the low dose (Fig. 4d). Nevertheless, the fatty acid levels in roots exposed to a high dose of  $\gamma$ HCH were still higher than controls except for  $\text{CH}=\text{CH}$  saturated fatty acids showing a significant decrease (-27%, correlation of 0.2 on the S-line).

#### **4 Discussion**

In this study, we established a simple, rapid and repeatable method for root tip metabolome description using  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR without the extraction step. The maize root tip metabolome was profiled in detail, including carbohydrates, amino acids, tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates and fatty acids. Improving the annotation of the metabolites ensured a comprehensive determination of metabolic changes induced in roots under abiotic stress from a persistent organochlorine pollutant, lindane ( $\gamma$ HCH). We found twenty-four metabolites for which quantitative variations were measured in the presence of  $\gamma$ HCH. In all of the metabolic responses, we observed increases in the amino acids asparagine, glutamine, alanine, valine, leucine, isoleucine, in the organic acids citrate, acetate, GABA (4-aminobutyrate), and in the saturated/unsaturated fatty acids and their

oxidized forms, as well as decreases in sucrose (not significant), fumarate and in the amino acids glycine and glutamate (Fig. 5).



**Fig. 5 Hypothetical diagram of biosynthetic pathways involving some of the metabolites identified by the  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR of maize root tips (names in bold) exposed to  $\gamma\text{HCH}$ .** Metabolite contents increased (upward arrows), decreased (downward arrows) or remained unchanged (horizontal arrows) illustrating the response of roots exposed to 0.7 mg/L  $\gamma\text{HCH}$  (dashed arrows) and to 7 mg/L  $\gamma\text{HCH}$  (solid arrows). Metabolic pathways are represented by direct ( $\longrightarrow$ ) or indirect ( $\cdots\longrightarrow$ ) enzymatic steps. Hypothetical involvement of enzymes (names in *italic*,  $\uparrow$  up-regulation,  $\downarrow$  down-regulation) and stress signaling effects (star-shaped) illustrate the literature data (see in the discussion text). *ASs*, Asparagine synthetase;  $\text{Ca}^{2+}$ , cytosolic calcium; *GABA*, 4-aminobutyrate; *GABA-Ts*, GABA-transaminases; *GAD*, glutamate decarboxylase; *GDH*, glutamate dehydrogenase; *GRPs*, glycine-rich proteins; *GS*, glutamine synthetase;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydrogen peroxide; *INV*, invertase; *LOX*, lipoxygenase; *OGDHC*, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; *ROS*, reactive oxygen species; *S*, stress; *Suc*, sucrose; *TCA cycle*, tricarboxylic acid cycle.

Therefore, like other abiotic stresses (Hey *et al.* 2010; Sardans *et al.* 2011; Rodziewicz *et al.* 2014) and herbicides (Trenkamp *et al.* 2009)  $\gamma\text{HCH}$  was shown to have a significant effect on the energy status and enrichment of a number of amino acid metabolic networks. Here,  $\gamma\text{HCH}$  seemed to induce the catabolism of sugars (mainly sucrose) and some amino acids to generate



sufficient energy to ensure appropriate development and cell defense mechanisms against this specific abiotic stress.

It has been demonstrated that carbohydrate metabolism and sugar signaling pathways are modulated by a range of environmental stresses such as drought, cold, salinity, metals and herbicides (Devi *et al.* 2007; Sardans *et al.* 2011; Rodziewicz *et al.* 2014). Carbohydrates are mobilized in the form of soluble sugars from storage tissues and translocated to various sink organs such as the radicles. In root tips, sucrose can be hydrolyzed into glucose and fructose by invertase catalysis (Fig. 5). Sucrose cleavage can play a key role in seedling growth notably through the division, elongation and expansion of meristematic cells. Sucrose and glucose can act as substrates for cellular respiration and as osmolytes in the maintenance of cellular osmotic homeostasis; while fructose seems to relate to secondary metabolism (Koch 2004; Gupta and Kaur 2005; Devi *et al.* 2013). In this study, sucrose levels became depleted suggesting an increase in the energy requirements of the  $\gamma$ HCH exposed roots. Glucose accumulation increased non-significantly for  $\alpha$ -glucose and dose-dependently for  $\beta$ -glucose (decrease at low dose, increase at high dose, neither were significant) (Fig. 5). Previous studies have demonstrated that oxidative stress, like  $H_2O_2$ , can modify the activity of regulatory enzymes such as invertase (Koch 2004; Xiang *et al.* 2011). Moreover, the high levels of invertase activity in tissues with oxidative stress may be indicative of changes in the transport of the phytohormone indol-acetic acid, responsible for cell hypertrophy (Koch 2004). It was previously demonstrated that the induction of  $H_2O_2$ , cytosolic  $Ca^{2+}$  and cell hypertrophy in root tips exposed to  $\gamma$ HCH and OCs (Faure *et al.* 2012; San Miguel *et al.* 2012; Blondel *et al.* 2014). Therefore, it is probable that the alterations in carbohydrate metabolism caused by  $\gamma$ HCH were due to an indirect induction of invertase activities controlled by reactive oxygen species (ROS).

The activation of the glycolysis converts the glucose in pyruvate thus providing intermediates which can be involved in the biosynthesis of amino acids. Overall, these changes in amino acid levels participated in complex metabolic/signaling processes to adapt cell responses to  $\gamma$ HCH exposure. First of all, the 3-phospho-glycerate (3PGA) is a precursor for glycine synthesis (Schauer and Fernie 2006). In this study,  $\gamma$ HCH significantly decreased glycine content in roots. This effect was dose-dependent with a marked decrease with low- $\gamma$ HCH exposure, and glycine content that was similar to the control with high exposure. In the literature, glycine is described as the main constituent of plant glycine-rich proteins (GRPs) which are involved in the development of vascular and epidermal tissue (Lin *et al.* 2005). They have been described in maize roots and root caps (Matsuyama *et al.* 1999; Lin *et al.* 2005). It has been suggested that some of these GRPs may play a role in stress responses, such as environmental stimuli and heavy metals, by protecting plasma membranes during stresses that involve increased osmotic pressure (Long *et al.* 2013; Manaa *et al.* 2013). Therefore, glycine depletion could be a marker of GRP synthesis occurring to protect cell roots against direct or indirect  $\gamma$ HCH. This marker might occur in the early stages of the defense mechanisms (low exposure) and then disappear when metabolism begins to fail (high exposure). Secondly, the branched-chain amino acids biosynthesized from pyruvate onwards, primarily in young tissues (Pavlíková *et al.* 2014), were impacted by  $\gamma$ HCH. Leucine and isoleucine (valine not significantly) were over-accumulated especially with high exposure. This result demonstrated that  $\gamma$ HCH did not inhibit the enzymes involved in branched-chain amino acid biosynthesis in contrast to acetolactate synthase-inhibiting herbicides (Zabalza *et al.* 2007). The over-accumulation of valine, leucine and isoleucine could balance the flux between these different amino acids; e.g. feedback control of threonine deaminase (Jander and Joshi 2010). Incidentally, Alves *et al.* (2011) suggested that branched-chain amino acid accumulation may relate to alterations in the cell cytoskeleton. Therefore, their accumulation

may correlate to the changes in root morphology previously observed under  $\gamma$ HCH exposure (Blondel *et al.* 2014).

Concerning the changes obtained under  $\gamma$ HCH stress with TCA cycle intermediates, GABA and associated amino acids, it seemed that part of the TCA cycle was inhibited and bypassed by the GABA shunt pathway (composed of the cytosolic enzyme glutamate decarboxylase (GAD) and the mitochondrial enzymes GABA transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase) (Fig. 5) (Bouché and Fromm, 2004). It has been demonstrated that several enzymes in the TCA cycle (e.g. 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDHC) and succinyl-CoA ligase) are sensitive to oxidative stress either directly ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) or indirectly through the lipid peroxidation product 4-hydroxynonen-2-al (Sweetlove *et al.* 2002; Bouché and Fromm 2004). In this study, this form of OGDHC inhibition could be considered as  $\gamma$ HCH induced  $\text{H}_2\text{O}_2$  content in the cell roots (Blondel *et al.* 2014). Nevertheless, we were unable to determine whether 2-oxoglutarate was not increased as described by Sweetlove *et al.* (2002). This suggests that the GABA shunt pathway might be induced, taking on the 2-oxoglutarate to synthesize glutamate, *via* glutamate dehydrogenase (GDH). This hypothesis is supported by previous studies demonstrating that GDH is induced by ROS (Skopelitis *et al.* 2006; Teixeira and Fidalgo 2009). In this study, glutamate was severely depleted by  $\gamma$ HCH exposure while the GABA content increased. It has already been demonstrated that glutamate levels are drastically reduced when GAD is over-expressed (by increased  $\text{Ca}^{2+}$  or low cytosolic pH), thus producing GABA (Bouché and Fromm 2004; Bailey-Serres *et al.* 2012). GABA is known to accumulate in plants in response to abiotic stresses as both a metabolite and signaling molecule (Bouché and Fromm 2004; Bailey-Serres *et al.* 2012). It is involved in the regulation of carbon flux in the TCA cycle, nitrogen metabolism, oxidative stress protection, osmoregulation and cytosolic pH (Bailey-Serres *et al.* 2012; Lehmann *et al.* 2012;

Pavlíková *et al.* 2014). GABA accumulation therefore increases in response to  $\gamma$ HCH exposure, certainly through indirect effects (e.g. cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation; Blondel *et al.* 2014), and plays a key role in scavenging ROS and regulating cytosolic pH. Furthermore, the fumarate depletion in response to  $\gamma$ HCH stress might be activated by acidification which releases  $\text{H}_2\text{O}$ , thus compensating the increase in protons (Hurth *et al.* 2005). Moreover, GABA catabolism can produce alanine through its conversion to succinic semialdehyde (Bouché and Fromm 2004; Bailey-Serres *et al.* 2012). Alanine levels also increased in response to  $\gamma$ HCH stress which may correspond to the regulation of cytosolic pH and/or the constitution of a carbon/nitrogen reserve used during the stress recovery period (Igamberdiev and Hill 2009). Moreover, alanine is described as an apoptosis-preventing metabolite which is consistent with previous results which found root cell apoptosis to increase with  $\gamma$ HCH dose-exposures (Franek and Sramkova 1996; Blondel *et al.* 2014). Overall, alanine seemed to be the metabolite which accumulated in the earliest stages and GABA content increased at later stages of plant defenses when cell vitality began to fail.

Surprisingly, we were unable to demonstrate the presence of glutathione (GSH) on our spectra although this metabolite is known to be involved in ROS concentration control and resistance to xenobiotics. It could be argued that the glutamate and glycine depletion was not due to the involvement in glutathione biosynthesis because this is consistent with previous studies showing very poor induction of glutathione S-transferases in plant tissues with  $\gamma$ HCH (San Miguel *et al.* 2013). The glutamate depletion might be due to a second catabolic pathway producing glutamine which is catalyzed by glutamine synthetase (GS) (He *et al.* 2012). Subsequently, asparagine synthetase (ASs) generates asparagine from glutamine and aspartate (Lea *et al.* 2007). It was interesting to note that in response to  $\gamma$ HCH stress, glutamine and asparagine content increased (not significantly with t-test). GS activities have been reported to be up-regulated by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and abiotic stress respectively (Lea *et al.* 2007, He *et al.*

2012). It was therefore hypothesized that the  $\gamma$ HCH indirectly induced the accumulation of glutamine via an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  or oxidative signaling, with a corresponding depletion of glutamate. However, ASs was down-regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  (Lea *et al.* 2007) and up-regulated by the decrease in sucrose content (Chevalier *et al.* 1996). Therefore, there may be a duality between the effectors ( $\text{Ca}^{2+}$  and sucrose decrease) in controlling ASs activities which, under  $\gamma$ HCH stress, lead to mild asparagine accumulation. It has been reported that asparagine accumulation might be a strategy to stock up on nitrogen when protein synthesis in plants is impaired due to environmental stress (Kaya *et al.* 2013). This potential asparagine increase would have broader implications for nitrogen metabolism in plants because it is the major transport compound in the xylem, from the root to the leaves (Lea *et al.* 2007).

$\gamma$ HCH specifically increased levels of citrate (26%), acetate (47 to 250%) and fatty acids while levels of choline (phospholipids abundant in the cell membrane) were similar to the control group. These data supported earlier findings showing that fatty acid synthesis increases, with fundamental changes in the membrane lipid composition in response to environmental stress (Debiane *et al.* 2012; Li *et al.* 2014). It has been shown that acetate and citrate are the preferred substrates for fatty acid synthesis, and there is evidence that a multienzyme system including acetyl-CoA synthetase (ACS), acetyl-CoA carboxylase and ATP-citrate lyase (ACL) exists to provide acetyl-CoA (Marillia *et al.* 2003; Fatland *et al.* 2005). Indeed, ACS and ACL expressions respond to environmental stresses thereby contributing, in part, to the acetyl-CoA pool required for fatty acid biosynthesis (Fatland *et al.* 2005; Molina *et al.* 2011). Therefore, citrate and acetate could constitute cell reserves for urgent acetyl-CoA biosynthesis under stresses, such as  $\gamma$ HCH exposure.  $\gamma$ HCH greatly increased the levels of both saturated and unsaturated fatty acids. A significant dose-dependent response was observed with decreased content at high- $\gamma$ HCH exposure but always

higher than the controls. The hypotheses regarding the increases in fatty acids were (i) the regulation of the lipid composition and the adjustment of the unsaturation level of membrane fatty acids (Debiane *et al.* 2012), and (ii) the synthesis of very-long-chain fatty acids to deposit lignin and suberin on the root surface (Li *et al.* 2014). The depositing of lignin in the epidermal cell walls of maize roots was observed under  $\gamma$ HCH stress (results not shown) and this plant root response was essential to deal with the pollutant and render the plant tolerant. This induction of fatty acid pathway could explain why choline content was not modified under  $\gamma$ HCH stress. However, the oxidized fatty acid content greatly increased in response to  $\gamma$ HCH and might be a prolonged consequence of  $\gamma$ HCH-induced oxidative stress (Blondel *et al.* 2014). Furthermore fumarate was found to be severely depleted by  $\gamma$ HCH exposure which might limit metabolism and enhance the catabolism of substrates from lipid degradation (Zell *et al.* 2010). Moreover, lipoxygenases (LOX) catalyse the formation of hydroperoxy-derivatives and have been described as being H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible (Alemayehu *et al.* 2013; Li *et al.* 2014). The pattern of oxidized fatty acid levels was similar to the pattern for fatty acids, with a significant decrease at the highest level of  $\gamma$ HCH exposure. These data suggest a failure in cell membranes integrity as previously observed at the highest level of  $\gamma$ HCH exposure (Blondel *et al.* 2014).

## **5 Conclusion**

Our study demonstrated that <sup>1</sup>H-HRMAS NMR-based metabolomics is an effective method for profiling polar and non-polar endogenous metabolite changes in maize roots exposed to  $\gamma$ HCH. The overall data indicate that  $\gamma$ HCH effect on primary metabolism has broader physiological consequences on root development. First of all, energy metabolism was impacted with a decrease in sucrose, used to generate sufficient energy to ensure cell defense mechanisms against this abiotic stress (GABA shunt pathway and fatty acid biosynthesis).



Metabolites such as fumarate, citrate, acetate, GABA, asparagine, leucine and isoleucine were also identified in this study as potential indicators of  $\gamma$ HCH and  $\gamma$ HCH-induced oxidative stress. These disturbances in amino acid composition reflect the maintenance of C:N balance under  $\gamma$ HCH stress. Other metabolite changes (increase in asparagine, branched-chain amino acids and fatty acids contents) explained the adaptation of root morphology to  $\gamma$ HCH-stress. Some hypotheses from this study into  $\gamma$ HCH metabolomic changes and its impact on root cell metabolism need to be further investigated, such as the GRPs biosynthesis, and lignin and/or suberin deposits. Therefore, these results indicate that  $^1$ H-HRMAS NMR-based plant root metabolomics has significant potential for use as a tool to assess the phytotoxicity of contaminated soils.

### **Acknowledgments**

This project was funded through a grant from the Région Rhône-Alpes. The authors wish to thank Kim Barrett (Version Originale) for proofreading the article.

### **References**

- Abhilash, P.C., & Singh, N. (2009). Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(6), 727-740.
- Alemayehu, A., Bocova, B., Zelinova, V., Mistrik, I., & Tamas, L. (2013). Enhanced lipoxygenase activity is involved in barley root tip swelling induced by cadmium, auxin or hydrogen peroxide. *Environmental and Experimental Botany*, 93, 55-62.
- Aliferis, K.A., Materzok, S., Paziotou, G.N., & Chrysayi-Tokousbalides, M. (2009). *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing H-1 NMR fingerprinting. *Chemosphere*, 76(7), 967-973.
- Alves, M., Chicau, P., Matias, H., Passarinho, J., Pinheiro, C., & Ricardo, C.P. (2011). Metabolic analysis revealed altered amino acid profiles in *Lupinus albus* organs as a result of boron deficiency. *Physiologia Plantarum*, 142(3), 224-232.
- Aranibar, N., Singh, B.K., Stockton, G.W., & Ott, K.H. (2001). Automated mode-of-action detection by metabolic profiling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(1), 150-155.
- Aslund, M.W., Simpson, M.J., Simpson, A.J., Zeeb, B.A., & Rutter, A. (2012). Earthworm metabolomic responses after exposure to aged PCB contaminated soils. *Ecotoxicology*, 21(7), 1947-1956.
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., Lee, S.C., Licausi, F., et al. (2012). Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science*, 17(3), 129-138.

- Blondel, C., Melesan, M., San Miguel, A., Veyrenc, S., Meresse, P., Pezet, M., et al. (2014). Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots. *Journal of Hazardous Materials*, 276(0), 312-322.
- Bouché, N., & Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9(3), 110-115.
- Bueno, M., Fillat, M.F., Strasser, R.J., Maldonado-Rodriguez, R., Marina, N., Smienk, H., et al. (2004). Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena* - Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP(+) reductase. *Environmental Science and Pollution Research*, 11(2), 98-106.
- Chevalier, C., Bourgeois, E., Just, D., & Raymond, P. (1996). Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L) root tips. *Plant Journal*, 9(1), 1-11.
- Chopra, A.K., Sharma, M.K., & Chamoli, S. (2011). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system-an overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, 173(1-4), 905-916.
- Chouychai, W., & Lee, H. (2012). Phytotoxicity Assay of Crop Plants to Lindane and Alpha-endosulfan Contaminants in Alkaline Thai Soil. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(5), 734-738.
- Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2012). Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the monoxenic arbuscular mycorrhizal chicory roots. *Journal of Hazardous Materials*, 209–210(0), 18-26.
- Devi, R., Munjral, N., Gupta, A.K., & Kaur, N. (2007). Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Environmental and Experimental Botany*, 61(2), 167-174.
- Devi, R., Munjral, N., Gupta, A., & Kaur, N. (2013). Effect of exogenous lead on growth and carbon metabolism of pea (*Pisum sativum* L) seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 81-89.
- Dubey, S., Misra, P., Dwivedi, S., Chatterjee, S., Bag, S.K., Mantri, S., et al. (2010). Transcriptomic and metabolomic shifts in rice roots in response to Cr (VI) stress. *Bmc Genomics*, 11, 2-19.
- Fatland, B.L., Nikolau, B.J., & Wurtele, E.S. (2005). Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(1), 182-203.
- Faure, M., San Miguel, A., Ravanel, P., & Raveton, M. (2012). Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Environmental Pollution*, 164, 188-194.
- Franek, F. & Sramkova, K. (1996). Protection of B lymphocyte hybridoma against starvation-induced apoptosis: Survival-signal role of some amino acids. *Immunology letters*, 52, 139-144.
- Gheju, M., & Stelescu, I. (2013). Chelant-assisted phytoextraction and accumulation of Zn by *Zea mays*. *Journal of Environmental Management*, 128(0), 631-636.
- Gupta, A.K., & Kaur, N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*, 30(5), 761-776.
- He, L.Z., Lu, X.M., Tian, J., Yang, Y.J., Li, B., Li, J., et al. (2012). Proteomic analysis of the effects of exogenous calcium on hypoxic-responsive proteins in cucumber roots. *Proteome Science*, 10, 2-15.
- Hey, S.J., Byrne, E., & Halford, N.G. (2010). The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany*, 105(2), 197-203.

- Hurth, M.A., Suh, S.J., Kretzschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., et al. (2005). Impaired pH homeostasis in arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology*, *137*(3), 901-910.
- Igamberdiev, A.U., & Hill, R.D. (2009). Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Annals of Botany*, *103*(2), 259-268.
- Jander, G., & Joshi, V. (2010). Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. *Molecular Plant*, *3*(1), 54-65.
- Kaya, C., Aydemir, S., Sonmez, O., Ashraf, M., & Dikilitas, M. (2013). Regulation of growth and some key physiological processes in salt-stressed maize (*Zea mays* L.) plants by exogenous application of asparagine and glycerol. *Acta Botanica Croatica*, *72*(1), 157-168.
- Kluender, C., Sans-Piché, F., Riedl, J., Altenburger, R., Härtig, C., Laue, G., et al. (2009). A metabolomics approach to assessing phytotoxic effects on the green alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Metabolomics*, *5*(1), 59-71.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(3), 235-246.
- Kushalappa, A.C., & Gunnaiah, R. (2013). Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends in Plant Science*, *18*(9), 522-531.
- Lankadurai, B.P., Nagato, E.G., & Simpson, M.J. (2013). Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environmental Reviews*, *21*(3), 180-205.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, R., & Halford, N.G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, *150*(1), 1-26.
- Lehmann, M., Laxa, M., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., & Obata, T. (2012). Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. *Metabolomics*, *8*(1), 143-153.
- Li, H.S., Ling, W.F., & Lin, C.X. (2011). Effects of different treatments on soil-borne DDT and HCH dynamics and plant uptake. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, *46*(7), 608-614.
- Li, Y., Wang, N., Zhao, F.T., Song, X.J., Yin, Z.H., Huang, R., et al. (2014). Changes in the transcriptomic profiles of maize roots in response to iron-deficiency stress. *Plant Molecular Biology*, *85*(4-5), 349-363.
- Lin, W.C., Cheng, M.L., Wu, J.W., Yang, N.S., & Cheng, C.P. (2005). A glycine-rich protein gene family predominantly expressed in tomato roots, but not in leaves and ripe fruit. *Plant Science*, *168*(2), 283-295.
- Liu, X.L., Wu, H.F., Ji, C.L., Wei, L., Zhao, J.M., & Yu, J.B. (2013). An integrated proteomic and metabolomic study on the chronic effects of mercury in *Suaeda salsa* under an environmentally relevant salinity. *Plos One*, *8*(5), 1-13.
- Long, R.C., Yang, Q.C., Kang, J.M., Zhang, T.J., Wang, H.M., Li, M.N., et al. (2013). Overexpression of a novel salt stress-induced glycine-rich protein gene from alfalfa causes salt and ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, *32*(8), 1289-1298.
- Lubbe, A., Verpoorte, R., & Choi, Y.H. (2012). Effects of fungicides on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs. *Plant Physiology and Biochemistry*, *58*, 116-123.
- Manaa, A., Mimouni, H., Wasti, S., Gharbi, E., Aschi-Smiti, S., Faurobert, M., et al. (2013). Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. *Plant Omics*, *6*(4), 268-277.
- Mansour, S.A. (2009). Persistent organic pollutants (POPs) in Africa: Egyptian scenario. *Human & Experimental Toxicology*, *28*(9), 531-566.

- Marillia, E.F., Micallef, B.J., Micallef, M., Weninger, A., Pedersen, K.K., Zou, J.T., et al. (2003). Biochemical and physiological studies of *Arabidopsis thaliana* transgenic lines with repressed expression of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase. *Journal of Experimental Botany*, *54*(381), 259-270.
- Matsuyama, T., Satoh, H., Yamada, Y., & Hashimoto, T. (1999). A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant Physiology*, *120*(3), 665-674.
- McKelvie, J., Yuk, J., Xu, Y., Simpson, A., & Simpson, M. (2009). <sup>1</sup>H NMR and GC/MS metabolomics of earthworm responses to sub-lethal DDT and endosulfan exposure. *Metabolomics*, *5*(1), 84-94.
- Mo, C.H., Cai, Q.Y., Li, H.Q., Zeng, Q.Y., Tang, S.R., & Zhao, Y.C. (2008). Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soil. *Chemosphere*, *73*(1), 120-125.
- Molina, C., Zaman-Allah, M., Khan, F., Fatnassi, N., Horres, R., Rotter, B., et al. (2011). The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. *BMC Plant Biology*, *11*, 2-26.
- Mukherjee, I., & Kumar, A. (2012). Phytoextraction of endosulfan a remediation technique. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *88*(2), 250-254.
- Pavliková, D., Zemanová, V., Procházková, D., Pavlík, M., Száková, J., & Wilhelmová, N. (2014). The long-term effect of zinc soil contamination on selected free amino acids playing an important role in plant adaptation to stress and senescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *100*(0), 166-170.
- Piccioni, F., Capitani, D., Zolla, L., & Mannina, L. (2009). NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1A(b) gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 6041-6049.
- Qiu, Y.W., Zhang, G., Guo, L.L., Cheng, H.R., Wang, W.X., Li, X.D., et al. (2009). Current status and historical trends of organochlorine pesticides in the ecosystem of Deep Bay, South China. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, *85*(2), 265-272.
- Rodziewicz, P., Swarcewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., & Stobiecki, M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*(1), 1-19.
- San Miguel, A., Faure, M., Ravanel, P., & Raveton, M. (2012). Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes. *Ecotoxicology*, *21*(2), 315-324.
- San Miguel, A., Schroder, P., Harpaintner, R., Gaude, T., Ravanel, P., & Raveton, M. (2013). Response of phase II detoxification enzymes in *Phragmites australis* plants exposed to organochlorines. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(5), 3464-3471.
- Sardans, J., Penuelas, J., & Rivas-Ubach, A. (2011). Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, *21*(4), 191-225.
- Schauer, N., & Fernie, A.R. (2006). Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends in Plant Science*, *11*(10), 508-516.
- Shahsavari, E., Adetutu, E., Anderson, P., & Ball, A. (2013). Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, *224*(4), 1-14.
- Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., et al. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell*, *18*(10), 2767-2781.

- Somtrakoon, K., & Pratumma, S. (2012). Phytotoxicity of heptachlor and endosulfan sulfate contaminants in soils to economic crops. *Journal of Environmental Biology*, 33(6), 1097-1101.
- Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J., et al. (2002). The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Journal*, 32(6), 891-904.
- Teixeira, J., & Fidalgo, F. (2009). Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(9), 807-813.
- Thi, T.H.D., Puig, R.C., Kim, H.K., Erkelens, C., Lefeber, A.W.M., Linthorst, H.J.M., et al. (2009). Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(2), 146-152.
- Trenkamp, S., Eckes, P., Busch, M., & Fernie, A. (2009). Temporally resolved GC-MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. *Metabolomics*, 5(3), 277-291.
- Tuffnail, W., Mills, G., Cary, P., & Greenwood, R. (2009). An environmental <sup>1</sup>H NMR metabolomic study of the exposure of the marine mussel *Mytilus edulis* to atrazine, lindane, hypoxia and starvation. *Metabolomics*, 5(1), 33-43.
- Vijgen, J., Abhilash, P.C., Li, Y., Lal, R., Forter, M., Torres, J., et al. (2011). Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(2), 152-162.
- Xiang, L., Le Roy, K., Bolouri-Moghaddam, M.R., Vanhaecke, M., Lammens, W., Rolland, F., et al. (2011). Exploring the neutral invertase-oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3849-3862.
- Yuk, J., Simpson, M.J., & Simpson, A.J. (2012). Coelomic fluid: a complimentary biological medium to assess sub-lethal endosulfan exposure using H-1 NMR-based earthworm metabolomics. *Ecotoxicology*, 21(5), 1301-1313.
- Zabalza, A., Gaston, S., Sandalio, L.M., del Rio, L.A., & Royuela, M. (2007). Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 150-159.
- Zell, M.B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E.V., Edwards, G.E., et al. (2010). Analysis of *Arabidopsis* with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiology*, 152(3), 1251-1262.



#### 4. Conclusion

Nos résultats sur l'étude de la phytotoxicité des racines de *Zea mays* nous suggèrent que les OCPs provoquent des effets néfastes sur la croissance des racines de maïs et la division cellulaire (Figure 38).

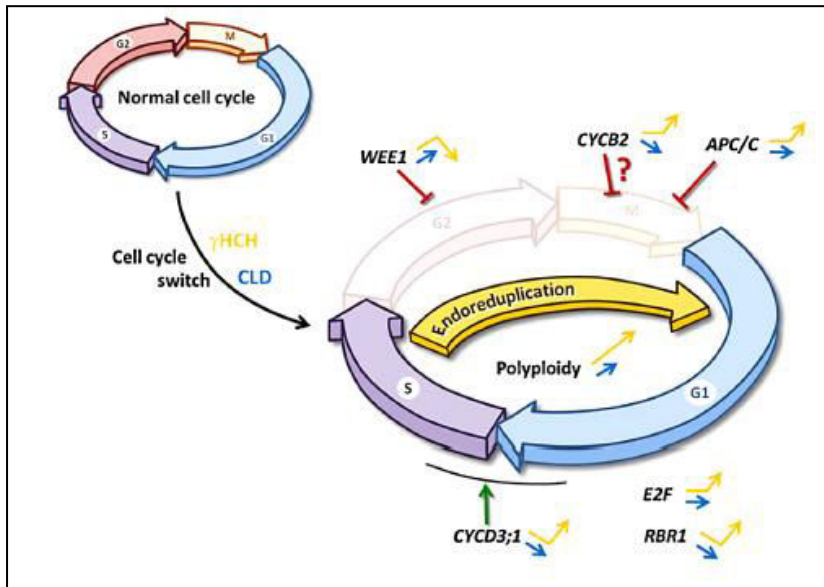


Figure 38. Modèle schématique des mécanismes moléculaires d'endoréplication induits par les OCPs dans les racines de *Zea mays*. Les flèches orange représentent les résultats obtenus avec une exposition au lindane. Les flèches bleues représentent les résultats obtenus avec une exposition à la chlordécone. Les flèches vertes représentent les mécanismes moléculaires induits par les OCPs. Les flèches rouges représentent les mécanismes inhibés par les OCPs.

Les inductions/inhibitions mesurées de la transcription des gènes des principaux régulateurs du cycle cellulaire (cyclines, WEE1...) ainsi que l'évaluation du niveau de ploïdie cellulaire montrent pour la première fois que la diminution de la croissance des racines en présence des OCPs peut être due à une induction de l'endoréplication.

Les OCPs pourraient agir directement sur le cycle cellulaire ou alors, indirectement via la génération de ROS (Figure 39). Ce phénomène induit par les OCPs aux plus fortes concentrations d'exposition explique l'hypertrophie cellulaire initialement observée lors de nos mesures anatomo-morphologiques. En conséquence de cette hypertrophie cellulaire, les racines présentent une induction de synthèse de certains métabolites primaires impliqués dans la structure du cytosquelette (acides aminés ramifiés), des membranes (acides gras) ou encore des dépôts lipophiles dans les parois (lignine/subérine). Les OCPs induisent une augmentation des molécules de signalisation cellulaire comme le calcium libre dans le cytosol et certains ROS ( $H_2O_2$ ) (Figure 39). Ces molécules peuvent induire des réponses cellulaires variées dont une perturbation du métabolome (Figure 40).

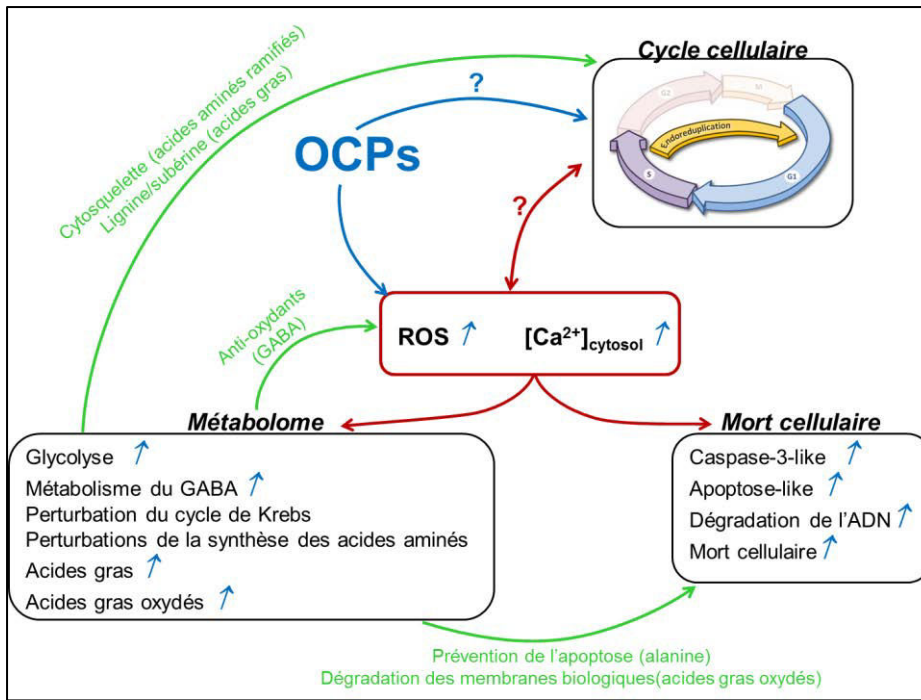


Figure 39. Schéma des effets cytotoxiques des OCPs sur les cellules racinaires de *Zea mays*. ROS, Espèces Réactives de l'Oxygène ; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cytosol</sub>, concentration cytosolique en calcium libre ; GABA, 4-aminobutyrique acide.

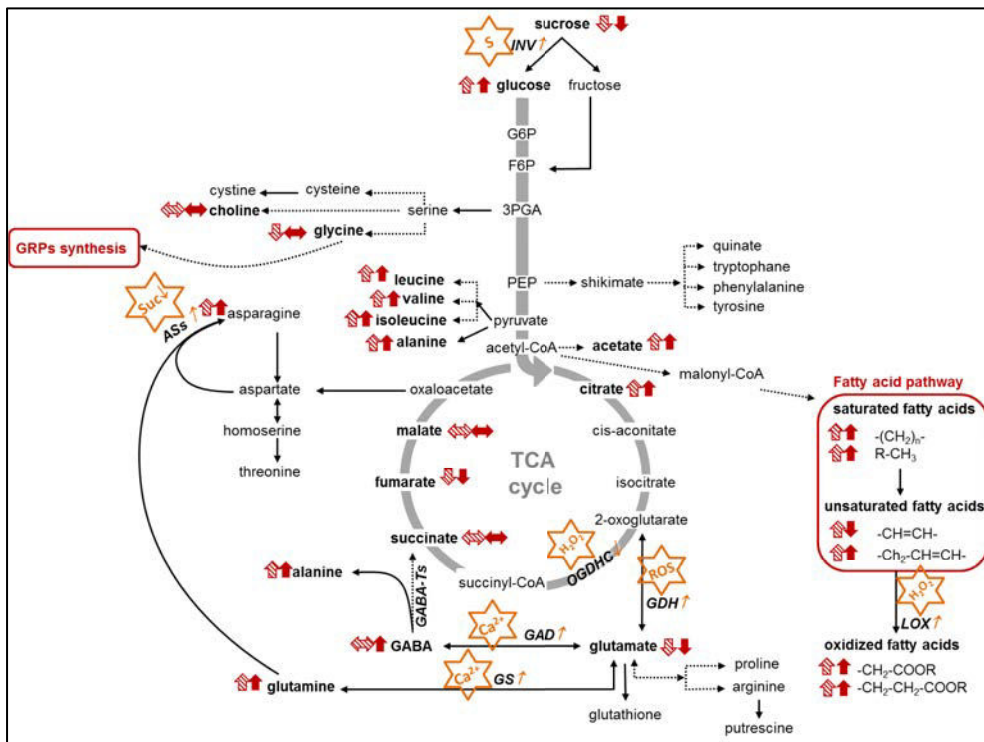


Figure 40. Schéma hypothétique des mécanismes de biosynthèse impliquant certains métabolites identifiés par RMN 1H-HRMAS (en gras) dans les racines de maïs exposées au lindane. Métabolite augmenté : flèche vers le haut. Métabolite diminué : flèche vers le bas. Métabolite constant par rapport au contrôle : flèche horizontale. Réponse au lindane 0.7 mg. l-1 : flèche hachurée. Réponse au lindane 7 mg. l-1 : flèche pleine. Voie métabolique directe (→) ou indirecte (---→). Les enzymes sont inscrits en italique. Les étoiles orange représentent les stress répertoriés dans la littérature. ASs, Asparagine synthetase ; Ca<sup>2+</sup>, calcium cytosolique ; GABA, 4-aminobutyrate ; GABA-Ts, GABA-transaminases ; GAD, glutamate decarboxylase ; GDH, glutamate dehydrogenase ; GRPs, glycine-rich proteins ; GS, glutamine synthetase ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène ; INV, invertase ; LOX, lipoxigénase ; OGDHC, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; S, stress ; Suc, sucrose ; TCA cycle, cycle de l'acide tricarboxylique



Les racines exposées au  $\gamma$ HCH et aux stressseurs secondaires (ROS,  $\text{Ca}^{2+}$ ) ont un état énergétique perturbé avec une induction de la glycolyse. Le métabolisme du GABA est lui aussi induit pouvant ainsi jouer un rôle anti-oxydant. Par ailleurs, la synthèse importante de GABA est un signe de perturbation du cycle de Krebs. Ainsi, certains métabolites comme le fumarate, le citrate ou encore l'acétate jouent ici un rôle de protection des cellules. D'autre part, les perturbations observées dans la synthèse des acides aminés peuvent être une conséquence du maintien d'une balance carbone/azote au sein des cellules racinaires ; modifiant l'allocation énergétique au sein des racines. L'alanine induite par une exposition au  $\gamma$ HCH est un marqueur de prévention contre l'apoptose cellulaire. Or, nous avons observé que l'exposition des racines de maïs à des concentrations croissantes en OCPs est corrélée à une augmentation de la cytotoxicité. Ainsi, plusieurs marqueurs de mort cellulaire ont été détectés comme l'induction des activités caspase-3-like, l'augmentation des cassures apoptotiques (TUNEL), de la dégradation de l'ADN, de l'oxydation des acides gras et de la viabilité cellulaire (marquage à l'iodure de propidium) (Figure 41).

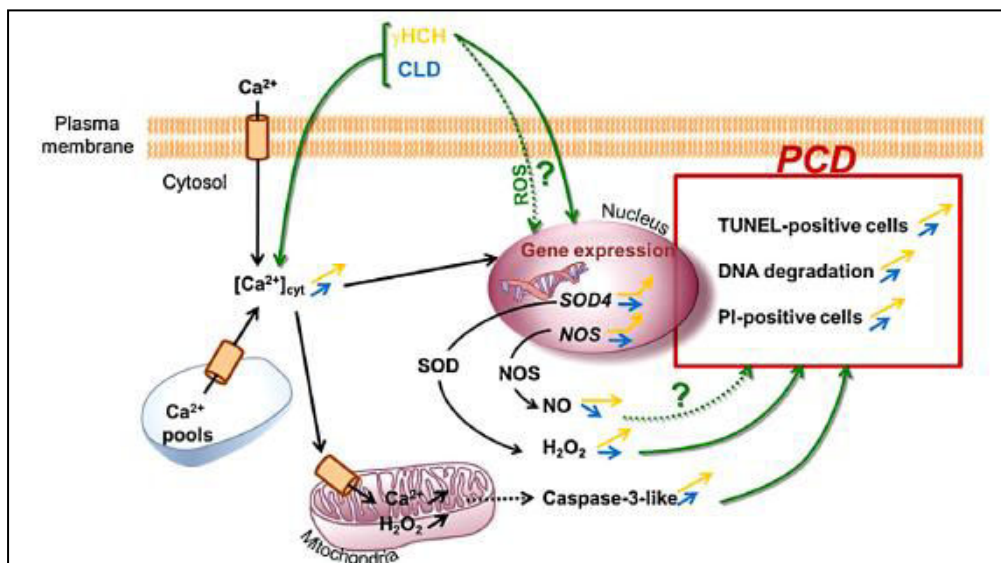


Figure 41. Modèle schématique des mécanismes moléculaire pour la PCD dans les racines de *Zea mays*. Les flèches orange représentent les résultats obtenus avec une exposition au lindane. Les flèches bleues représentent les résultats obtenus avec une exposition à la chlordécone. Les flèches vertes représentent les mécanismes moléculaires induits par les OCPs. Les flèches noire représentent les mécanismes moléculaires induits par les OCPs publiés dans Gadjev et al., (2008) et Sun et al., (2012). SOD, superoxide dismutase ; NOS, oxide nitrique synthase

La mort cellulaire induite par les OCPs est décrite pour les plus fortes doses d'exposition n'ayant pas de réalité environnementale. En effet, les effets cytotoxiques décrits précédemment sont dose-dépendants et aux concentrations d'exposition possibles dans

l'environnement ( $< 0.7 \text{ mg. l}^{-1}$  pour le lindane et  $< 0.04 \text{ mg. l}^{-1}$  pour le chlordécone), le cycle et la viabilité cellulaire des racines de maïs sont relativement peu atteints. Cependant, le métabolome montre des fluctuations significatives qui représentent le système d'adaptation des racines à la pression chimique. En rassemblant l'ensemble de ces données phytotoxiques évaluées en hydroponie (conditions extrêmes d'exposition) et sur du court-terme d'exposition, le maïs semble être une plante adaptée aux conditions environnementales d'exposition aux OCPs. Pour confirmer cette hypothèse, il serait judicieux de valider la fonctionnalité de la rhizosphère en réalisant des expérimentations en sol et voir si (i) l'impact des OCPs sur la croissance des racines a des conséquences sur le long terme, et si (ii) les modifications du métabolisme racinaire observées peuvent modifier les relations plantes/microorganismes du sol.

Chapitre 3:  
Allocation des ressources  
et  
fonctionnalité de la rhizosphère



## Chapitre 3 Allocation des ressources et fonctionnalité de la rhizosphère

### 1. Introduction

Dans ce chapitre, l'hypothèse formulée sur la tolérance du maïs aux pressions d'exposition aux OCPs sur du long terme a été abordée en focalisant notre recherche sur la fonctionnalité de la rhizosphère exposée au lindane ( $\gamma$ HCH) et à la chlordécone (CLD). Cette approche intégrée d'analyse du fonctionnement rhizosphérique est un choix permettant d'évaluer à l'échelle globale les dérèglements possibles induits par les OCPs sur les interactions plante/microorganismes, sur l'efficacité de minéralisation, sur le turnover des nutriments et sur la viabilité du système dans son ensemble. Les travaux précédemment discutés montrent une perturbation du métabolome racinaire en présence des OCPs (par exemple pour le  $\gamma$ HCH) et laissent envisager une perturbation de la composition des exsudats. Par ailleurs, de précédentes études ont démontré une modification dose-dépendante des communautés microbiennes lors d'exposition à des mélanges en OCPs (San Miguel et al., 2013). Cependant, de tels changements n'induisent pas nécessairement une modification de la fonctionnalité rhizosphérique. Ainsi notre questionnement a pour but d'évaluer si le système rhizosphérique est capable (malgré ces dérèglements) de s'adapter par des fonctions compensatoires entre racines et microorganismes aux stress engendrés par les OCPs.

Pour ce faire, les plants de maïs ont été exposés à des sols contaminés en  $\gamma$ HCH (**Publication III**) et en CLD (**Publication IV**); aux doses classiquement mesurées dans l'environnement. Notre stratégie d'étude a été d'étudier dans les différents compartiments du sol la teneur en carbone et en azote (formes organiques et inorganiques), la biomasse microbienne (la minéralisation potentielle de l'azote (NMP) et les activités cataboliques *via* l'utilisation des tests Biolog EcoPlates® permettant de dessiner un profil physiologique des communautés microbiennes (community level physiological profile, CLPP)) et le développement des plantules de maïs (traits végétaux des racines et des feuilles). Pour comprendre les potentielles perturbations engendrées par les OCPs sur les exsudats racinaires, nous avons évalué l'impact du CLD sur le métabolome racinaire par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) *high resolution magic angle spinning* (HRMAS) du proton (**Publication IV**).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Schéma expérimental des expériences

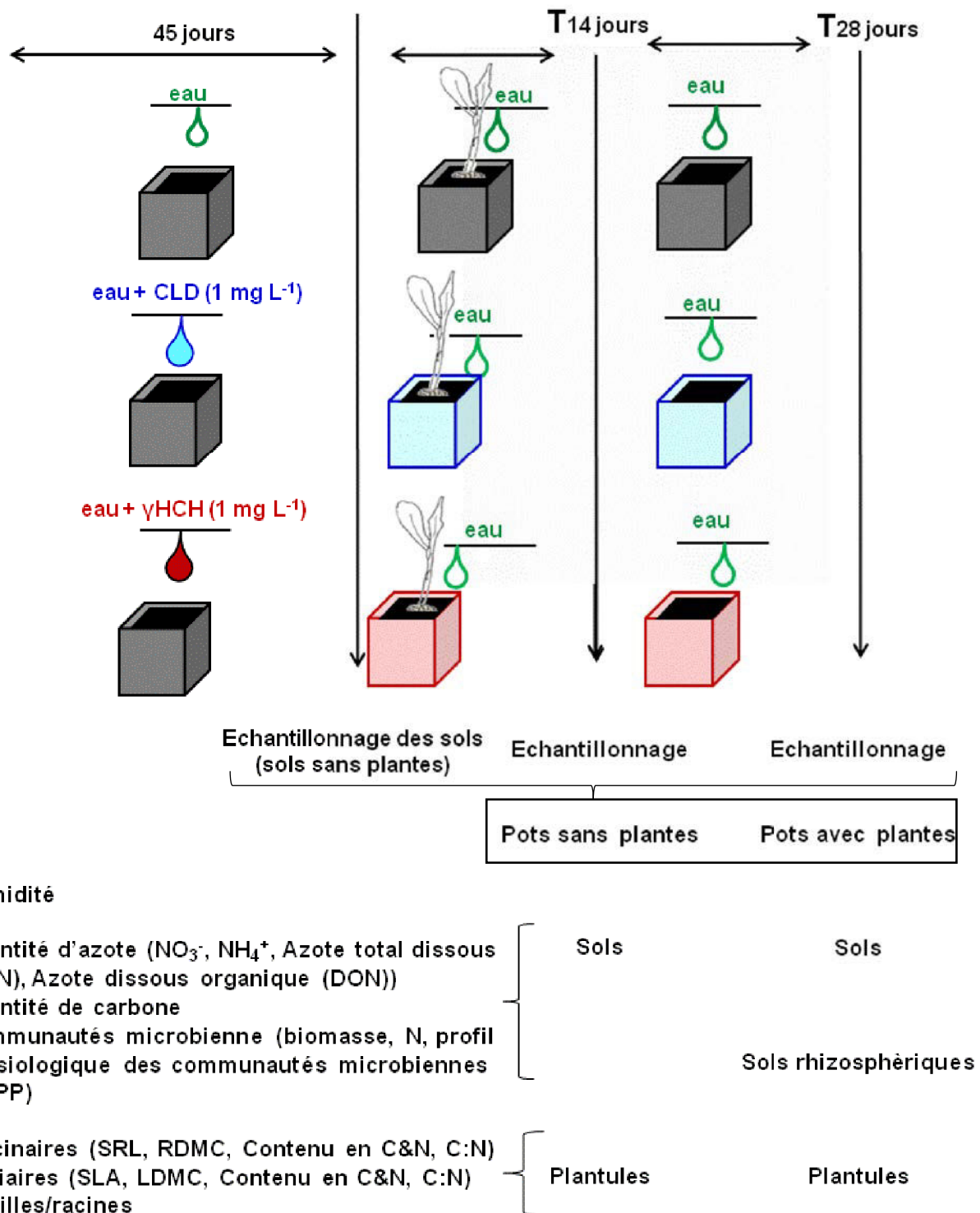


Figure 42. Schéma expérimental des manipulations pour évaluer l'allocation des ressources et la fonctionnalité de la rhizosphère de *Zea mays* exposé aux OCPs.



## 2.2. Analyses Carbone/Azote, traits fonctionnels

Pour évaluer les stocks d'azote potentiellement disponibles pour la plante, les différentes formes d'azote ont été mesurées comme l'azote inorganique dissous (DIN, Dissolved inorganic nitrogen) correspondant à l'ensemble des nitrates, nitrites et ammonium, l'azote organique dissous (DON, Dissolved organic nitrogen) et l'azote total dissous (TDN, Total Dissolved Nitrogen). Le TDN correspond à la totalité de l'azote contenu dans les formes azotées minérales et organiques en solution dans l'eau (sauf le N<sub>2</sub>; TDN = DIN + DON).

En absence de plante, le contenu des sols en ammonium dépend des bactéries nitrifiantes et des bactéries ammonifiantes qui transforment l'ammonium en nitrate et l'azote organique en ammonium réciproquement. La minéralisation de l'azote (PNM) est la conversion de l'azote organique en azote inorganique (ammonium et nitrate). La mesure de la PNM permet donc de savoir si les OCPs ont un impact sur les bactéries nitrifiantes et les bactéries ammonifiantes.

Le carbone organique dissous (Dissolved organic content, DOC) provient de la décomposition de débris organiques végétaux et animaux. Il peut également provenir de substances organiques émises par les exsudats racinaires. Le dosage du DOC est indirect en mesurant la quantité de CO<sub>2</sub> produite par réaction d'oxydation thermique (680°C) grâce à un appareil de spectrométrie gazeuse. Le contenu en carbone organique dissous est exprimé en mg g<sup>-1</sup> de masse sèche.

Nous avons également mesuré certains traits chez les plantules de *Zea mays*. Il s'agit de deux traits foliaires qui sont la surface spécifique des feuilles (Specific leaf area, SLA) et le contenu en matière sèche des feuilles (Leaf dry matter content, LDMC) et deux traits racinaires qui sont la longueur spécifique des racines (Specific root length, SRL) et la teneur en matière sèche des racines (Root dry matter content, RDMC) (Figure 43). La masse sèche des racines et des feuilles permet de calculer le ratio racine sur feuille (root-to-shoot ratios, R/S).

$\text{SLA} = \frac{\text{Aire des feuilles (cm}^2\text{)}}{\text{Masse fraîche des feuilles (g)}}$	$\text{LDMC} = \frac{\text{Masse sèche des feuilles (g)}}{\text{Masse fraîche des feuilles (g)}}$
$\text{SRL} = \frac{\text{Longueur des racines(cm)}}{\text{Masse sèche des racines(g)}}$	$\text{RDMC} = \frac{\text{Masse sèche des racines(g)}}{\text{Masse fraîche des racines (g)}}$

Figure 43. Equations des traits foliaires et racinaires

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Fonctionnalité de la rhizosphère de *Zea mays* en présence de lindane

##### 3.1.1. Publication III

**Publication III :** Assessing the dynamic changes of rhizosphere functionality of *Zea mays* plants grown in lindane contaminated soils

**Auteurs:** Claire Blondel<sup>a,b</sup>, Loïc Briset<sup>a,b</sup>, Cindy Arnoldi<sup>a,b</sup>, Nicolas Legay<sup>a,b</sup>, Frank poly<sup>c</sup>, Jean-Christophe Clément<sup>a,b</sup>, Muriel Raveton<sup>a,b,\*</sup>

**Participation:** Encadrement et réalisation des expériences, Analyses des résultats, Réalisation des figures, Rédaction

**Publication en préparation pour Chemosphere**

<sup>a</sup>Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>b</sup>Université de Grenoble - Alpes, France

<sup>c</sup>UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France

**\*Author for correspondence:**

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Tel: 00 33 476 51 46 80

Fax: 00 33 476 51 44 63

E-mail: [muriel.raveton@ujf-grenoble.fr](mailto:muriel.raveton@ujf-grenoble.fr)

## **Abstract**

Organochlorine pesticides may have potential effects on rhizosphere functionality and disturbed nutrient turnover and availability. Therefore, a pot experiment was conducted to study the dynamic changes in the rhizosphere functionality of maize plants grown in lindane ( $\gamma$ HCH) contaminated soils at a relevant environmental dose ( $48 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Effects of  $\gamma$ HCH were measured on soil parameters (pH, C and N contents), potential nitrogen mineralization, microbial biomass and community structure, and above and below-ground plant traits. Decreases in soil  $\text{N-NH}_4^+$  contents were only  $\gamma$ HCH-influenced in bulk soils of pots without plant, while increases in N-TDN and N-DON contents were induced by  $\gamma$ HCH contamination in bulk soils of pots with plant. Microbial biomass and nitrogen mineralization potentials were reduced by  $\gamma$ HCH-exposure only for bulk soils in pots without plant. Nevertheless,  $\gamma$ HCH did not impact the microbial community level physiological profile. Finally,  $\gamma$ HCH-effects on plant traits showed a significant but temporary decrease of the specific root length and the surface leaf area at T14, followed by a full recovery at after 28 days of exposure. Therefore, these results indicate an enhanced resilience of the soil functioning when plants were present. Overall, the maize rhizosphere functionality is sustained after 28 days of exposure to  $\gamma$ HCH, which could efficiently participate to remediation of contaminated soils.

**Keywords:** Rhizosphere, Lindane, microbial community level physiological profile, Maize, C:N

## **1. Introduction**

Organochlorine pesticides (OCPs) are an important class of xenobiotics listed as priority environmental pollutants by the Stockholm Convention (Vijgen et al. 2011). In the past,

lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane,  $\gamma$ HCH) was one of the most extensively used OCPs to control a wide range of agricultural pests. The use and production of  $\gamma$ HCH has resulted in environmental contamination of global dimensions, and its high stability-lipophilicity has generated its accumulation and persistence in the environment (Vijgen et al. 2011).  $\gamma$ HCH is now banned of used (C.N.524.2009.TREATIES-4, Stockholm Convention, 26/08/2009), it is nevertheless a major contaminant of soils and by dissipation of food-crops, waters and trophic webs (Chopra et al. 2011). Human health can also be impacted as  $\gamma$ HCH is described as an endocrine disrupter and a carcinogen (Chopra et al. 2011). The soil contamination with  $\gamma$ HCH is heterogeneous, with hot spots (former industrial and agricultural sites) containing between 900 to 4000 mg/kg (Abhilash and Singh 2009).

Soils exposed to  $\gamma$ HCH long-term contamination represent extreme challenges to find remediation solutions. It was demonstrated that plants constitute an important sink for OCPs, as they are able to retain them efficiently in their tissues (mainly in underground tissues as roots or tubers) by partition/diffusion processes (San Miguel et al., 2013). Moreover, plant roots are able to maintain a diversity of microbial communities in the adjacent root-surface soil which are liable to bioaccumulate and/or biodegrade OCPs (White et al., 2001; Alvarez et al., 2012, Segura and Ramos, 2013; San Miguel et al., 2014). Kidd et al. (2008) demonstrated a greater biodegradation of HCH isomers in the soil-plant-microbe system of *Cytisus striatus* and *Holcus lanatus* than in bulk soil. Therefore soil volume that is physically, chemically, or biologically altered by the presence of plant roots -named rhizosphere (Gerhardt et al., 2009)- appeared as a key core system which might be implicated in the remediation of OCPs (Bell et al., 2014; Fester et al., 2014). The prerequisite for the efficiency of such a remediation strategy is the sustainability of the rhizosphere system in terms of volume/density, functionality, microbial abundance/biodiversity (Megharaj et al., 2011). Previous studies have shown that plants without rhizospheric microbial association showed

OCP-dose dependent toxic effects (Abhilash and Singh, 2010; Li et al., 2011; Faure et al., 2012; Blondel et al., 2014). Blondel et al. (publication II) have demonstrated that the maize root metabolome is altered by  $\gamma$ HCH in terms of quality and relative quantity of metabolites (some of them are constitutive of exudates). Plant exudates provide readily available organic carbon sources to the surrounding microbes, which profoundly affect their catabolic activities and the structure of microbial communities (Puglisi et al., 2009; Martin et al., 2014). Therefore, the OCP-effects might impact directly and/or indirectly (e.g., via exudates changes) microbial biomass and/or biodiversity (Bais et al., 2006; Kidd et al., 2008; Merlin et al., 2013; Mercier et al., 2013; Gupta et al., 2014; San Miguel et al., 2014). However, changes in microbial community structure do not necessarily imply changes in microbial functions. Another fundamental ecological process is described as the “microbial loop” model, through which soil microbes from the rhizosphere mobilize nutrients, primarily nitrogen, then microbial turn-over release these nutrients in forms that are bioavailable to plants (Bonkowski, 2004; Raynaud et al., 2006). Consequently, OCP potential effects on rhizosphere functionality may disturb nutrient turnover and availability (Van der Heijden et al., 2008), and possible negative effects on plant nutrient acquisition, growth and carbohydrate allocation may be suspected (Nie et al., 2010; Desalme et al., 2013). Thus, characterizing plant-microbial functionality in presence of OCP-contaminated soils remains an important goal of fundamental ecological understandings, with significant accurate inputs in remediation developments.

For this purpose, we used maize (*Zea mays*) as one of the major crops worldwide which is able to cope with excessive levels of OCPs (Mo et al. 2008; Chouychai and Lee 2012; Mukherjee and Kumar 2012; Faure et al. 2012; Somtrakoon and Pratumma 2012; Gheju and Stelescu 2013; Shahsavari et al. 2013; Blondel et al. 2014). A pot experiment was conducted to study the changes in the rhizosphere functionality of maize plants grown in  $\gamma$ HCH

contaminated soils at a relevant environmental dose (48 mg/kg). The specific objectives of this study were to monitor the temporal variation in (1) soil parameters (moisture, pH, C and N contents, potential nitrogen mineralization), (2) microbial biomass and catabolic activities (Biolog EcoPlates® designed for ecological study of whole microbial community level physiological profile (CLPP) (Weber et al., 2007)), and (3) plant growth (specific roots and leaves traits).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemical**

Lindane ( $\gamma$ -HCH) was purchased at Sigma-Aldrich (Germany) as pure standard (99% of purity).

### **2.2. Sterilisation of maize seeds**

Maize seeds (*Zea mays* L., Golden Bantam; Graines Baumaux, France) were surface sterilized in ethanol:water (v/v 8:2) for 30s and then placed in sodium hypochlorite:water (w/v 5:100) for 2 min before washing several times in sterilized distilled water (San Miguel et al., 2012).

### **2.3. Soil conditioning and experimental design**

Standard soils (Compost composition (dry weight), 1.11% N, 38.16% C; Botanic, France) were sieved at 5.6 mm and divided in pots of 70 g fresh weight (FW). The soils were sprayed every two days with a solution of water containing 0.05% of ethanol (used to dissolve  $\gamma$ HCH; batch control, n=30) and 7 mg L<sup>-1</sup> of  $\gamma$ HCH (water solubility) during 45 days under controlled conditions (16h/8h (day/night); 25 ± 2°C). The final  $\gamma$ HCH concentration was 48 mg kg<sup>-1</sup> in soil. This time was the Time 0 (T0) of the experiment (Fig. S1, Annexe 3). Sterile seeds pre-germinated (2days) in sterile petri dishes were planted in soils (1 seed per pot) contaminated or not-contaminated with  $\gamma$ HCH. All plants were cultivated under controlled conditions for 28

days (16h/8h (day/night);  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). At 14 and 28 days, plantlets were harvested and dissected. To collect the rhizosphere, roots were manually shaken and then introduced in a phosphate buffer solution (PBS) during 1h under stirring. Afterwards, solutions were centrifuged at 9000 rpm during 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Supernatants and pellets were stored separately at  $-20^\circ\text{C}$ . Plantlets, rhizosphere and bulk soils were collected and stored at  $-20^\circ\text{C}$  for further analyses.

#### **2.4. Rhizosphere and bulk soil nitrogen contents**

Extraction of mineral N ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) was performed by addition of 50 mL of  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.5 M) to fresh soil (rhizosphere and bulk soils, 10 g) for 1h under stirring at 250 rpm as described in (Legay, 2013). Solutions were then filtered on Whatman papers (porosity 2.5  $\mu\text{m}$ ) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis by spectrophotometry (FS-IV, OI Analytical, Bioritech, France).

Total dissolved nitrogen (TDN) was performed on  $\text{K}_2\text{SO}_4$  soil filtrates. 1mL of oxide persulfate ( $52 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $31.2 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ , 50 mL NaOH 3.75 M) was added to 5mL of filtrate and digested during 1h at  $121^\circ\text{C}$ . Then the digestion extracts were measured for N- $\text{NO}_3$  content by spectrophotometry (FS-IV; OI-Analytical Corp., Bioritech, France).

The analysis of total C and N contents in rhizosphere and bulk soils was performed on dried samples (7 days,  $60^\circ\text{C}$ ). Afterwards, 10-20 mg DW of each soil sample were collected, ground and analyzed using a CHN elemental analyzer (Flash EA1112, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) (Grigulis et al., 2013).

#### **2.5. Rhizospheric dissolved organic carbon (DOC) contents**

Rhizospheric supernatant was incubated with two drops of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (97%) (1 week, obscurity,  $4^\circ\text{C}$ ). Inorganic carbon was eliminated with HCl. DOC was burned ( $680^\circ\text{C}$ ) releasing  $\text{CO}_2$



which was dosed by gas chromatography (TOC-5000A Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). DOC was expressed as mg C g<sup>-1</sup> dry weight (DW).

## **2.6. Soil microbial characterization**

For assessing the microbial biomass, soils (10 g FW) were exposed to chloroform fumigation during 7 days. Then, soils were shaken at 250 rpm with K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 M) during 1 h (Legay, 2013). Afterwards, nitrogen was measured by spectrophotometry (FS-IV) and express as µgN g<sup>-1</sup> DW. For measuring the potential nitrogen mineralization (PNM), soils (10 g FW) were saturated with water (50ml, 7 days, 40°C, anaerobiose). The resulting NH<sub>4</sub><sup>+</sup> production was measured by spectrophotometry (FS-IV) and PNM (µgN g<sup>-1</sup>biomass day<sup>-1</sup>) was calculated as the difference of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents in soil extracts between day 0 and day 7 (Grigulis et al., 2013).

The whole microbial community level physiological profile (CLPP) was characterized by using Biolog Ecoplate® (BIOLOG Inc., Hayward, USA) as described in Baudoin et al. (2003). Biolog system is an *in vitro* cultivation method used to discriminate heterotrophic microbial communities of environmental samples by comparing carbon utilization profiles for 31 carbon sources (3 replicates, Table S2, Annexe 3). For this purpose, bulk and rhizosphere soils were shaken in a solution of PBS (1/10; m/v) and the soil solutions obtained were diluted at 10<sup>-2</sup>. This dilution was chosen in order to reduce the influence of soil particles on the optical density development. Plates were inoculated with 150 µL of the soil suspension and incubated in the dark at 26°C during 3 days. The number of pixels was automatically recorded every 15min by the OmniLog® (Biolog, Hayward, U.S.A) reader in conjunction with the module D5E data converter (V.1.2) and Kinetic (V.1.3) softwares. The catabolic kinetics were analyzed using the area under the curve (AUC) because this parameter integrates the lag phase, the slope and the maximum number of pixels as described in Vaas et al. (2012). For each sampling date and each type of soil, 3 plates were analyzed per treatment.

## 2.7. Plantlet C and N contents, and biometry

Total C and N contents were measured in leaves and roots as described above for soil using a CHN elemental analyzer (FS-IV; OI-Analytical Corp., Bioritech, France).

Roots and leaves were weighed (FW), scanned (EPSON Perfection V300), and analyzed with the WinRhizo software (Regent Instruments Inc., Canada) to determine the surface of leaves and the roots length. Samples were then dried at 60°C for 48h for measuring dry weight (DW). Consequently, the specific leaf area (SLA), the leaf dry matter content (LDMC), the specific root length (SRL), and the root dry matter content (RDMC) were determined using these equations:

$$\text{SLA} = \frac{\text{leaf area (cm}^2\text{)}}{\text{leaf FW (g)}} \quad \text{LDMC} = \frac{\text{leaf DW (g)}}{\text{leaf FW (g)}}$$

$$\text{SRL} = \frac{\text{root length (cm)}}{\text{root DW (g)}} \quad \text{RDMC} = \frac{\text{root DW (g)}}{\text{root FW (g)}}$$

These DW data were used to calculate root-to-shoot ratios (R/S).

## 2.8. Data analyses

The Gaussian distribution of the data was analyzed using a Shapiro-Wilk test (R 2.14.1). Mann-Whitney tests (non-parametric) were adjusted to each parameter measured in order to estimate the effects of  $\gamma$ HCH-exposures compared to controls. In order to get the global view effect of  $\gamma$ HCH-exposure on microbial metabolic activities, a Kruskal Wallis test considering time (T0, T14 and T28 days), soil type (rhizosphere and bulk soils, with or without plant),  $\gamma$ HCH-exposure (control *vs* exposed samples) was performed, then, a Mann-Whitney test was performed to determine significant conditions for all group of substrates (carbohydrates,

amino acids, polymers, carboxylic acids, phenolic compound, amines). Furthermore, a principal component analysis (PCA) was performed using the AUC for each substrate.

### 3. Results

#### 3.1. Soil variations in C and N pools in presence of $\gamma$ HCH

During the time-course experiment, no significant difference among soil types of controls and  $\gamma$ HCH-exposures were found for soil parameters such as soil water content ( $325.85 \pm 17.53\%$ ), soil pH ( $5.91 \pm 0.03$ ) and nitrate ( $\text{N-NO}_3^-$ ) contents (Table 1).

**Table 1. Effect of  $\gamma$ HCH contamination (control vs  $\gamma$ HCH-exposure) on soil properties, N and C pools, and microbial communities in bulk and rhizosphere soils collected from pots with or without plants.**

Values represent percentage of increase (+)/decrease (-) of  $\gamma$ HCH effects compared to control. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*,  $P < 0.05$ ; ns: not significant).

	Bulk soil			Bulk soil/plant		Rhizosphere soil	
	T0	T14	T28	T14	T28	T14	T28
<b>(a) Soil parameters</b>							
Percentage of humidity	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
pH	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>(b) Soil N pools</b>							
N- $\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	ns		
N- $\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	-0.13% *	ns	-4.69% *	ns	ns		
Ratio N- $\text{NO}_3^-$ :N- $\text{NH}_4^+$	ns	ns	ns	ns	ns		
N-TDN ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	0.71% *	-1.47% *	ns
N-DON ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	0.69% *		
<b>(c) Soil C pools</b>							
C ( $\text{mg g}^{-1}$ soil)	0.95% *	-1.10% *	0.95% *	ns	ns	-1.29% *	ns
<b>(d) Soil C:N</b>							
	ns	ns	ns	ns	ns		
<b>(e) Microbial N pools</b>							
Microbial biomass ( $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil)	-1.93% *	ns	-1.56% *	ns	ns		
PNM ( $\text{mgN g}^{-1}$ biomasse. day $^{-1}$ )	-2.95% *	ns	-2.17% *	ns	-1.81% *		

This observation was valid with or without plants. Decreases in soil N- $\text{NH}_4^+$  contents were only  $\gamma$ HCH-influenced in bulk soils without plant. In bulk soils with plant increases in N-TDN and N-DON contents were induced by  $\gamma$ HCH contamination (Table 1). Both N-TDN and N-DON rises were significant only at T28. On the other hand, rhizosphere soil N-TDN contents showed significant decrease at T14, and then, a similar content to the controls at T28.

The  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  ratio was not affected by  $\gamma\text{HCH}$  contamination in bulk soils with plant or without plant.

$\gamma\text{HCH}$  contamination influenced DOC contents of bulk soils when plants were absent (Table 1). This parameter was significantly time dependent, with increasing DOC pools at T0 and T28, and conversely decreasing at T14. In the case of soil with plant, DOC contents were similar to the controls in bulk soil samples, while a significant decrease was noticed in rhizosphere soils only at T14. Finally, the soil C:N ratio was not affected by  $\gamma\text{HCH}$  contamination in bulk soils with plant and without plant.

### **3.2. $\gamma\text{HCH}$ effects on bulk soil and rhizospheric microbial characteristics**

The soil microbial biomass was impacted by  $\gamma\text{HCH}$ -exposure only in bulk soils without plant (Table 1). Indeed, there were a small but significant decrease of the microbial biomass at T0 and T28 (respectively -1.93% and -1.56%). Contrastingly, in presence of plants, the microbial biomass of bulk soils was not affected by  $\gamma\text{HCH}$ -exposure. Microbial nitrogen mineralization potentials (PNM) was  $\gamma\text{HCH}$ -impacted as a significant decrease in bulk soils without plant at T0 and T28 (-2.95% and -2.17%, respectively) was found (Table 1). The same pattern of  $\gamma\text{HCH}$ -effects was observed in bulk soils with plant, with a significant decrease (-1.81%) at T28.

$\gamma\text{HCH}$ -effects on the microbial community level physiological profile (CLPP) –based on cultivable heterotrophic bacteria- were assessed using Biolog EcoPlates. The time-lapse of the experiment (T0, T14 and T28) had a significant ( $p < 0.001$ ) impact on the consumption of all carbon source groups (except for carboxylic acids (Table 2). Microbial community from diverse soil types (bulk and rhizosphere soils with or without plant) showed significant differences in the utilization of amino acids ( $p < 0.001$ ), phenolic compounds ( $p < 0.001$ ) and

carboxylic acids ( $p < 0.05$ ). Interestingly,  $\gamma$ HCH-exposure did not significantly affect the microbial catabolic activities.

**Table 2. The assessment of parameters influencing the metabolic signatures of soil microbial communities.**

Time: the time-lapse experiment, T0/T14/T28.

Soil type: the distinction between bulk and rhizosphere soils with and without plant.

$\gamma$ HCH-exposure: the distinction between pots exposed to  $\gamma$ HCH and control pots.

Statistical analysis was performed with Kruskal Wallis test (Line time, soil type and  $\gamma$ HCH-exposure in bold) then Mann-Whitney test when it was significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns: not significant).

	All	Carbohydrates	Amino acids	Polymers	Carboxylic acids	Phenolic compound	Amines
<b>Time</b>	***	***	***	***	ns	***	***
T0-T14	ns	ns	ns	ns		ns	ns
T0-T28	***	***	***	*		**	**
T14-T28	***	***	***	***		***	***
<b>Soil type</b>	ns	ns	***	ns	*	***	ns
Bulk soil – Bulk soil with plant			**		ns	***	
Bulk soil with plant- Rhizosphere soil			ns		ns	ns	
Bulk soil- Rhizosphere soil			**		**	***	
<b><math>\gamma</math>HCH-exposure</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

This result was confirmed by the principal component analysis aiming at the discrimination of each carbon substrate utilization between all conditions (Samples of T0, T14 and T28 on the same model). Thus, the first principal component (PC1 63%) clearly separated bacterial populations isolated at T0 and T14 from those collected at T28. The second principal component (PC2 23%) separated bacterial populations isolated from bulk soils without plant (exposed to  $\gamma$ HCH or control) from those from bulk and rhizosphere soils with plant (exposed to  $\gamma$ HCH or control). Therefore, there was a clear discrimination between the microbial CLPP between soil types (bulk and rhizosphere soils with or without plant) and the sampling time

(T0/T14 and T28). The PCA confirmed that  $\gamma$ HCH did not significantly affect the microbial CLPP in all considered soil compartments (Fig 2).

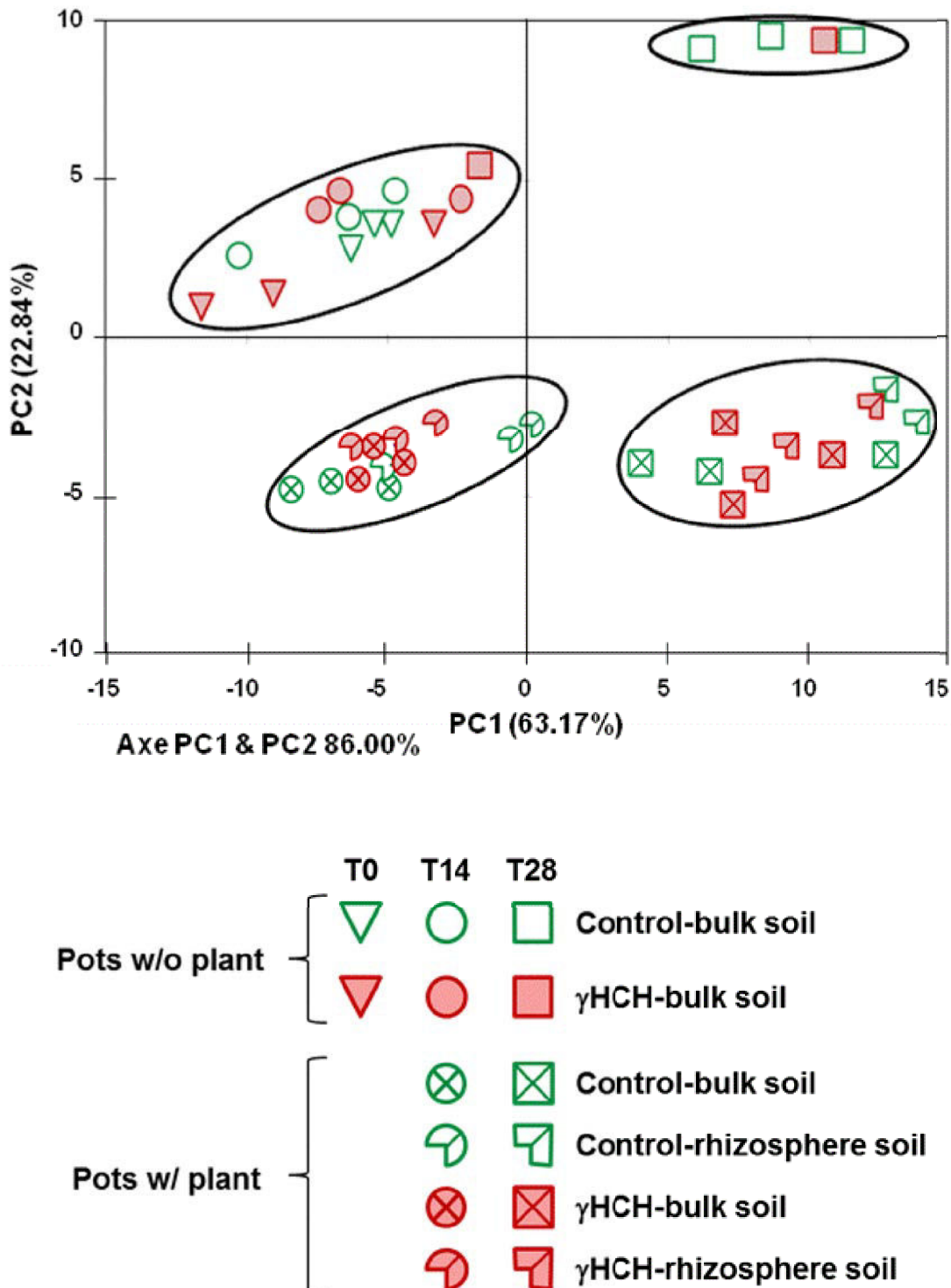


Figure 2. Principal Component analysis (PCA) of microbial community level physiological profiles in different soil types from controls and exposed to  $\gamma$ HCH, at diverse times (T0, T14 and T28).

We also studied each sampling time individually to evaluate if there was an evolution in carbon sources utilization (Fig. S3, Annexe 3). First, the evaluation of carbon utilization patterns from bulk soil samples at T0 revealed a consistent  $\gamma$ HCH effect along the first principal component (PC1 61%): the functional abilities of soil microbial community were affected by  $\gamma$ HCH (Fig S3A, Annexe 3). The most important carbon sources that discriminated control and  $\gamma$ HCH groups were 2-hydroxy-benzoic acid for  $\gamma$ HCH group and d-glucoside, D-xylose, Tween 40,  $\alpha$ -cyclodextrin, N-acetyl-d glucosamine, glucose 1 phosphate and Tween 80 for control group. On the contrary, at T14 and T28, the evaluation of carbon utilization patterns from bulk soil samples with and without plant revealed an absence of  $\gamma$ HCH effect (Fig S3B, C; Annexe 3). Nevertheless, two groups of carbon utilization appeared which corresponded on the one hand of bulk soil samples without plant and, on the other hand, of bulk and rhizosphere soils with plant. Besides, we highlighted that in pots with plants (bulk and rhizospheric soils), 4 carbon sources explained the PCA discrimination at time T14 and T28. It was 4-hydroxy-benzoic acid, itaconic acid, phenylalanine and glycogen. The only distinction between carbon sources utilization between T14 and T28 was the importance of L-serine instead of L-asparagine, respectively.

### **3.3. $\gamma$ HCH-effects on plant biomass, growth and C:N pools**

There were slight effects of  $\gamma$ HCH-exposure on roots with a significant decrease of the specific root length (SRL) (-1.14%) only at T14 (not maintained at T28) and a significant increase of carbon contents in roots (0.95%) at T28 (Table 3).  $\gamma$ HCH-exposure did not affect leaves except for the surface leaf area (SLA), which was decreased significantly (-1.16%) only at T14 (Table 3).



**Table 3. Effect of  $\gamma$ HCH contamination (control vs  $\gamma$ HCH-exposure) on plant functional traits.**

Values represent percentage of increase (+)/decrease (-) of  $\gamma$ HCH effects compared to control. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*,  $P < 0.05$ ; ns: not significant).

	T14	T28
<b>(a) Leaves</b>		
Surface Leaf Area (SLA, cm <sup>2</sup> . g <sup>-1</sup> )	-1.16% *	ns
Leaf Dry Matter Content (LDMC)	ns	ns
C (mg g <sup>-1</sup> leaves)	ns	ns
N (mg g <sup>-1</sup> leaves)	ns	ns
C:N	ns	ns
<b>(b) Roots</b>		
Specific Root Length (SRL, cm. g <sup>-1</sup> )	-1.14% *	ns
Root Dry Matter Content (RDMC)	ns	ns
C (mg g <sup>-1</sup> roots)	ns	0.95% *
N (mg g <sup>-1</sup> roots)	ns	ns
C:N	ns	ns
<b>(c) Ratio R/S</b>		
	ns	ns

#### 4. Discussion

There is evidence that pesticides may have negative effects on soil global metabolic activities (hydrolases, oxidoreductases, dehydrogenases) (Riah et al., 2014). Nevertheless, the ecotoxicity of pesticides varies according to environmental factors (pH, organic matter...) and presence/absence of plant. In this study, changes regarding soil biological processes (C and N turn-over, biomass and enzymatic activities of microorganisms) under  $\gamma$ HCH stress were studied in standard soils with or without plant.

First, bulk soils without plant and exposed to  $\gamma$ HCH during 45 days (T0) were depleted in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents, microbial biomass, PNM and had higher DOC contents. The whole microbial community level physiological profile (CLPP) of these soils was also statistically different from control soil with an intensive use of certain phenolic substrates. With exposure time, a chrono-modulation was observed; with at T14 a similar pattern compared to control except for DOC content which was significantly decreased. Afterwards, the same disturbances as described above in T0 were observed at T28. Such results suggest an impact of  $\gamma$ HCH on the survival and/or the metabolic activities of ammonifying bacteria. This hypothesis is consistent with Bezchlebová et al. (2007) works, where toxaphene (OCP) was described as an inhibitor

of ammonification with a significant decrease in bacterial biomass without disturbing nitrification. The increase in C contents could be due to the input of  $\gamma$ HCH ( $C_6H_6Cl_6$ ). Moreover, OCPs did not show a clear effect on carbon cycle enzymatic activities. For example, Endosulfan is able to induce cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities at neutral pH but inhibited them at acidic pH (Riah et al., 2014). In this study, we observed at T14 that  $\gamma$ HCH moderately induced C cycle enzymatic activities.

In pots with plant, bulk soils showed completely different results than open soils (pots without plant) with an increase in N-TDN, N-DON and a decrease in PNM only at T28. Distinct carbon utilization profiles were also effectively observed. These results confirmed the hypothesis that a mild  $\gamma$ HCH inhibition of N cycle enzymatic activities (PNM decrease) could be offset by plant N releases. The plant effect on bulk soil biological processes was significantly observed here. Therefore, plant exudates (primary metabolites, enzymes) may maintain in bulk soil a sufficient microbial biomass showing a similar CLPP compared to controls. Moreover, the plant extracellular enzymes as amino acid oxidases (Yu and Qiao, 2012) could insure deamination of organic metabolites leading to the release of bioavailable ammonium for plants or microbes (Jones and Kielland, 2012).

In the rhizosphere, plants are known to release important quantities of C which can reach up to 40% of the photoassimilates (Gupta et al., 2014). The maize exudates are mainly composed of carbohydrates followed by carboxylic acid and a minority of amino acids (Schönwitz et al., 1989; Schilling et al., 1998). Nature and quantity of exudates are known to be modified by chemical stressors, physical or environmental stressors (Badri and Vivanco et al., 2009). Therefore, these high C inputs in the rhizosphere are able to support high levels of microbial activity with an intimately link between N cycle and C cycle during the mineralization and immobilization processes (Raynaud et al., 2006). In presence of  $\gamma$ HCH, N-

TDN and C contents in rhizosphere soils were significantly decreased at T14 but similar to controls at T28. Then, as previously demonstrated the ammonifying bacteria might be impacted by  $\gamma$ HCH on the short term (T14) but then exudates allowed the stimulation of bacteria resistant to  $\gamma$ HCH on the longer term (T28). The role of plants on microbial induction in terms of growth and pollutant-degrading activities was already demonstrated *via* various mechanisms as cometabolism, enhancement of bioavailability and improvement of soil aeration (Van Aken et al., 2004; Slater et al., 2011). However, the microbial rhizospheric CLPP was similar to bulk soil and controls. Such results are certainly plant species dependent, since it was previously demonstrated that bulk and rhizosphere soil with *C. Striatus* had microbial CLPP modifications under  $\gamma$ HCH exposure when compared to controls (Kidd et al., 2008).

Maize rhizosphere was able to provide sufficient exudates to maintain an efficient cycling of N and C even in the presence of  $\gamma$ HCH. Previous studies have demonstrated that rhizodegradation of  $\gamma$ HCH occurs in various plant species rhizosphere (*Cytisus sp.*, *Holcus sp.*, *Sesamum sp.*, cereals...) releasing chlorine ions (Gonzalez et al., 2003; Calvelo-Pereira et al., 2006; Kidd et al., 2008; Abhilash et al., 2010). Therefore,  $\gamma$ HCH effects on plant growth could be expected due to osmotic stress by dechlorination of  $\gamma$ HCH (Nelson and Mele, 2007). Maize plant growth was impacted by  $\gamma$ HCH exposure only at T14 according to SLA and SRL results, afterwards, its development was similar to controls. Same observations were obtained with *C. striatus* and *H. lanatus L.* during six months of  $\gamma$ HCH exposure, even if a significant decrease of *C. striatus* leaf biomass was observed (Kidd et al., 2008). With maize, the root-shoot (R/S) ratio was similar between control and exposed plants. An increase of the R/S means that growing conditions are more favorable and a R/S decrease pictures less favorable conditions (Harris et al., 1992). Thus, such a result confirmed an absence of effect of  $\gamma$ HCH

exposure on maize growth. Moreover, a significant increase in maize root C contents at T28 was observed, testifying of an efficient nutrition (insuring a great synthesis of photoassimilates) for maize plants and then, indirectly of an efficient soil microbial loop. In particular, some bacteria qualified as plant growth-promoting bacteria could also have increased plant tolerance to contaminants and improved plant growth (Huang et al., 2004; Weyens et al., 2009b). Furthermore, the time-evanescent of  $\gamma$ HCH effects on plant growth might be linked to the  $\gamma$ HCH disappearance enhanced by plants, either through adsorption or uptake by roots (Mueller et al., 2006) or through rhizodegradation (Huang et al., 2010).

## **5. Conclusion**

$\gamma$ HCH contamination induced a decrease in soil N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents in bulk soils of pots without plant and an increase in N-TDN and N-DON contents in bulk soil with plant. Microbial biomass and nitrogen mineralization potentials were reduced by  $\gamma$ HCH-exposure only in bulk soils in pots without plant. Nevertheless,  $\gamma$ HCH did not impact the microbial community level physiological profile. Finally,  $\gamma$ HCH-effects on plant traits showed a significant but temporary decrease of the specific root length and the surface leaf area at T14, followed by a full recovery after 28 days of exposure. Therefore, these results indicate an enhanced resilience of the soil functioning when plants were present. Overall, the maize rhizosphere functionality is sustained after 28 days of exposure to  $\gamma$ HCH, which could efficiently participate to remediation of contaminated soils.

## **Acknowledgement**

Funding for this project was provided by a grant from the Rhône-Alpes Région. The authors wish to thank Kim Barrett (Version Originale) for correcting their proofreading.

## References

- Abhilash PC. & Singh N., 2009. Pesticide use and application: An Indian scenario. *Journal of hazardous materials* 165(1-3): 1-12
- Abhilash PC. & Singh N., 2010. *Withania somnifera* Dunal-mediated dissipation of lindane from simulated soil: implications for rhizoremediation of contaminated soil. *Journal of soils and sediments* 10(2): 272-282
- Alvarez A., Yanez ML., Benimeli CS. & Amoroso M.J., 2012. Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 66(1): 14-18
- Bais HP., Weir TL., Perry LG., Gilroy S., Vivanco JM., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology* 57: 233-266
- Badri, DV Vivanco, JM., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant cell and environment* 32(6): 666-681
- Baudoin E., Benizri E. & Guckert A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 35(9): 1183-1192
- Bell C., Carrillo Y., Boot CM., Rocca JD., Pendall E., Wallenstein MD., 2014. Rhizosphere stoichiometry: are C : N : P ratios of plants, soils, and enzymes conserved at the plant species-level? *New phytologist* 201(2): 505-517
- Bezchlebova, J; Cernohlavkova, J; Lana, J; Sochova, I; Kobeticova, K; Hofman, J., 2007. Effects of toxaphene on soil organisms *Ecotoxicology and environmental safety* 68(3): 326-334
- Blondel, C ; Melesan, M; Miguel, AS; Veyrenc, S; Meresse, P; Pezet, M; Reynaud, S ; Raveton, M., 2014. Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots. *Journal of hazardous materials* 276: 312-322
- Bonkowski, M. 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited *New phytologist* 162(3): 617-631
- Calvelo Pereira, R., Camps-Arbestain, M., Garrido, BR., Macias, F., & Monterroso, C., 2006. Behaviour of alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution*, 144(1), 210-217
- Chopra A.K., Sharma MK., Chamoli S., 2011. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system-an overview. *Environmental Monitoring and assessment* 173(1-4): 905-916
- Chouychai W., Lee H., 2012. Phytotoxicity Assay of Crop Plants to Lindane and Alpha-endosulfan Contaminants in Alkaline Thai Soil. *International journal of agriculture and biology* 14(5): 734-738

- Desalme D., Binet P., Chiapusio G., 2013. Challenges in Tracing the Fate and Effects of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Deposition in Vascular Plants. *Environmental science & technology* 47(9): 3967-3981
- Faure M, San Miguel A., Ravanel P., Raveton M., 2012. Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Environmental pollution* 164: 188-194
- Fester T., Giebler J., Wick LY., Schlosser D. & Kastner M., 2014. Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 168-175
- Gerhardt KE., Huang XD., Glick BR., Greenberg BM., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci* 176: 20–30
- Gheju M., Stelescu I., 2013. Chelant-assisted phytoextraction and accumulation of Zn by *Zea mays* *Journal of environmental management* 128: 631-636
- Gonzalez M., Miglioranza KSB., de Moreno J.E.A., & Moreno V.J., 2003. Organochlorine pesticide residues in leek (*Allium porrum*) crops grown on untreated soils from an agricultural environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5024-5029.
- Grigulis K., Lavorel S., Krainer U., Legay N., Baxendale C., Dumont M., Kastl E., Arnoldi C., Bardgett RD., Poly F., Pommier T., Schloter M., Tappeiner U., Bahn M., Clement JC., 2013. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services *Journal of ecology* 101(1): 47-57
- Gupta DK., Chatterjee S., Datta S., Veer V., & Walther C., 2014. Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere*, 108, 134-144.
- Harris RW., 1992. Root-Shoot ratios. *Journal of Arboriculture* 18(1): 39-42
- Huang ZY., Bonsall RF., Mavrodi DV., Weller DM., Thomashow LS., 2004. Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production *FEMS microbiology ecology* 49(2): 243-251
- Huang YH., Ren GL., Wei L., Wu XL., Yuan HM., Song KP., 2010. Analysis of Microbial Community Succession in Daqing Oil Field Edited by: Du, ZY; Sun, XB *Environment materials and environmental management PTS 1-3 Book Series: Advanced Materials Research* 113-116 Pages: 830-834 Part: 1-3
- Jones DL., Kielland K., 2012. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil *Soil biology & biochemistry* 55: 60-69
- Kidd PS., Prieto-Fernandez A., Monterroso C., Acea MJ., 2008. Rhizospheremicrobial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant Soil* 302: 233–247
- Legay N., Grassein F., Robson TM., Personeni E., Bataille MP., Lavorel S., Clement JC., 2013. Comparison of inorganic nitrogen uptake dynamics following snowmelt and at peak biomass in subalpine grasslands *Biogeosciences* 10(11): 7631-7645

- Li XY., Wang L., Wang ZM., Zhang HH., Su R., Xu X., Zhang, HQ., 2011. Ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace hollow fiber microextraction of pesticides from root of *Panax ginseng* C.A. Mey. *Journal of separation science* 34(13): 1582-1589
- Martin BC., George SJ., Price CA., Ryan MH., Tibbett M., 2014. The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions *Science of the total environment* 472: 642-653
- Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment international* 37(8): 1362-1375
- Mercier A., Dictor MC., Harris-Hellal J., Breeze D., Mouvet C., 2013. Distinct bacterial community structure of 3 tropical volcanic soils from banana plantations contaminated with chlordecone in Guadeloupe (French West Indies). *Chemosphere* 92(7): 787-794
- Merlin A., He ZLL., Rosolem CA., 2013. Ruzigrass affecting soil-phosphorus availability. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 48(12): 1583-1588
- Mo CH., Cai QY., Li HQ., Zeng QY., Tang SR., Zhao YC., 2008. Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soil *Chemosphere* 73(1): 120-125
- Mukherjee I., Kumar A., 2012. Phytoextraction of Endosulfan a Remediation Technique. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 88(2): 250-254
- Mueller KE., Mueller-Spitz SR., Henry HF., Vonderheide AP., Soman RS., Kinkle BK., Shann JR., 2006. Fate of pentabrominated diphenyl ethers in soil: Abiotic sorption, plant uptake, and the impact of interspecific plant interactions *Environmental science & technology* 40(21): 6662-6667
- Nelson DR., Mele PM., 2007. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biol Biochem* 39:340-351
- Nie M., Yang QA., Jiang LF., Fang CM., Chen JK., Li B., 2010. Do plants modulate biomass allocation in response to petroleum pollution? *Biology letters* 6(6): 811-814
- Puglisi E., Fragoulis G., Ricciuti P., Cappa F., Spaccini R., Piccolo A., Trevisan M., Crecchio C., 2009. Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.) *Chemosphere* 77(7): 829-837
- Raynaud X., Lata JC., Leadley PW., 2006. Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C : N model of plant-microbial interactions *Plant and soil* 287(1-2): 95-116
- Riah W., Laval K., Laroche-Ajzenberg E., Mouglin C., Latour X., & Trinsoutrot-Gattin I., 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 12(2), 257-273.
- San Miguel A., Roy J., Gury, J., Monier A., Coissac E., Ravanel P., Geremia RA., Raveton, M., 2014. Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere. *Applied microbiology and biotechnology* 98(9): 4257-4266



- San Miguel A., Schroder P., Harpaintner R., Gaude T., Ravanel P., Raveton M., 2013. Response of phase II detoxification enzymes in *Phragmites australis* plants exposed to organochlorines. *Environmental science and pollution research* 20(5): 3464-3471
- Schilling G., Gransee A., Deubel A., Lezovic G., Ruppel S., 1998. Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 161 465–478.
- Schönwitz R., Ziegler H., 1982. Interaction of maize roots and rhizosphere microorganisms, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152: 217–222
- Segura A., Ramos JL., 2013. Plant-bacteria interactions in the removal of pollutants. *Currenty opinion in biotechnology.* 24(3): 467-47
- Shahsavari E., Adetutu EM., Anderson PA., Ball AS., 2013. Tolerance of Selected Plant Species to Petrogenic Hydrocarbons and Effect of Plant Rhizosphere on the Microbial Removal of Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Water air and soil pollution* 224(4): 1495
- Slater H., Gouin T., Leigh MB., 2011. Assessing the potential for rhizoremediation of PCB contaminated soils in northern regions using native tree species. *Chemosphere* 84(2): 199-206
- Somtrakoon K., Pratumma S., 2012. Phytotoxicity of heptachlor and endosulfan sulfate contaminants in soils to economic crops. *Journal of environmental biology* 33(6): 1097-1101
- Vaas LAI., Sikorski J., Michael V., Goker M., Klenk HP., 2012. Visualization and Curve-Parameter Estimation Strategies for Efficient Exploration of Phenotype Microarray Kinetics. *Plos one.* 7(4)
- Van Aken B., Yoon JM., Just CL., Schnoor JL., 2004. Metabolism and mineralization of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine inside poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN-34) . *Environmental science & technology.* 38 (17) : 4572-4579
- van der Heijden MGA., Verkade S., de Bruin SJ., 2008. Mycorrhizal fungi reduce the negative effects of nitrogen enrichment on plant community structure in dune grassland. *Global change biology.* 14(11) : 2626-2635
- Vijgen J., Abhilash PC., Li YF., Lal R., Forter M., Torres J., Singh N., Yunus M., Tian CG., Schaffer A., 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental science and pollution research.*18(2) : 152-162
- Qiao G., Wen XP., Yu LF., Ji XB., 2012. Identification of differentially expressed genes preferably related to drought response in pigeon pea (*Cajanus cajan*) inoculated by arbuscular mycorrhizae fungi (AMF).*Acta physiologiae plantarum.* 34(5) : 1711-1721
- Weber KP., Grove JA., Gehder M., Anderson WA., Legge RL., 2007. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. *Journal of microbiological methods.* 69(3): 461-469
- Weyens N., Van Der Lelie D., Artois T., Smeets K., Taghavi S., Newman L., Carleer R., Vangronsveld J., 2009. Bioaugmentation with Engineered Endophytic Bacteria Improves

Contaminant Fate in Phytoremediation. *Environmental science & technology* 43(24): 9413-9418

White JC., 2001. Plant-facilitated mobilization and translocation of weathered 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene (p,p'-DDE) from an agricultural soil. *Environ ToxicolChem* 20: 2047–2052

## 3.2. Fonctionnalité de la rhizosphère de Zea mays en présence de chlordécone

### 3.2.1. Publication IV

**Publication IV:** Exploring the maize rhizosphere functionality after exposure to the organochlorine, chlordécone

**Auteurs:** Claire Blondel<sup>a,b</sup>, Loïc Briset<sup>a,b</sup>, Cindy Arnoldi<sup>a,b</sup>, Frank poly<sup>c</sup>, Florence Fauvelle<sup>d</sup>, Jean-Christophe Clément<sup>a,b</sup>, Muriel Raveton<sup>a,b,\*</sup>

**Participation:** Encadrement et réalisation des expériences, Analyses des résultats, Réalisation des figures, Rédaction

**Publication en préparation pour Environmental Science and Technology**

<sup>a</sup>Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>b</sup>Université de Grenoble - Alpes, France

<sup>c</sup>UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France

<sup>d</sup>IRBA, 91220 Bretigny sur Orge, France

**\*Author for correspondence:**

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Tel: 00 33 476 51 46 80

Fax: 00 33 476 51 44 63

E-mail: [muriel.raveton@ujf-grenoble.fr](mailto:muriel.raveton@ujf-grenoble.fr)

## ABSTRACT

Organochlorine pesticides may have potential effects on rhizosphere functionality; disturbing the composition of root exudates, the nutrient turnover and availability. We setup a pot experiment to study the dynamic changes in the rhizosphere functionality of maize plants grown in chlordecone (CLD) contaminated soils at a relevant environmental dose (6.86 mg kg<sup>-1</sup>). Effects of CLD were measured on soil parameters (pH, C and N contents), potential soil nitrogen mineralization, soil microbial biomass and community level physiological profile, above-/below-ground plant traits and metabolic phenotyping of roots using high-resolution magic-angle-spinning <sup>1</sup>H-NMR. Decreases in soil N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents were CLD-influenced in both bulk soils without plant at T0 and with plant at T14. Microbial biomass and nitrogen mineralization potential were reduced by CLD-exposure in bulk soils with and without plant. C-contents increased in bulk soils with and without plant. Contrastingly, CLD did not impact the microbial community level physiological profile in pots with plant while, in soils without plant, some significant changes were noted. . Moreover, CLD seemed to increase amino acids and organic acids in root exudates conferring a functional nutrient turnover in bulk soil and rhizosphere. Plants in presence of CLD showed optimal growth with elevated C-contents in roots and leaves when compared to controls. Overall, the maize rhizosphere functionality was sustained after 28 days of exposure to CLD and might efficiently participate to its remediation in contaminated soils.

## INTRODUCTION

Chlordecone (decachloropentacyclodecan-5-one, CLD) is an organochlorine pesticide (OCP) with high persistence in terrestrial ecosystems, high bioaccumulation/biomagnification (Coat et al., 2006 et 2011), and high suspicion to be carcinogenic and endocrine disruptors (Multigner et al., 2010; Giusti et al., 2013). Although CLD has been banned of used (C.N.524.2009.TREATIES-4, Stockholm Convention, 2009), it is still a major soil contaminant and, by dissipation, of food-crops, waters and aquatic biota (Coat et al. 2011; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). The soil contamination with CLD is heterogeneous, with hot spots containing 1.8-10 mg kg<sup>-1</sup> and up to 10 g kg<sup>-1</sup>, respectively in agricultural and former industrial sites (Epstein, 1978; Levillain et al., 2012). Furthermore, CLD has been shown to be strongly resistant to biotic and abiotic degradations (Cabidoche et al., 2009; Dolfing et al., 2012).

Soils exposed to CLD long-term contamination may present extreme challenges to find remediation solutions. It has been demonstrated that plants constitute an important sink for OCPs, as they are able to retain them efficiently in their tissues (mainly roots or tubers) by partition/diffusion processes (Hulster et al., 1994; Dubuisson et al., 2007; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012; San Miguel et al., 2013). Plants also maintain in their rhizosphere a richness of microbial communities capable of bioaccumulating OCPs (Alvarez et al., 2012; San Miguel et al., 2014). Therefore rhizosphere (soil area that is physically, chemically, or biologically altered by the presence of plant roots; Gerhardt et al., 2009) appeared as a key core system which might insure an efficient management of CLD, especially through rhizospheric retention to control further release of CLD from contaminated soils towards other compartments. The prerequisite for such remediation strategy is the sustainability of the rhizosphere system in terms of volume/density, functionality, microbial

abundance/biodiversity (Megharaj et al., 2011). Previous studies have shown (i) that plants without rhizospheric microbial association showed OCP-dose dependent toxic effects (Faure et al., 2012; San Miguel et al., 2012; Blondel et al., 2014) and (ii) that microbial community structure considerably differed in function of OCP-dose exposures (Kidd et al., 2008; Mercier et al., 2013; San Miguel et al., 2014). However, changes in community structure do not necessarily imply changes in microbial community functions due, for instance, to functional redundancy (Schimel et al., 2005). Moreover, rhizospheric chemical processes involved in plant-microorganisms exchanges are largely unraveled and OCP effects on this relationship are unknown. Understanding plant-microbial functionality in contaminated soil and in its rhizosphere is crucial to the successful development and use of bioremediation technologies. To our knowledge, no attempt has been made to evaluate the influence of environmental dose of OCPs on the rhizosphere functionality using an integrated plant metabolomics/microbial sole-carbon-source utilization profiles/key nutrient cycling dynamics approach.

Metabolomic approaches have been successfully used to study a variety of plant-environmental biotic interactions (Kushalappa and Gunnaiah, 2013) exposed to abiotic environmental stressors such as drought, salt, temperature and nutrients (Sardans et al. 2011; Rodziewicz et al. 2014). However, few studies have examined the plant metabolome in response to environmental contaminants (Aliferis et al., 2009; Kluender et al., 2009; Trenkamp et al., 2009; Lubbe et al., 2012; Li et al., 2014; Blondel et al., publication II). To understand the response mechanisms of plants exposed to OCPs, <sup>1</sup>H-HRMAS NMR (high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance) spectroscopy was used. This approach permits the analysis of samples without laborious pre-treatments and also the access to their global profile of low molecular weight (1,000 Da) metabolites (Blondel et al., publication II). Obviously, a combination of plant metabolomics and microbial sole-carbon-source utilization profiles could potentially complement one another, when testing the effects

of OCPs on the rhizosphere functionality. Biolog EcoPlates™ have been typically designed for ecological study of whole microbial community level physiological profile (CLPP) (Weber et al., 2007). Nine of the 31 carbon substrates provided to microbes are known as components of exudates of plants roots (Campbell et al., 1997; Baudoin et al., 2003). It has been shown that the maize rhizosphere harbors distinct bacterial communities in comparison to bulk soil, presumably due to plant exudates selecting for and/or stimulating rhizobacterial communities (Baudoin et al., 2002). Another consideration is that OCPs potential effects on rhizosphere functionality may disturb nutrient turnover and availability, all the more that bacteria and plants compete for nutrients (Van der Heijden et al., 2008). Therefore, possible negative feedbacks on plant nutrient acquisition, growth and carbohydrate allocation may be suspected (Nie et al., 2010; Desalme et al., 2013). Characterizing such effects in the presence of OCPs remains an important goal of fundamental ecological understanding, with possibly significant consequences for remediation developments.

In this study, we used maize (*Zea mays*), one of the major crops worldwide, which is able to cope with excessive levels of OCPs (Mo et al., 2008; Chouychai and Lee, 2012; Mukherjee and Kumar, 2012; San Miguel et al., 2012; Somtrakoon and Pratumma, 2012; Gheju and Stelescu, 2013; Shahsavari et al., 2013; Blondel et al., 2014). First, a <sup>1</sup>H-HRMAS NMR spectroscopy method using sterile 7-day maize root tips was used to study the metabolic changes caused by CLD at different levels of exposure. Multivariate analyses were used to evaluate the variation patterns for significantly changed metabolites relative to interaction with CLD exposure. Secondly, a pot experiment was conducted during 1 month to study the dynamic changes in the rhizosphere functionality of maize plants grown in CLD contaminated soils at an environmentally relevant dose (6.86 mg kg<sup>-1</sup>). The specific objectives of this study were to monitor the temporal variation in (1) soil carbon and nitrogen contents and the nature



of the mineral forms, (2) microbial biomass and CLPP, and (3) plant growth (specific plant functional traits on roots and leaves).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sterilisation of maize seeds**

Maize seeds (*Zea mays* L., Golden Bantam; Graines Baumaux, France) were surface sterilized in ethanol:water (v/v 8:2) for 30s and then in sodium hypochlorite:water (w/v 5:100) for 2 min before washing several times in sterilized distilled water (San Miguel et al., 2012).

### **Sterile conditions of maize seedling growth and root metabolome analyses**

Sterile seeds were then germinated in sterile pots (3seeds/pot) containing Hoagland nutritive solution with (i) 0.05 % of ethanol (used to dissolve CLD) for control plants, (ii) CLD environmentally relevant concentration ( $0.04 \text{ mg L}^{-1}$ ) and (iii) high CLD exposure (at its water limit solubility:  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ). All plants were cultivated under controlled conditions (obscurity,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Root tips (1mm from the apex, one spectrum with 6 independent radicles pooled, 10 replicates) of 7-days maize seedlings were collected, and prepared for  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR analyses as described by Blondel et al. (publication II). Data acquisition, pre-treatment and multivariate statistical analyses of  $^1\text{H}$  NMR spectra were performed as detailed in Supporting Information (Annexe 4).

### **Soil conditioning and experimental design**

Standard soil (Compost composition (dry weight), 1.1% N, 38.2% C; Botanic, France) were sieved at 5.6 mm and divided in pots of 70 g fresh weight (FW). The soils were sprayed every two days with a solution of water containing 0.05% of ethanol (used to dissolve CLD; batch control, n=30) and  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of CLD (water solubility) during 45 days under controlled

conditions (16h/8h (day/night);  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The final CLD concentration was  $6.86 \text{ mg kg}^{-1}$  in soil. This time was the Time 0 (T0) of the experiment (Fig. S1, Annexe 4). Sterile seeds pre-germinated in sterile petri dishes were planted in soils (1 seed/pot) contaminated or not-contaminated with CLD. All plants were cultivated under controlled conditions (16h/8h (day/night);  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). After 14 and 28 days, plantlets were harvested and dissected. To collect rhizosphere, the roots were manually shaken and then introduced in a phosphate buffer solution (PBS) during 1h under stirring. Afterwards, solutions were centrifuged at 9000 rpm during 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Supernatants and pellets were stored separately at  $-20^\circ\text{C}$ . Plantlets, rhizosphere and bulk soils were collected and stored at  $-20^\circ\text{C}$  for further analyses.

#### **Rhizosphere and bulk soil nitrogen contents**

Extraction of mineral N forms ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) was performed by addition of 50 mL of  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.5 M) to fresh soil (rhizosphere and bulk soils, 10 g FW) and stirring at 250 rpm for 1h as described in Legay et al. (2013). Solutions were then filtered on Whatman filters (porosity  $2.5 \mu\text{m}$ ) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis by colorimetric spectrophotometry (FS-IV, OI-Analytical Corp., Bioritech, France). Total dissolved nitrogen (TDN) contents were measured as nitrate after digestion of  $\text{K}_2\text{SO}_4$  soil extracts : 1 mL of oxide persulfate ( $52 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $31.2 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ , 50 mL NaOH 3.75 M) was added to 5 mL of soil extract and autoclaved at  $121^\circ\text{C}$  for 1h. The analysis of total C and N contents in rhizosphere and bulk soils was performed on dried samples (7 days,  $60^\circ\text{C}$ ). Afterwards, 10-20 mg DW of each soil sample were collected, ground and analyzed by a CHONS elemental analyzer (Flash EA1112, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) (Grigulis,2013).

#### **Rhizospheric dissolved organic carbon (DOC) contents**

Rhizospheric supernatant was incubated with two drops of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (97%) (1 week, obscurity,  $4^\circ\text{C}$ ). Inorganic carbon was eliminated with HCl. DOC was burned ( $680^\circ\text{C}$ ) releasing  $\text{CO}_2$

which was measured by gas chromatography (TOC-5000A Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). DOC was expressed as mg N g<sup>-1</sup> dry weight (DW).

### **Soil microbial characterization**

For assessing the microbial biomass, soils (10 g FW) were exposed to chloroform fumigation during 7 days. Then, soils were shaken at 250 rpm with K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 M) during 1h (Legay et al., 2013). Afterwards, total dissolved nitrogen was measured by colorimetric spectrophotometry (FS-IV), compared to non-fumigated TDN contents and expressed as µgN g<sup>-1</sup> DW. Potential nitrogen mineralization (PNM) rates were obtained from soils (10 g FW) incubated in water (50 mL, 7 days, 40°C, anaerobic conditions) and subsequently analyzed for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents by colorimetric spectrophotometry (FS-IV). PNM (µgN g<sup>-1</sup> biomass day<sup>-1</sup>) corresponded to the difference in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> soil contents between day 0 and day 7 (Grigulis et al., 2013). The whole microbial community level physiological profile (CLPP) was characterized using Biolog Ecoplate® (BIOLOG Inc., Hayward, USA) as described in Blondel et al. (publication III). Plates were inoculated with 150 µL of the soil suspension and incubated in the dark at 26°C for 3 days. The number of pixels was automatically recorded every 15min by the OmniLog® (Biolog, Hayward, U.S.A) reader in conjunction with the module D5E data converter (V.1.2) and Kinetic (V.1.3) softwares. The catabolic kinetics were analyzed using the area under the curve (AUC) because this parameter integrates the lag phase, the slope and the maximum of number of pixels as described in Vaas et al. (2012). For each sampling date and each soil type, 3 plates were analyzed per treatment.

### **Plantlet C and N contents, and biometry**

C and N contents were measured on leaves and roots as described above using a CHONS elemental analyzer (FS-IV; OI-Analytical Corp., Bioritech, France). Roots and leaves were weighted (FW), scanned (EPSON Perfection V300) and analyzed with the WinRhizo software

(Regent Instruments Inc., Canada) to determine the surface of leaves and the root length. Samples were then dried at 60°C for 48h to obtain dry weight (DW). Therefore, the specific leaf area (SLA), the leaf dry matter content (LDMC), the specific root length (SRL), and the root dry matter content (RDMC) were determined as described in Blondel et al. (publication III). These DW data were used to calculate root-to-shoot ratios (R/S).

### **Data analyses**

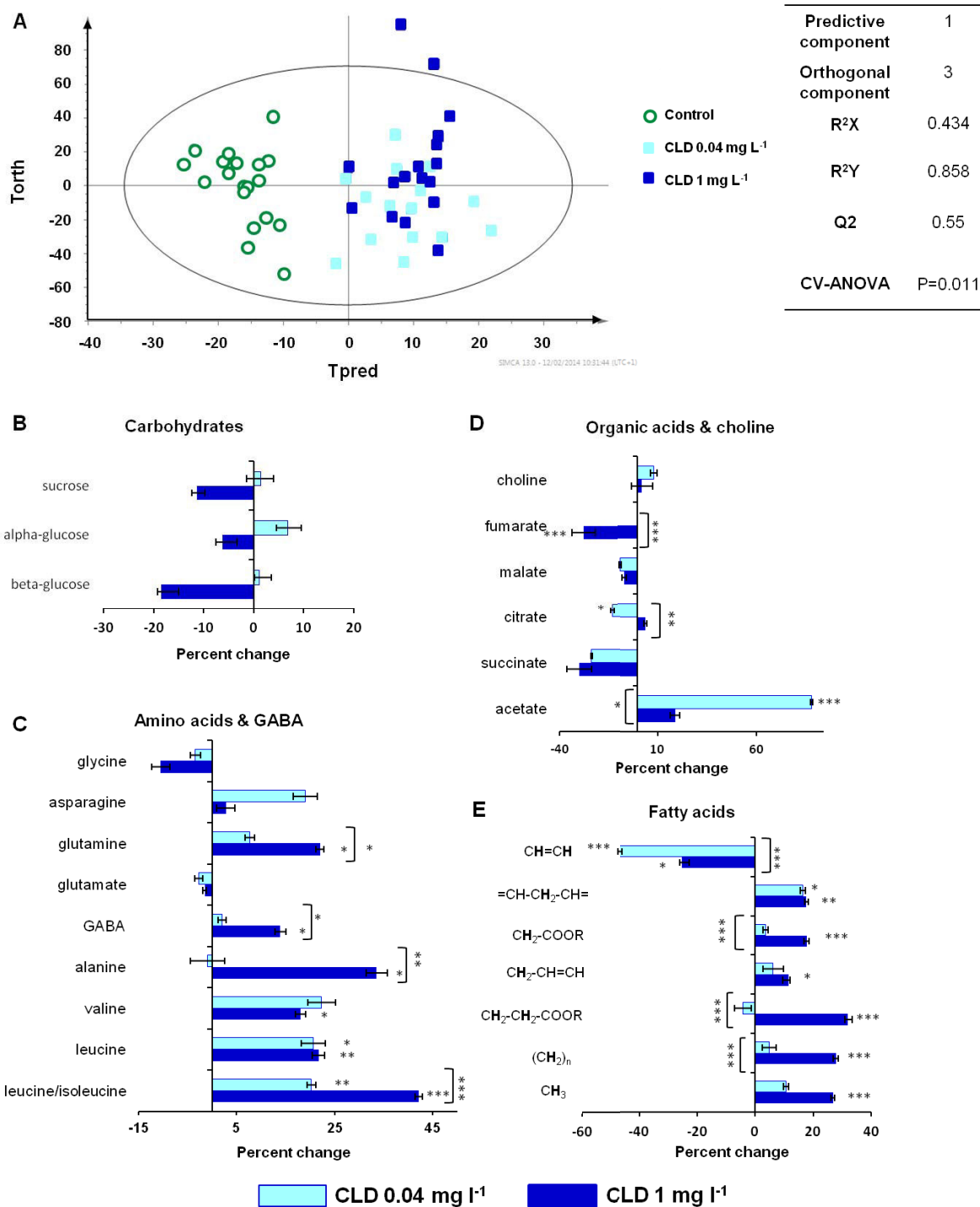
The Gaussian distribution of the data was analyzed using a Shapiro-Wilk test (R 2.14.1). Mann-Whitney tests (non-parametric) were adjusted to each parameter to estimate the effects of exposure to CLD compared to controls.

In order to get the global view of CLD-exposure effects on microbial metabolic activities, a Kruskal Wallis test considering time (T0, T14 and T28 days), soil type (rhizosphere and bulk soils, with or without plant), CLD-exposure (control vs exposed samples) was performed, then, a Mann-Whitney test was done to determine significant conditions for all groups of substrates (carbohydrates, amino acids, polymers, carboxylic acids, phenolic compound, amines). Furthermore, a principal component analysis (PCA) was performed using the AUC for each substrate.

## **RESULTS**

### **Maize root metabolome changes in response to CLD exposures**

Supervised orthogonal partial least square discriminant analyses (OPLS-DA) were performed to determine the strength and significance of the differences between exposed and control maize root metabolomes. Score plots showed significant separation between control and samples exposed to CLD. The OPLS-DA model was robust ( $R^2Y = 0.858$ ,  $Q^2Y = 0.55$ ) with a highly significant CV-ANOVA test ( $p = 0.011$ ; Fig. 1A).



**Figure 1. Changes in metabolome of CLD-exposed root tips compared to the controls. (A)** Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA) scores on <sup>1</sup>H-HRMAS NMR spectra of maize root tip controls and exposed to CLD (0.04 & 1 mg L<sup>-1</sup>). (B-E) Percentage (%) of changes in the sum of bucket of metabolites identified on the S-line of CLD-exposed root tips compared to the controls. (B) carbohydrates, (C) amino acids and GABA, (D) organic acids and choline, (E) fatty acids. Bars represent mean ± SE values for 10 replicates. The statistical analysis was performed using a t-test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values or between the two CLD-dose exposure values: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.0001.

Thirty metabolites were identified (Fig. S2, Annexe 4) and distributed in 5 main classes: carbohydrates, amino acids, tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates, fatty acids and others. The OPLS-DA S-plot loadings were generated to identify the metabolites responsible for the differentiation between control and CLD exposed maize roots (Fig. S3, Annexe 4). The signals in the spectrum were associated with the significance of metabolites in characterizing the NMR data (more abundant metabolites in the positive direction and less abundant ones in the negative direction) and the color scaling map (red for the most significant contributions with a correlation  $> 0.9$  and dark blue for less significant contributions with a correlation  $< 0.1$ ). Based on the S-line, the 3.00-4.00 ppm region (polar molecules) and the 0.50-3.00 ppm region (non-polar metabolites such as saturated/unsaturated long-chain fatty acids and oxidized fatty acids) of the  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectra have been clearly modified in response to CLD exposure, whatever the level of exposure (Fig. S3B-D, Annexe 4). In addition, the percent changes in discernible metabolite bucket intensities were calculated to determine the fluctuations of these selected metabolites involved in maize root metabolome responses to CLD exposure (Fig. 1B-E). The carbohydrates responded differently since sucrose,  $\alpha$ -glucose and  $\beta$ -glucose did not show significant fluctuations but a tendency to decrease under  $1 \text{ mg L}^{-1}$  CLD exposures (-11.32%, -6.30% and -18.49%, respectively and a correlation of 0.7 in the S-line in Fig.S3) (Fig. 2B). In the group of amino acids, the level of asparagine, glutamine, 4-aminobutyrate (GABA), alanine, valine, leucine and isoleucine showed a significant increase when roots were exposed to CLD (Fig. 1C). The significant highest accumulations were obtained with  $1 \text{ mg L}^{-1}$  CLD: +22.03% glutamine, +13.96% GABA, +33.53% alanine, +18.09% valine, +21.69% leucine and +42.16% isoleucine/leucine. Interestingly, glycine and glutamate showed different patterns of contents with a non-significant tendency to decrease (respectively -10.42% and -1.50%). The TCA intermediates such as succinate and malate showed no-significant disturbances in presence of

CLD, while fumarate (-27.80% at 1 mg L<sup>-1</sup> CLD) and citrate (-13.32% at 0.04 mg L<sup>-1</sup> CLD) were significantly depleted (Fig. 1D). A dose-dependent effect on acetate contents was noted with an increase of +87.68% at 0.04 mg L<sup>-1</sup> CLD and a non-significant increase of +18.95% at 1 mg L<sup>-1</sup> CLD (corroborated by a correlation of 0.5 and 0.2 respectively in the S-line Fig. S3, Annexe 4). The fatty acid levels showed different changes in function of the dose-exposure (Fig. 1E). The saturated fatty acids were significantly over-accumulated at 1 mg L<sup>-1</sup> CLD with +28.02% (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> and +26.98 % (CH<sub>3</sub>). The response of unsaturated fatty acids to CLD exposures was more disparate with a group of metabolites significantly increased (=CH-CH<sub>2</sub>-CH= and CH<sub>2</sub>-CH=CH), while some others were markedly decreased (CH=CH, -46.81% and -25.15%, respectively at 0.04 and 1 mg L<sup>-1</sup> CLD). The oxidized forms of fatty acids were moderately increased in response to CLD exposures.

#### **C and N soil contents under CLD stress**

During the time-experiment, no significant differences among all soil types (controls and CLD exposures) were found for gravimetric water content (3.26 g.g<sup>-1</sup> ±0.18), pH (5.91± 0.03) and nitrogen forms contents (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-TDN, N-DON) (Table 1). This observation was valid for pots with and without plant. At T0, the bulk soil without plant was CLD-impacted compared to controls with a significant decrease in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content (-7.83%), an increase in DOC content (+0.96%), and a rise in soil C:N ratio (+0.85%). Such effects were not maintained further at T14 and T28. In pots with plant, soil N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content decrease was still significant at T14 (-3.67%, weaker than the ones at T0) but not at T28. The soil DOC content was similar to controls at T14 while a rise was observed at T28 in bulk (+0.89%) and rhizosphere (+0.72%) soils. Finally, the soil C:N ratio was significantly higher at T28 (+0.89%) in bulk soils exposed to CLD compared to control (Table 1).



**Table 1. Effect of CLD contamination (control vs CLD-exposure) on soil properties, soil N and C pools, and soil microbial communities in bulk and rhizosphere soils collected from pot with and without plant.**

Values represent percentages of increase (+)/decrease (-) of CLD effects compared to control. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*,  $P < 0.05$ ; ns: not significant.

	Bulk soil			Bulk soil/plant		Rhizosphere soil	
	T0	T14	T28	T14	T28	T14	T28
<b>(a) Soil parameters</b>							
Gravimetric soil water content ( $\text{g.g}^{-1}$ )	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
pH	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>(b) Soil N pools</b>							
N- $\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
N- $\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	-7.83% *	ns	ns	-3.67% *	ns	ns	ns
N-TDN ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
N-DON ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
N- $\text{NO}_3^-$ :N- $\text{NH}_4^+$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>(c) Soil C pools</b>							
C ( $\text{mg g}^{-1}$ soil)	0.96% *	ns	ns	ns	0.92% *	ns	0.72% *
C:N ratio	0.85% *	ns	ns	ns	0.89% *	ns	ns
<b>(c) Microbial N pools</b>							
Microbial biomass ( $\mu\text{gN g}^{-1}$ soil)	ns	ns	ns	ns	-1.47% *	ns	ns
PNM ( $\text{mgN g}^{-1}$ soil. $\text{day}^{-1}$ )	-4.03% *	ns	-1.49% *	ns	ns	ns	ns

### Microbial soil characteristics under CLD-exposure

At T0 in bulk soils without plant, the microbial biomass was not affected by CLD exposure whereas the potential nitrogen mineralization (PNM) was significantly depleted (-4.03%) (Table 1). In pots without plant such a PNM decrease was observed only at T28 (-1.49%). In pots with plant, the microbial biomass was significantly reduced only at T28 (-1.47%) compared to control, without any impact on PNM.

CLD-effects on the microbial community level physiological profile (CLPP) -based on cultivable heterotrophic bacteria- were assessed using Biolog EcoPlates (Table 2). The time-lapse of experiment (T0, T14 and T28) had a significant impact ( $p < 0.001$ ) on the utilization of all carbon source groups except for amines (Table 2). Microbial communities from diverse soil types (bulk and rhizosphere soils with and without plant) showed significant differences in the use of amino acids ( $p < 0.01$ ) and phenolic compounds ( $p < 0.001$ ). Interestingly, CLD-exposure did not significantly affect the microbial catabolic activities.

**Table 2. The assessment of parameters influencing the metabolic signatures of soil microbial communities by groups of carbon substrates.**

Time: the time-lapse experiment, T0/T14/T28.

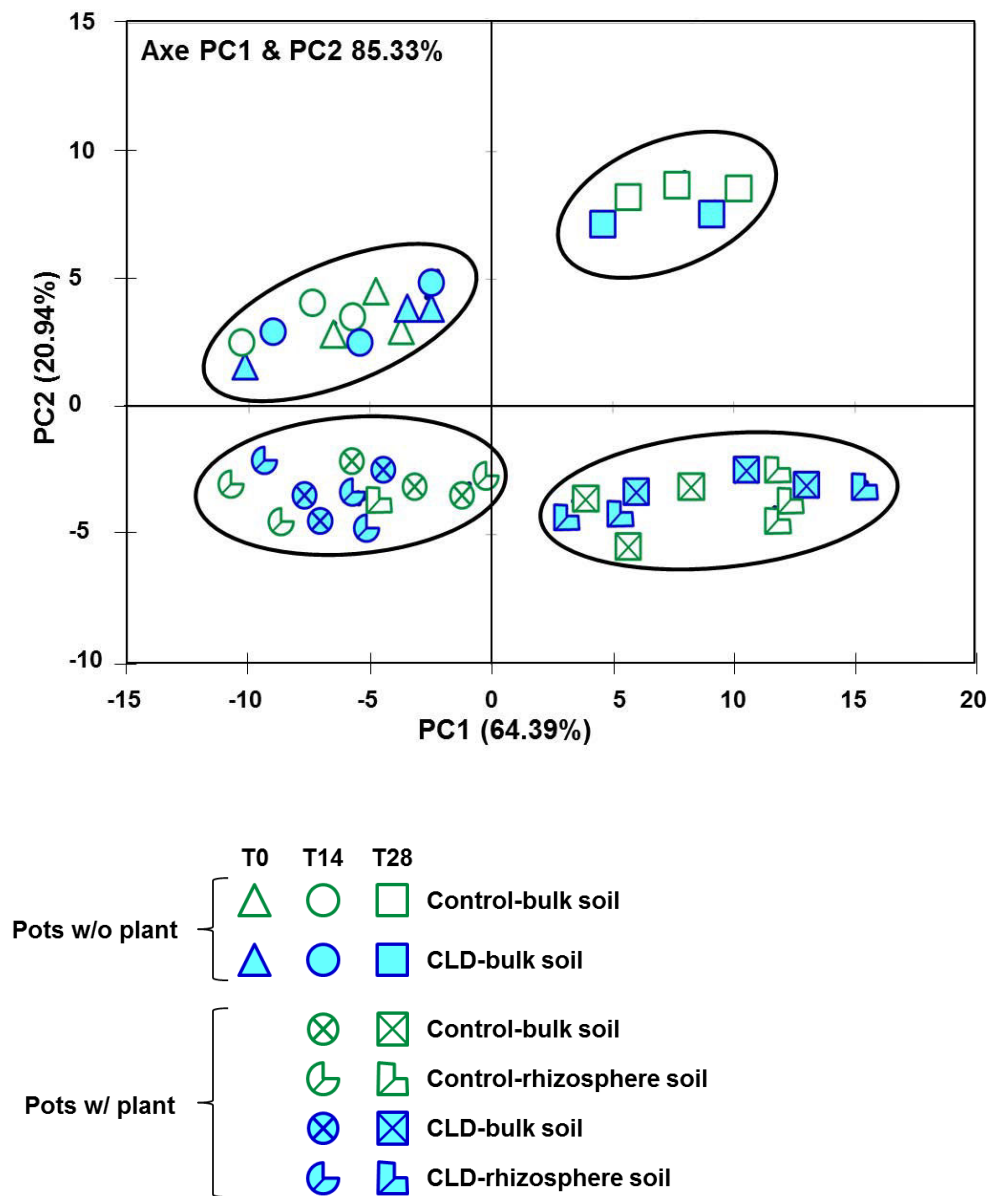
Soil type: the distinction between bulk and rhizosphere soils from pots with and without plant.

CLD-exposure: the distinction between pots exposed to CLD and control pots.

Statistical analysis was performed with Kruskal Wallis test (Lines in bold: time, soil type and CLD-exposure), then Mann-Whitney test when it was significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns: not significant).

	All	Carbohydrates	Amino acids	Polymers	Carboxylic acids	Phenolic compound	Amines
<b>Time</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>
T0-T14	ns	ns	ns	*	ns	ns	*
T0-T28	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>
T14-T28	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	ns
<b>Soil type</b>	ns	ns	<b>**</b>	ns	ns	<b>***</b>	ns
Bulk soil – Bulk soil with plant			*			<b>***</b>	
Bulk soil with plant- Rhizosphere soil						ns	
Bulk soil- Rhizosphere soil			<b>***</b>			<b>***</b>	
<b>CLD-exposure</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>**</b>

The principal component analysis (Figure 2), obtained by submitting the AUC for each carbon substrate for all samples to PCA (Samples of T0, T14 and T28 on the same model), confirmed the previous statistical results (Table 2). Thus, the first principal component (PC1 64.99%) clearly separated microbial CLPP from soil samples at T0 and T14 to those collected at T28. The second principal component (PC2 20.94%) separated microbial CLPP isolated from bulk soils collected in pots without plant (exposed to CLD and control) from those from bulk and rhizosphere soils collected in pots with plant (exposed to CLD and control). Therefore, there was a clear discrimination of the microbial CLPP between soil types (bulk and rhizosphere soils with and without plant) and the time of sampling (T0/T14 and T28). The PCA confirmed that CLD did not significantly affect the microbial CLPP in all considered soil compartments (Figure 2).



**Figure 2. Principal Component analysis (PCA) of microbial community level physiological profiles in different soil types under control and exposed to CLD conditions at diverse times (T0, T14 and T28).**

Nevertheless, carbon substrates involved in the discrimination of bacterial communities showed some relative variations between controls and CLD-contaminated soils (Figure S4, Annexe 4). First, at T0 the CLPP results indicated a similar catabolic pattern between bulk soils of controls and those of CLD-exposure (Figure S4, Annexe 4). However, carbon utilization in bulk soils exposed to CLD showed variations between T14 and T28. At T14, a significant decrease of catabolism occurred compared to control mainly for amino acids

(L-arginine, L-serine, L-threonine) some carbohydrates (D-galatonic acid  $\gamma$  lactone), carboxylic acids ( $\alpha$  ketobutyric acid) and amines (phenylethylamine). At T28, the catabolism of amino acids was found to be similar to control while, d-glucoside and D-galatonic acid  $\gamma$  lactone catabolisms were significantly reduced. Interestingly, CLD-exposed soils exhibited greater oxidation of 2-hydroxy benzoic acid and  $\alpha$ -ketobutyric acid (Figure S4, Annexe 4).

### CLD-effects on maize functional traits

Maize SLA or LDMC were not affected by CLD-exposures. However, there was a significant increase of leaf carbon contents (1.02%) at T28, while their ratio C:N was lower (-1.30%) compared to control plants (Table 3). CLD-exposure did not affect SRL, RDMC and total nitrogen contents in roots of maize (Table 3). Yet, there was an increase of total carbon contents in roots at T14 and T28 (0.95% and 0.96%, respectively).

**Table 3. Effect of CLD contamination (control vs CLD-exposure) on plant functional traits.**

Values represent percentage of increase (+)/decrease (-) of CLD effects compared to control. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*,  $P < 0.05$ ; ns: not significant.

	T14	T28
<b>(a) Leaves</b>		
Surface Leaf Area (SLA, $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	ns	ns
Leaf Dry Matter Content (LDMC)	ns	ns
C ( $\text{mg g}^{-1}$ leaves)	ns	<b>1.02% *</b>
N ( $\text{mg g}^{-1}$ leaves)	ns	ns
C:N	ns	<b>1.01% *</b>
<b>(b) Roots</b>		
Specific Root Length (SRL, $\text{cm} \cdot \text{g}^{-1}$ )	ns	ns
Root Dry Matter Content (RDMC)	ns	ns
C ( $\text{mg g}^{-1}$ roots)	<b>0.95%</b>	<b>0.96%</b>
N ( $\text{mg g}^{-1}$ roots)	ns	ns
C:N	ns	ns
<b>(c) Ratio Root/Shoot</b>		
	ns	ns

## DISCUSSION

In this study, changes regarding the rhizosphere functionality under CLD stress were characterized for the first time by using an integrated plant metabolomics/microbial sole-carbone-source utilization profiles/key nutrient cycling dynamics approach. For this purpose,

comparisons between standardized soils with and without plant were performed under CLD-exposure and no-exposure (controls).

First, bulk soils without plant and exposed to CLD during 45 days (T0) were depleted in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents, PNM and showed higher DOC contents. The whole microbial community level physiological profile (CLPP) of these soils was not statistically different from control soil. A time-dependent modulation was observed; with at T14, a similar pattern of C-N contents and microbial N pools compared to controls. Afterwards, a decrease of PNM was observed at T28. Such results suggest an impact of CLD on the metabolic activities of ammonifying bacteria. This ammonification inhibition was already observed with toxaphene and lindane (Bezchlebová et al., 2007; Blondel et al., publication III). Moreover, the higher soil C-contents at T0, inducing a soil C:N ratio rise, could be due to the input of CLD (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>10</sub>O), which is extremely stable in soils (Dolfing et al., 2012). The amount of pesticide adsorbed on soil aggregates has already been shown to be related to an increase of soil organic matter content (Kanazawa, 1989; Fushiwaki & Urano, 2001 ; Ahmad et al., 2001; Muratova et al., 2012). Furthermore, CLD did not show a clear effect on carbon cycle enzymatic activities, since soil C-contents were similar to controls at T14 and T28. However, such effect might be hidden by the C excess coming from the CLD application. Overall, CLD might inhibit ammonification and moderately impact C cycle in bulk soils without plant. Indeed, the whole microbial CLPP of these soils at T14 and T28 was statistically different from control soils with an intensive use of certain phenolics and a depletion in the use of some amino acids.

In pots with plant, bulk soils showed a significant decrease of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents only at T14. Previous studies have shown that maize growth caused significant N depletion not only in the rhizosphere, but also in different soil layers (Peng et al., 2012). Then, CLD enhanced this N-

$\text{NH}_4^+$  depletion only at T14 but this state was not maintained with time exposure. At T28, a decrease in microbial biomass was detected without any parallel change of PNM. These results suggested that there was not an inhibition of N cycle enzymatic activities in bulk soils with plant exposed to CLD or that it was offset by plant exudates. It was already demonstrated that root exudates influenced soil microbial activity which regulated N transformation (Qian et al., 1997), and we suggest that such plant effect on bulk soil biological processes was significantly observed here. Consequently, plant exudates might sustain in bulk soil a sufficient microbial activity of nitrifying bacteria which compensates for the decrease in microbial biomass at T28, with a similar CLPP compared to controls. Moreover, plant extracellular enzymes such as amino acid oxidases (Yu and Qiao, 2012) could insure deamination of organic metabolites leading to the release of bioavailable ammonium for plants or microbes (Jones and Kielland, 2012). Finally, a significant increase in C-contents and C:N ratio were significantly observed at T28, which support the notion that plant exudates influenced bulk soils microbial communities maintaining an efficient cycling of C and N even in presence of CLD.

In the rhizosphere, plants release important quantities of C which can reach up to 40% of the photoassimilates (Gupta et al., 2014). Maize root exudates were reported to consist of 72-73% carbohydrates, 17-18% phenolics, 7% organic acids, 3% amino acids and a minority of other compounds such as fatty acids, sterols, enzymes, vitamins and plant growth regulators (Schönwitz and Ziegler, 1982; Azaizeh et al., 1995; Schilling et al., 1998; Carvalhais et al., 2011; Oburger et al., 2013). In this study, the analysis of maize root metabolome using  $^1\text{H}$ -HRMAS NMR spectroscopy gave insights in the production of the mobile low molecular weight metabolites such as carbohydrates, organic acids, amino acids and some fatty acids.

Such a method allowed us to picture potential disturbances in root exudates when they were exposed to CLD.

A clear CLD dose-response of metabolome composition was noted with strong disturbances at the highest exposure levels. In particular, a depletion in carbohydrates was observed, suggesting an increase in the energy requirements in roots exposed to CLD. A similar pattern of lower carbohydrates production was described under  $\gamma$ HCH-exposure (Blondel et al., publication II). Such decrease in roots carbohydrate content (sucrose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose) might cascade down to the composition of exudates (Schönwitz and Ziegler, 1982). Furthermore, CLD induced a significant increase in amino acid (glutamine, alanine, valine, leucine, isoleucine) and organic acid (citrate, acetate) contents in maize roots, which might be released as root exudates and could be involved in the changes of rhizosphere pH and/or the regulation of the balance in carbon/nitrogen (Jones, 1998; Martin et al., 2014). On the other hand, the depletion of fumarate and citrate might be suspected in maize root exudates under CLD exposure. Such depletions might induce disturbances in soil properties as fumarate and citrate are known to be available for microorganisms in soils (Liebeke et al., 2009). Moreover, CLD might stimulate the release of GABA, which has been reported as (i) a carbon and nitrogen source for a wide variety of microbes, and as (ii) an amplifier of stress signal conducting to the modification of the root absorbing surface (Beuve et al., 2004). The increase in fatty acid oxidation might be a sign of cell disruption and subsequently, of a release of cell lysates in the rhizosphere. Overall, the exudate composition modifications might induce changes in available sources of C and N for the soil microbial biomass. It has been shown that 50 to 75% of root exudates were rapidly decomposed by bacterial respiration within 3 days (Schilling et al., 1998; Marx et al., 2007), but CLD potential effects on maize root exudates might disturb such nutrient turnover and availability (Raynaud et al., 2006; Van der Heijden et al., 2008). In our study, , rhizosphere soil N-TDN content exposed to CLD was similar to



the controls suggesting that CLD-exposed plant exudates with more amino acids and GABA allowed the stimulation of bacteria involved in N cycling.

Moreover, the microbial rhizosphere CLPP exposed to CLD was similar to the ones obtained in bulk soils exposed or not to CLD. Such results were also obtained under the exposure of an other OCPs, the  $\gamma$ HCH (Blondel et al., publication III). However, C-contents in rhizosphere soils exposed to CDL were significantly increased only at T28, and we suggest that this was related to CLD effects on maize root metabolome which significantly boosted the production of organic acids and amino acids. Overall, our results suggest that, even in the presence of CLD, maize roots were able to release sufficient exudates in the rhizosphere to maintain an efficient cycling of N and C.

Maize plant growth, inferred through its functional traits such as the root-shoot (R/S) ratio, was similar in soil exposed to CLD and controls. An increase of the R/S usually means that growing conditions are more favorable, whereas a R/S reduction pictures less favorable conditions (Harris et al., 1992). Thus, in our study analogous R/S under both soil conditions confirmed an absence of effect of CLD exposure on maize growth and functional traits. This was further supported by the significant increase in maize root C-contents observed at T14 and T28, and in leaf C-contents and C:N ratio at T28, which both testified of an efficient maize plant nutrition (insuring a great synthesis of photoassimilates) and, indirectly, of an efficient soil microbial loop. In particular, some bacteria qualified as plant growth-promoting bacteria could also have increased plant tolerance to contaminants and improved plant growth (Huang et al., 2004; Weyens et al., 2009b). Finally, we observed that the maize rhizosphere functionality in presence of CLD showed efficient microbial enzyme activities involved in soil C and N turnover, providing nutrients for plant growth.

## ACKNOWLEDGMENT

Funding for this project was provided by a grant from the Rhône-Alpes Région. The authors wish to thank Kim Barrett (Version Originale) for correcting their proofreading.

## ABBREVIATIONS

C: Carbon

CLD: chlordécone

CLPP : Community level physiological profile

HRMAS : High resonance magic angle spinning

$\gamma$ HCH: Gamma-Hexachlorocyclohexane (Lindane)

N: Nitrogen

NMR: Nuclear magnetic resonance

OCP : Organochlorine pesticide

PNM: Potential nitrogen mineralization

## REFERENCES

Ahmad R., Kookana R.S., Alston A.M., Skjemstad J.O., The nature of soil organicmatter affects sorption of pesticides. 1. Relationships with carbon chemistry asdetermined by C-13 CPMAS NMR spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001)878–884.

Aliferis, K.A., Materzok, S., Paziotou, G.N., & Chrysayi-Tokousbalides, M. (2009). Lemna minor L. as a model organism for ecotoxicological studies performing H-1 NMR fingerprinting. *Chemosphere*, 76(7), 967-973.

Alvarez, A., Yanez, M.L., Benimeli, C.S., & Amoroso, M.J. (2012). Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66(1), 14-18

Azaizeh, H.A., Marschner, H., Romheld, V., & Wittenmayer, L. (1995).Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal growth, mineral nutrient acquisition and root exudation and root exudation of soil-grown maize plants. *Mycorrhiza*, 5(5), 321-327.

Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 35(9), 1183-1192.

Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2002). Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*, 19(2), 135-145.

Beuve, N., Rispaïl, N., Laine, P., Cliquet, J.B., Ourry, A., & Le Deunff, E. (2004). Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a longdistance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant Cell and Environment*, 27(8), 1035-1046.

Bezchlebova, J., Cernohlavkova, J., Lana, J., Sochova, I., Kobeticova, K., Hofman, J. (2007). Effects of toxaphene on soil organisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), 326-334.

Blondel, C., Melesan, M., San Miguel, A., Veyrenc, S., Meresse, P., Pezet, M., et al. (2014). Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots. *Journal of Hazardous Materials*, 276(0), 312-322.

Cabidoche, Y.M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., & Sansoulet, J. (2009). Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue. *Environmental Pollution*, 157(5), 1697-1705.

Cabidoche, Y.M., & Lesueur-Jannoyer, M. (2012). Contamination of Harvested Organs in Root Crops Grown on Chlordecone-Polluted Soils. *Pedosphere*, 22(4), 562-571.

Campbell, C.D., Grayston, S.J., & Hirst, D.J. (1997). Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 30(1), 33-41.

Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.R., Borriss, R., & von Wiren, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 3-11.

Chouychai W., Lee H. (2012). Phytotoxicity Assay of Crop Plants to Lindane and Alpha-endosulfan Contaminants in Alkaline Thai Soil. *International journal of agriculture and biology* 14(5): 734-738

Coat, S., Bocquene, G., & Godard, R. (2006). Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquatic Living Resources*, 19(2), 181-187.

Coat, S., Monti, D., Legendre, P., Bouchon, C., Massat, F., & Lepoint, G. (2011). Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 159(6), 1692-1701.

Desalme, D., Binet, P., & Chiapusio, G. (2013). Challenges in Tracing the Fate and Effects of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Deposition in Vascular Plants. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 3967-3981.

Dolfing, J., Novak, I., Archelas, A., & Macarie, H. (2012). Gibbs Free Energy of Formation of Chlordecone and Potential Degradation Products: Implications for Remediation Strategies and Environmental Fate. *Environmental Science & Technology*, 46(15), 8131-8139.

- Dubuisson, C., Heraud, F., Leblanc, J.C., Gallotti, S., Flamand, C., Blateau, A., et al. (2007). Impact of subsistence production on the management options to reduce the food exposure of the Martinican population to Chlordecone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49(1), 5-16
- Epstein, S.S. (1978). Kepone-hazard evaluation. *Science of the Total Environment*, 9(1), 1-62.
- Faure, M., San Miguel, A., Ravanel, P., & Raveton, M. (2012). Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Environmental Pollution*, 164, 188-194.
- Fushiwaki Y., Urano K., Adsorption of pesticides and their biodegraded productson clay minerals and soils, *J. Health Sci.* 47 (2001) 429–432.
- Gerhardt, K.E., Huang, X., Glick, B.R., & Greenberg, B.M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*, 176, 20-30
- Giusti, A., Leprince, P., Mazzucchelli, G., Thome, J.P., Lagadic, L., Ducrot, V., et al. (2013). Proteomic Analysis of the Reproductive Organs of the Hermaphroditic Gastropod *Lymnaea stagnalis* Exposed to Different Endocrine Disrupting Chemicals. *Plos One*, 8(11).
- Grigulis, K; Lavorel, S ; Krainer, U ; Legay, N ; Baxendale, C; Dumont, M; Kastl, E; Arnoldi, C; Bardgett, RD; Poly, F; Pommier, T; Schloter, M; Tappeiner, U ; Bahn, M; Clement, JC (2013) Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. *Journal of ecology* 101(1): 47-57
- Hulster, A., Muller, J.F., & Marschner, H. (1994). Soil-plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (cucurbitaceae). *Environmental Science & Technology*, 28(6), 1110-1115.
- Jones, D.L. (1998). Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*, 205(1), 25-44.
- Jones, D.L., Clode, P.L., Kilburn, M.R., Stockdale, E.A., & Murphy, D.V. (2013). Competition between plant and bacterial cells at the microscale regulates the dynamics of nitrogen acquisition in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, 200(3), 796-807.
- Kanazawa J., Relationship between the soil sorption constants for pesticides and their physicochemical properties, *Environ. Toxicol. Chem.* 8 (1989)477–484.
- Kidd, P.S., Prieto-Fernandez, A., Monterroso, C., & Acea, M.J. (2008). Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*, 302(1-2), 233-247
- Kluender, C., Sans-Piché, F., Riedl, J., Altenburger, R., Härtig, C., Laue, G., et al. (2009). A metabolomics approach to assessing phytotoxic effects on the green alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Metabolomics*, 5(1), 59-71.
- Kushalappa, A.C., & Gunnaiah, R. (2013). Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends in Plant Science*, 18(9), 522-531
- Legay N., F. Grassein, T. M. Robson, E. Personeni, M.-P. Bataillé, S. Lavorel, & J.C. Clement. 2013. Comparison of inorganic nitrogen uptake dynamics following snowmelt and at peak biomass in subalpine grasslands. *Biogeosciences (IF=3.753, 29/140 Ecology)*, 10, 7631-7645.

Levillain, J., Cattan, P., Colin, F., Voltz, M., & Cabidoche, Y.M. (2012). Analysis of environmental and farming factors of soil contamination by a persistent organic pollutant, chlordecone, in a banana production area of French West Indies. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 159, 123-132.

Lesuffleur, F., Paynel, F., Bataille M.P., Deunff E. and Cliquet J.B. (2007). Root amino acid exudation: Measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant and Soil*, 294, 235-246.

Lubbe A., Verpoorte R., Choi YH. (2012). Effects of fungicides on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs. *Plant physiology and biochemistry* 58: 116-123

Li, K., Pidatala, V.R., Shaik, R., Datta, R., & Ramakrishna, W. (2014). Integrated Metabolomic and Proteomic Approaches Dissect the Effect of Metal-Resistant Bacteria on Maize Biomass and Copper Uptake. *Environmental Science & Technology*, 48(2), 1184-1193.

Liebeke, M., Broezel, V.S., Hecker, M., et al. (2009) Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(1), 161-173

Lubbe, A., Verpoorte, R., & Choi, Y.H. (2012). Effects of fungicides on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 116-123.

Martin, B.C., George, S.J., Price, C.A., Ryan, M.H., & Tibbett, M. (2014). The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 472, 642-653.

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362-1375.

Mercier, A., Dictor, M.C., Harris-Hellal, J., Breeze, D., & Mouvet, C. (2013). Distinct bacterial community structure of 3 tropical volcanic soils from banana plantations contaminated with chlordecone in Guadeloupe (French West Indies). *Chemosphere*, 92(7), 787-794.

Multigner, L., Ndong, J.R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., et al. (2010). Chlordecone Exposure and Risk of Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(21), 3457-3462.

Muratova, A.Y., Golubev, S.N., Dubrovskaya, E.V., Pozdnyakova, N.N., Panchenko, L.V., Pleshakova, E.V., et al. (2012). Remediating abilities of different plant species grown in diesel fuel-contaminated leached chernozem. *Applied Soil Ecology*, 56(0), 51-57.

Nie, M., Yang, Q.A., Jiang, L.F., Fang, C.M., Chen, J.K., & Li, B. (2010). Do plants modulate biomass allocation in response to petroleum pollution? *Biology Letters*, 6(6), 811-814

Oburger, E., Dell'mour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., & Wenzel, W.W. (2013). Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany*, 87(0), 235-247.

- Peng, Y., Yu, P., Zhang, Y., Sun, G., Ning, P., Li, X., et al. (2012). Temporal and spatial dynamics in root length density of field-grown maize and NPK in the soil profile. *Field Crops Research*, 131(0), 9-16.
- Qian, J.H., Doran, J.W., and Walters, D.T. (1997) Maize plant contributions to root zone available carbon and microbial transformations of nitrogen. *Soil Biol Biochem* 9: 1451–1462.
- Rodziewicz P., Swarcewicz B., Chmielewska K., Wojakowska A., Stobiecki M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta physiologiae plantarum* 36(1): 1-19
- San Miguel, A., Faure, M., Ravanel, P., & Raveton, M. (2012). Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes. *Ecotoxicology*, 21(2), 315-324.
- San Miguel, A., Ravanel, P., & Raveton, M. (2013). A comparative study on the uptake and translocation of organochlorines by *Phragmites australis*. *Journal of Hazardous Materials*, 244, 60-69.
- San Miguel, A., Roy, J., Gury, J., Monier, A., Coissac, E., Ravanel, P., et al. (2014). Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(9), 4257-4266.
- Sardans J., Penuelas J., Rivas-Ubach A. (2011). Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology* 21(4): 191-225
- Schilling, G., Gransee, A., Deubel, A., Lezovic, G., & Ruppel, S. (1998). Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 161(4), 465-478.
- Schimel, J.P., Bennett, J., and Frierer, N. (2005). Microbial community composition and soil nitrogen cycling: is there really a connection? In: *Biological Diversity and Function in Soil* (eds. R.D. Bardgett, M.B. Usher, and D.W. Hopkins), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Schonwitz, R., & Ziegler, H. (1982). Exudation of water-soluble vitamins and some carbohydrates by intact roots of maize seedlings (*Zea mays L*) into a mineral nutrient solution. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, 107(1), 7-14.
- Trenkamp, S., Eckes, P., Busch, M., & Fernie, A. (2009). Temporally resolved GC-MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants treated reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. *Metabolomics*, 5(3), 277-291.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., & van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310.
- Weber, K.P., Grove, J.A., Gehder, M., Anderson, W.A., & Legge, R.L. (2007). Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 69(3), 461-469.

#### 4. Conclusion

Nos résultats sur l'étude de l'allocation des ressources et de la fonctionnalité de la rhizosphère de *Zea mays* nous suggèrent que les OCPs provoquent certains effets sur le cycle du carbone, de l'azote et des microorganismes du sol (Figure 44). Cependant, ils sont soumis à une modulation en fonction du temps et à des différences entre les sols sans plantes, les sols avec plantes et les sols rhizosphériques.

Les sols sans plantes sont bien plus impactés que les sols avec plantes en présence des OCPs. En effet, nous observons une diminution du N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, de la biomasse microbienne et de la PNM pour les sols exposés au  $\gamma$ HCH. En ce qui concerne la CLD, une diminution du N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> est observable à T0 uniquement et une diminution de la PNM est aussi relevée. Les profils physiologiques des communautés microbiennes (CLPP) de ces sols sont partiellement impactés par les OCPs. Ces résultats nous permettent de penser qu'il y a un impact des OCPs sur la survie et/ou les activités métaboliques des bactéries ammonifiantes. Par contre, les sols avec plantes présentent une augmentation du N-TDN, N-DON et une diminution de la PNM en présence de  $\gamma$ HCH alors qu'en présence de la CLD, ces paramètres sont similaires aux sols témoins excepté pour la biomasse microbienne qui est réduite. Les CLPP des sols en présence de plantes sont similaires et démontrent peu d'effet des OCPs sur les activités cataboliques des microorganismes. Ainsi, les plantes semblent influencer sur la fonctionnalité des sols à distance de leur réseau racinaire ; ces derniers montrant un fonctionnement assez proche des sols témoins même en présence des OCPs. L'effet inhibiteur possible des OCPs sur l'étape d'ammonification semble compensé par la présence des plantes et leurs potentielles excréctions d'azote par les racines de maïs (Figure 44).

De plus, dans les sols exposés au  $\gamma$ HCH et à la CLD, nous observons une augmentation de la teneur en carbone dans les sols sans plantes et avec plantes. Cela pourrait s'expliquer par l'ajout de carbone lors du conditionnement des sols avec du  $\gamma$ HCH (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>) et de la CLD (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>10</sub>O). Les plantes peuvent également excréter du carbone dans le sol sous forme d'exsudats ou de lysats cellulaires. Pour ce dernier, nous avons mis en évidence une augmentation de la mortalité cellulaire dans les cellules racinaires en présence d'OCPs (Blondel et al., 2014, publication I). Le contenu des cellules épidermiques mortes se retrouve dans le sol par lyse et sont donc une source de carbone potentielle. L'autre hypothèse pouvant



expliquer le faible impact des OCPs sur le contenu en azote et carbone du sol est la présence d'exsudats racinaires compensant un potentiel stress. Le métabolome des racines de maïs est perturbé de façon dose dépendante par la CLD et le  $\gamma$ HCH. Les sucres sont fortement diminués pour compenser l'augmentation des besoins en énergie causés par l'exposition aux OCPs. On observe également une augmentation de certains acides aminés (glutamine, alanine, valine, leucine, isoleucine) et acides organiques (acétate). Ce phénomène peut laisser penser que les exsudats racinaires composés en majorité de sucres, d'acides organiques et d'acides aminés sont impactés par les modifications du métabolome racinaire. Les acides aminés peuvent également être impliqués dans la régulation de l'équilibre en carbone/azote. Les OCPs induisent une augmentation du métabolisme du GABA, impliquant potentiellement une excrétion du GABA dans les exsudats racinaires. Cette hypothèse est concordance avec le fait que le GABA a été décrit comme pouvant être une source d'azote pour certains microbes et pouvant modifier la surface des racines. Globalement, la modification du métabolome racinaire pourrait entraîner des modifications de la composition des exsudats impliquant à leurs tours des changements dans la nature des sources de C et N disponibles pour les microorganismes du sol. Un excès de C est mesuré dans la rhizosphère des plantes exposées à la CLD mais en présence de  $\gamma$ HCH, le N-TDN et le contenu carboné sont tous les deux diminués à T14 puis similaires aux témoins à T28. De plus, les CLPP de la rhizosphère sont statistiquement similaires à ceux du sol et ceux des lots témoins. L'impact des OCPs sur le fonctionnement rhizosphérique peut être détecté à court-terme puis les exsudats racinaires permettraient de stimuler le développement de microorganismes tolérants aux OCPs rendant le système fonctionnel au même titre que celui des témoins.

En ce qui concerne le développement des plants de maïs, le  $\gamma$ HCH induit une diminution de la SLA et de la SRL uniquement à T14. La CLD quant à elle, a comme effet d'augmenter le contenu en carbone des feuilles et des racines. Les deux OCPs ne modifient pas le ratio R/S (Roots to Shoots) signe d'un bon état physiologique de la plante. Nous pouvons donc en conclure que les OCPs n'affectent pas la croissance des plantules de *Zea mays* sur le long terme.

Nous avons donc démontré que la présence de *Zea mays* favorisait la résilience de la fonctionnalité des sols exposés aux OCPs. Les relations entre les plantes et les microorganismes du sol se sont adaptées au stress pour montrer sur le long terme un

fonctionnement rhizosphérique similaire à celui des lots témoins. Les plantes par leurs exsudats racinaires sont capables d'impacter les sols rhizosphériques et les sols plus éloignés. L'allocation des ressources et la fonctionnalité de la rhizosphère n'étant globalement pas modifiées par les OCPs sur le long terme, *Zea mays* apparaît comme une plante pouvant réaliser une remédiation efficace des sols contaminés.

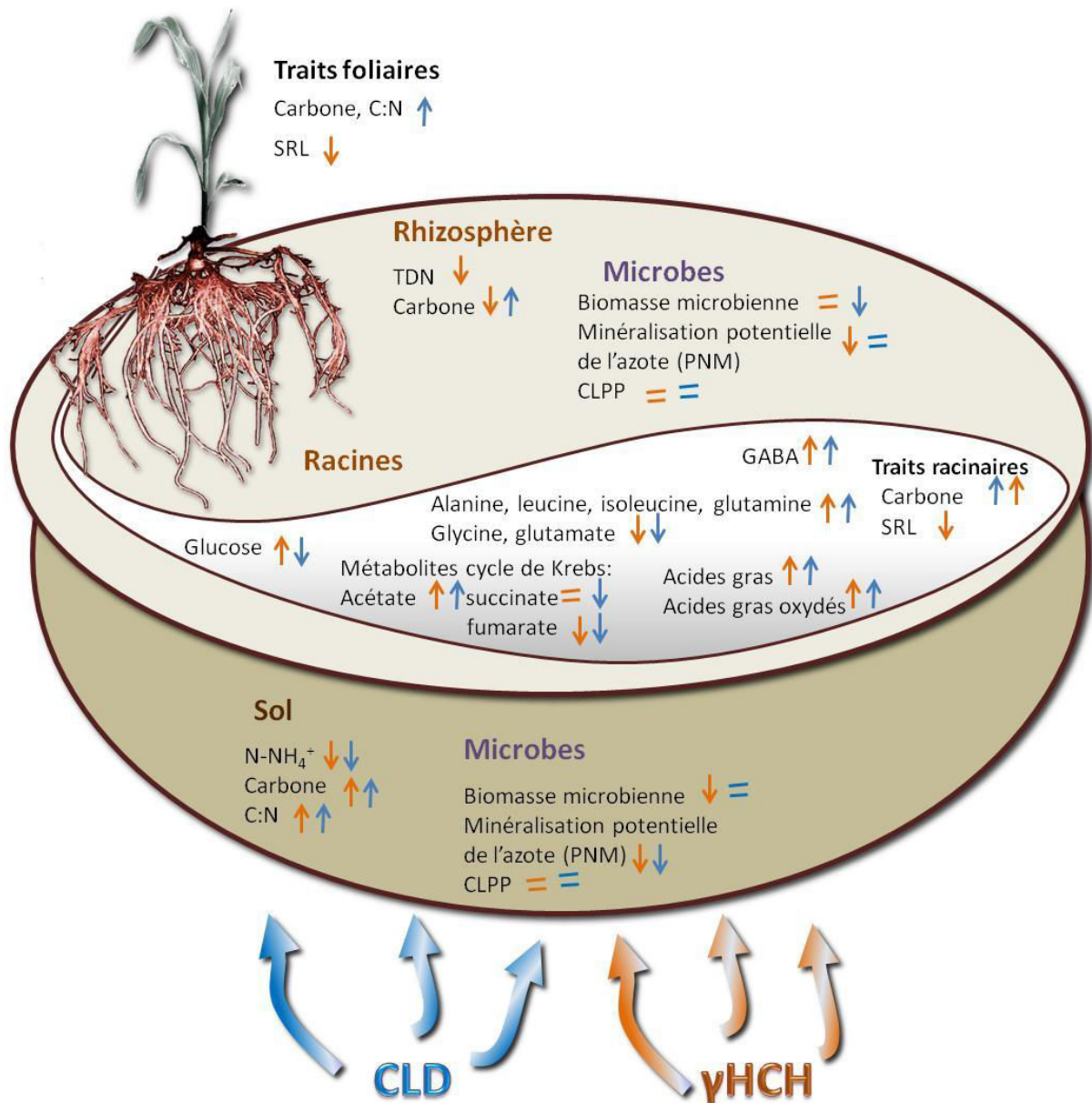


Figure 44. Schéma bilan de l'impact du lindane ( $\gamma$ HCH) et de la chlordécone (CLD) sur l'allocation des ressources et la fonctionnalité de la rhizosphère de *Zea mays*. C : Carbone, N : Azote, SRL : Surface Leaves area, TDN : Total dissolve nitrogen, CLPP : community level physiological profile.



Chapitre 4:  
Capacité d'absorption  
du lindane  
par *Zea mays*



## Chapitre 4: Capacités d'absorption du lindane par *Zea mays*

### 1. Introduction

Les précédentes expériences sur sol ont démontré le peu d'impact des OCPs sur la croissance des plantules de *Zea mays* avec une fonctionnalité de la rhizosphère comparable à celle des plants témoins. Il serait intéressant de déterminer la capacité de cette plante à capter les OCPs présents dans les sols. L'acquisition des OCPs par les plantes a été démontrée chez diverses espèces végétales (Miglioranza et al., 2003 et 2004; Pereira et al. 2006 ; Abhilash et al. 2008 et 2009; San Miguel et al., 2013). Il semblerait que les plantes accumulent le  $\gamma$ HCH présent dans le sol par des processus passifs décrits pour des contaminants organiques non-chargés lipophiles ( $1 \leq \text{LogKow} \leq 3.5$ ) correspondant en une succession de phénomènes de partition/diffusion au sein des espaces lipophiles des tissus végétaux (Briggs et al., 1982 ; Paterson et al., 1990 ; Burken & Schnoor, 1998 ; Dietz et Schnoor, 2001 ; Trapp, 2004). La translocation de ces contaminants organiques des racines jusqu'aux parties aériennes s'effectue sans sélection grâce au flux xylémien (sève brute) et dont l'intensité dépend du taux transpiratoire. Ensuite, l'accumulation de ces molécules dans les feuilles serait déterminée par leur partition dans les tissus en contact avec la sève xylémienne. San Miguel et al. (2013) ont mis en évidence une légère phytovolatilisation du  $\gamma$ HCH à partir des surfaces foliaires de *P. australis* (~0.03% en 28 jours). L'ensemble de ces études se sont focalisées dans la compréhension des mécanismes d'absorption des contaminants organiques dans les tissus végétaux. Pour mieux comprendre les phénomènes mis en jeu au sein de la rhizosphère, nous allons suivre le parcours du  $\gamma$ HCH de la rhizosphère à la plante et au sein de la plante grâce à du  $\gamma$ HCH marqué avec du  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ HCH). Nous comparerons la distribution du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ HCH au sein de plantes stériles sans rhizosphère, de plantes avec rhizosphère et de plantes avec une rhizosphère acclimatée à un stress de type  $\gamma$ HCH. Cela nous permettra d'évaluer (i) l'effet de la rhizosphère sur la distribution du  $\gamma$ HCH, (ii) l'accumulation du  $\gamma$ HCH dans les racines, et (iii) la translocation éventuelle dans les feuilles.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Conditionnement des sols

Les pots de culture (70g tourbe) sont placés en salle conditionnée ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ , photopériode 16h/8h (jour/nuit), 60% d'humidité relative) pendant 45 jours (Figure 45). Les différentes expositions sont réalisées par un arrosage de 40 mL tous les 3 jours avec les solutions suivantes :

- Pour le lot témoin chaque pot est arrosé avec de l'eau du robinet (0,05% d'éthanol)
- Pour le lot  $\gamma\text{HCH}$ , les pots sont arrosés avec une solution de lindane ( $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) contenant 0,05 % d'éthanol. A la fin du conditionnement, la teneur en  $\gamma\text{HCH}$  dans chaque pot est égale à  $0.52 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sol.

Au bout de 45 jours, les lots témoin et  $\gamma\text{HCH}$  sont séparés en deux groupes correspondant aux sols nus (sans plantes) et aux sols contenant des plantules de maïs (*Zea mays* L., Golden Bantam; Graines Baumaux, France) âgées de 4 jours (Figure 45). La culture des plantules dans ces conditions à lieu pendant 15 jours. Les sols avec plantes et les sols sans plante sont régulièrement arrosés avec les solutions décrites précédemment pour chaque lot (40 mL tous les 3 jours). Au bout de ces 15 jours, la teneur en  $\gamma\text{HCH}$  dans chaque pot est égale à  $0.69 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sol. En parallèle, des plantules de maïs âgées de 4 jours sont cultivées en hydroponie (milieu de Hoagland), en conditions stériles et dans les mêmes conditions contrôlées de développement décrites précédemment.

### 2.2. Ajout du lindane marqué ( $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$ ) et extraction du $^{14}\text{C}$

Au terme des 15 jours de culture en pot, les plantules de chaque condition d'exposition sont prélevées en conservant la rhizosphère et introduites dans des pots stériles de culture en hydroponie contenant du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  ( $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  ;  $894 \text{ MBq mmol}^{-1}$  ; 60 mL) (Figure 45). D'autre part, 2g de sol sont prélevés sur chaque lot et déposés dans des pots stériles de culture en hydroponie contenant du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  ( $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  ;  $894 \text{ MBq mmol}^{-1}$ ). Pour la culture stérile des plantules de maïs, le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est directement introduit dans la solution nutritive et homogénéisé pour obtenir une concentration de  $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$ . Au cours de l'expérience, le volume d'eau absorbée par les plantes et perdu par transpiration a été ajusté à 60 mL chaque semaine.



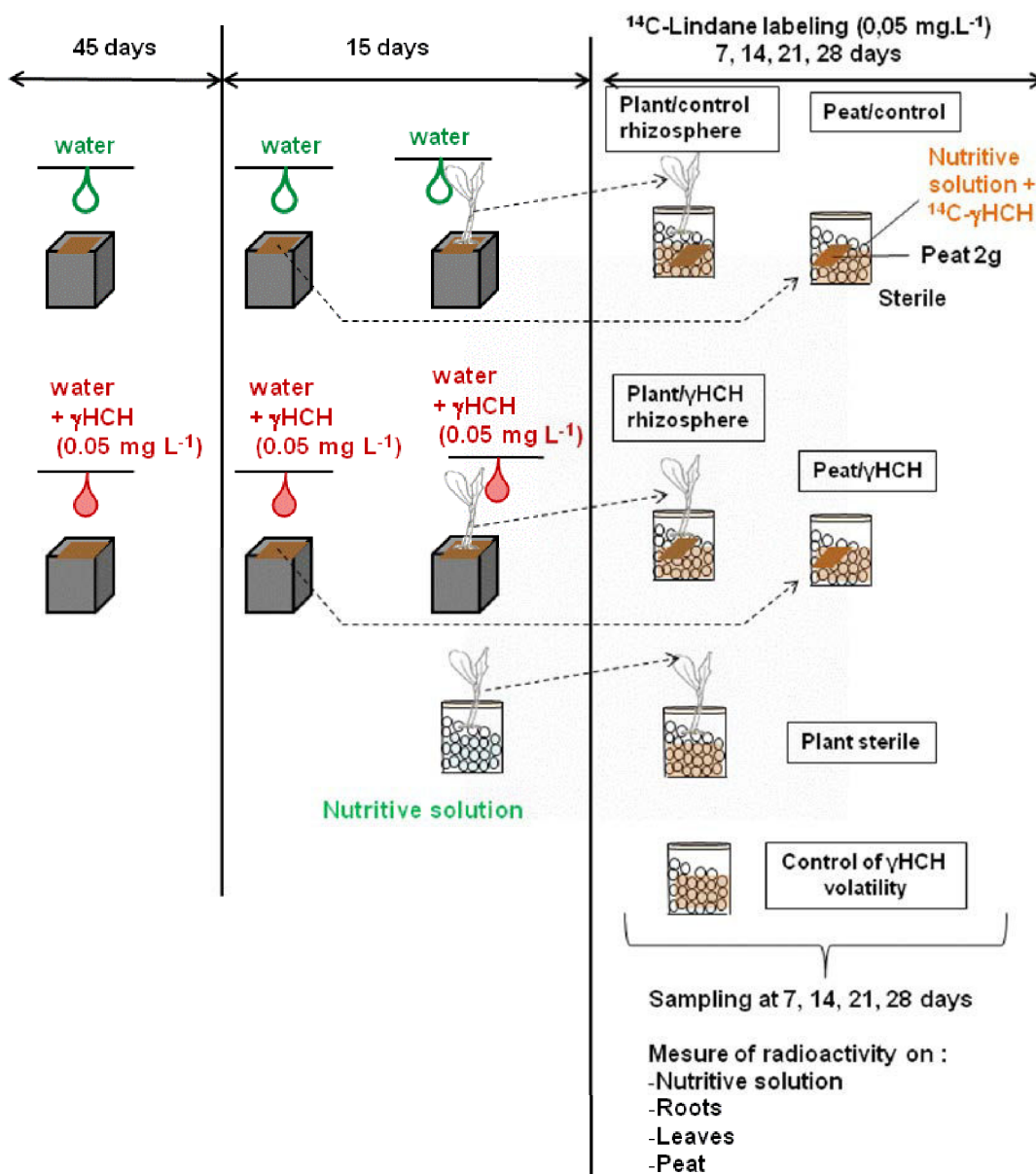


Figure 45. Schéma expérimental de l'expérience d'uptake du lindane chez *Zea mays*.

La radioactivité du <sup>14</sup>C- $\gamma$ HCH est mesurée dans le milieu de culture, la tourbe, les racines et les feuilles au bout de 7, 14, 21, 28 jours. A chaque temps de prélèvement, les échantillons de plante sont lavés et transférés dans l'azote liquide pour réaliser l'extraction du <sup>14</sup>C comme décrit par San Miguel et al. (2013). Les échantillons sont rapidement réduits en poudre en présence d'éthanol puis extraits successivement trois fois avec de l'éthanol. Les solutions obtenues sont centrifugées à 10 000g pendant 10 minutes. Les résidus de poudre ne contiennent ainsi plus de radioactivité. La radioactivité du <sup>14</sup>C est mesurée dans les extraits éthanoliques par un comptage à scintillation (1414 Winspectral, Wallac). Durant l'extraction,

$10 \pm 2\%$  de perte de  $^{14}\text{C}$  a été mesuré comme décrit par San Miguel et al. (2013). Chaque mesure est répétée 3 fois.

### 3. Résultats

#### 3.1. Comportement du lindane par rapport à la matière organique de la rhizosphère en absence de plante

Pour comprendre la distribution du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  au niveau de la rhizosphère, nous avons comparé des lots contenant uniquement de la solution nutritive, des lots contenant de la tourbe témoin et des lots contenant de la tourbe acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$  (Figure 45). Nous observons une perte de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  qui augmente au cours du temps de façon significative (Kruskall Wallis,  $p=0.0495$ ) dans l'ensemble des lots (Figure 46A). Dans les lots contenant de la solution nutritive, un maximum de  $40.1 \pm 2.1 \%$  de volatilisation est obtenu à 28 jours. En présence de tourbe, la perte de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est significativement plus importante que les lots contenant uniquement de la solution nutritive quel que soit le temps. Le conditionnement de la tourbe avec de l'eau ou du  $\gamma\text{HCH}$  n'a pas d'impact significatif sur la perte de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$ . A 28 jours, la volatilisation atteint  $54.1 \pm 1.1 \%$  pour les lots avec la tourbe témoin et  $55.5 \pm 2.6 \%$  pour les lots avec la tourbe acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$ . Sur la quantité de  $^{14}\text{C}$ -volatilisée à 28 jours, nous avons montré grâce à des pièges à potasse que  $0.7 \pm 0.03 \%$  de la volatilisation correspondait à du  $^{14}\text{CO}_2$ , le reste correspondant à des composés organiques semi à volatiles ( $\gamma\text{HCH}$  et métabolites). Par contre, le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est en partie adsorbé sur la tourbe, respectivement  $34.4\%$  sur la rhizosphère témoin et  $31.1\%$  sur la rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$ . Ainsi à 28 jours, le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  présent dans le milieu nutritif est significativement plus élevé ( $13.4 \pm 0.1\%$  ;  $0.031 \pm 0.002 \text{ nmol.mL}^{-1}$ ) dans les pots contenant de la tourbe témoin (Peat/water) que ceux contenant de la tourbe acclimatée avec du  $\gamma\text{HCH}$  (Peat/ $\gamma\text{HCH}$ ) ( $11.5 \pm 0.7\%$  ;  $0.020 \pm 0.001 \text{ nmol.mL}^{-1}$ ).

**A**

	Time (days)	Solution	Peat/ control	Peat/ γHCH
Nutritive solution (%)	Time	*	*	*
	D7-D14	*	ns	*
	D14-D21	ns	ns	ns
	D21-D28	*	*	*
Peat (%)	Time		*	*
	D7-D14		ns	*
	D14-D21		ns	ns
	D21-D28		*	*

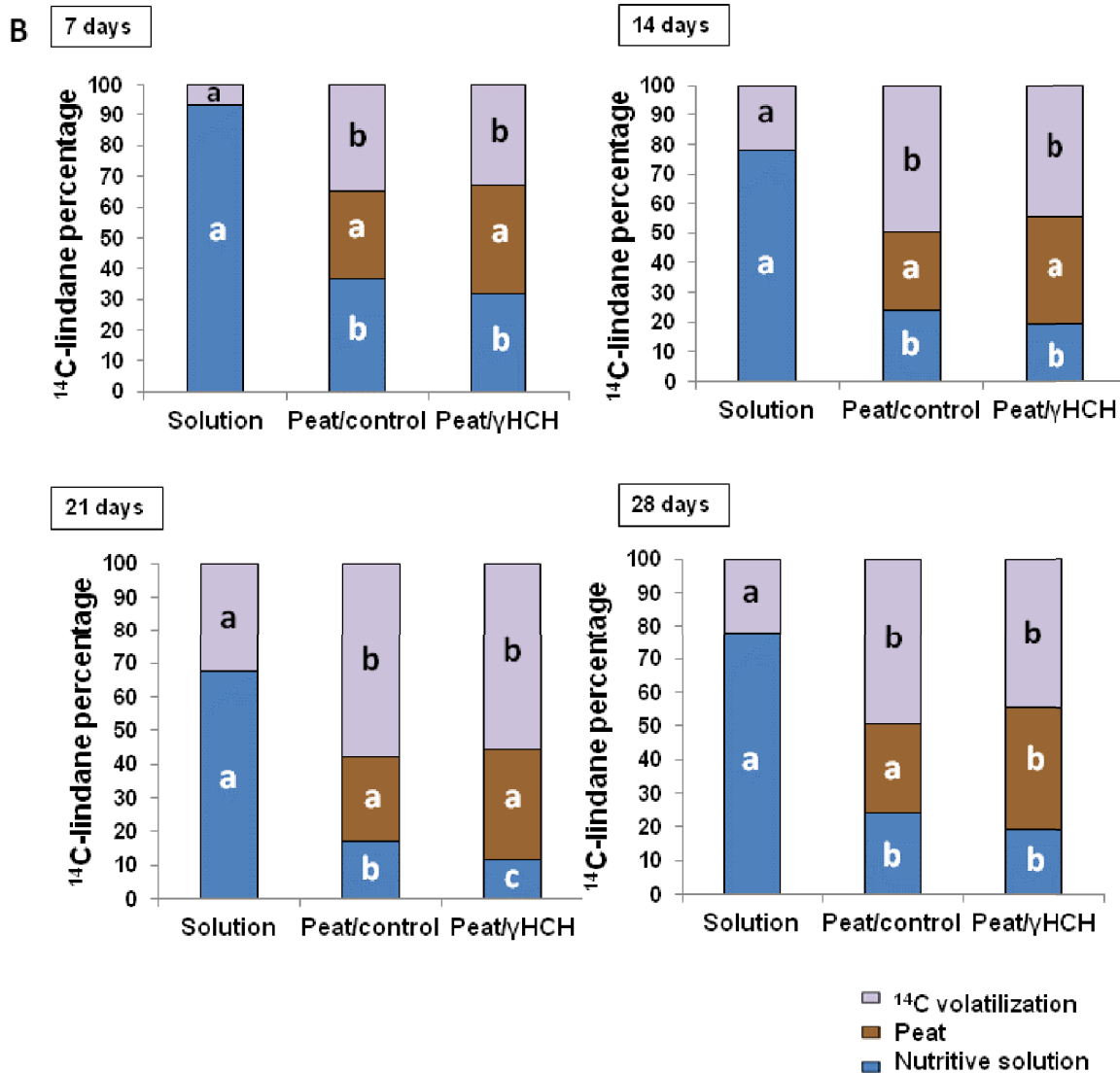


Figure 46. Distribution du <sup>14</sup>C-γHCH dans les lots sans plante. (A) Analyse statistique de la distribution temporelle du <sup>14</sup>C-γHCH pour chaque condition (Solution, Peat/control, Peat/γHCH). Test Kruskal Wallis pour les lignes « Time » puis Test Mann-Whitney pour comparer deux à deux les temps (\*, P < 0.05; ns: non significatif). (B) Pourcentage de <sup>14</sup>C-γHCH dans les différents compartiments (solution nutritive, tourbe, volatilisation de <sup>14</sup>C) des pots contenant de la solution nutritive, des pots contenant de la tourbe témoin (Peat/control) et des pots contenant de la tourbe acclimatée pendant 59 jours avec du γHCH (Peat/γHCH). Des tests statistiques Mann Whitney ont été réalisés entre les différents compartiments (solution nutritive, tourbe, volatilisation de <sup>14</sup>C) pour chaque condition (Solution, Peat/control, Peat/γHCH). Les lettres a,b,c indiquent les différences significatives (p<0.05).

### 3.2. Distribution du lindane dans un système plante-rhizosphère

Nous avons ensuite évalué le pourcentage de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les différents compartiments pour les lots contenant des plantules (Sterile plant, Plant/control rhizosphere, Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere). Les pertes par volatilisation de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  sont moins fortes (facteur 1.7) pour les lots avec des plantes ayant une rhizosphère comparés aux lots possédant des plantes stériles (Mann Whitney,  $p=0.0495$ ).

En condition stérile (sterile plant), nous observons un effet temps significatif de la distribution du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  entre la solution et les plantes (Kruskall Wallis,  $p = 0.0273$ ). A 7 jours, la majorité du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est retrouvé dans le milieu de culture ( $63.0 \pm 1.6\%$  ;  $0.070 \pm 0.001 \text{ nmol.mL}^{-1}$ ) (Figure 47A et Tableau VII). Une partie est retrouvée dans les racines ( $33.1 \pm 0.8\%$ ) et très peu dans les feuilles ( $3.9 \pm 1.2\%$ ). Entre le 7<sup>ème</sup> jour et le 14<sup>ème</sup> jour, nous observons une augmentation significative de la quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les racines ( $45.6 \pm 5.8\%$ ). Cette quantité ne changera pas de façon significative jusqu'à la fin de l'expérience. Entre le 21<sup>ème</sup> jour et le 28<sup>ème</sup>, nous observons une augmentation significative de la quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les feuilles ( $50.0 \pm 1.1\%$  soit une concentration de  $0.13 \pm 0.02 \text{ nmol.g}^{-1}$ ) et en parallèle une diminution significative la quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans la solution nutritive ( $12.6 \pm 2.4\%$  soit  $0.016 \pm 0.003 \text{ nmol.mL}^{-1}$ ) (Tableau VII, Tableau VIII).

Dans les pots contenant les plantes ayant une rhizosphère témoin (Plant/control rhizosphere), la distribution du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  au cours du temps est significative pour les compartiments solution nutritive, racines et feuilles (Kruskall Wallis,  $p=0.0337$ ,  $p= 0.0476$ ,  $p = 0.0145$ ). A 7 jours, la majorité du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est retrouvé dans la tourbe ( $51.3 \pm 5.8\%$ ) et la solution nutritive ( $40.3 \pm 6.8\%$ ) (Figure 47B). Uniquement une petite partie est retrouvée dans les racines ( $8.4 \pm 2.2\%$ ) et aucune dans les feuilles. La quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  présente dans la tourbe reste similaire au cours du temps de l'ordre de  $1.17 \pm 0.22 \text{ nmol.g}^{-1}$ . Entre le 7<sup>ème</sup> jour et le 21<sup>ème</sup> jour, nous observons une diminution significative de la quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  ( $56.7 \pm 3.9\%$  et  $38.3 \pm 7.4\%$ , respectivement) dans la solution nutritive alors que les concentrations sont respectivement de  $0.059 \pm 0.006$  et  $0.119 \pm 0.022 \text{ nmol.mL}^{-1}$ . La quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  présente dans les racines augmente significativement uniquement entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour ( $p=0.0495$ ) mais présentent cependant une concentration similaire de l'ordre de  $0.6 \text{ nmol.g}^{-1}$  (Tableau VIII). Enfin, la quantité de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les feuilles augmente significativement entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour ( $p=0.0495$ ) mais reste néanmoins assez faible

au 28<sup>ème</sup> jour ( $9.1 \pm 1.6\%$ ) présentant aussi une concentration similaire entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour de l'ordre de  $0.15 \text{ nmol.g}^{-1}$  (Tableau VII).

Dans les lots contenant les plantes dont la rhizosphère est acclimatée avec du  $\gamma\text{HCH}$  (Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere), la distribution du  $^{14}\text{C-}\gamma\text{HCH}$  est significative au cours du temps d'exposition (Kruskall Wallis,  $p=0.0188$ ,  $p=0.0188$ ,  $p=0.0232$ ,  $p=0.0249$  respectivement pour 7, 14, 21 et 28 jours). Dès 7 jours d'exposition, les racines contiennent  $10.9 \pm 3.7\%$  % (soit  $1.46 \pm 0.69 \text{ nmol.g}^{-1}$ ) de  $^{14}\text{C-}\gamma\text{HCH}$  et les feuilles  $2.3 \pm 0.8\%$  (soit  $0.11 \pm 0.03 \text{ nmol.g}^{-1}$ ) de  $^{14}\text{C-}\gamma\text{HCH}$  (Figure 47C et Tableau II). Au bout de 28 jours, la distribution du  $^{14}\text{C-}\gamma\text{HCH}$  dans les racines et les feuilles est statistiquement plus importante avec respectivement :  $22.3 \pm 0.9\%$  ( $0.50 \pm 0.07 \text{ nmol.g}^{-1}$ ) et  $11.5 \pm 1.3\%$  ( $0.16 \pm 0.03 \text{ nmol.g}^{-1}$ ).

Tableau VII. Concentrations en équivalent  $^{14}\text{C-}\gamma\text{HCH}$  dans la solution et la tourbe des lots contenant des plantules. Le test statistique Mann Whitney est utilisé pour comparer deux à deux les concentrations entre les différents lots (Sterile plant, Plant/control rhizosphere, Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere) pour chaque temps d'exposition. Les lettres a,b indiquent les différences significatives ( $P < 0.05$ ).

Time (days)			Sterile Plant	Plant/ control rhizosphere	Plant/ $\gamma\text{HCH}$ rhizosphere
7	Nutritive solution (nmol/ml)	Mean	0.070 ] a	0.059 ] a	0.066 ] a
		Sd	0.001	0.006	0.003
	Peat (nmol/g)	Mean		1.168 ] a	1.337 ] a
		Sd		0.222	0.154
14	Nutritive solution (nmol/ml)	Mean	0.087 ] a	0.104 ] a	0.148 ] a
		Sd	0.004	0.017	0.056
	Peat (nmol/g)	Mean		1.271 ] a	1.576 ] a
		Sd		0.126	0.156
21	Nutritive solution (nmol/ml)	Mean	0.032 ] a	0.119 ] <b>b</b>	0.079 ] <b>b</b>
		Sd	0.001	0.022	0.015
	Peat (nmol/g)	Mean		0.932 ] a	1.009 ] a
		Sd		0.119	0.222
28	Nutritive solution (nmol/ml)	Mean	0.016 ] a	0.051 ] <b>b</b>	0.051 ] <b>b</b>
		Sd	0.003	0.012	0.012
	Peat (nmol/g)	Mean		0.988 ] a	0.987 ] a
		Sd		0.097	0.097

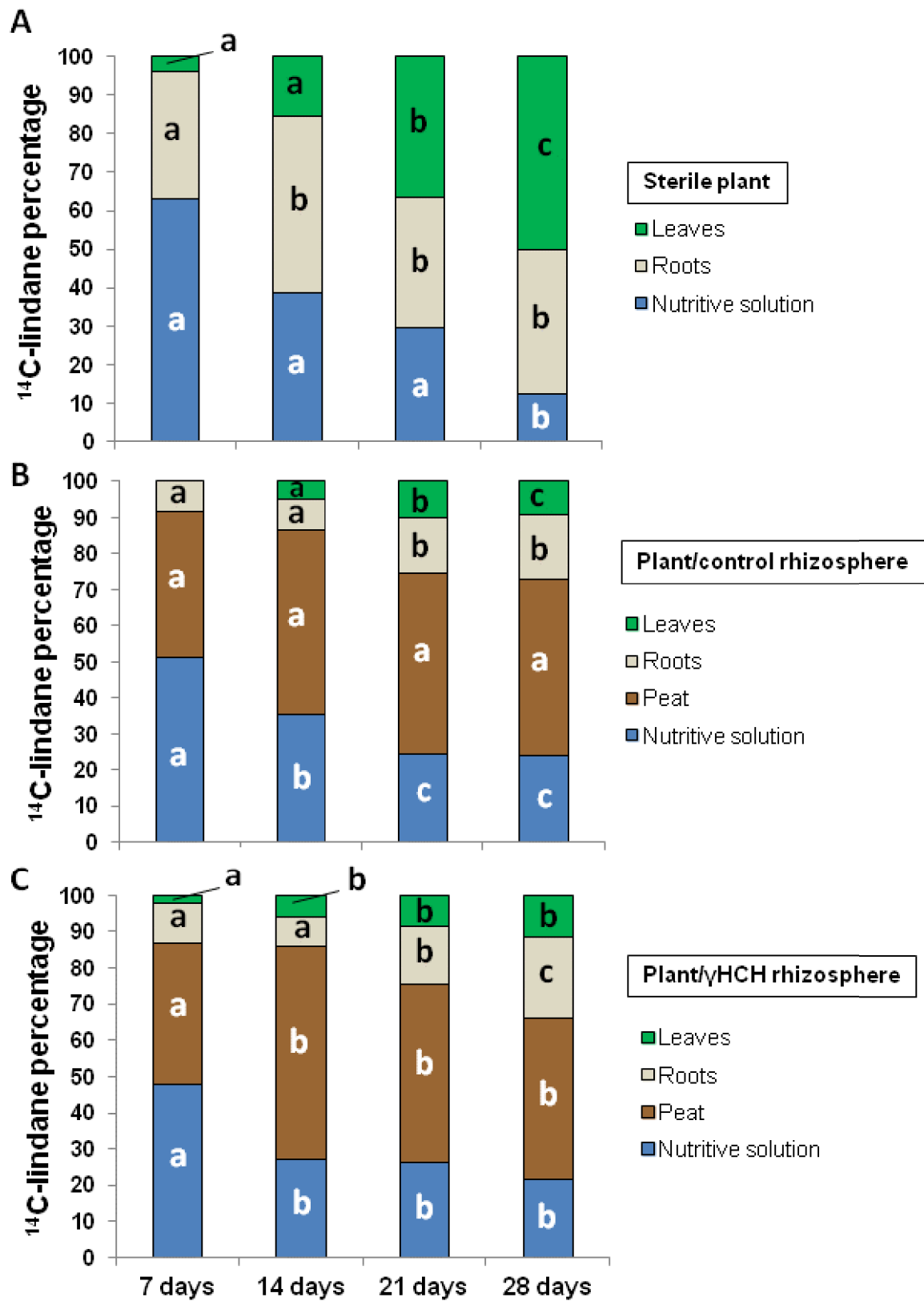


Figure 47. Pourcentage de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les différents compartiments (solution nutritive, tourbe, racines, feuilles) des pots avec plantes Sterile plant (A), Plant/control rhizosphere (B) et Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere (C). Des tests statistiques Mann Whitney ont été réalisés entre les différents compartiments (solution nutritive, tourbe, racines et feuilles) pour chaque condition (Plant sterile, Plant/control rhizosphere, Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere). Les lettres a,b,c indiquent les différences significatives ( $p < 0.05$ )

A partir de 21 jours, les concentrations en  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans la solution nutritive des lots de plantes stériles sont statistiquement plus faibles (facteur moyen de 2.5) comparés aux lots contenant des plantes avec une rhizosphère (Tableau VII). Par contre, aucune différence statistique n'a été relevé entre les concentrations en  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans la rhizosphère quel que soit le temps considéré (Tableau VII). La comparaison de la distribution du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les plantes entre les conditions d'exposition (Sterile plant, Plant/control rhizosphere, Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere) montre des différences listées dans le Tableau VIII. Dès 7 jours d'exposition, les concentrations en  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les feuilles sont statistiquement différentes entre les trois conditions. L'ordre croissant de concentration est plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere > plant/control rhizosphere > sterile plant. Malgré la différence statistique la concentration foliaire en  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est équivalente entre les plantes stériles et les plantes ayant une rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$ . A 14 jours, il y a peu de différence observable. A 21 jours, les concentrations foliaires des plantes avec rhizosphère sont statistiquement plus faibles (facteur 2) que celles mesurées chez les plantes stériles. Enfin à 28 jours, les concentrations racinaires des plantes avec rhizosphère sont plus élevées (maximum facteur 1.5) que celles mesurées dans les plantes stériles. Par ailleurs, les concentrations foliaires malgré des différences significatives présentent des concentrations relativement similaires (de l'ordre de  $0.13 \text{ nmol.g}^{-1}$ ).

Tableau VIII. Concentrations en équivalent  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les racines et les feuilles des lots contenant des plantules. Le test statistique Mann Whitney est utilisé pour comparer deux à deux les concentrations entre les différents lots (Sterile plant, Plant/control rhizosphere, Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphere) pour chaque temps d'exposition. Les lettres a,b,c indiquent les différences significatives ( $P < 0.05$ ).

Time (days)			Sterile Plant	Plant/water	Plant/ $\gamma\text{HCH}$
7	Roots (nmol/g)	Mean	1.11 ] a	0.79 ] a	1.46 ] a
		Sd	0.21	0.16	0.69
	Leaves (nmol/g)	Mean	0.14 ] a	0 ] b	0.11 ] c
		Sd	0.04	0	0.03
14	Roots (nmol/g)	Mean	0.97 ] a	0.64 ] a	0.44 ] b
		Sd	0.10	0.16	0.10
	Leaves (nmol/g)	Mean	0.31 ] a	0.15 ] a	0.14 ] a
		Sd	0.11	0.05	0.01
21	Roots (nmol/g)	Mean	0.42 ] a	0.60 ] a	0.47 ] a
		Sd	0.13	0.03	0.10
	Leaves (nmol/g)	Mean	0.34 ] a	0.14 ] b	0.14 ] b
		Sd	0.07	0.05	0.03
28	Roots (nmol/g)	Mean	0.30 ] a	0.36 ] b	0.50 ] b
		Sd	0.04	0.04	0.07
	Leaves (nmol/g)	Mean	0.13 ] a	0.12 ] b	0.16 ] b
		Sd	0.02	0.02	0.03



#### 4. Discussion

Dans les pots sans plantes contenant uniquement de la solution nutritive et de la tourbe, il y a plus de  $^{14}\text{C}$ -volatilisation (facteur 1.5) que dans les pots contenant uniquement de la solution nutritive. L'observation de la perte en  $^{14}\text{CO}_2$  dans les lots avec tourbe laisse présager une étape de métabolisation, voire de minéralisation, du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$ . Nous pouvons supposer que cette métabolisation est due à la présence de microorganismes pouvant dégrader le  $\gamma\text{HCH}$ , libérant des métabolites de volatilité équivalente ou supérieure ainsi que du  $\text{CO}_2$ . Effectivement de nombreuses études ont démontré l'existence d'une biodégradation en présence de certaines bactéries en milieu aérobie produisant des métabolites phénol-chlorés et pouvant aller jusqu'à la minéralisation complète du  $\gamma\text{HCH}$  (Rodriguez-Garrido et al., 2004 ; Phillips et al., 2005 ; Quintero et al., 2005). Par ailleurs, nous observons un effet d'adsorption du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  sur la matière organique de la rhizosphère ce qui est cohérent avec des études antérieures (Joo et al., 2008 ; Kidd et al., 2008). Chez les lots contenant de la rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$ , il semble que l'adsorption du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  soit légèrement plus importante que dans la rhizosphère témoin. Ceci induit une diminution (facteur 1.6) statistique de la concentration dans la solution en présence de rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$  comparé au lot avec rhizosphère témoin. L'augmentation de l'adsorption pourrait être due à la sélection de bactéries tolérantes au  $\gamma\text{HCH}$  dans la tourbe lors de l'étape d'acclimatation ; ces dernières pouvant fixer et/ou utiliser le  $\gamma\text{HCH}$  comme source de carbone (Rodriguez-Garrido et al., 2004 ; Phillips et al., 2005 ; Quintero et al., 2005 ; San Miguel et al., 2013).

Dans les pots contenant des plantules de *Zea mays*, nous avons mis en évidence une diminution (facteur 1.7) de la  $^{14}\text{C}$ -volatilisation lorsque les plantes possèdent une rhizosphère par rapport aux plantes stériles dépourvues de rhizosphère. Ce phénomène peut être relié à l'adsorption du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  sur la matière organique de la rhizosphère et à la prise en charge du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  par les microorganismes. Cependant, contrairement aux pots sans plantes où l'hypothèse avancée est une volatilisation du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  et de ses métabolites à partir du support tourbe, la présence d'une rhizosphère associée à une plante semble démontrer que les métabolites produits au sein de la rhizosphère sont pris en charge par la plante directement plutôt que volatilisés à partir de ce support. La concentration en  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans la solution est statistiquement plus faible (facteur 2.5 à 28 jours) dans les pots avec des plantes stériles par rapport à celle des pots avec des plantes possédant une rhizosphère. Ceci s'explique par

deux hypothèses : (i) Les plantes stériles absorbent de façon optimale le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  puisque celui-ci est totalement biodisponible et (ii) le taux de  $^{14}\text{C}$ -volatilisation est plus important.

Chez les plantes stériles, le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est absorbé par les racines en contact avec la solution. La quantité maximum est atteinte au bout de 14 jours alors que les concentrations sont maximales à 7 jours ( $1.11 \text{ nmol.g}^{-1}$ ) puis diminuent au cours de l'expérience pour atteindre  $0.30 \text{ nmol.g}^{-1}$ . Ceci s'explique par la croissance de la biomasse racinaire permettant d'avoir une  $^{14}\text{C}$ -quantité constante mais une  $^{14}\text{C}$ -concentration interne qui diminue. Le phénomène d'absorption racinaire classiquement décrit correspond à une partition/diffusion du  $\gamma\text{HCH}$  entre la solution et les parties lipophiles des tissus végétaux (San Miguel et al., 2013). Le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est ensuite transféré des racines aux feuilles par un transfert xylémien. Ce type de distribution a déjà été décrit chez certaines plantes comme *P. australis* (San Miguel et al., 2013). En fonction des espèces végétales, le  $\gamma\text{HCH}$  et/ou ses métabolites peuvent être volatilisés à partir des surfaces foliaires (Pereira et al., 2005 ; San Miguel et al., 2013). Dans le cas des plantes avec rhizosphère (Plant/control rhizosphère, Plant/ $\gamma\text{HCH}$  rhizosphère), la distribution du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les plantes est similaire entre les racines et les feuilles mais montrent une diminution drastique des  $^{14}\text{C}$ -quantités absorbées par rapport aux plantes stériles. Ceci est une conséquence directe de la rétention (adsorption) du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  par la matière organique de la rhizosphère (Kidd et al., 2008).

La comparaison des plantes avec rhizosphère témoin et celles avec rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$  montre des différences statistiques dans la distribution quantitative du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$ . Effectivement à 7 jours, les plantes avec rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$  ont une meilleure efficacité d'absorption du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  et de transfert vers les feuilles. Dans ce cas, les concentrations dans les racines et les feuilles sont comparables à celles mesurées dans les organes des plantes stériles. Dans le cas des plantes avec une rhizosphère témoin, la détection de  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les feuilles est nulle. Une telle différence peut s'expliquer par l'effet de la rhizosphère acclimatée au  $\gamma\text{HCH}$  où les microorganismes sont efficaces dans la métabolisation du  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  libérant des  $^{14}\text{C}$ -métabolites plus facilement assimilables par la plante comme cela a été démontré par Kidd et al. (2008). Certaines souches bactériennes de la rhizosphère sont connues pour augmenter la minéralisation du  $\gamma\text{HCH}$  grâce à la présence de déhydrochlorinase LinA et de déhalogenase LinB (Schwitzguébel et al., 2006 ; Geueke et al., 2013). Ainsi, l'acclimatation de la tourbe avec du  $\gamma\text{HCH}$  démontre que l'interaction entre les bactéries et les plantes peut augmenter significativement la biodisponibilité des contaminants organiques ou modifier l'entrée du  $\gamma\text{HCH}$  dans les plantes (Davis et al., 2002 ; Welsh et al.,

2009 ; Geueke et al., 2013). Sur le long terme de l'expérience (jusqu'à 28 jours), la concentration en  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  dans les racines reste supérieure (facteur 1.7) chez les plantes avec une rhizosphère par rapport aux racines de plantes stériles. Par contre au niveau foliaire, la concentration est équivalente dans toutes les conditions étudiées.

## 5. Conclusion

Ces expériences montrent que la rhizosphère peut jouer un rôle majeur dans la remédiation des OCPs, comme cela est mis en évidence avec le  $\gamma\text{HCH}$ . Dans un premier temps, la matière organique et la microflore permettent de fixer le  $\gamma\text{HCH}$  par des phénomènes d'adsorption (sol) et d'absorption (microflore). Cette étape permet de minimiser les pertes par volatilisation. La métabolisation du  $\gamma\text{HCH}$  au sein de la rhizosphère semble libérer des métabolites biodisponibles pour la plante qui absorbe de façon optimale ces molécules ( $\gamma\text{HCH}$  et métabolites). Leur transfert vers les parties aériennes semble optimal lorsque le sol est précédemment acclimaté au  $\gamma\text{HCH}$ . Ainsi, dans ce cas, la microflore sélectionnée par la pression chimique est plus efficace dans la métabolisation du  $\gamma\text{HCH}$ .

## Remerciements

Ce travail a été réalisé de façon équivalente avec Angélique San Miguel.

# Discussion générale & perspectives



## Discussion générale

Ce travail de thèse, se place dans un contexte de contamination des sols par les OCPs, notamment le lindane ( $\gamma$ HCH) et la chlordécone (CLD). La trop grande superficie de contamination ne permet pas d'appliquer des solutions de décontamination classiques. C'est pourquoi, la phytoremédiation est une technologie qui paraît appropriée pour cette problématique. Toutefois, de nombreuses études ont démontré un effet létal des OCPs sur la germination et le développement de nombreuses espèces végétales comme les *Brassicaceae*, *Leguminoceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae* et *Poaceae* (Kumar et al., 1995; Arkhipchuk et al., 2000; Bidlan et al., 2004; Bueno et al., 2004; Kidd et al. 2008; Abhilash & Singh, 2010; Li et al., 2011; Chouychai & Lee, 2012). Cependant, quelques études ont néanmoins montré la capacité du maïs (*Zea mays*) à tolérer des expositions élevées aux OCPs (Chouychai & Lee, 2012; Somtrakoon & Pratumma, 2012). Il s'agit donc d'une plante modèle pour des études de phytoremédiation sur les sols pollués par les OCPs. En outre, cette plante semble posséder de nombreuses qualités pour être une plante candidate pour des études de phytoremédiation comme sa biomasse importante (Alberto et al., 2014) et son réseau racinaire dense permettant de prélever d'importantes quantités d'eau au niveau du sol (Hinsinger et al., 2009 ; Postma et al., 2014). Afin d'envisager une utilisation du maïs pour des applications en phytoremédiation, nous devons évaluer la tolérance de cette espèce végétale aux OCPs. Il est démontré qu'un mauvais développement racinaire induit un développement médiocre des parties aériennes de la plante impliquant de ce fait, une efficacité de phytoremédiation moyenne à nulle. Ainsi, l'originalité de cette étude était de se focaliser sur la fonctionnalité de la rhizosphère en présence des OCPs. Effectivement ce compartiment complexe –à la fois abiotique (sol, solution du sol, minéraux...), végétal (racines, exsudats), microbien (bactéries, champignons) et parfois animal (comme les vers de terre)- est un espace prépondérant dans la remédiation des sols.

### 1. Définir le niveau de phytotoxicité du lindane ( $\gamma$ HCH) et de la chlordécone (CLD) sur la plante au niveau des racines.

La première partie de ce travail consistait à comprendre les mécanismes moléculaires/biochimiques/métaboliques impliqués dans la phytotoxicité au niveau racinaire et selon un gradient d'exposition au  $\gamma$ HCH et la CLD en hydroponie (Figure 48).

Les doses extrêmes en OCPs n'ayant que peu de réalité environnementale (excepté dans les cas particuliers des friches industrielles) permettent de caractériser les mécanismes cellulaires qui sont impliqués dans la cytotoxicité. Nos résultats démontrent les effets des OCPs sur la croissance et le cycle cellulaire des racines. Les OCPs provoquent une augmentation de la ploïdie cellulaire ainsi qu'un dérèglement de la transcription des gènes (E2F, RBR1, CYCD3;1, CYCB2, WEE1, APC/C) régulateurs du cycle cellulaire. Ces deux aspects sont caractéristiques d'une induction de l'endoréplication. L'endoréplication est un phénomène courant chez les plantes, corrélé avec l'augmentation de la taille des cellules (Bourdon et al., 2011) mais aucune étude à notre connaissance n'a démontré le lien entre les OCPs et l'endoréplication. Une telle perturbation explique l'inhibition de croissance des racines observées en présence des OCPs à de telles concentrations. Par ailleurs, nous avons également démontré la capacité des OCPs à induire une augmentation des molécules de signalisation cellulaire comme le calcium libre dans le cytosol et certains ROS ( $H_2O_2$ ). Ces résultats sont en cohérence avec des études précédentes démontrant que les OCPs induisent un stress oxydant chez les plantes (Menone et al., 2008 ; Faure et al., 2012 ; Zhang et al., 2013). L'augmentation de ces molécules de signalisation a pour conséquence d'induire des voies d'apoptose et/ou de mortalité cellulaire (Gadjev et al., 2008 ; Dudits et al., 2011 ; De Pinto et al., 2012).

Aux doses classiquement retrouvées dans l'environnement, les effets des OCPs sur les voies de mort cellulaire sont plus faiblement marqués et montrent une induction modérée de l' $H_2O_2$ , des caspase-3-like, des marqueurs d'apoptose et de la dégradation des membranes. Il semblerait que ces concentrations puissent induire une faible phytotoxicité sur du court terme. Ces marqueurs de cytotoxicité peuvent interagir avec le métabolisme racinaire. Pour ce faire, nous avons étudié le métabolome racinaire afin de caractériser les phénotypes métaboliques en relation au stress d'exposition aux OCPs. Nos résultats montrent que les OCPs augmentent le catabolisme des sucres en réponse à un besoin énergétique nécessaire à la réponse au stress d'exposition (Trenkamp et al., 2009). Les OCPs modifient la production des acides organiques, des acides aminés et des acides gras. Or les exsudats racinaires sont composés de sucres (72-73%), de composés phénoliques (17-18%), d'acides organiques (7%) et d'acides aminés (3%) (Schönwitz and Ziegler, 1982; Azaizeh et al., 1995; Schilling et al., 1998; Carvalhais et al., 2011; Oburger et al., 2013). Ainsi les modifications induites par les OCPs sur le métabolome vont changer la composition des exsudats racinaires. De telles modifications dans la nature des excréments racinaires peuvent agir sur les communautés microbiennes associées aux plantes (Benizri et al., 2002 ; Benizri & Amiaud, 2006).



## 2. Analyser les changements de dynamique du carbone et de l'azote et les modifications cataboliques des microorganismes au niveau rhizosphérique en présence d'OCPs

Dans le sol, la zone densément peuplée dans laquelle les racines des plantes interagissent avec les systèmes racinaires des plantes voisines pour l'espace, l'eau et les minéraux ainsi qu'avec les microorganismes est la rhizosphère (Bais et al., 2004). Or, c'est au niveau de celle-ci que l'action conjointe des plantes et des microorganismes peut jouer un rôle essentiel dans l'efficacité de remédiation des contaminants (Hinsinger, 2001). De plus, des études récentes ont démontré l'augmentation significative de la disparition et/ou de la minéralisation des polluants organiques persistants au niveau de l'interface racines-sol (Kuiper et al. 2004; Krutz et al. 2005; Kidd et al. 2008; Gerhardt et al. 2009).

Nos résultats sur l'étude de l'allocation des ressources et de la fonctionnalité d'un sol, nous suggèrent que les OCPs provoquent certains effets sur le cycle du carbone, de l'azote et des communautés microbiennes (Figure 48). Nous avons mis en évidence un effet inhibiteur possible des OCPs sur l'étape d'ammonification entraînant une diminution de la PNM. Les communautés microbiennes sont impactées avec des profils physiologiques statistiquement différents en présence des OCPs. Cependant en présence de plante, l'effet des OCPs semblent être amoindrit. En effet, les racines jouent un rôle majeur dans la fonctionnalité de la rhizosphère *via* les rhizodépôts qui sont de deux sortes : les débris racinaires et les exsudats (Gobat et al., 2010). Nous avons mis en évidence une mortalité cellulaire possible et induite par les OCPs dans les racines de maïs (Blondel et al., 2014). Ainsi, les lysats libérés dans la rhizosphère peuvent être utilisés par les microorganismes comme source de carbone. D'autre part, les changements de composition des exsudats induits par les OCPs décrits précédemment peuvent entraîner une modification de la structure des communautés microbiennes. Effectivement, des études ont montré que les OCPs induisent un réarrangement des communautés microbiennes de la rhizosphère puisque certains genres semblent particulièrement sensibles (*Hevizibacter*, *Acidovorax*) et d'autres apparaissent tolérants (*Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*) (San Miguel et al., 2014). Ainsi la modification de la microflore rhizosphérique pourrait être due à un effet direct des OCPs sur la viabilité de certaines souches bactériennes mais aussi être liée à une modification dans la composition des exsudats racinaires. Au niveau rhizosphérique, nous avons mis en évidence une absence de perturbation du turnover des nutriments (N, C) et du catabolisme des

microorganismes. Cette adaptation peut être liée à une modification de la nature ou de la quantité des exsudats racinaires permettant de favoriser le développement des souches opportunistes (Corgie et al., 2004 ; Wenzel, 2009). Par ailleurs, les plantes semblent agir à distance puisque dans les sols plus éloignés de la rhizosphère, les effets des OCPs sur le cycle de l'azote est amoindri. Les profils physiologiques des communautés microbiennes sont similaires à ceux de la rhizosphère et des sols témoins. Ainsi, les plantes ont un effet bénéfique en maintenant au niveau rhizosphérique -mais aussi au niveau des sols à distance- un système fonctionnel en termes de recyclage de l'azote et du carbone ainsi qu'en produisant des exsudats racinaires favorables au développement des communautés bactériennes. La fonctionnalité de la rhizosphère sous une pression chimique en OCPs assez élevée ( $\gamma$ HCH : 48 mg kg<sup>-1</sup> ; CLD : 6.86 mg kg<sup>-1</sup>) est proche de celle évaluée chez les témoins. Ainsi, les plants de *Z. mays* exposés à ces OCPs montrent un développement optimal similaire à celui des plants témoins.

### 3. Efficacité de l'uptake des OCPs par les plants de *Zea mays*.

Le rôle potentiel de la rhizosphère dans l'absorption des OCPs est difficile à cerner puisque ce compartiment montre une grande complexité dans les interactions entre organismes et une adaptation très rapide en fonction des changements environnementaux. De précédentes études ont mis en évidence une métabolisation active des OCPs au niveau rhizosphérique (Schwitzguébel et al. 2006 ; Kidd et al., 2008 ; Geueke et al., 2013). Certaines souches bactériennes (*Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Devosia* sp., *Sphingobium* sp.) isolées à partir de la rhizosphère de *Withania somnifera*, *Solanum torvum*, *Erianthus munja* et *Lantana camera* sont capables de biodégrader le  $\gamma$ HCH ou d'autres OCPs (Kidd et al., 2008 ; Lal et al., 2008 ; Abhilash & Singh 2010 ; Akshi & Kumar, 2012 ; San Miguel et al., 2014). Les plantes pourraient être un acteur principal de cette biodégradation puisqu'il a été montré que les exsudats racinaires de *Z. mays* améliorent l'absorption du  $\gamma$ HCH par certaines souches bactériennes (Davis et al., 2002 ; Welsh et al., 2009 ; Alvarez et al., 2012 ; Geueke et al., 2013).

Nous avons mis en évidence que les plantes et leur rhizosphère peuvent jouer un rôle majeur dans la remédiation des OCPs (Figure 48). La rhizosphère permet d'adsorber les OCPs sur la matière organique et de les fixer au niveau de la rhizo-microflore. Effectivement, nous avons

démontré que le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  est activement métabolisé voire minéralisé (libéralisation de  $^{14}\text{CO}_2$ ) par la microflore. En effet, certaines bactéries peuvent dégrader le  $\gamma\text{HCH}$  en des métabolites phénol-chlorés voire le minéraliser complètement (Rodriguez-Garrido et al., 2004 ; Phillips et al., 2005 ; Quintero et al., 2005). Ainsi, les activités microbiennes peuvent libérer à proximité des tissus racinaires des métabolites des OCPs qui sont pris en charge par la plante directement plutôt que volatilisés à partir de ce support. Ce résultat montre l'importance d'associer plante et rhizosphère fonctionnelle dans les études de phytoremédiation afin d'éviter la volatilisation des OCPs et/ou de leurs métabolites qui peuvent ensuite contaminer l'atmosphère.

Les plantules de *Z. mays* absorberaient le  $^{14}\text{C}$ - $\gamma\text{HCH}$  et ses métabolites et semblent les bioconcentrer majoritairement au niveau racinaire. Un transfert vers les parties aériennes est possible mais nécessite une estimation sur des temps plus long d'exposition. Nos conditions expérimentales ont permis de démontrer que lorsque le sol est acclimaté à une pression chimique en OCPs, les mécanismes mis en jeu lors d'une phytoextraction sont optimaux. Cela est très certainement lié à une sélection de souches microbiennes tolérantes et/ou biodégradantes des OCPs.

Au final, les plants de *Z. mays* sont un modèle végétal judicieux pour des applications de phytoremédiation puisque la rhizosphère montre peu de perturbations dans son fonctionnement (turnover des nutriments, profils physiologiques microbiens), que les plants sont capables d'extraire et de bioconcentrer les OCPs et que le développement de ces plantes est optimal.

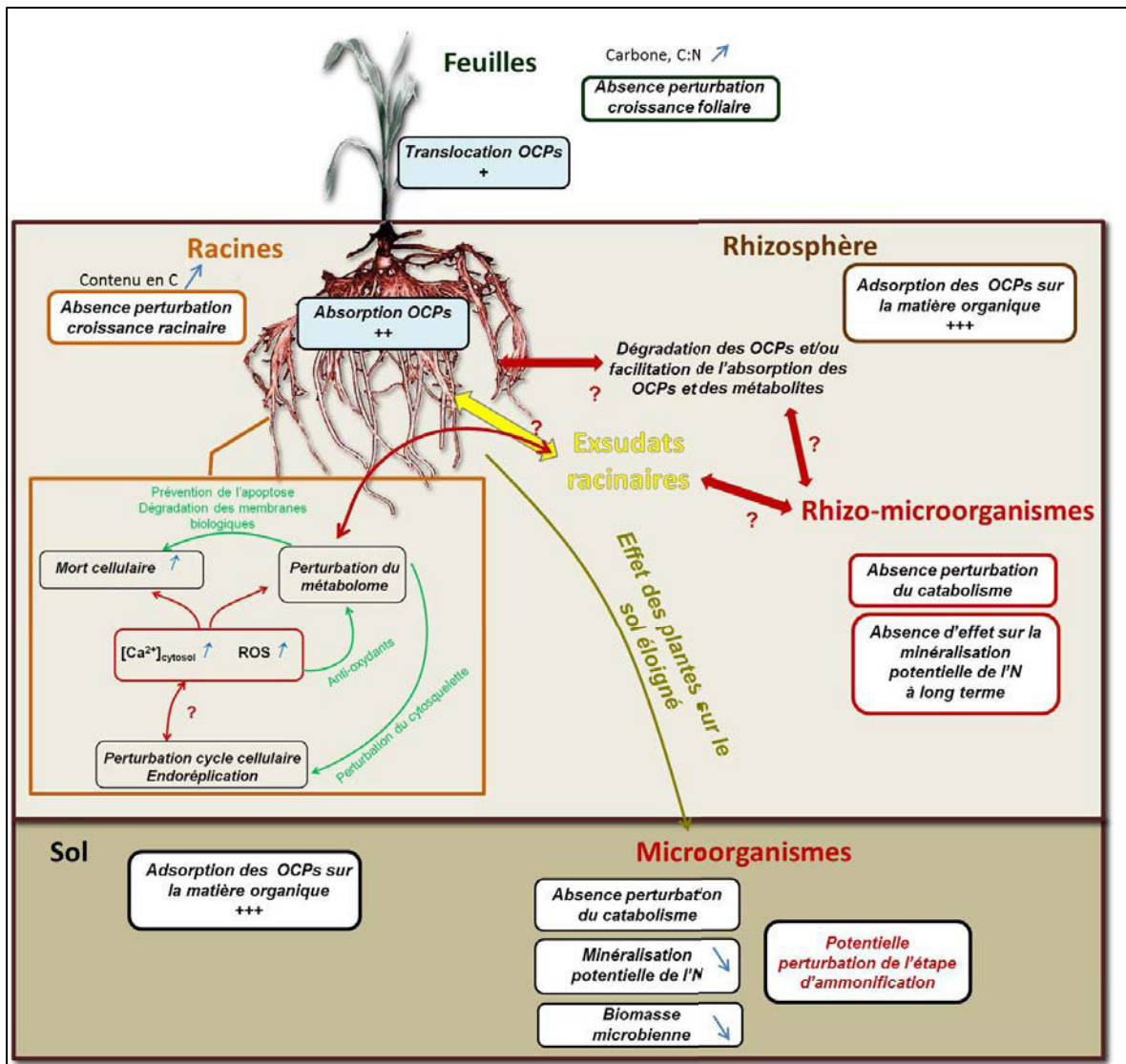


Figure 48. Schéma bilan des résultats obtenus

## Perspectives

Ce travail de thèse a permis d'aborder le rôle de la rhizosphère lors d'un processus de phytoremédiation. Il s'agit d'une étude en laboratoire s'affranchissant donc d'un certain nombre de paramètres aléatoires ayant lieu sur un site pollué (variation température, hydrométrie, interaction avec d'autres plantes...). Nos conditions expérimentales, nous ont permis de comprendre en partie les mécanismes impliqués dans la phytoremédiation des OCPs mais certains points pourraient être complétés par des expériences complémentaires.

### 1. Définir le niveau de phytotoxicité du lindane ( $\gamma$ HCH) et de la chlordécone (CLD) sur les racines.

Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'expression de la phytotoxicité racinaire lors d'exposition aux OCPs ont été étudiés grâce à une exposition en hydroponie sur du court terme à 7 jours.

Nous pourrions approfondir nos connaissances sur ces mécanismes en réalisant des mesures temporelles à l'échelle de 24h. Nous obtiendrons une meilleure perception des premiers marqueurs de phytotoxicité et de l'organisation des réponses en cascade. En parallèle de cette étude sur racine, la culture cellulaire de maïs permettrait d'évaluer les mécanismes de régulation ayant lieu à l'échelle des racines de maïs entières. Par ailleurs, des racines de maïs pourraient être exposées à des concentrations plus faibles en OCPs sur du long terme pour comparer les réponses cellulaires. .

De plus, peu de travaux ont étudié le métabolome des plantes en réponse aux polluants organiques (Aranibar et al., 2001; Aliferis et al., 2009; Kluender et al., 2009; Thi et al., 2009; Trenkamp et al., 2009; Lubbe et al., 2012). Notre étude a validé l'utilisation de la  $^1\text{H}$ -RMN HRMAS pour mettre en évidence des perturbations fines chez les racines de maïs exposées aux OCPs. Afin de valider notre hypothèse de perturbation des exsudats racinaires, nous pourrions étudier la modification des exsudats racinaires en présence des OCPs par spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN HRMAS.

Etudier la synthèse des Glycine-riche protéines (GRPs) ainsi que les dépôts de lignines et de subérines pourrait également être un axe intéressant. Cela nous permettrait de renforcer les

liens entre les perturbations de la morphologie cellulaire (hypertrophie) et les molécules protectrices constitutives du cytosquelette et des parois.

## 2. Analyser les changements de dynamique du carbone et de l'azote et des modifications cataboliques des microorganismes au niveau rhizosphérique en présence d'OCPs

Nous avons mis en évidence une absence de perturbation du catabolisme des microorganismes dans la rhizosphère et les sols en présence de plante. Cependant, nous avons observé une diminution de la biomasse microbienne sur le court terme dans la rhizosphère et sur le long terme dans les sols non rhizosphérique. Nous sommes peut être en présence d'une adaptation des microorganismes face à la pression chimique : (i) il resterait uniquement les microorganismes tolérants au lindane et à la chlordécone dont le catabolisme n'est pas modifié, ou (ii), nous sommes en présence de microorganismes non sensibles au lindane et à la chlordécone grâce à la présence des plantules de *Zea mays*. Pour répondre à cette question, nous pourrions réaliser une analyse DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Cela permettrait de mettre en évidence les différences de communautés bactériennes en présence ou absence d'OCPs. L'analyse par pyroséquençage permettrait d'identifier les phylums bactériens présents dans les différents compartiments du sol et de la rhizosphère ainsi que dans les tissus végétaux (endophytes).

## 3. Efficacité de l'absorption des OCPs par les plants de maïs.

Nous avons mis en évidence l'action bénéfique de la rhizosphère dans l'absorption du lindane par les racines de *Zea mays*. Pour valider ces résultats, nous pourrions réaliser une expérience de laboratoire complémentaire avec du terreau pour chiffrer l'efficacité de phytoextraction en conditions proches du terrain. De plus, un dosage du lindane et de ses métabolites permettrait de mieux comprendre les mécanismes induits par la relation plante-microorganisme pour faciliter l'absorption et la dégradation du lindane. L'activité de biodégradation (dans les différents compartiments du sol) pourrait être évaluée par l'analyse de la transcription des gènes *linA*, *linB*, *linC* et *linD* responsables de la dégradation du lindane par les bactéries (codant respectivement pour une déhydrochlorinase, une haloalkane-déhalogénase, déhydrogénase et une déchlorinase).

Nous pourrions aussi évaluer l'uptake de la chlordécone par *Zea mays* car aucune étude à notre connaissance ne le démontre.





# Annexes



## Annexe 1 : Données supplémentaires de la publication I

### Supplementary data

#### **Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots**

Claire Blondel<sup>†,‡</sup>, Marc Melesan<sup>†,‡</sup>, Angélique San Miguel<sup>†,‡</sup>, Sylvie Veyrenc<sup>†,‡</sup>, Patrick Meresse<sup>‡,§</sup>, Mylène Pezet<sup>‡</sup>, Stéphane Reynaud<sup>†,‡</sup>, Muriel Raveton<sup>†,‡,\*</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>‡</sup>Université de Grenoble - Alpes, France

<sup>§</sup>Centre Universitaire de Biologie Expérimentale, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

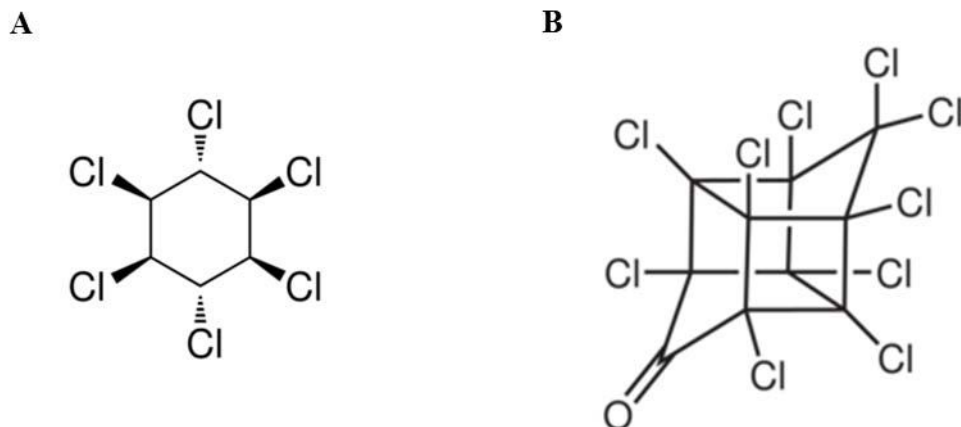
<sup>‡</sup>Centre de Recherche Inserm/UJF U823, Institut Albert Bonniot, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 09, France.

**Corresponding author:** Muriel Raveton ([muriel.raveton@ujf-grenoble.fr](mailto:muriel.raveton@ujf-grenoble.fr))

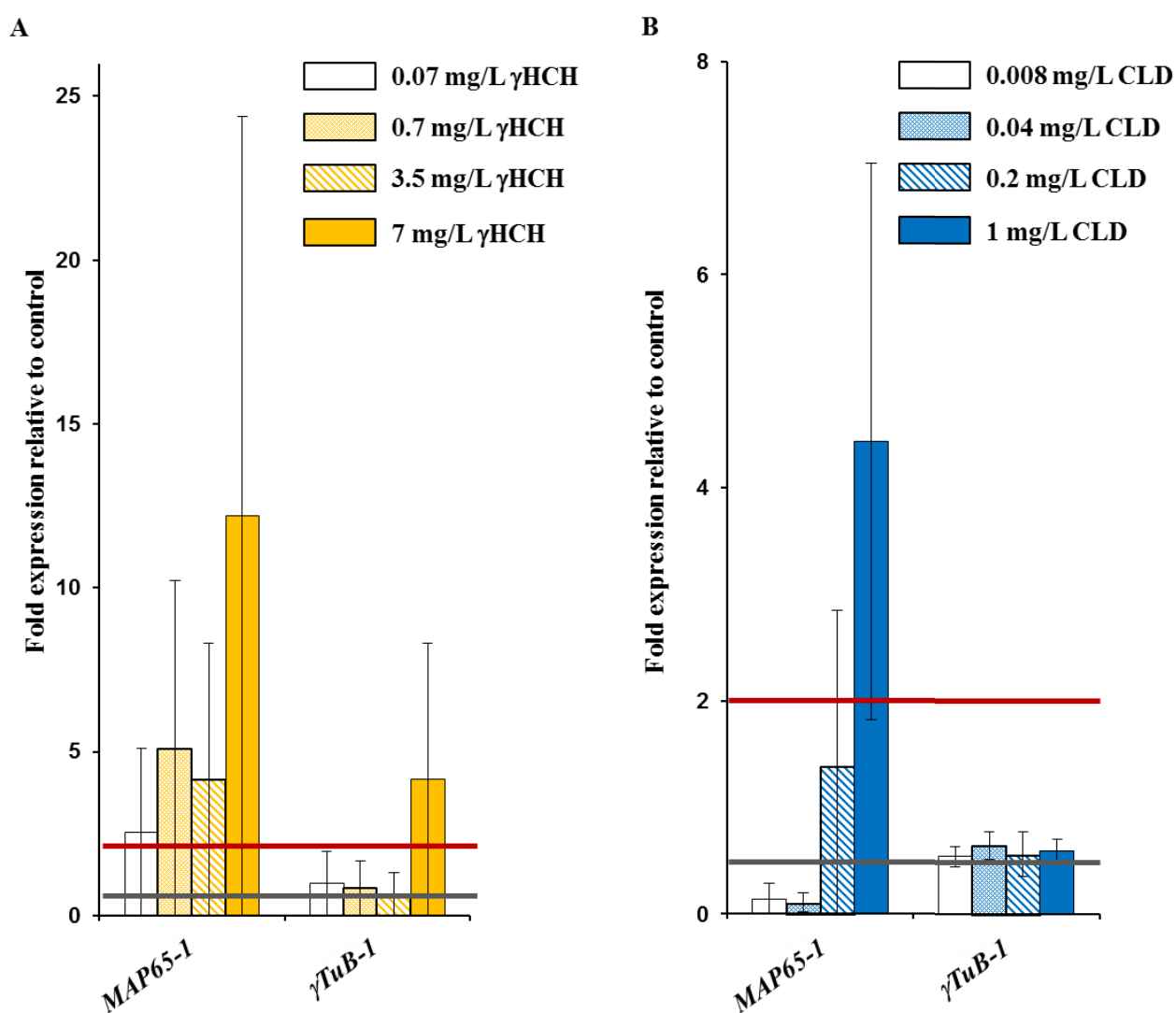
**Number of pages: 10**

**Number of figures: 8**

**Number of tables: 1**

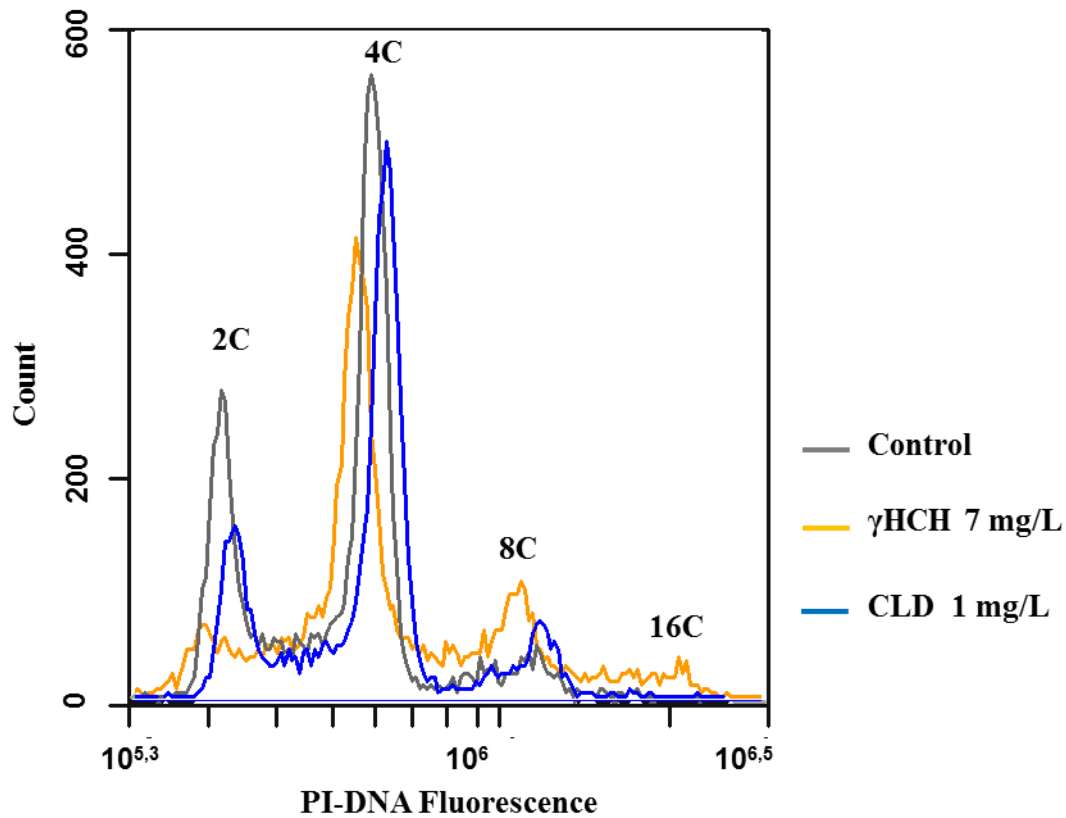


**Fig. S1.** Chemical structures of lindane (A) and chlordecone (B)



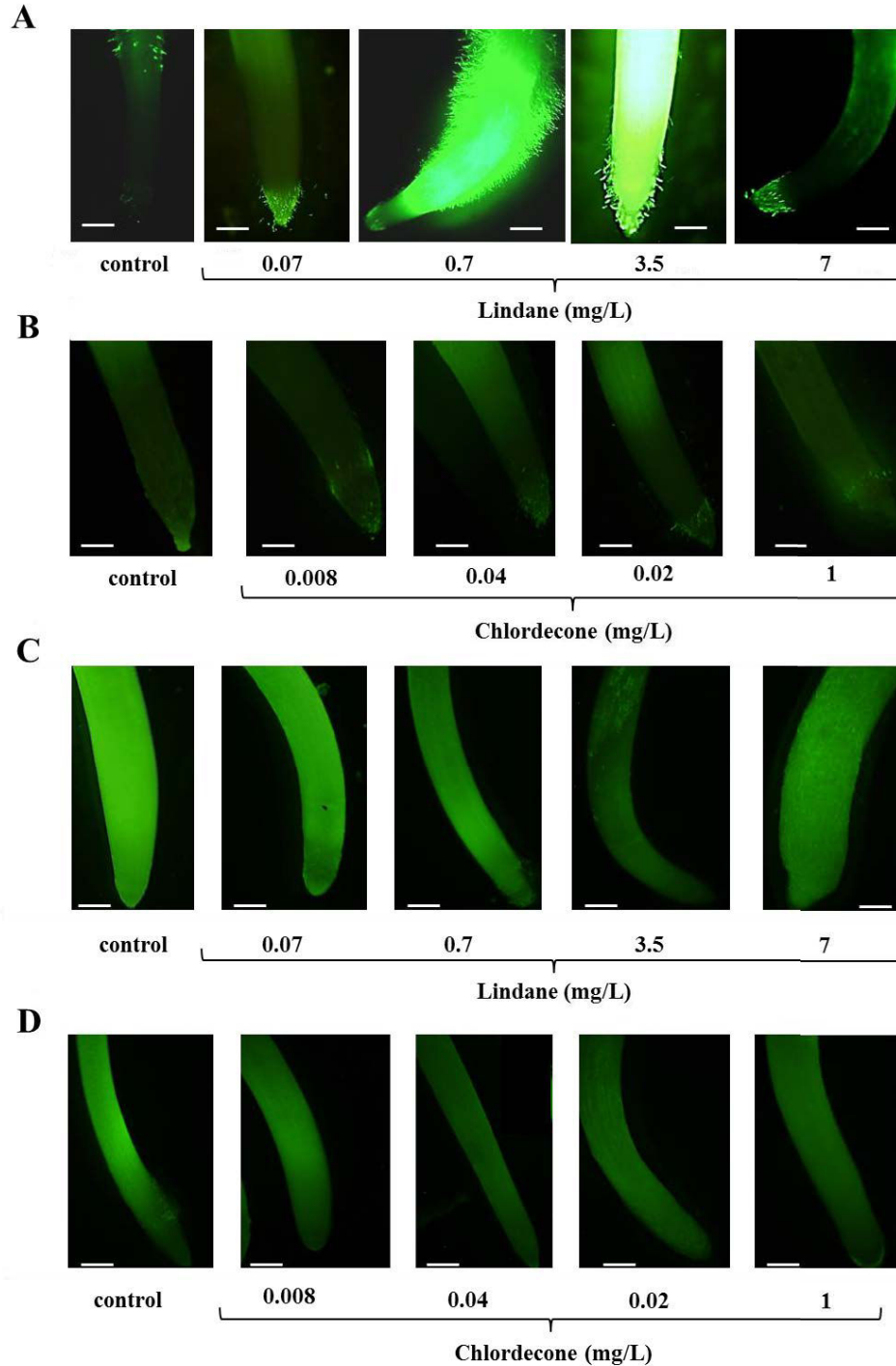
**Fig. S2.** Comparative real-time quantitative RT-PCR analysis of the differential transcription of genes involved in the cell cytoskeleton. Gene transcription values are indicated as fold expression in root apex exposed to different concentrations of lindane [(A): 0.07, 0.7, 3.5 and

7 mg/L  $\gamma$ HCH] and chlordecone [(B): 0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg/L CLD] to unexposed roots (controls). Genes were considered significantly under-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $< 0.5$ -fold, or over-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $> 2$ -fold. Horizontal red and grey lines represent a 2-fold over-expression and 2-fold under-expression in roots exposed to OCPs compared to controls, respectively.



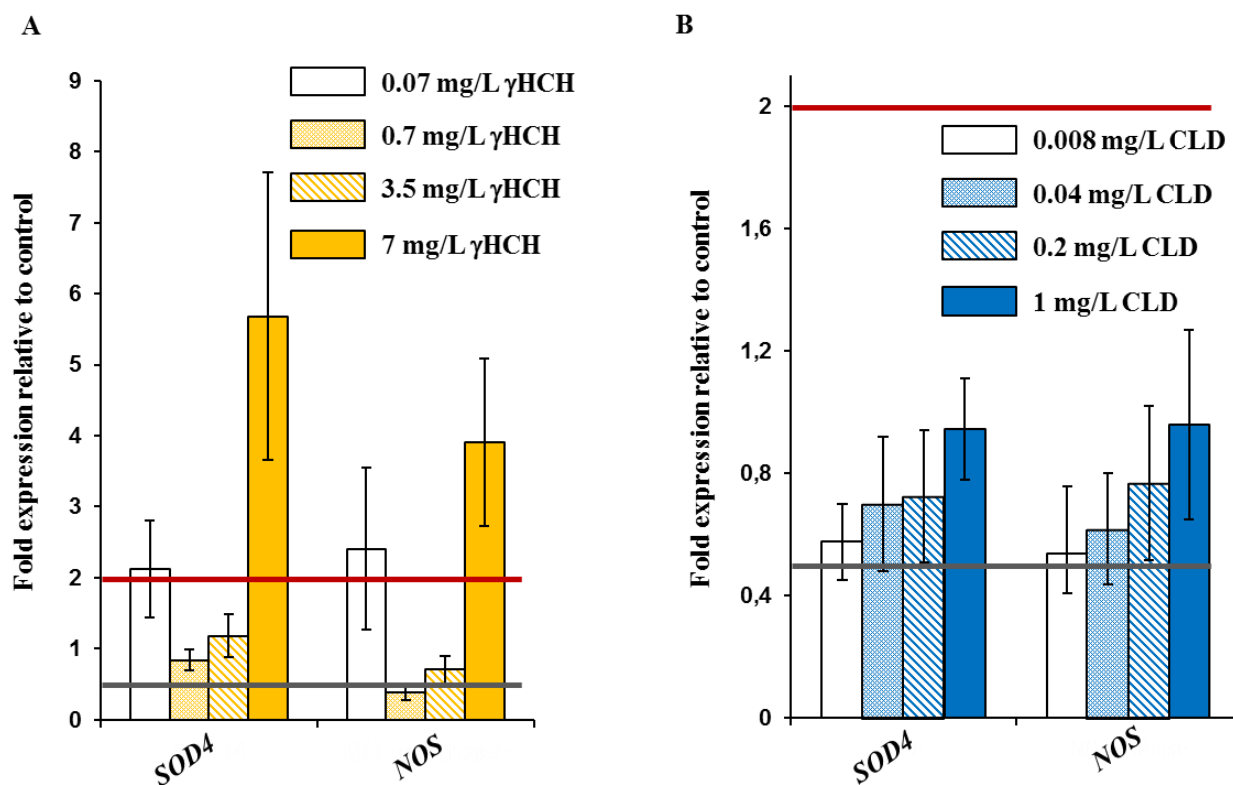
**Fig. S3.** Flow cytometric measurement of mean nuclear ploidy of *Zea mays* root tip cells of control plants, and plants exposed to  $\gamma$ HCH (7 mg/L) and CLD (1 mg/L).

Logarithmic histogram of PI-DNA fluorescence (585/40 nm) of nuclei gate population.

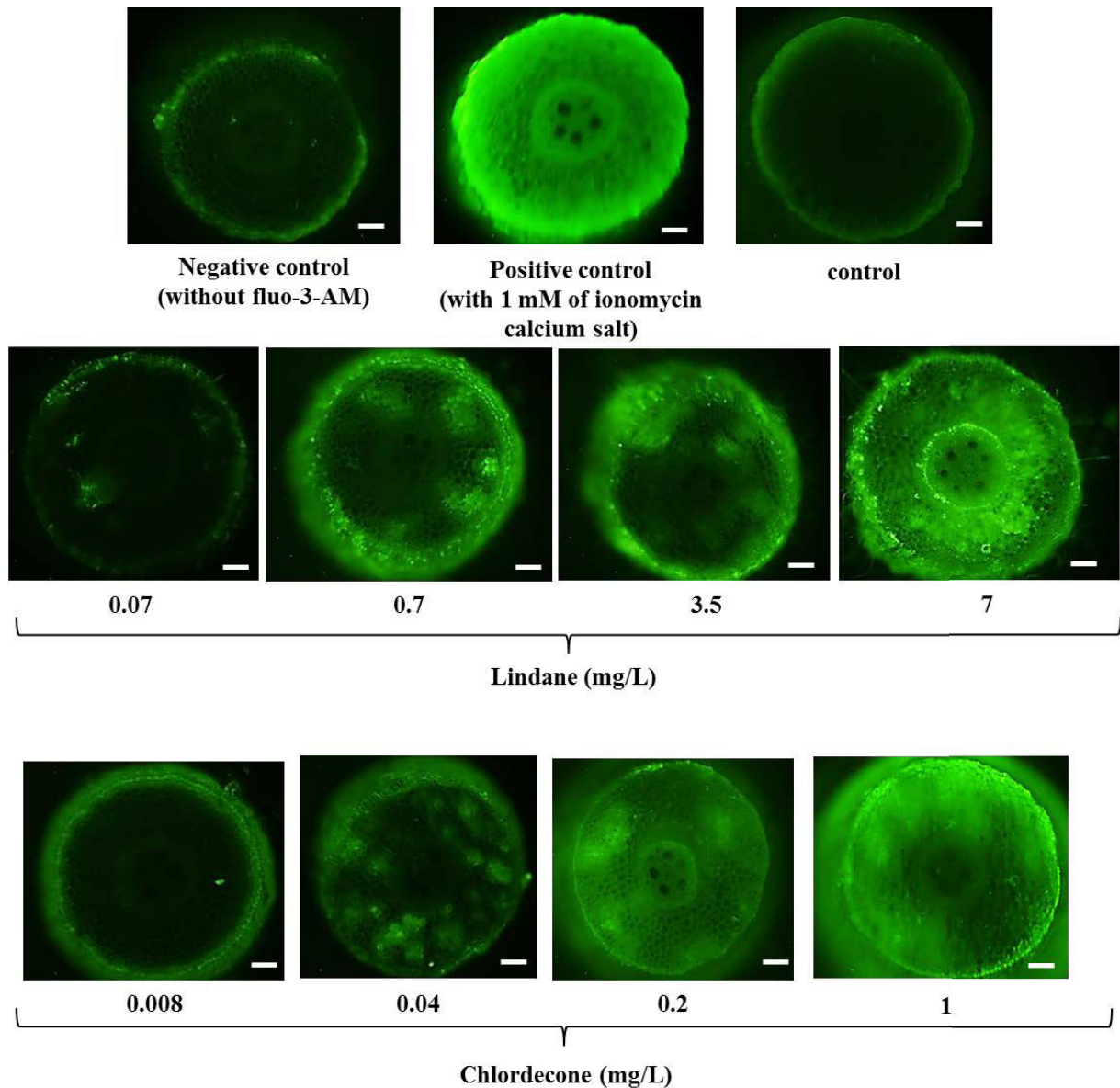


**Fig. S4.** *Zea mays* roots treated with different concentrations of  $\gamma$ HCH (A,C) and CLD (B,D). (A,B). The pictures show the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation using the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA). Bars = 1 mm (C,D). The pictures reveal the presence of nitric oxide (NO) using the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2-DA). Bars = 1 mm  
Fluorescence of DCF in roots was also observed under a fluorescence microscope (Olympus SZX12; excitation 450–490 nm, emission 520 nm).

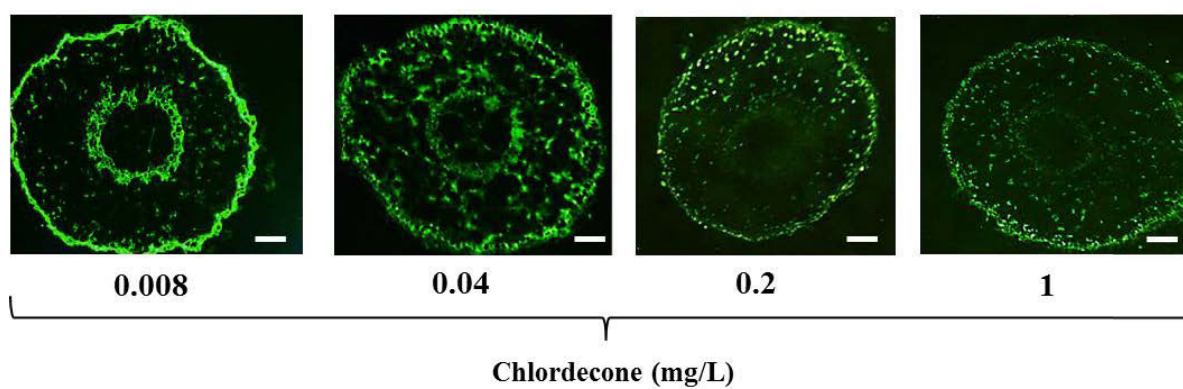
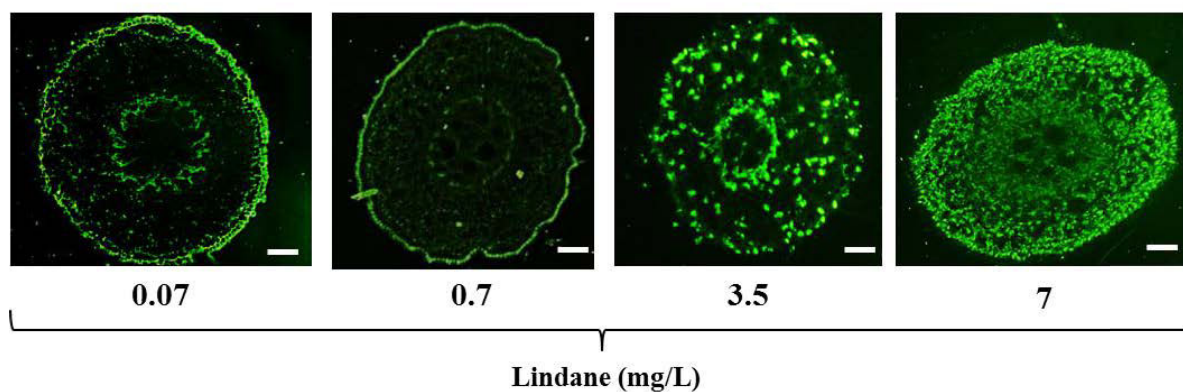
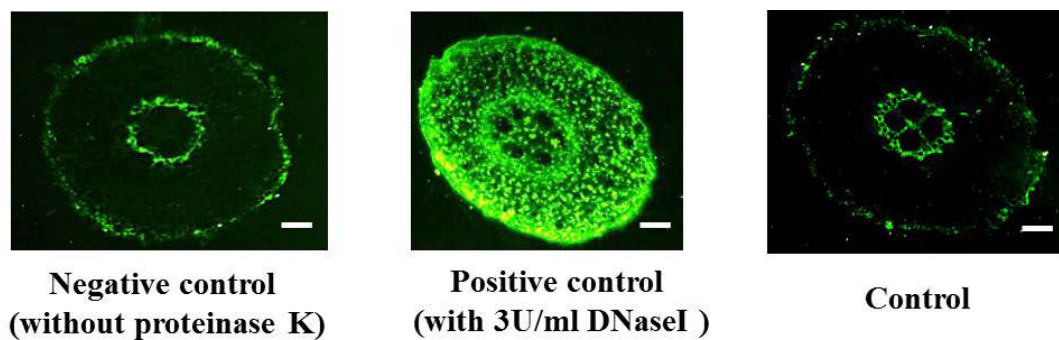




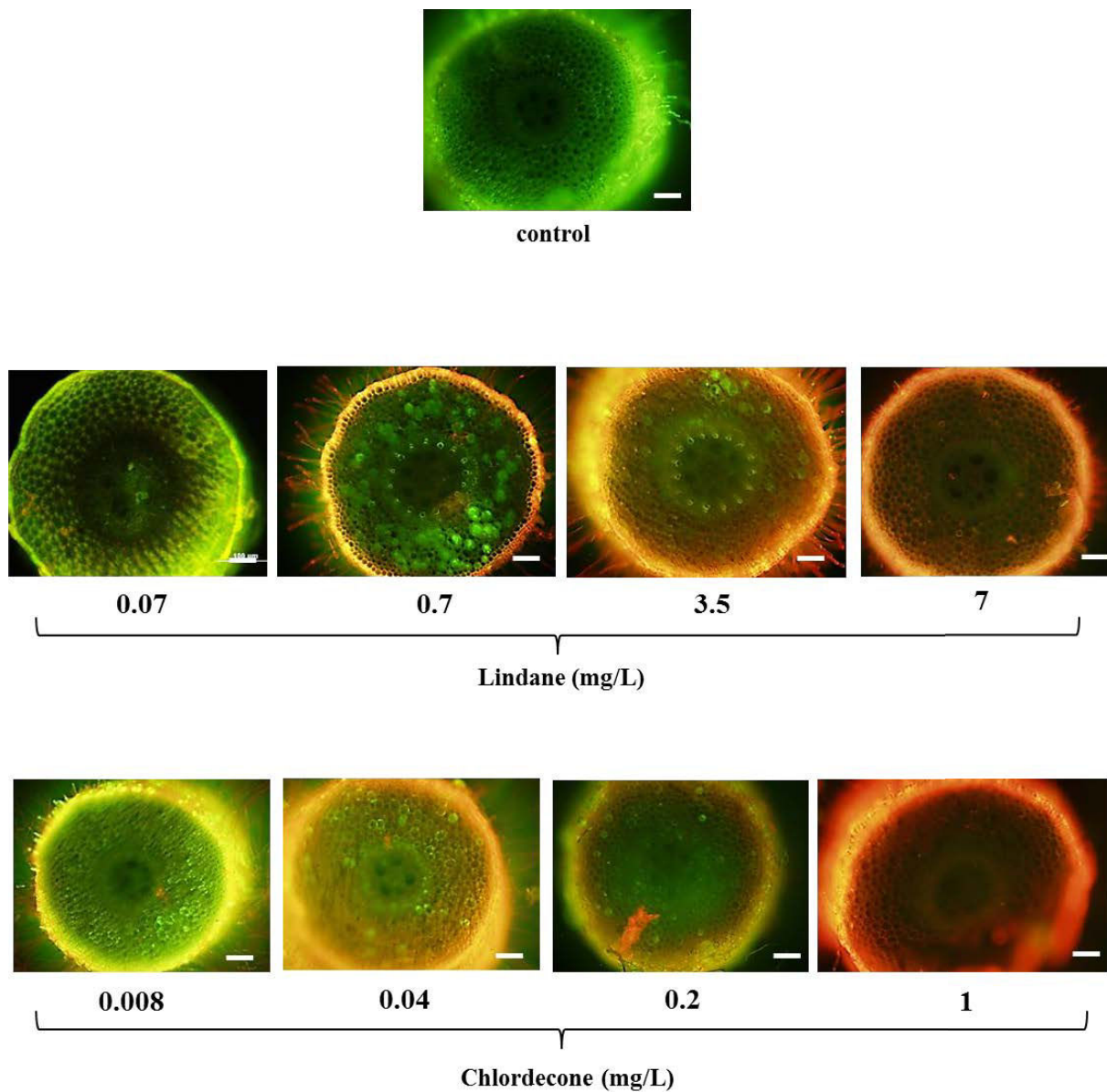
**Fig. S5.** Comparative real-time quantitative RT-PCR analysis of the differential transcription of genes encoding a cytosolic superoxide dismutase (*SOD4*) and nitric oxide synthase (*NOS*). Gene transcription values are indicated as fold expression in root apex exposed to concentration of lindane [(A): 0.07, 0.7, 3.5 and 7mg/L  $\gamma$ HCH] and chlordecone [(B): 0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg/L CLD] to unexposed roots (controls). Genes were considered significantly under-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $<0.5$ -fold, or over-transcribed when mean fold expression  $\pm$  SE was  $>2$ -fold. Horizontal red and grey lines represent a 2-fold over-expression and 2-fold under-expression in roots exposed to OCPs compared to controls, respectively.



**Fig. S6.** Exposure to  $\gamma$ HCH and CLD increased cytosolic concentrations of calcium ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) in *Zea mays* roots. The images show the accumulation of  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  in cross sections of root tips using the fluorescent probe fluo-3-AM. Negative control: without fluo-3-AM, Positive control: ionomycin calcium salt 1mM. Bars = 200  $\mu$ m. Fluorescence of DCF in roots was also observed under a fluorescence microscope (Olympus SZX12; excitation 450–490 nm, emission 520 nm).



**Fig. S7.** Exposure to  $\gamma$ HCH and CLD induced apoptosis in cortical cells of *Zea mays* root tips. The images reveal the apoptotic nuclei labeled with fluorescein (green fluorescence, TUNEL assays). Negative control: without proteinase K; Positive control: with DNaseI (3U/mL). Bars = 200  $\mu$ m.



**Fig. S8.** Exposure to  $\gamma$ HCH and CLD induced cellular death in cortical cells of *Zea mays* root tips. The images show the live (green, fluorescent probe fluorescein diacetate) and dead (red, fluorescent probe propidium iodide) cells. Bars = 200  $\mu$ m.

**Table S1.** Primers used for RT-qPCR expression analysis.

Name	Primer sequence (5'-3')	Fragment (bp)	qPCR Reaction conditions in roots	Accession number (GenBank ID)*
<i>CycA1</i>	FW GACTACGGTATGGTGATGAC RV CAGTGTGGTGCTTCAAGG	115	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 58C)	EU960265.1
<i>CycD3;1</i> <sup>45</sup>	FW GTAGAAGCCGAGCCGAGC RV AAGCAATGCCAAGAACCAAC	111	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 63C)	NM_001158642.1
<i>CycB2</i>	FW GCTCACGGACATCAAGAACC RV AACGCTGGCTGCTTTTCG	105	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 59C)	NM_001155561.1
<i>RBR1</i>	FW AGGAACACAGTAGTAGAGC RV CACCAACAGGATTACAGAC	136	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 56C)	EU961732
<i>E2F</i>	FW GCAGCAGAACCATCCAGAAAGC RV CGCCAGAAGCAAGCCAGTAATC	94	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 52C)	NM_001158169.1
<i>PCNA1</i>	FW CGGTAAACGACGACATCATCAC RV CTTATCTTGCTTGGGCGACTC	85	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 49C)	NM_001111991.1
<i>WEE1</i>	FW GAGATGATTCGGAAGAAG RV ATCGGTATTGAGGTATGG	137	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 52C)	AF123594.1
<i>Aurora</i>	FW TCAGAGTCATCTTCGTATC RV CACCTTGTCAAGTTCCTTATAC	123	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 52C)	NM_001136725.1
<i>APC/C</i>	FW TGCCTGCTTGTGTGCTGTC RV ATGAGATGTGGATGCTGCTGAG	85	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30sec at 55C)	NM_001155176.1
<i>MAP65-1</i>	FW CTGGTGCTCCTGACAAGAC RV ACGAAGTATCTGAATCTGAAGTTG	140	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30sec at 54C)	NM_001158046.1
<i>γTuB-1</i>	FW CCTTCTTGCCTCCTTGATTCC RV GTCTTCTCATAACATCCAATACCG	125	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30sec at 49C)	NM_001111998.1
<i>SOD4</i>	FW AGCCGTCGCCTTCCTATC RV CTACCCAGCACAGCAACAG	88	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30sec at 59C)	NM_001112234.1
<i>NOS</i>	FW CTTGCCCTCCACCGACAC RV TCCTGCCTTGCTGCTCTTC	115	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30sec at 60C)	NM_001153795.1
<i>α-tubulin</i>	FW CCGTGGTGATGTGGTTCC RV GAGGCTGGTAGTTGATTCCG	122	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 60C)	NM_001174192.1
<i>Actin1</i>	FW AACTGGTATTGTGATGGATTC RV ATTAGGTGGTCGGTGAGG	126	10 min at 95 C 40 cycles (15 sec at 95 C, 30 sec at 50C)	NM_001155179

<sup>45</sup>Buendia-Monreal et al. (2011) ; \*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



## Annexe 2 : Données supplémentaires de la publication II

**Table S1: Regions excluded on the <sup>1</sup>H-HRMAS spectrum**

Regions of spectrum with reproducibility problems (ppm)	Regions of spectrum corresponding to residual water signal (ppm)
δ 5.80-5.67	δ 5.22-4.85
δ 6.13-6.03	
δ 6.51-6.22	
δ 6.58-6.54	
δ 7.70-7.44	
δ 7.79-7.69	
δ 8.44-8.26	

**Table S2: Buckets used to realized the t-test for each metabolite**

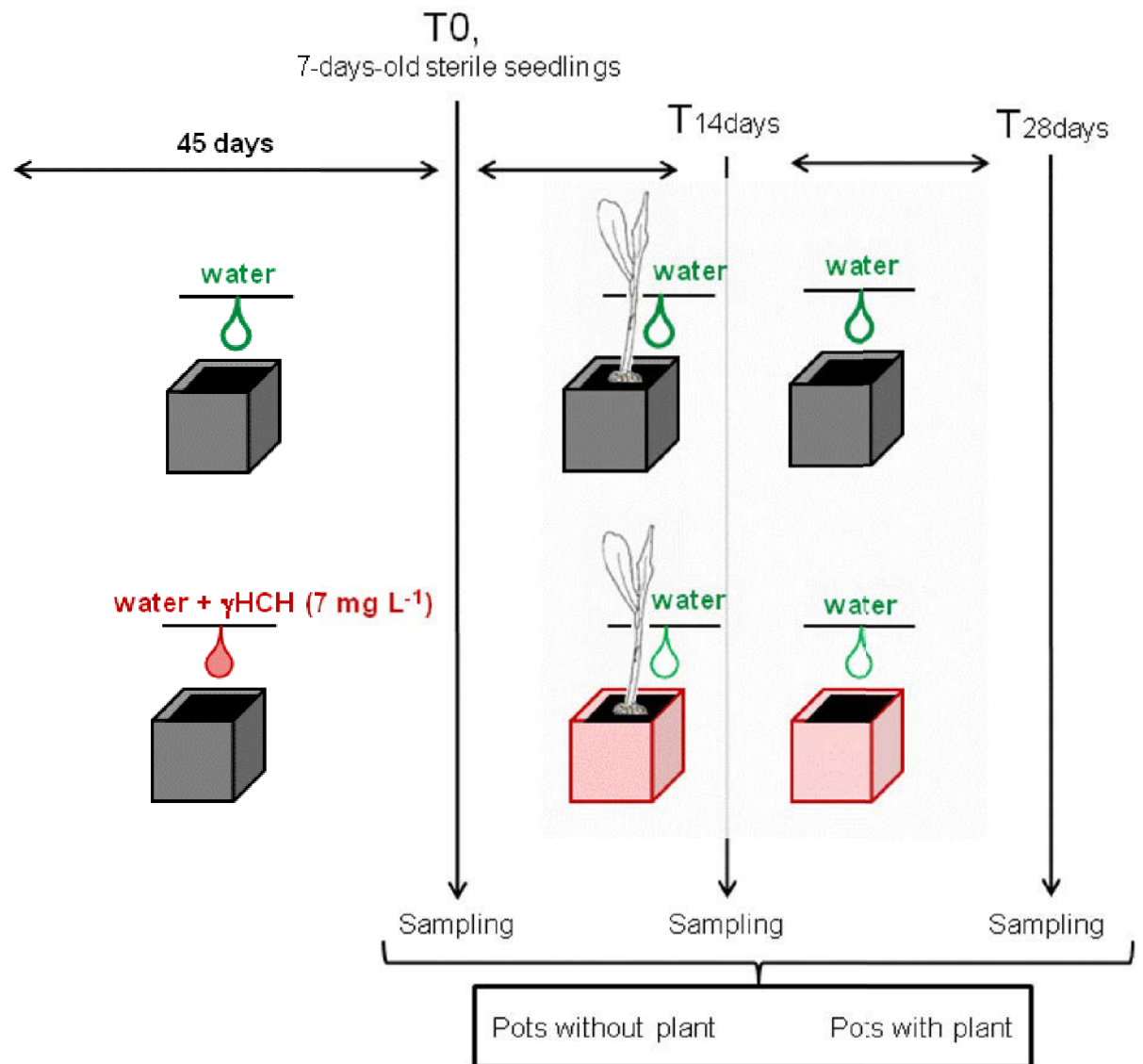
Metabolites	Buckets (ppm)
Sucrose	4.2415 à 4.2115
α-glucose	5.2405 à 5.2295
β-glucose	4.6615 à 4.6355
glycine	3.5505 à 3.5445
asparagine	2.8465 à 2.7975
glutamine	2.5045 à 2.4305
glutamate	2.3855 à 2.3235
GABA	2.3245 à 2.2885
Alanine	1.5325 à 1.4725
Valine	1.0625 à 0.9815
Leucine	1.0345 à 1.0015
Leucine/Isoleucine	0.9775 à 0.9515
Choline	3.2285 à 3.2115
Fumarate	0.9565 à 0.9495
Malate	2.7085 à 2.6445
Citrate	2.5895 à 2.5325
Succinate	2.4245 à 2.4075
Acetate	1.9395 à 1.9175
CH=CH	0.9565 à 0.8845
=CH-CH <sub>2</sub> -CH=	2.7935 à 2.7445
CH <sub>2</sub> -COOR	2.2825 à 2.2365
CH <sub>2</sub> -CH=CH	2.0965 à 2.0305
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOR	1.6445 à 1.5525
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.4135 à 1.2605
CH <sub>3</sub>	0.9565 à 0.8005

**Table S3 Metabolites identified in *Zea mays* root tips.** *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, doublet of doublets; *t*, triplet; *m*, complex multiplet

Metabolites	No.	Group	Chemical shift 1H(ppm)	Chemical shift 13C(ppm)
<b>Carbohydrates</b>				
Alpha glucose	7	d	5.22	95.10
		dd	3.88	62.90
		m	3.70	63.15
beta glucose	8	d	4.63	98.80
		m	5.45	95.00
sucrose	5	d	4.13	79.13
		t	4.05	77.00
		m	3.80	62.11
		s	3.66	64.25
		t	3.47	70.88
		dd	3.87	84.02
		t	3.74	74.13
		dd	3.54	72.97
<b>Amino acids and GABA</b>				
alanine	29	dd	1.47	19.00
		m	3.77	54.23
arginine	18	m	1.67	27.12
		t	3.76	57.07
		t	3.23	43.05
asparagine	10	dd	4.00	54.11
		m	2.85	37.01
		m	2.85	37.33
cysteine	11	m	3.06	27.99
		m	3.94	59.00
glutamate	23	t	3.75	55.20
		dt	2.09	27.69
		t	2.34	34.10
glutamine	12	m	2.45	34.11
		m	2.15	30.00
		t	3.75	57.20
GABA	24	t	2.28	35.98
		m	1.89	26.99
glycine	16	s	3.51	40.00
histidine	3	s	7.10	119.10
		s	7.70	81.10
isoleucine	14	m	0.94	14.00
		d	1.00	17.98
		m	1.45	27.00
		m	1.96	38.50
		d	3.65	62.00
leucine	13	m	0.94	23.01
		m	0.95	25.09
		m	1.70	26.08
		m	1.70	41.99
		m	3.74	56.11
proline	17	m	2.36	28.23
		m	2.06	30.00
		m	3.43	49.03
tyrosine	2	m	6.83	111.00
		m	7.20	134.03
		dd	3.90	59.01
		dd	3.17	40.05
valine	15	d	1.03	21.12
		d	0.95	19.50
		m	2.27	32.00
		d	3.60	63.03
<b>Organic acids and choline</b>				
acetate	27	s	1.95	57.00
fumarate	4	s	6.50	138.00
choline	19	s	3.18	50.04
citrate	21	dd	2.50	45.15
malate	9	d	4.35	73.09
succinate	22	dd	2.70	44.08
succinate	22	s	2.45	36.12
<b>Fatty acids</b>				
CH3	31		0.93	
(CH2) <i>n</i>	32		1.32	
CH2-CH2-COOR	28		1.61	
CH2-CH=CH	26		2.05	
CH2-COOR	25		2.27	
=CH-CH2-CH=	20		2.86	
CH=CH	6		5.36	

## Annexe 3 : Données supplémentaires de la publication III

**Figure S1: Experimental design**



Humidity  
pH  
N pools ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , TDN, DON),  
C pools,  
microbial community (biomass, N pools, CLPP)

Bulk soils

Bulk soils

Rhizosphere soils

Root traits (SRL, RDMC, C and N contents, C:N)  
Leaf traits (SLA, LDMC, C and N contents, C:N)  
R/S ratio

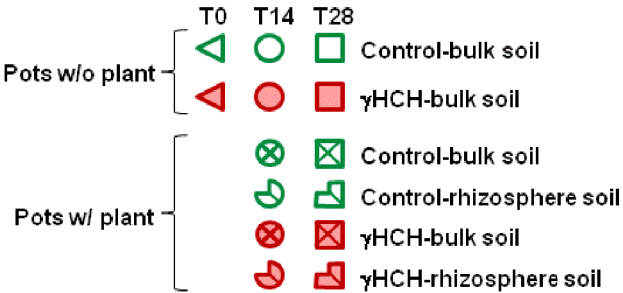
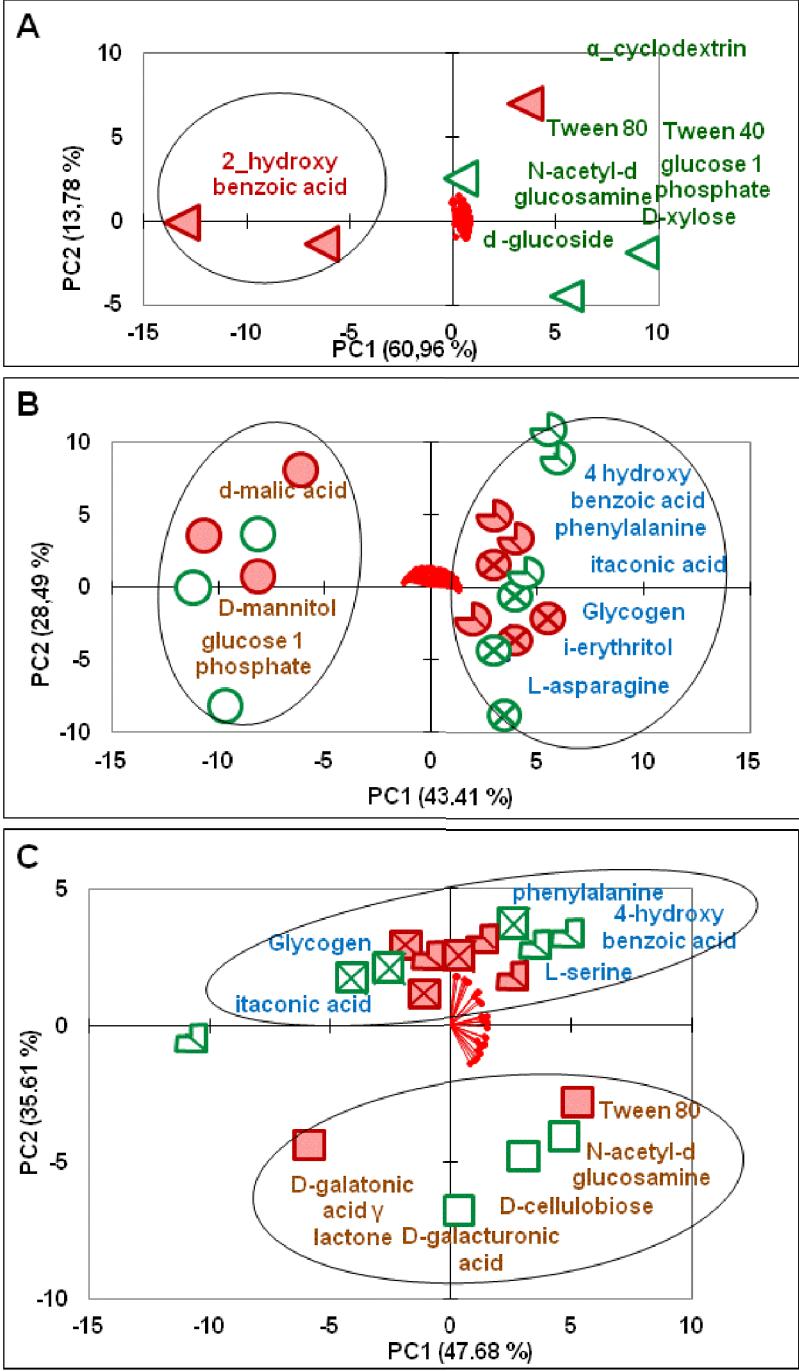
Plantlets



**Table S2: Groups of carbon substrates present in Biolog Ecoplate.** Substrates described in root exudates are indicated by \* (Campbell et al., 1997).

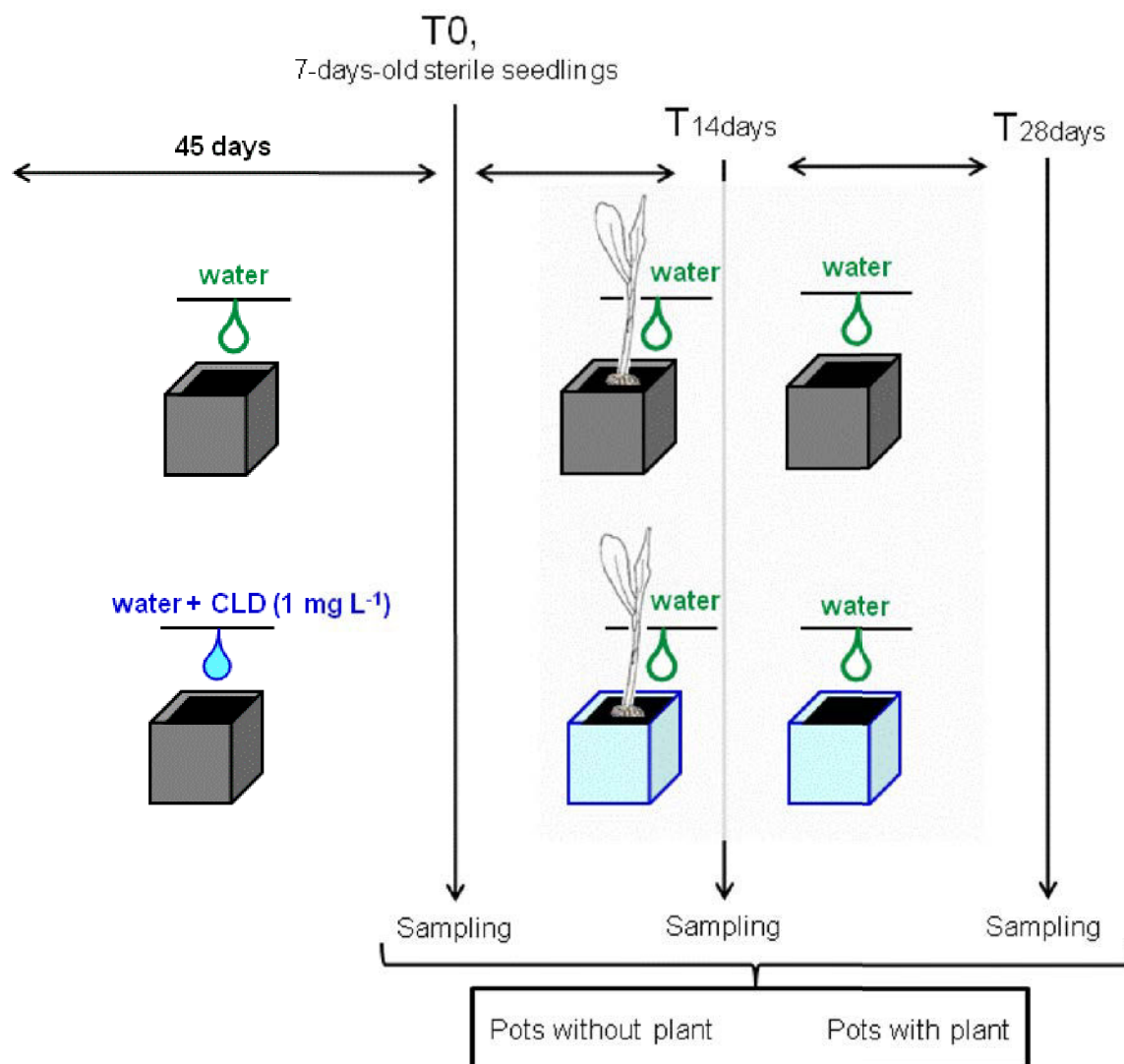
<b>Carbohydrates</b>	<b>Amino acids</b>	<b>Polymers</b>	<b>Carboxylic acids</b>	<b>Phenolic compounds</b>	<b>Amines</b>
d -glucoside	L-arginine *	Tween 40	pyruvic acid methyl ester	2-hydroxy benzoic acid *	phenylethylamine
D-galatonic acid γ lactone	L-asparagine *	Tween 80	D-galacturonic acid	4 hydroxybenzoic acid *	Putrescine
D-xylose *	phenylalanine *	α-cyclodextrin	γ-hydroxybutyric acid		
i-erythritol	L-serine *	Glycogen	D-glucosaminic acid		
D-mannitol	L-threonine *		itaconic acid		
N-acetyl-d glucosamine	glycyl-l-glutamic acid		α-ketobutyric acid		
D-cellulobiose			d-malic acid *		
glucose 1 phosphate					
α-D-lactose					
DL-α-Glycerol phosphate					

**Figure S3. Biplot of Principal Component Analysis (PCA) of microbial community level physiological profiles in different soil types from controls and exposed to  $\gamma$ HCH, at T0 (A), T14 (B) and T28 (C) and most important substrates in in each groups.**



## Annexe 4 : Données supplémentaires de la publication IV

**Figure S1: Experimental design**



Humidity  
pH  
N pools (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, TDN, DON),  
C pools,  
microbial community (biomass, N pools, CLPP)

Bulk soils

Bulk soils

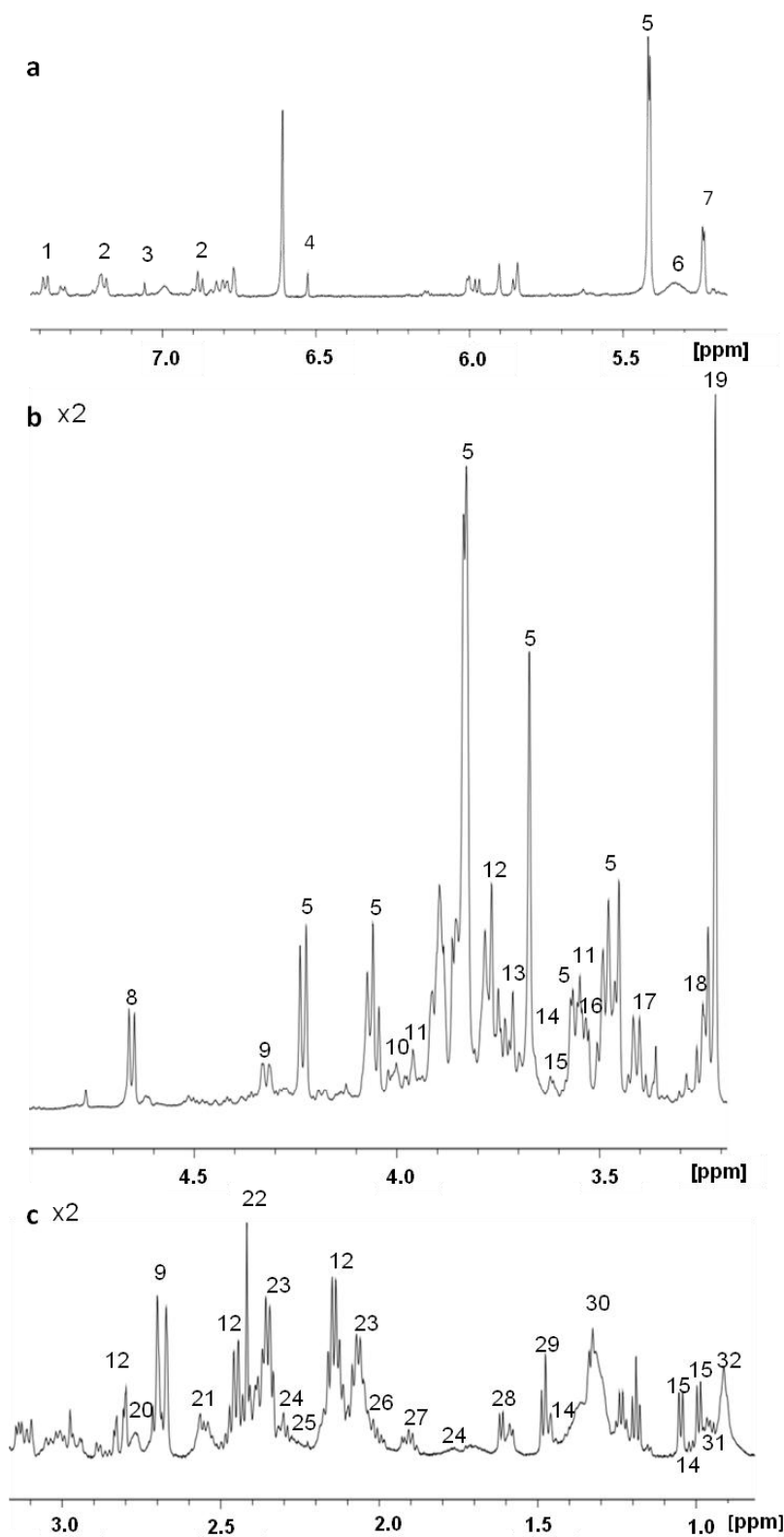
Rhizosphere soils

Root traits (SRL, RDMC, C and N contents, C:N)  
Leaf traits (SLA, LDMC, C and N contents, C:N)  
R/S ratio

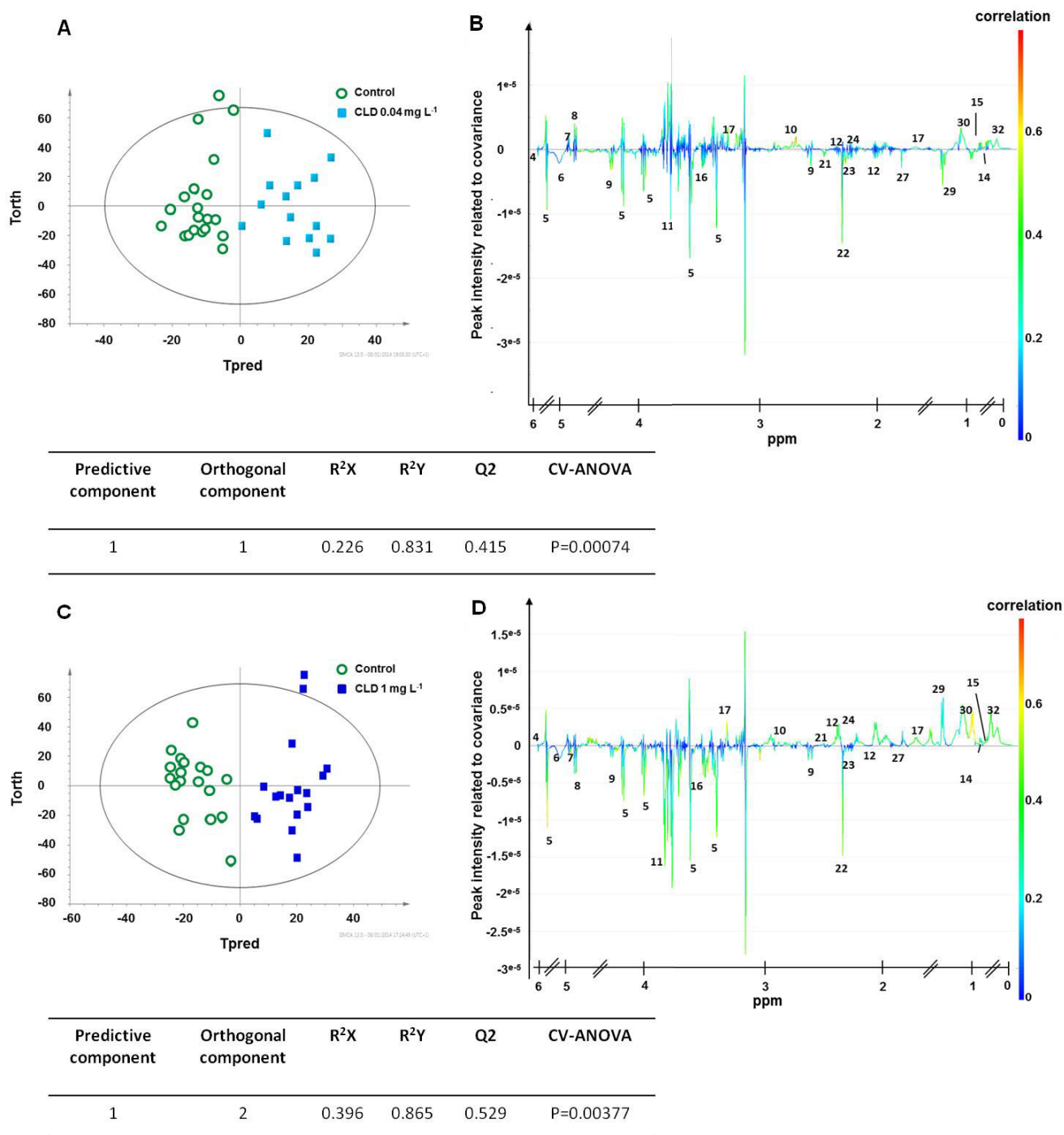
Plantlets

**Fig. S2 Representative one-dimensional <sup>1</sup>H-HRMAS NMR spectrum of the *Zea mays* root metabolome in the range of (a) δ7.4-δ5.2, (b) δ4.9-δ3.2 and (c) δ3.2-δ0.8.**

Number key for metabolites: 1 phenylalanine, 2 tyrosine, 3 histidine, 4 fumarate, 5 sucrose, 6 Fatty Acid (FA) -CH=CH-, 7  $\alpha$ -glucose, 8  $\beta$ -glucose, 9 malate, 10 asparagine, 11 cysteine, 12 glutamine, 13 leucine, 14 isoleucine, 15 valine, 16 glycine, 17 proline, 18 arginine, 19 choline, 20 FA =CH-CH<sub>2</sub>-CH=, 21 citrate, 22 succinate, 23 glutamate, 24 GABA, 25 FA -CH<sub>2</sub>-COOR, 26 FA -CH<sub>2</sub>-CH=CH-, 27 acetate, 28 FA -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOR, 29 alanine, 30 FA (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, 31 leucine/isoleucine, 32 FA -CH<sub>3</sub>



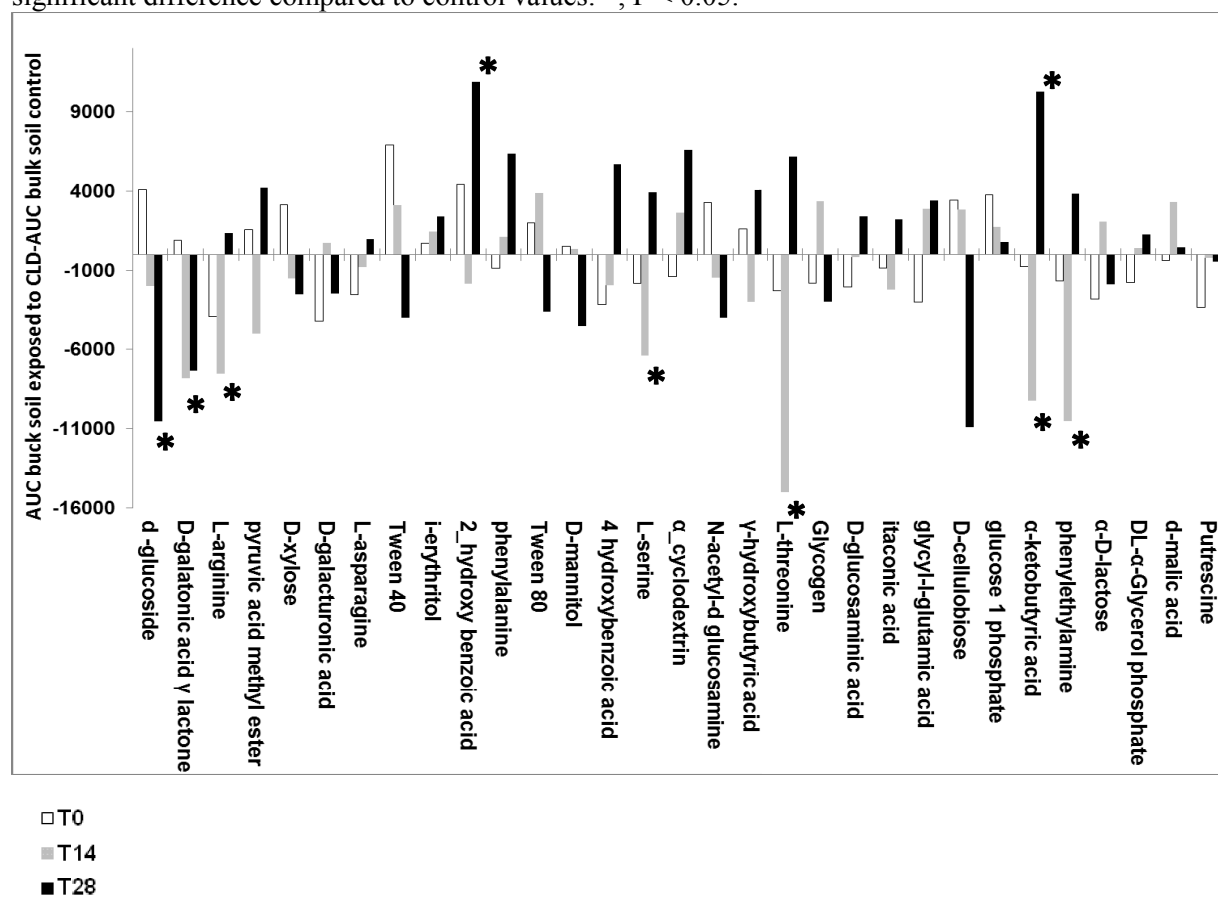
**Fig S3.** Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA) scores on <sup>1</sup>H-HRMAS NMR spectra of maize root tip controls, or exposed to 0.04 mg L<sup>-1</sup> (A) and 1 mg L<sup>-1</sup> (C) CLD. OPLS-DA S-line for (B) 0.04 mg L<sup>-1</sup> CLD and (D) 1 mg L<sup>-1</sup> CLD showing the metabolites that were major contributors to the changes observed in exposed maize root tips compared to control ones by mimicking NMR spectrum. The peak intensity is determined by the covariance and the peak color by the correlation. The positive peaks are the ones which increased and the negative ones are those which decreased in exposed roots relative to the controls. For number coding see legend fig S2, Annexe 4.



**Table S1:** Groups of carbon substrates present in Biolog Ecoplate. Substrates present in root exudates are indicated by \* (Campbell et al., 1997)

<b>Carbohydrates</b>	<b>Amino acids</b>	<b>Polymers</b>	<b>Carboxylic acids</b>	<b>Phenolic compounds</b>	<b>Amines</b>
d -glucoside	L-arginine *	Tween 40	pyruvic acid methyl ester	2-hydroxy benzoic acid *	phenylethylamine
D-galatonic acid γ lactone	L-asparagine *	Tween 80	D-galacturonic acid	4 hydroxybenzoic acid *	Putrescine
D-xylose *	phenylalanine *	α-cyclodextrin	γ-hydroxybutyric acid		
i-erythritol	L-serine *	Glycogen	D-glucosaminic acid		
D-mannitol	L-threonine *		itaconic acid		
N-acetyl-d glucosamine	glycyl-l-glutamic acid		α-ketobutyric acid		
D-cellulobiose			d-malic acid *		
glucose 1 phosphate					
α-D-lactose					
DL-α-Glycerol phosphate					

**Figure S4: Differences between substrate utilization in Biolog plates of bulk soils exposed to CLD and controls.** Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Asterisks indicate a significant difference compared to control values: \*,  $P < 0.05$ .





## Supporting Information Publication IV:

### Data acquisition

<sup>1</sup>H-NMR spectra were acquired using a Bruker Avance III 600 spectrometer (BrukerBiospin, Wissembourg, France) at the IRBA Grenoble laboratory using a <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 4 mm HRMAS probe-head (proton frequency 600.13 MHz). The samples were spun at 4,000 Hz and the temperature was maintained at 4°C for all experiments. 1D-spectra were acquired with a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence synchronized with the spinning rate (inter-pulse delay 125 μs, total spin echo time 30 ms). The 90° pulse was calibrated on each sample. The acquisition of one <sup>1</sup>H-NMR spectrum consisted of 256 scans lasting 16 min. The residual water signal was pre-saturated during the 2 s relaxation delay.

The assignment of resonances was based on the literature (MeryB database, HMDB database, Piccioni *et al.* 2009) and on standard 2D experiments on liquid extracts (homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HTOSCY (Total Correlation Spectroscopy) and heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>CHSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence sequences). The identification of some metabolites (alanine, asparagine, glutamate, glutamine, histidine, malate, phenylalanine, proline, pyruvate, tyrosine, succinate) were confirmed by adding a true solution of chemical reference substances to the root samples after the first acquisition using <sup>1</sup>H-HRMAS NMR as described above.

### Pre-treatment

All pre-processing steps were performed using the TOPSPIN 3.1 Bruker software (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany). The spectra were aligned to the TSP signal at zero ppm and phase corrected. A five order polynome was systematically applied for the baseline correction.

All spectra from 6.54 to 0.31 ppm were divided into intervals or buckets equal to 10<sup>-3</sup> ppm using the AMIX software program (Bruker). Each bucket was normalized to the total spectrum amplitude. Regions corresponding to residual water signal or with reproducibility problems, even in the control group, were excluded from the analysis.

### Statistical analyses of <sup>1</sup>H NMR spectra

The buckets were then imported into the SIMCA V13 software application (UmetricsAB, Umea, Sweden) for multivariate statistical analysis. The buckets were mean centered, scaled to unit variance (i.e., weighted by 1/standard deviation for a given variable) and submitted for a principal component analysis (PCA) to ensure the homogeneity of data and to exclude outliers where required. To this end the data were visualized as score plots, where each point represents a NMR spectrum and thus a sample. Supervised analyses including orthogonal partial least square discriminant analyses (OPLS-DA) were performed, using the group (control or exposed) as the Y matrix. Compared to PLS-DA, the orthogonal filtering separates systemic intra-class variations in X (variable matrix) that are unrelated to Y (orthogonal) from linear variations in X that are related to Y (inter-class variations). The number of components was determined using the cross validation procedure that produces R2Y and Q2 factors (> 0.5). Moreover, the reliability of our OPLS-DA model was assessed using a CV-ANOVA test. The results were visualized by plotting the scores for individuals relative to the first two components of the model. The S-lines were examined in order to highlight the metabolites that are the most distinct between the control and the exposed groups. This plotting shows in a single graph, mimicking a NMR spectrum, the covariance (peak intensity) and correlation

(peak color) between the exposed and control groups. Moreover, the signs of S-line peaks give an indication of the direction of change of metabolites in the exposed group which increased (positive peaks) or decreased (negative peaks) relative to the control. All the metabolites identified in the S-line were integrated (sum of the buckets for one isolated peak for each metabolite) for univariate statistics. A t-test was then performed using the Xlstat software (Yuk *et al.* 2012).

## Annexe 5 : communications de congrès

9<sup>th</sup> International Phytotechnology Society 2012

### **Phytoremediation of organochlorines. Lindane phytotoxicity vs uptake on *Zea mays***

**Blondel Claire**, San Miguel Angélique, Melesan Marc, Ravanel Patrick and Raveton Muriel

*LECA, Pollution-Environment-Ecotoxicology-Ecoremediation Team, Grenoble University, BP 53X,  
38041 Grenoble Cedex 09, France*

Organochlorines (OCs) are known to be persistent organic pollutants due to their high lipophilicity and stability. Therefore, solutions to restore polluted system by bio-technologies are studied especially using plant materials. For this purpose, phytoextraction of standard OCs, lindane, was experimented. Screening of plant species adapted to OCs exposition (biomass and morphological criteria) permitted to select *Zea mays* as a relatively tolerant plant. Therefore, 7-day-old plants were exposed to a concentration range of lindane (0.07 – 7 mg/l) to determine toxicity featuring and then, uptake rate (1 month exposure). Using biomass, oxidative stress, apoptosis and cell death indicators, the lindane effects on root tissues were characterized. Compared to controls treatment with lindane caused swelling of root tips. Root cell viability was strongly dependent on the lindane concentrations: apoptosis and cell death exponentially increased with lindane concentrations. Plants exposed to lindane (0.7 mg/l) did not show extreme phytotoxic symptoms and were able to absorb lindane. Root uptake seemed to be correlated to lipophilicity (strong correlation between  $RCF$  and  $\text{Log}K_{ow}$ ) and at 28 days of exposure, plants bioconcentrated 80% of the total  $^{14}\text{C}$ -lindane. Therefore, *Zea mays* could be a good plant candidate to remediate area contaminated by lindane, in a pollution range comprised between 0 to 30 mg kg<sup>-1</sup> (1).

Funding for this project was provided by a grant from la Région Rhône-Alpes.

blondel.claire@yahoo.fr

(1) San Miguel A, Faure M, Ravanel P, Raveton M (2012) Ecotoxicology 21, 315-324.

# **<sup>1</sup>H-RMN HRMAS study of maize (*Zea mays*) roots exposed to organochlorines pesticides**

Claire Blondel<sup>a,b</sup>, Farid Khelalfa<sup>a,b</sup>, Muriel Raveton<sup>a,b</sup>, Florence Fauvelle<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>b</sup>Université de Grenoble - Alpes, France

<sup>c</sup>IRBA, Bretigny sur Orge, France

<sup>d</sup>GIN-IRMage, 38041 Grenoble Cedex 09, France

**Context:** Organochlorines pesticides (OCPs), as lindane, are persistent organic pollutants in the environment due to their high lipophilicity and stability. Restoration of polluted ecosystem exists such as the use of plants like maize (*Zea mays*) to clean up soils (phytoremediation).

**Objectives:** Roots have a key role on the uptake of pesticides by plant; therefore we study the impact of lindane on root cell metabolism. This will allow us to improve the understanding of process involved in plant-OCPs interactions.

**Methods:** For this purpose, maize seedlings were exposed during 7 days with lindane at 7 mg l<sup>-1</sup> (maximum water solubility) and 0.7 mg l<sup>-1</sup> (environmentally relevant concentration). We collected root tips. 6 meristems were rinsed with D<sub>2</sub>O, pooled together in inserts and flash frozen with liquid nitrogen. Samples were analyzed with <sup>1</sup>H RMN HRMAS (proton frequency 600.13MHz) at 4°C and spun at 4000 Hz. Spectra from 0.3 to 6.5 ppm were divided into buckets to 10<sup>-3</sup> ppm and submitted to multivariate analysis (OPLS-DA) with SIMCA software. Results were visualized with score plots for individuals and "S-line plot" for variables in order to identify metabolites' changes in presence of lindane

**Results:** Lindane induced disturbances in maize metabolism. We noticed an increase in lipids and a decrease of carbohydrates in exposed maize roots. Amino acids, as glutamine, GABA and glycine, as well as metabolites of the citric acid cycle were also impacted.

**Conclusion:** Lindane exposure induces modifications on maize root metabolism. Impacts on lipid metabolism are the most important, especially for fatty acid which are classically disturbed in response to biotic and abiotic stresses (Kachroo and Kachroo 2009). Moreover, a significant increase of glutamine, an anti-apoptotic amino acids (Pérez-Maldonado, D az-Barriga et al. 2004), is measured which is in accordance with our previous results showing root cell apoptosis when exposed to lindane. These results improve the knowledge on plant responses to OCP-exposure and validate the use of <sup>1</sup>H RMN HRMAS as a tool of great interest to study plant environmental stress responses. Further analyses are needed to understand in details lipids/lindane interactions.

Fundings for this project were provided by a grant from la Région Rhône-Alpes.

Kachroo, A. and P. Kachroo (2009). "Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense." *Annual Review of Phytopathology* 47(1): 153-176.

Pérez-Maldonado, I. N., F. D az-Barriga, et al. (2004). "DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children." *Environmental Research* 94(1): 38-46.

## IMPACT OF ORGANOCHLORINES (LINDANE, CHLORDECONE) ON THE RHIZOSPHERE FUNCTIONALITY OF ZEA MAYS

Blondel Claire<sup>1</sup>, Briset Loïc<sup>1</sup>, Arnoldi Cindy<sup>1</sup>, Poly Frank<sup>2</sup>, Clément Jean-Christophe<sup>1</sup>  
Raveton Muriel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> LECA, UMR CNRS 5553, Grenoble University, BP 53X, 38041 Grenoble Cedex 09, France  
1; blondel.claire@yahoo.fr

<sup>2</sup> Lyon University, UMR CNRS 5557 Villeurbanne F-69622, France 2; [franck.poly@univ-lyon1.fr](mailto:franck.poly@univ-lyon1.fr)

### ABSTRACT

Organochlorines (OCs) are persistent organic pollutants in the environment due to their high lipophilicity and stability. Restoration of polluted ecosystem exists such as phytoremediation (*Zea mays*) in which plant roots play a key role in the uptake to OCs. Also, roots interact with soil bacteria of the rhizosphere. We hypothesize that rhizospheric functionalities can be altered by OCs and the present study aims to evaluate their effects on (i) plant functional traits, (ii) carbon and nitrogen resource allocation, and (iii) soil bacterial communities' activities.

For this purpose, maize seedlings were grown during 28 days on soils previously contaminated with OCs (lindane, chlordecone). Carbon and nitrogen contents were measured in leaves, roots and soil. Specific root length and leaf area were also measured, as well as microbial features (biomass, nitrogen mineralization potential, BIOLOG-carbon metabolism profile).

OCs induced a slight decrease in specific root length and leaf area after 14 days of culture, while roots and leaves carbon contents were altered after 28 days. OCs negatively affected microbial biomass, nitrogen mineralization and availability, as well as bacterial carbon metabolism profiles. However, with time exposure, some of these parameters recovered up to control values. We conclude that OCs induced minor disturbances on maize-soil system functionality, and plant-bacteria relationships seemed to be resilient in a contaminated environment by OCs.

Fundings for this project were provided by a grant from la Région Rhône-Alpes.

**Keywords:** *Ecoremediation, Zea mays, Organochlorines, rhizosphere, resource allocation.*

**Tel: + 33(0)4 76 51 46 80; fax: + 33(0)4 76 51 42 79**

## Bibliographie

Aajoud A., Ravanel P., Tissut M. (2003). Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(5): 1347-1352

Aajoud A., Raveton M., Aouadi H., Tissut M., Ravanel P. (2006). Uptake and xylem transport of fipronil in sunflower. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(14): 5055-5060

Abhilash PC., Jamila S., Singh V., Singh A., Singh N., & Srivastava SC. (2008). Occurrence and distribution of hexachlorocyclohexane isomers in vegetation samples from a contaminated area. *Chemosphere* 72: 79-86

Abhilash PC. & Singh N. (2009). Pesticide use and application: An Indian scenario. *Journal of hazardous materials* 165(1-3): 1-12

Abhilash PC. & Singh N. (2009). Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 727-740

Abhilash PC. & Singh N. (2010). *Withania somnifera* Dunal-mediated dissipation of lindane from simulated soil: implications for rhizoremediation of contaminated soil. *Journal of soils and sediments* 10(2): 272-282

Achard R., Cabidoche YM., Caron A., Nelson R., Duféal D., Lafont A., Lesueur Jannoyer M. (2008). Contamination des racines et tubercules cultivées sur sol pollué par la chlordécone aux Antilles, *Cahiers du PRAM n°7*, p 45-50

ADEME. Vernus E., Hube D., Boudouch O., Benadda B. (2008). Traitabilité des sols pollués: Guide méthodologique pour la sélection des techniques et évaluation de leurs performances. Polden Insavalor, Brgm, Insa Lyon. 236pp

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta- Hexachlorocyclohexane (Update). Draft for Public Comment. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1997

Aggarwal PK, Means JL, Hinchee RE, Headington GL, Gavaskar AR. Methods to select chemicals for in-situ biodegradation of fuel hydrocarbons. Florida: Tyndall AFB, Air Force Engineering and Services Center; 1990

Agnihotri N.P., Kulshrestha G., Gajbhiye V.T., Mohapatra S.P., & Singh S.B. (1996). Organochlorine insecticide residues in agricultural soils of the Indo-Gangetic plain. *Environmental Monitoring and Assessment* 40(3) : 279-288

Aira M., Gomez-Brandon M., Lazcano C., Baath E., Dominguez J. (2010). Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities . *Soil biology & biochemistry* 42(12): 2276-2281

Akshi., Kumar MD. (2012). Isolation of Endosulfan degrading *Acinetobacter haemolyticus* with agronomic significance. *Research journal of chemistry and environment* 16(1): 15-22

Albanis T.A., Hela D.G., & Hatzilakos D. (1995). Organochlorine residues in eggs of *Pelecanus crispus* and its prey in wetlands of Amvrakikos Gulf, North-western Greece. *Chemosphere*, 31(11–12): 4341-4349

Ali U., Syed J.H., Malik R.N., Katsoyiannis A., Li J., Zhang G. (2014). Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: A review. *Science of the Total Environment* 476 : 705-717

Aliferis KA., Materzok S., Paziotou GN., Chrysayi-Tokousbalides M. (2009). *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing H-1 NMR fingerprinting. *Chemosphere* 76(7): 967-973

Alonso AP., Raymond P., Hernould M., Rondeau-Mouro C., de Graaf A., Chourey P., Lahaye M., Shachar-Hill Y., Rolin D. and Dieuaide-Noubhani M. (2007b) A metabolic flux analysis to study the role of sucrose synthase in the regulation of the carbon partitioning in central metabolism in maize root tips. *Metab Eng* 9(5-6): 419-432

Alonso AP., Raymond P., Rolin D. and Dieuaide-Noubhani M. (2007a). Substrate cycles in the central metabolism of maize root tips under hypoxia. *Phytochemistry* 68(16-18): 2222-2231

- Alvarez A., Yanez ML., Benimeli CS. & Amoroso M.J. (2012). Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 66(1): 14-18
- Amorim, M.J.D., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., & Soares, A. (2002). Bioaccumulation and elimination of (14)C-lindane by *Enchytraeus albidus* in artificial (OECD) and a natural soil. *Chemosphere* 49(3) : 323-329
- Anderegg BN., Lichtenstein EP., Kemp JD. (1977). Effects of lindane on DNA, RNA and protein-synthesis in corn roots. *Journal of agricultural and food chemistry* 25(4): 923-928
- Angerer J, Maasz R, & Heinrich R (1983) Occupational exposure to hexachlorocyclohexane. VI. Metabolism of gamma-hexachlorocyclohexane in man. *Int Arch Occup Environ Health* 52: 59-67
- Aranibar N., Singh BK., Stockton GW., Ott, KH. (2001). Automated mode-of-action detection by metabolic profiling. *Biochemical and biophysical research communications* 286(1): 150-155
- Arkhipchuk VV., Malinovskaya MV., Garanko NN. (2000) Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells. *Environmental toxicology* 15(4): 338-344
- Bae MS., Cho EJ., Choi EY. & Park OK. (2003). Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant Journal* 36(5): 652-663
- Baetz U. & Martinoia E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* 19(2): 90-98
- Bai Y., Zhou L., Li J. (2006). Organochlorine pesticide (HCH and DDT) residues in dietary products from Shaanxi Province, People's Republic of China. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 76: 422-428
- Bais HP., Park SW., Weir TL., Callaway RM., Vivanc, JM. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science* 9(1): 26-32



- Bais HP., Weir TL., Perry LG., Gilroy S., Vivanco JM. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology* 57: 233-266
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert JV., Vangronsveld J., van der Lelie D. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology* 22(5): 583-588
- Barber J.L., Sweetman AJ., van Wijk D., Jones KC. (2005). Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes: a review. *Science of the total environment* 349: 1-44
- Barriada-Pereira M., Gonzalez-Castr, M.J., Muniategui-Lorenzo S., Polze-Mahia P., Prada-Rodriguez, D., Fernandez-Fernandez E., (2005). Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 58: 1571-1578
- Barriuso E., Koskinen WC. (1996). Incorporating nonextractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time. *Soil science society of America journal*. 60(1): 150-157
- Barth, J.A.C., Grathwohl, P., Fowler, H.J., Bellin, A., Gerzabek, M.H., Lair, G.J. (2009). Mobility, turnover and storage of pollutants in soils, sediments and waters: achievements and results of the EU project AquaTerra. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29(1): 161-173
- Baudoin E., Benizri E. & Guckert A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 35(9): 1183-1192
- Baudoin E., Benizri E., & Guckert A. (2001). Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology* 37(2): 85-93
- Benizri E. & Amiaud B. (2005) Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 2055-2064
- Benizri E., Baudoin E., Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Tech* 11: 557-574

- Benizri E., Dedourge O., Dibattista-Leboeuf C., Piutti S., Nguyen C., Guckert A. (2002). Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology* 21: 261-265
- Bidlan R., Afsar M., Manonmami HK. (2004). Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere* 56(8): 803-811
- Bino RJ., Hall RD., Fiehn O., Kopka J., Saito K., Draper J. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science* 9(9): 418-425
- Bhatnagar A., Gupta A. (1998). Chlorpyrifos, quinalphos, and lindane residues in sesame seed and oil (*Sesamum indicum* L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 60(4): 596-600
- Borghi L., Gutzat R., Futterer J., Laizet Y., Hennig L., Gruissem W. (2010). Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production, *Plant Cell* 22: 1792–1811.
- Bourdon M., Coriton O., Pirrello J., Cheniclet C., Brown SC., Poujol C., Chevalier C., Renaudin JP., Frangne N. (2011). In planta quantification of endoreduplication using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Plant journal* 66(6): 1089-1099
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science* 161(5): 839-851
- Briggs GG., Bromilow RH., Evans AA. (1982). Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley, *Pestic. Sci.* 13: 495–504
- Brown S. S., Gaston G. R., Rakocinski C. F. & Heard R. W. (2000). Effects of sediment contaminants and environmental gradients on macrobenthic community trophic structure in gulf of Mexico estuaries. *Estuaries* 23(3): 411-484.
- Buendia-Monreal M., Renteria-Canett I., Guerrero-Andrade O., Bravo-Alberto CE., Martinez-Castilla LP., Garcia E., Vazquez-Ramos JM. (2011) The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression pat-terns. *Physiol. Plant* 143: 297–308

- Bueno M., Fillat MF., Strasser RJ., Maldonado-Rodriguez R., Marina N., Smienk H., Gomez-Moreno C., Barja, F. (2004). Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena* - Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP(+) reductase . *Environmental science and pollution research* 11(2): 98:106
- Burger J., Gochfeld M., Shukla S., Jeitner C., Ramos R., Tsipoura N., Donio, M. (2008). Pollution, contamination and future land use at Brookhaven National Laboratory. *Archives of environmental contamination and toxicology* 55(3): 341-347
- Burken JG. & Schnoor JL. (1998) Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees, *Environ. Sci. Technol.* 32: 3379-3385
- Cabidoche YM, Achard R, Cattan P, Clermont-Dauphin C, Massat F, Sansoulet J.(2009). Long-term pollution by chlordécone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue. *Environmental Pollution* 157(5): 1697-1705
- Cabidoche YM., Clermont-Dauphin C., Lafont A., Sansoulet J., Cattan P., Achard R., Caron A., Chabrier C. (2006). Stockage dans les sols à charges variables et dissipation dans les eaux de zoocides organochlorés autrefois appliqués en bananeraies aux Antilles : relation avec les systèmes de culture. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, p. 100
- Cabidoche YM, Lesueur Jannoyer M. (2012). Contamination of harvested organs in root crops grown on chlordécone-polluted soils. *Pedosphere* 22(4): 562-571
- Cabidoche YM., Lesueur Jannoyer M. (2011). Pollution durable des sols par la chlordécone aux Antilles : comment la gérer ? *Innovations Agronomiques* 16: 117-133
- Campbell CD., Grayston SJ., Hirst DJ. (1997). Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of microbiological methods* 30(1): 33-41
- Cannon SB., Veazey JM., Jackson RS et al. (1978). Epidemic Kepone poisoning in chemical workers. *Am J Epidemiol*, 107: 529–537

Cardwell RD; Purdy R; Bahner RC. (1985) Aquatic toxicology and hazard assessment, seventh symposium : a symposium ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate. ASTM special technical publication, 854. Philadelphia.

Carson R. (1962). Silent Spring. (eds.) G. K. Hall & Company, Boston.

Castellanos T., Dohrmann AB., Imfeld G., Baumgarte S., Tebbe CC. (2009). Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. *European journal of soil biology* 45(5-6): 383-393

Cattan P. (2012) CHLORDEXCO - Pollution des sols et des eaux par la chlordecone aux Antilles, consequences sur la contamination des cultures et des organismes dulcaquicoles. Compte-rendu final de projet, ANR.

Cattan P., Bussiere F., and Nouvellon A. (2007) .Evidence of large rainfall partitioning patterns by banana and impact on surface runoff generation. *Hydrological Processes* 21(16): 2196-2205

Cebolla A., Vinardell J.M., Kiss E., Olah B, Roudier F., Kondorosi A., Kondorosi E. (1999). The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* 18: 4476–4484.

CEIP Centre on Emission Inventories and Projections. <http://www.ceip.at>

Charnets WA., Lichtens EP., Evert RF. (1973). Effects of Lindane on cell structure of pea roots. *Canadian journal of botany-Revue canadienne de botanique* 51(11): 2111-&

Chaudhry Q., Blom-Zandstra M., Gupta S., Joner EJ. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment . *Environmental science and pollution research* 12(1): 34-48

Chaudhry Q., Schröder P., Werck-Reichhart D., Grajek, W., Marecik, R. (2002). Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental science* 9(1): 4-17

Chelius MK., Triplett EW. (2001). The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial ecology* 41(3): 252-263

Cheng W., Johnson DW., Fu S. (2003). Rhizosphere effects on decomposition. *Soil Science Society of America Journal* 67: 1418-1427

Chevreuil M., Garmouma M., Teil M.J., Chesterikoff A., (1996). Occurrence of organochlorine (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from the urban and rural stations of the Paris area. *Science of total environment* 182: 25-37

Chopra A.K., Sharma MK., Chamoli S. (2011). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system-an overview. *Environmental Monitoring and assessment* 173(1-4): 905-916

Chouychai W., Lee H. (2012). Phytotoxicity Assay of Crop Plants to Lindane and Alpha-endosulfan Contaminants in Alkaline Thai Soil. *International journal of agriculture and biology* 14(5): 734-738

Coat S., Monti D., Legendre P., Bouchon C., Massat F., & Lepoint G. (2011). Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environmental Pollution* 159(6) : 1692-1701

Coat C., Perrin A., Talagas, M., Tetefort, R., Amice, J., Valeri, A., De Braekeleer, M., Amice, V. (2011). Azoospermia: Management and results. A series of 90 cases. *Progrès en urologie*. 21(13): 946-954

Corgie SC., Beguiristain T., Leyval C. (2004). Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and environmental microbiology* 70(6): 3552-3557

Curl EA. & Truelove B. (1987). The Rhizosphere. *Journal of plant nutrition and soil science* 150(2): 124-125

Danon A., Delorme V., Mailhac N., Gallois P. (2000). Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant physiology and biochemistry* 38(9): 647-655

Darnerud PO., Atuma S., Aune M., Bjerselius R., Glynn A., Peterson Grawé K., Becker W. (2006). Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market data. *Food and chemical toxicology* 44: 1597-1606

Dawson G.W., Weimer W.C. (1979). Kepone: A case study of a persistent material, *Water American Institute of Chemical Engineers (AIChE)* 75: 366 – 374

De Pinto M.C., Locato V. & De Gara L. (2012). Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell and Environment* 35(2): 234-244.

De Roy K., Marzorati, M., Van den Abbeele P., Van de Wiele T. & Boon N. (2014). Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environmental Microbiology* 16(6): 1472-1481

De Schutter K., Joubes J., Cools T., Verkest A., Corellou F., Babiychuk E., VanDer Schueren E., Beeckman T., Kushnir S., Inze D., De Veylder L. (2007). Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* 19: 211–225.

De Veylder L., Beeckman T., Inze D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature reviews molecular cell biology* 8(8): 655-665

De Veylder L., Larkin J.C., Schnittger A. (2011). Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in plant science* 16(11): 624-634

Dewitte W. & Murray J.A.H. (2003). The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54: 235-264

Dietz A.C. & Schnoor J.L. (2001). Advances in phytoremediation, *Environ. Health Perspect* 109: 163-168

Dohrmann A.B., Kuting M., Junemann S., Jaenicke S., Schluter A., Tebbe C.C. (2013). Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *ISME Journal* 7(1): 37-49

DREAL Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Rhône-Alpes. (2008). Etat des lieux des pesticides dans les eaux superficielles et souterraines de la région Rhône-Alpes N° ISSN : 1951-2503

Dubuisson C, Heraud F, Leblanc J.C, Gallotti S, Flamand C, Bateau A, Quenel P, Volatier J.L. (2007). Impact of subsistence production on the management options to reduce the food

exposure of the Martinican population to chlordecone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49(1): 5-16

Dudits D., Abraham E., Miskolczi P., Ayaydin F., Bilgin M. & Horvath GV. (2011). Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Annals of Botany* 107(7): 1193-1202

Duggan RE. & Corneliussen PE. (1972). Dietary intake of pesticides chemicals in the United States (III) June 1968-April 1970. *Pesticides monitoring journal* 5: 331-337

Epstein S.S. (1978). Kepone Hazard Evaluation. *Science of the Total Environment* 9(1): 1-62

Fabre B., Heintz V., Roth E. (2005). Les isomeres de l'hexachlorocyclohexane. Rapport bibliographique de l'ADEME

Falco G., Bocio A., Llobet JM., Domingo JL., Casas C., Teixido A. (2004). Dietary intake of hexachlorobenzene in Catalonia, Spain. *The science of the total environment* 322: 63-70

Faroon O., Kueberuwa S., Smith, L., DeRosa, C. (1995). ATSDR evaluation of health effects of chemicals .2. Mirex and chlordecone: Health effects, toxicokinetics, human exposure, and environmental fate. *Toxicology and industrial health* 11(6): 1-203

Farrar J., Hawes M., Jones D., Lindow S. (2003). How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology* 84: 827–837

Faure M, San Miguel A., Ravanel P., Raveton M. (2012). Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Environmental pollution* 164: 188-194

Federal Ministry of Agriculture and Forestry, Vienna, Austria (1998). Lindane Monograph: Report and Proposed Decision, Annex B (Summary, Scientific Evaluation and Assessment)

Fernandez-Bayo JD., Saison C., Voltz M., Disko U., Hofmann D., Berns AE. (2013). Chlordecone fate and mineralisation in a tropical soil (andosol) microcosm under aerobic conditions. *Science of the total environment* 463: 395-403

Ferro AM., Rock SA., Kennedy J., Herrick JJ., Turner DL. (1999). Phytoremediation of Soils Contaminated with Wood Preservatives: Greenhouse and Field Evaluations. *International journal of phytoremediation* 1(3): 289-306

- Fester T., Giebler J., Wick LY., Schlosser D. & Kastner M. (2014). Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 168-175
- Fleeger J. W., Carman K. R. et Nisbet R. M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of Total Environment* 317: 207-233.
- Flores HE., Vivanco JM., Loyola-Vargas VM. (1999). 'Radicale' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in plant science* 4(6): 220-226
- 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 Environ* 28: 1056–1071
- Friso G., Majeran W., Huang MS., Sun Q., van Wijk KJ.(2010). Reconstruction of Metabolic Pathways, Protein Expression, and Homeostasis Machineries across Maize Bundle Sheath and Mesophyll Chloroplasts: Large-Scale Quantitative Proteomics Using the First Maize Genome Assembly . *Plant physiology* 152(3): 1219-1250
- Gadjev I., Stone JM. & Gechev TS. (2008). Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants: New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. In W.J. Kwang (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. Volume 270, pp. 87-144): Academic Press.
- Galiulin, R.V., Bashkin, V.N., & Galiulina, R.A. (2002). Review: Behavior of persistent organic pollutants in the air-plant-soil system. *Water Air and Soil Pollution* 137(1-4) : 179-191
- Garcia-Salazar JA., Ramirez-Jaspeado R. (2014). The corn (*Zea mays* L.) improved seed market in Mexico. An analysis of the commercial balance by state. *Revista fitotecnia Mexicana* 37(1): 69-77
- Gaskin SE., Bentham RH. (2010). Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Science of the total environment* 408(17): 3683-3688
- Gueke B., Garg N., Ghosh S., Fleischmann T., Holliger C., Lal R., Kohker HPE. (2013). Metabolomics of hexachlorocyclohexane (HCH) transformation: ratio of LinA to LinB determines metabolic fate of HCH isomers. *Environ Microbiol.* 15(4): 1040-9



Ghosh S., Das SK., Arun K. Guha AK., Asis K. Sanyal AK. (2009). Adsorption behavior of lindane on *Rhizopus oryzae* biomass: Physico-chemical studies. *Journal of Hazardous Materials* 172(1): 485–490

Gilbert E.E. & Giolito, S.L. (1952). US Patent 2.616.825 and US Patent 2.616.928, to Allied Chemical and Dye Corporation. 4 November.

Glazer AN. & Nikaido H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology* Cambridge University Press. New York: W.H. Freeman and Company

Gobat, JM., Aragno M., Matthey W. (2010). *Le Sol vivant. Bases de pédologie. Biologie des sols.* Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, Kavlock RJ. (2000). Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical Reviews in Toxicology* 30(2): 135-196

Gonzalez M., Miglioranza KSB., de Moreno JEA., Moreno VJ. (2003). Organochlorine pesticide residues in leek (*Allium porrum*) crops grown on untreated soils from an agricultural environment. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(17): 5024-5029

George SE. & Claxton LD. (1988). Biotransformation of chlordecone by *seudomonas* species. *Xenobiotica* 18(4): 407:416

Gerhardt KE., Huang XD., Glick BR., Greenberg BM. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci* 176: 20-30

Gobat JM., Aragno M., Matthey W. (2010). *Le sol vivant bases de pédologie, biologie des sols.* 3e éd. revue et augmentée ed. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes

Gomez-Hermosillo C., Pardue J.H., & Reible DD. (2006). Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments. *Environmental Science & Technology* 40(10): 3229-3236

- Gouy V., Dur JC., Calvet R., Belamie R., Chaplain V. (1999). Influence of adsorption-desorption phenomena on pesticide run-off from soil using simulated rainfall. *Pesticide science* 55(2): 175-182
- Grant WF. (1978). Chromosome-aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental health perspectives* 27: 37-43
- Grover R., Franklin CA., Muir NI., Cessana AJ., Riedel D. (1986). Dermal exposure and urinary metabolite excretion in farmers repeatedly exposed to 2,4-D amine. *Toxicol. Lett* 33: 73-83
- Guglielmo, F., Lammel, G., & Maier-Reimer, E. (2009). Global environmental cycling of gamma-HCH and DDT in the 1980s-A study using a coupled atmosphere and ocean general circulation model. *Chemosphere* 76(11) : 1509-1517
- Guzzella, L., Roscioli, C., Vigano, L., Saha, M., Sarkar, S.K., & Bhattacharya, A. (2005). Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. *Environment International* 31(4): 523-534
- Hammond B., Katzenellenbogen BS., Krauthammer N., McConnell J. (1979). Estrogenic activity of the insecticide chlordécone (Kepone) and interaction with uterine estrogen-receptors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 76(12): 6641-6641
- Hinsinger P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil* 237(2): 173-195
- Hinsinger P., Bengough AG., Vetterlein D. & Young, IM. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321(1-2): 117-152
- Hinsinger P, Plassard C, Jaillard B. (2006). Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *Journal of Geochemical Exploration* 88(1-3): 210-3
- Hodge A., Stewart J., Robinson D., Griffiths BS., Fitter AH.(2000). Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity *Journal of Ecology* 88: 150-164

Hoekstra PF., O'Hara TM., Karlsson H., Solomon KR., Muir DCG. (2003) Enantiomer-specific biomagnification of alpha-hexachlorocyclohexane and selected chiral chlordane-related compounds within an arctic marine food web. *Environmental toxicology and chemistry* 22(10): 2482-2491

Holm L., Blomqvist A., Brandt I., Brunstrom B., Ridderstrale Y., Berg C. (2006). Embryonic exposure to o,p'-DDT causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Environmental toxicology and chemistry* 25(10): 2787-2793

Hossain Z., Nouri MZ., Komatsu S. (2012). Plant Cell Organelle Proteomics in Response to Abiotic Stress. *J. Proteome Res.* 11 (1): 37–48

Hulster A., Muller JF. Marschner H. (1994). Soil-plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (cucurbitaceae). *Environmental science & technology* 28(6): 1110:1115

Imlay JA. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* 77: 755-776

INERIS. (2005). Lindane. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N2-1, INERIS–DRC-02-25590-02DF43.doc

INRS. (2014). Fiche toxicologique FT81

INSERM, Pesticides – Effets sur la santé. (2013). Editions Inserm, Collection Expertise collective, ISBN 978-2-85598-905-1

InVS, (2012). Chlordécone aux Antilles : Actualités des études de santé. *Bulletin de veille sanitaire* n°4.

IPCS International Programme on Chemical Safety (1991) Lindane. World Health Organization. *Environmental Health Criteria* 124

Jantunen L.M.M. and Bidleman T.F.(1998). Organochlorine pesticides and enantiomers of chiral pesticides in arctic ocean water. *Archives of environmental contamination toxicology* 35: 218-228

Janzen HH. (1990). Deposition of nitrogen into the rhizosphere by wheat roots. *Soil Biology and Biochemistry* 22(8): 1155-1160

Jeanne N. (1979). Effects of lindane on division cell-cycle and biosynthesis of 2 unicellular algae. *Canadian journal of botany-Revue canadienne de botanique* 57(13) : 1464-1472

Jones DL., Hodge A., Kuzyakov Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *Tansley review. New Phytologist* 163(3): 459-474.

Jones DL. & Darrah PR. (1993). Influx and efflux of amino acids from *Zea mays* L. roots and their implications for N nutrition and the rhizosphere. *Plant and Soil* (155,156): 87–90

Jones DL, Hodge A. (1999). Biodegradation kinetics and sorption reactions of three differently charged amino acids in soil and their effects on plant organic nitrogen availability. *Soil Biol Biochem* 31: 1331-1342

John PCL., Qi R. (2008). Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth *Trends Plant Sci.* 13:121–127.

Joo JC., Shackelford CD., Reardon KF. (2008). Sorption of nonpolar neutral organic compounds to humic acid-coated sands: Contributions of organic and mineral components. *Chemosphere* 70: 1290-1297

Kadhel P., Monfort C., Costet N., Rouget F., Thome JP., Multigner L., Cordier S. (2014). Chlordecone Exposure, Length of Gestation, and Risk of Preterm Birth. *American journal of epidemiology* 179(5): 536-544

Kandeler E., Marschne, P., Tscherk, D., Gahoonia TS., & Nielsen NE. (2002). Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil*, 238(2): 301-312

Karant NGK., Jayaram M., Majumder SK. (1983). Observations on the growth and residue levels of insecticide in vegetable plants raised on hexachloro-cyclohexane treated soil. *Comparative physiology and ecology* 8(4): 357-361

Katayama A., & Matsumura F. (1993). Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *trichoderma-harzianum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12(6): 1059-1065

- Kawahigashi H., Hirose S., Ohkawa H., Ohkawa Y. (2006). Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(8): 2985:2991
- Kidd PS., Prieto-Fernandez A., Monterroso C., Acea MJ. (2008). Rhizospheremicrobial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant Soil* 302: 233-247
- Klemedtsson L., Svensson BH., Rosswall T. (1987). Dinitrogen and nitrous-oxide produced by denitrification and nitrification in soil with and without barley plants. *Plants and soil* 99(2-3): 303-319
- Kluender C., Sans-Piche F., Riedl J., Altenburger R., Hartig C., Laue G., Schmitt-Jansen M. (2009). A metabolomics approach to assessing phytotoxic effects on the green alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Metabolomics* 5(1): 59-71
- Kohli J., Weisgerber I., Klein W., Korte F. (1976). Contributions to ecological chemistry. 107. Fate of lindane-C-14 in lettuce, endives and soil under outdoor conditions. *Journal of environmental science and health part B-pesticides food contaminants and agricultural wastes* 11(1): 23-32
- Korsaeth A, Molstad L, Bakken LR. (2001). Modelling the competition for nitrogen between plants and microflora as a function of soil heterogeneity. *Soil Biol Biochem* 33(2): 215–226
- Kraaij H., & Connell DW. (1997). Bioconcentration and uptake kinetics of chlorobenzenes in soy-bean roots. *Chemosphere* 34(12): 2607-2620
- Kreps J.A., Wu Y.J., Chang H.S., Zhu T., Wang X., & Harper J.F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130(4): 2129-2141.
- Krutz LJ., Beyrouthy CA., Gentry TJ., Wolf DC., Reynolds CM. (2005). Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere. *Biol Fertil Soils* 41: 359-364
- Kuiper I., Lagendijk EL., Bloemberg GV., Lugtenberg BJJ. (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 6-15

- Kumar D., Khan PK., Sinha SP. (1995). Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides. *Food and chemical toxicology* 33(4): 309-314
- Kutz, F.W., Wood, P.H., Bottimore, D.P., (1991). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenils in human adipose tissue. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 120 : 1-82
- Kushalappa AC. & Gunnaiah R. (2013). Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends in plants science* 18(9): 522-531
- Kuzyakov Y., Raskatov A. & Kaupenjohann M. (2003). Turnover and distribution of root exudates of *Zea mays*. *Plant and Soil* 254(2): 317-327
- Lal R., Dadhwal M., Kumari K., Sharma P., Singh A., Kumari H. (2008). *Pseudomonas* sp to *Sphingobium indicum*: a journey of microbial degradation and bioremediation of Hexachlorocyclohexane. *Indian Journal of Microbiology* 48(1): 3-18
- Lal R., Pandey G., Sharma P., Kumari K., Malhotra S., Pandey R., Raina V., Kohler HPE., Holliger C., Jackson C. (2010). Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and molecular biology reviews* 74(1): 58-+
- Lal R., Saxena DM. (1980). Effect of DDT on cell-population growth, cell-division, and DNA-synthesis in *Stylonychia-Notophora* (Stokes). *Archives of environmental contamination and toxicology* 9(2): 163-170
- Lal R., Saxena DM. (1981). Effect of DDT on cell-division and DNA and preotein-synthesis in a ciliateprotozoan, *Blepharisma-intermedium*. *Acta protozoologica* 20(4): 421-&
- Lam E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development . *Nature reviews molecular cell biology* 5(4): 305-315
- Larney FJ., Cessna AJ., Bullock, MS. (1999). Herbicide transport on wind-eroded sediment. *Journal of environmental quality* 28(5): 1412-1421
- Lee RGM., Burnett V., Harner T., Jones KC.(2000). Short-term temperature-dependent air-surface exchange and atmospheric concentrations of polychlorinated naphthalenes and organochlorine pesticides. *Environmental science & technology* 34(3): 393-398

- Leigh MB., Prouzova P., Mackova M., Macek T., Nagle DP., Fletcher JS. (2006). Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Applied and environmental microbiology* 72(4): 2331-2342
- Levillain J, Cattan P, Colin F, Voltz M, Cabidoche YM. (2012). Analysis of environmental and farming factors of soil contamination by a persistent organic pollutant, chlordecone, in a banana production area of French West Indies. *Agriculture Ecosystems & Environment* 159: 123-132.
- Li H., Sheng GY., Chiou CT., Xu OY. (2005). Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants. *Environmental science & technology* 39(13): 4864-4870
- Li XD., Yu E., Fan CC., Zhang CY., Fu TD, Zhou YM. (2012). Developmental, cytological and transcriptional analysis of autotetraploid Arabidopsis. *Planta* 236: 579–596
- Li XY., Wang L., Wang ZM., Zhang HH., Su R., Xu X., Zhang, HQ. (2011). Ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace hollow fiber microextraction of pesticides from root of *Panax ginseng* C.A. Mey. *Journal of separation science* 34(13): 1582-1589
- Li XZ., Rui JP., Mao YJ., Yannarell A., Mackie R. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil biology & biochemistry* 68: 392-401
- Liu WM., Hu Y., Zhao JH., Xu Y., Guan YF. (2005). Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *Journal of chromatography A* 1095(1-2): 1-7
- Lock, K., De Schamphelaere, K.A.C., & Janssen, C.R. (2002). The effect of lindane on terrestrial invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(2), 217-221.
- Lubbe A., Verpoorte R., Choi YH. (2012). Effects of fungicides on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs. *Plant physiology and biochemistry* 58: 116-123
- Luellen DR., Vadas GG., Unger MA. (2006). Kepone in James River fish: 1976–2002. *Sci. Total Environ* 358: 286–297

Lyman W.J., Reehl W.F.; Rosenblatt D.H. (1982). Handbook of chemical property estimation methods- environmental behavior of organic compounds. New York, Mc Graw-Hill Book Co

Ma XM. & Burken JG. (2002). VOCs fate and partitioning in vegetation: Use of tree cores in groundwater analysis. *Environmental Science & Technology* 36(21): 4663-4668

Ma XM., & Havelka MM. (2009). Phytotoxicity of Chlorinated Benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environmental Toxicology* 24(1): 43-48

Mackay D. and Leinonen P.J. (1975). Rate of evaporation of low-solubility contaminants from water bodies to atmosphere. *Environ Sci Technol*, 9, 13: 1178-1180

Madan VK., Singh R., Kumari B., Naresh JS., Kathpal TS. (2000). Dissipation of lindane and fenvalerate residues in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Indian climatic conditions . *Ecotoxicology and environmental safety* 46(2): 163-166

Madsen T., Aamand J. (1991). Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlororophenol a metahnogenic enrichment culture. *Applied and environmental microbiology* 57(9): 2453-2458

Marcacci S., Raveton M., Ravanel P., Schwitzguebel JP. (2005). The possible role of hydroxylation in the detoxification of atrazine in mature vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Zeitschrift fur naturforschung section C- A journal of biosciences* 60(5-6): 427-434

Marvin CH., Painter S., Charlton MN., Fox ME., Thiessen PAL. (2004). Trends in spatial and temporal levels of persistent organic pollutants in Lake Erie sediments. *Chemosphere* 54(1):33-40

Mary B., Fresneau C., Morel JL., Mariotti A. (1993). C and N cycling during decomposition of root mucilage, roots and glucose in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 1147-1156

Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment international* 37(8): 1362-1375



Meharg AA., Wright J., Leeks GJL., Wass P., Osborn D. (2000). Spatial and temporal regulation of the pesticide dieldrin within industrial catchments. *Science of the total environment* 251: 255-263

Melnitchouck A., Leinweber P., Eckhardt KU. & Beese R. (2005). Qualitative differences between day- and night-time rhizodeposition in maize (*Zea mays* L.) as investigated by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Soil Biology & Biochemistry* 37(1): 155-162

Mengel K. (1996). Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops. *Plant and soil* 181(1): 83-93

Menges M. de Jager SM., Gruissem W., Murray JAH.(2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant journal* 41(4): 546-566

Menone ML., Pesce SF., Diaz MP., Moreno VJ., Wunderlin DA. (2008). Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry* 69(5): 1150-1167

Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulz J. (1999). Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162: 373-383.

Messing P., Farenhorst A., Waite D., Sproull J.(2013). Influence of usage and chemical–physical properties on the atmospheric transport and deposition of pesticides to agricultural regions of Manitoba, Canada. *Chemosphere* 90(6): 1997-2003

Metcalf RI., (1955) *Organic Insecticides, Their Chemistry and Mode of Action*. Interscience New York

Miglioranza KSB., Aizpún de Moreno JE., Moreno VJ., Osterrieth ML. & Escalante AH. (1999). Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of “Los Padres” pond watershed, Argentina. *Environmental Pollution* 105(1): 91-99

- Miglioranza KSB., de Moreno JEA., Moreno VJ. (2004). Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water research* 38(7): 1765-1772
- Miglioranza KSB., De Moreno JEA., and Moreno VJ. (2003). Dynamics of organochlorine pesticides in soils from a southeastern region of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 712-717
- Mikes O., Cupr P., Trapp S., Klanova J.(2009). Uptake of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides from soil and air into radishes (*Raphanus sativus*). *Environmental Pollution* 157(2): 488-496
- Millet, M., Wortham, H., Sanusi, A., & Mirabel, P. (1997). Atmospheric contamination by pesticides: Determination in the liquid, gaseous and particulate phases. *Environmental Science and Pollution Research* 4(3) : 172-180
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498
- Monferran MV., Pesce SF., Cazenave J., Wunderlin DA. (2008). Detoxification and antioxidant responses in diverse organs of *Jenynsia multidentata* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Environmental Toxicology* 23(2): 184-192
- Moore JC., McCann K., Setälä H., de Ruiter PC. (2003). Top-down is bottom-up: Does predation in the rhizosphere regulate aboveground dynamics? *Ecology* 84: 846–857
- Moussaieff A., Rogachev I., Brodsky L., Malitsky S., Toal TW., Belcher H., et al. (2013). High-resolution metabolic mapping of cell types in plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(13): E1232-E1241
- Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S, Jegou B, Thome JP, Blanchet P. (2010). Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28(21): 3457-3462
- Multigner L, Kadhel P, Huc-Terki F, Thome JP, Janky E, Auger J. (2006). Exposure to chlordecone and male fertility in Guadeloupe (French West Indies). *Epidemiology* 17 S372

Nielsen J. & Oliver S. (2005). The next wave in metabolome analysis. *Trends in biotechnology* 23(11): 544-546

Neilson EH., Goodger JQD., Woodrow IE., Moller BL. (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends in plant science* 18(5): 250-258

Ohno R., Kadota Y., Fujii S., Sekine M., Umeda M., Kuchitsu K. (2011). Cryptogein-Induced Cell Cycle Arrest at G(2) Phase is Associated with Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases, Suppression of Expression of Cell Cycle-Related Genes and Protein Degradation in Synchronized Tobacco BY-2 Cells. *Plant and cell physiology* 52(5): 922-932

Olivella MA., Caixach J., Planas C., Oliveras A., Jove P. (2012). Concentrations of organochlorine pesticides and 2,4,6-trichloroanisole in cork bark. *Chemosphere* 86(7): 754-758

Oliver DJ., Nikolau BJ. & Wurtele ES. (2009). Acetyl-CoA-Life at the metabolic nexus. *Plant Science* 176(5): 597-601

Orton, T.G., Saby, N.P.A., Arrouays, D., Jolivet, C.C., Villanneau, E.J., Marchant, B.P., et al. (2013). Spatial distribution of Lindane concentration in topsoil across France. *Science of the Total Environment* 443 : 338-350

Parent-Massin D., Thouvenot D., Rio B., Riche C. (1994). Lindane haematotoxicity confirmed by in vitro tests on human and rat progenitors. *Hum Exp Toxicol* 13(2): 103-6

Paterson E., Gebbing T., Abel C., Sim A., Telfer G. (2007). Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New phytologist* 173(3): 660-610

Paterson S., Mackay D., Tam D., Shiu WY. (1990). Uptake of organic-chemicals by plants- A review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 21: 297-331

Pereira RC., Camps-Arbestain M., Garrido BR., Macias F., Monterroso C. (2006). Behaviour of alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental pollution* 144(1): 210-217

Parween T., Jan S., Mahmooduzzafar., Fatma T. (2012). Evaluation of oxidative stress in *Vigna radiata* L. in response to chlorpyrifos. *International journal of environmental science and technology* 9(4): 605: 612

Petersen G., Rasmussen D. et Gustavson K. (2007). Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. DHI, 53559

Phillips TM., Seech AG., Lee H., Trevors JT. (2005). Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16: 363-392

Postma JA., Schurr U. & Fiorani F. (2014). Dynamic root growth and architecture responses to limiting nutrient availability: linking physiological models and experimentation. *Biotechnology Advances* 32(1): 53-65

Quintero JC., Moreira MT., Feijoo G., Lema JM. (2005). Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere* 61: 528-536

Ramade. (1998). Dictionnaire encyclopédique des sciences de l' eau. Ediscience international, Paris, 786 pp

Ratliffe RG. & Shachar-Hill Y. (2006). Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. *Plant journal* 45(4): 490-511

Rawsthorne S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research* 41(2): 182-196.

Raynaud X., Lata JC. & Leadley PW. (2006). Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant-microbial interactions. *Plant and Soil* 287(1-2): 95-116

Ricking M., & Schwarzbauer J. (2008). HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin. Germany. *Environmental Chemistry Letters* 6(2): 83-89

Riwa. (1998). Xeno-oestrogenen en drinkwater. The pesticide manual. A World Compendium. 8th Edition

Roberts AL., Totten LA., Arnold WA., Burris DR., and Campbell TJ. (1996). Reductive elimination of chlorinated ethylenes by zerovalent metals. *Environ. Sci. Technol* 30(8): 2654–2659

Roche H., Vollaire Y., Persic A., Buet A., Oliveira-Ribeiro C., Coulet E., et al. (2009). Organochlorines in the Vaccares Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). *Environmental Pollution* 157(8-9) : 2493-2506

- Rodriguez-Garrido B., Arbestain MC., Monterroso MC., Macias F. (2004). Reductive dechlorination of alpha-, beta-, delta-, and gamma-hexachlorocyclohexane isomers by hydrocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environmental Science & Technology* 38: 5046-5052
- Rodziewicz P., Swarczewicz B., Chmielewska K., Wojakowska A., Stobiecki M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta physiologiae plantarum* 36(1): 1-19
- Rugh CL., Senecoff JF., Meagher RB., Merkle SA. (1998). Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature biotechnology* 16(10): 925-928
- Sainz MJ., Gonzalez-Penalta B. & Vilarino A. (2006). Effects of hexachlorocyclohexane on rhizosphere fungal propagules and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Plantago lanceolata*. *European Journal of Soil Science* 57(1): 83-90
- San Miguel A., Roy J., Gury, J., Monier A., Coissac E., Ravanel P., Geremia RA., Raveton, M. (2014). Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere. *Applied microbiology and biotechnology* 98(9): 4257-4266
- San Miguel A., Schroder P., Harpaintner R., Gaude T., Ravanel P., Raveton M. (2013). Response of phase II detoxification enzymes in *Phragmites australis* plants exposed to organochlorines. *Environmental science and pollution research* 20(5): 3464-3471
- Sardans J., Penuelas J., Rivas-Ubach A. (2011). Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology* 21(4): 191-225
- Scheyer A., Morville S., Richert J., Mirabel P., Millet M. (2003). Atmospheric trace levels of pesticides in urban area during active treatment period. *Pesticide in air, plant, soil & water system* 811-821
- Schilling G., Gransee A., Deubel A., Lezovic G., Ruppel S. (1998). Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk* 161: 465–478
- Schönwitz R., Ziegler H. (1989). Interaction of maize roots and rhizosphere microorganisms, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk* 152: 217–222

Schroder P., Harvey PJ. Schwitzguebel JP. (2002). Prospects for the phytoremediation of organic pollutants in Europe. *Environmental science and pollution research* 9(1): 1-3

Schultz J.C., Appel HM., Ferrieri AP., Arnold TM. (2013). Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-11

Schwitzguebel 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(6): 842-856

Schwitzguébel JP., Meyer J., Kidd P.(2006). Pesticides Removal Using Plants: Phytodegradation Versus Phytostimulation, *Phytoremediation Rhizoremediation* 179-198

Seurin S., Rouget F., Reninge, JC., Gillot N., Loynet C., Cordier S. (2012). Dietary exposure of 18-month-old Guadeloupian toddlers to chlordecone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63(3): 471-479.

Sharada K., Salimath BP., Shetty HS., Karanth NGK. (1992). Indol-3- $\gamma$ -lactic acid-regulated and calmodulin-regulated  $Ca^{2+}$  ATPase- A target for the phytotoxic action of hexachlorocyclohexane. *Pesticide Science* 35(4): 315-319

Sinha S. (2002). Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46(2): 281-288

Siess H. (1991). *Oxidative stress: Introduction*. Academic Press, San Diego I-XV

Singh G., Kathpal TS., Spencer WF., Dhankar JS. (1991). Dissipation of some organochlorine insecticides in cropped and uncropped soil 70(3): 219-239

Sinha S. (2002). Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46(2): 281-288

Šmídová K., & Hofman J. (2014). Uptake kinetics of five hydrophobic organic pollutants in the earthworm *Eisenia fetida* in six different soils. *Journal of Hazardous Materials* 267(0): 175-182

Somtrakoon K. & Pratumma.S. (2012) Phytotoxicity of heptachlor and endosulfan sulfate contaminants in soils to economic crops. *Journal of environmental biology* 33(6): 1097-1101

- Sonchieu J., Ngassoum MB., Tchatchueng JB., Srivastava AK. & Srivastava, LP. (2010). Survey of pesticide residues in maize, cowpea and millet from northern Cameroon: part I. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance* 3(3): 178-184
- Streit B. (1992). Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia* 48(10): 995-970
- Stitt M. (2013). Progress in understanding and engineering primary plant metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 24(2): 229-238
- Sun J., Zhang CL., Deng SR., Lu CF., Shen X., Zhou XY. (2012). An ATP signalling pathway in plant cells: extracellular ATP triggers programmed cell death in *Populus euphratica*. *Plant Cell and Environment* 35(5): 893-916
- Sweetlove LJ., Beard KFM., Nunes-Nesi A., Fernie AR. Ratcliffe RG. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science* 15(8): 462-470
- Sweetlove LJ., Obata T. & Fernie AR. (2014). Systems analysis of metabolic phenotypes: what have we learnt? *Trends in Plant Science* 19(4): 222-230.
- Taghavi S., Barac T., Greenberg B., Borremans B., Vangronsveld J., van der Lelie D. (2005). Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Applied and environmental microbiology* 71(12): 8500-8505
- Tam DD., Shiu WY., Qiang K., Mackay D. (1996). Uptake of chlorobenzenes by tissues of the soybean plant: Equilibria and kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(4): 489-494
- Tasli S., Patty L., Boetti H., Ravanel P., Vachaud G., Scharff C., Favre-Bonvin J., Kaouadji M., Tissut M. (1996). Persistence and leaching of atrazine in corn culture in the experimental site of La Côte Saint André (Isère, France). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* : 30(2): 203-212
- Thewys T., Witters N., Van Slycken S., Ruttens A., Meers E., Tack FMG., Vangronsveld J. (2010). Economic Viability of Phytoremediation of a Cadmium Contaminated Agricultural Area Using Energy Maize. Part I: Effect on the Farmer's Income. *International journal of phytoremediation* 12(7) : 650-662

- Thi THD., Puig RC., Kim HK., Erkelens C., Lefeber AWM., Linthorst HJM., Choi YH., Verpoorte R. (2009). Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry* 42(2): 146-152
- Tiemann U., (2008). *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review, *Reprod. Toxicol.*, 25: 316-326
- Tomlin C. (1994). *The Pesticide Manual* (4th edn.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK The British Crop Protection Council, Surrey
- Tomza-Marciniak A., Marciniak A., Pilarczyk B., Prokulewicz A., Bakowska M. (2014). Interspecies Comparison of Chlorinated Contaminant Concentrations and Profiles in Wild Terrestrial Mammals from Northwest Poland. *Arch Environ Contam Toxicol* 66(4): 491–503
- Topp E., Scheunert I., Attar A., Korte F. (1986). Factors affecting the uptake of C-14-labeled organic-chemicals by plants from soil. *Ecotoxicology and environmental safety* 11(2): 219-228
- Tovar-Mendez A., Miernyk JA. & Randall DD. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *European Journal of Biochemistry* 270(6): 1043-1049
- Trapp S. (2004). Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11: 33-39
- Trenkamp S., Eckes P., Busch M., Fernie AR. (2009). Temporally resolved GC-MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. *Metabolomics* 5(3): 277-291
- Turgut C., Atatanir L., Cutright TJ. (2010). Evaluation of pesticide contamination in Dilek National Park, Turkey. *Environmental monitoring and assessment* 170(1-4): 671-679
- UNEP (2005). Proposal for listing chlordecone in Annex A of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (UNEP/POPS/POPRC.1/INF/6). United Nations Environment Programme, Geneva, UNEP/POPS/POPRC.1/INF/6
- Vaarama A. (1947). Experimental studies on the influence of DDT insecticide upon plant mitosis. *Hereditas* 33(1-2): 191-219



- Van der Krift TAJ, Berendse F. (2001). The effect of plant species on soil nitrogen mineralization. *Journal of ecology* 89(4): 555-561
- Van Dongen JT., Gupta KJ., Ramirez-Aguilar SJ., Araujo WL., Nunes-Nesi A., Fernie AR. (2011). Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. *Journal of plant physiology* 168(12): 1434-1443
- Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental science and pollution research* 16(7): 765-794
- Vigneault F. (2007). Caractérisation de la famille des protéines Kinases de type NIMA chez les plantes et analyse fonctionnelle de PNEK1, une NEK du peuplier (*Populus tremula* X *P. Alba* clone 717 I-B4). Doctorat en sciences forestières. Université Laval
- Vijaya Padma V., Sowmya P., Arun Felix T., Baskaran R., Poornima P. (2011). Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology* 49(4): 991-998
- Villanneau E., Saby N.P.A., Arrouays D., Jolivet C.C., Boulonne L., Caria, G., et al. (2009). Spatial distribution of lindane in topsoil of Northern France. *Chemosphere* 77(9): 1249-1255
- Vrchotová B., Macková M., Macek T. and Demnerová K. 2013 Bioremediation of chlorobenzoic acids. In: *Applied Bioremediation – Active and passive approaches, Agricultural and biological Sciences*. Ed. Patil Y. B. & Rao P. ISBN 978-953-51-1200-6
- Wafford KA., Sattelle DB., Gant DB, et al.(1989). Non competitive inhibition of GABA receptors in insect and vertebrate CNS by endrin and lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiologie* 33(3): 213-219
- Waliszewski SM., Carvajal O., Infanzon RM., Trujillo P., Aguirre AA., Maxwell M. (2004). Levels of organochlorine pesticides in soils and rye plant tissues in a field study. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(23): 7045-7050
- Waliszewski SM., Carvajal O., Gomez-Arroyo S., Amador-Munoz O., Villalobos-Pietrini R., Hayward-Jones PMV., alencia-Quintana R. (2008). DDT and HCH isomer levels in soils,

carrot root and carrot leaf samples. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 81(4): 343-347

Wang MJ. & Jones KC. (1994a). Behavior and fate of chlorobenzenes (CBS) introduced into soil-plant systems by sewage-sludge application-a review. *Chemosphere* 28(7): 1325-1360

Wang MJ. & Jones KC. (1994b). Uptake of chlorobenzenes by carrots from spiked and sewage sludge-amended. *Environmental Science & Technology* 28(7): 1260-1267

Warren N., Allan I. J., Carter J. E., House W. A. et Parker A. (2003). Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments-a review. *Applied Geochemistry* 18: 159-194

Weingartner M., Pelayo HR, Binarova P., Zwerger K, Melikant B., de la Torre C., Heberle-Bors E., Bogre L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage check-point, *J. Cell Sci.* 116: 487-498.

Wenzel WW. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil* 321: 385-408

Westcott ND., Worebey BL. (1985). Novel solvent-extraction of lindane from soil. *Journal of agricultural and food chemistry* 33(1): 58-60

Winterbourn CC. & Christine C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology* 4(5): 278-286

Xiong HY., Li YS., Li LJ. (2006). A unique form of cell death occurring in meristematic root tips of completely submerged maize seedlings. *Plant science* 171(5): 624-631

Ye M., Sun MM., Ni N., Chen YW., Liu ZT., Gu CG., Bian YR., Hu F., Li HX., Kengara FO. (2014). Role of cosubstrate and bioaccessibility played in the enhanced anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides (OCPs) in a paddy soil by nitrate and methyl-beta-cyclodextrin amendments. *Environmental science and pollution research* 21(13): 7785-7796

Zimmermann P., Zentgraf U. (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol Lett* 10: 515-534

Zhang JY., Zhao W., Pan J., Qiu LM. & Zhu YM. (2005). Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environment International*, 31(6): 855-860

Zhang Q., Zhou C., Qian HF., Liu WP. & Zhao MR. (2013). Stereoselective Phytotoxicity of HCH Mediated by Photosynthetic and Antioxidant Defense Systems in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 8(1)

Zohair A., Salim AB., Soyibo AA., Beck AJ.(2006). Residues of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in organically-farmed vegetables. *Chemosphere* 63 (4): 541-553