

Ecole doctorale n°358 : Sciences, Technologies, Santé



THESE

Présentée à l'U.F.R. des Sciences Exactes et Naturelles

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne Spécialité : Biologie - Environnement

par

Rachel DOSNON-OLETTE

Phytoremédiation d'eaux contaminées par des pesticides : tolérance et capacité d'élimination par des plantes aquatiques.

Soutenue publiquement le 27 novembre 2009, devant le jury composé de :

M ^r M. MENCH, Directeur de Recherche (INRA, Bordeaux)	Rapporteur
M ^{lle} M. RAVETON, Maître de Conférences – HDR (Université, Grenoble)	Rapporteur
M ^r G. BLAKE, Professeur (Université, Chambéry)	Examinateur
M ^r F. LAURENT, Chargé de Recherche (INRA, Toulouse)	Examinateur
M ^r P. EULLAFFROY, Maître de Conférences – HDR (Université, Reims)	Co-directeur de thèse
M ^r M. COUDERCHET, Professeur (Université, Reims)	Co-directeur de thèse
M ^r D. PINÇONNET, Directeur Territorial (AESN, Châlons en Champagne)	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'Agence de l'Eau Seine Normandie et la Ville de Reims qui ont soutenu financièrement ce travail en m'attribuant une allocation doctorale et en participant au financement des travaux effectués lors de ma thèse dans le cadre du contrat d'objectifs AQUAL.

Je remercie Messieurs les Professeurs Philippe Jeandet et Christophe Clément pour leur accueil au sein de l'Unité de Recherche Vigne et Vin de Champagne Stress et Environnement, en tant que directeurs de l'Unité à des moments différents de ma thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Michel Couderchet, responsable de l'équipe Plantes, Pesticides, Développement Durable (PPDD), pour son accueil et son encadrement lors de ma thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier Philippe Eullaffroy qui m'a conduit sur le chemin de la thèse, en ayant encadré mon stage de maîtrise puis de DEA. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir emmené sur les chemins de la recherche. Merci pour son encadrement et ses conseils tout au long de ce parcours, jusqu'à son appui pour trouver le post-doc convoité.

Merci, également, aux autres membres de notre petite équipe PPDD (Aziz et Patricia) et aux nouvelles thésardes arrivées depuis peu, Joséphine, Saloua et Virginie, qui ont animé le labo pendant mes derniers mois d'expériences.

J'exprime ma reconnaissance à Michel Mench et Muriel Raveton pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Egalement à Monsieur Gérard Blake, Monsieur François Laurent et Monsieur Didier Pinçonnet pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je suis reconnaissante au COST 859 (European Cooperation in Science and Technology), et à son « chairman » Jean-Paul Schwitzguébel pour m'avoir fait découvrir ce réseau de spécialistes européens en phytotechnologies, ainsi que pour le financement de congrès et d'une mission scientifique de 6 semaines au sein du laboratoire de Peter Schröder (Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen, Helmholtz-Zentrum München, Neuherberg, Allemagne).

Merci à Valérie Page, rencontrée lors d'un congrès COST, qui nous a autorisé, avec Peter Schröder, l'utilisation de son protocole novateur pour le dosage des P450.

Un merci également pour tous les midis passés dans une bonne ambiance avec les collègues du laboratoire SiRMa (je ne me lance pas dans l'énumération de leurs noms, de peur d'oublier quelqu'un !), et pour l'utilisation de leur ultra-centrifugeuse, sans laquelle je n'aurais pu répéter les dosages des P450.

Je salue chaleureusement les membres de l'équipe de recherche URVVC-SE, qui m'ont aidée durant ma thèse (Anne-No, Cédric, Laurence, Lucile, Olivier, ...).

Je ne peux faire une partie remerciements sans penser à ma famille, ma belle-famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant ces années d'étude. Merci à eux pour m'avoir permis de me changer les idées et de profiter de la vie en dehors de ma thèse !

Et enfin (« last but not least »), le plus grand des merci à mon mari qui a vécu en même temps que moi toutes les étapes de cette thèse, avec ses moments d'excitation et d'énervement, ses réussites et ses échecs. Merci pour ta patience et ton soutien durant toutes ces années et ces dernières semaines de stress.

SOMMAIRE

Sommaire

REMERCIEMENTS	i
RESUME	. v
ABSTRACT	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONSv	iii
INTRODUCTION	. 1
1. Les produits phytosanitaires et les problèmes environnementaux	.1
1.1 Le contexte général	. 1
1.2 Les problèmes environnementaux	. 2
1.3 Pollution locale par les pesticides	. 2
1.4 Les pesticides incriminés	.3
1.5 Les moyens de lutte contre cette pollution	.4
2. La phytoremédiation	. 5
2.1 Historique	. 5
2.2 Les aspects économiques	.6
2.3 Les différents types de remédiation	.7
2.4 Le potentiel épuratoire des plantes aquatiques	. 8
3. Les produits phytosanitaires étudiés	10
3.1 Les fongicides	10
3.1.1 Le diméthomorphe	10
3.1.2 Le pyriméthanil	11
3.2 Les herbicides	11
3.2.1 L'isoproturon	11
3.2.2 Le glyphosate	12
4. Le matériel végétal	13
4.1 Les plantes aquatiques	14
4.1.1 Cabomba aquatica	14
4.1.2 Callitriche palustris	14
4.1.3 Elodea canadensis	15
4.1.4 Lemna minor	15
4.1.5 Spirodela polyrhiza	16
4.2 Les algues : genre Scenedesmus	17
4.2.1 Scenedesmus obliquus	17
4.2.2 Scenedesmus quadricauda	17

Sommaire

5.	La fluorescence chlorophyllienne	19
6.	Les mécanismes de détoxication	
6	.1 Le cytochrome P450	23
6	.2 La glucosyltransférase	24
6	.3 La glutathion S-transférase	25
OB.	JECTIFS DU DOCTORAT	
RES	SULTATS ET DISCUSSION	
Part	tie 1 : Toxicité et remédiation	
Р	Publication II	
Р	Publication III	
Р	Publication IV	
Part	tie 2 : Effet de différents paramètres sur la remédiation du diméthomorphe	67
Р	Publication V	67
Part	tie 3 : Compréhension des mécanismes de détoxication du diméthomorphe	
Pub	lication VI	
CO	NCLUSIONS ET PERSPECTIVES	97
RE	FERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
AN	NEXES	116

RESUME

Résumé

Dans le vignoble champenois, afin de contenir et de réduire la pollution des eaux de ruissellement chargées en polluants, celles-ci sont souvent collectées dans des bassins avant de rejoindre les rivières et les nappes souterraines. L'utilisation de plantes aquatiques dans ces bassins pourrait être une technique efficace pour éliminer les nombreux pesticides contenus dans ces eaux. L'étude a porté sur la sensibilité et l'efficacité de macrophytes (Cabomba aquatica, Callitriche palustris, Elodea canadensis, Lemna minor et Spirodela polyrhiza) et d'algues unicellulaires (Scenedesmus obliquus et Scenedesmus quadricauda) dans la remédiation de fongicides (diméthomorphe et pyriméthanil) et d'herbicides (glyphosate et isoproturon). Suite à l'évaluation de la toxicité des pesticides sélectionnés, nous avons mené nos travaux de phytoremédiation sur ces contaminants concentrés à 600, 80 et 10 µg.L⁻¹ pour les fongicides, le glyphosate et l'isoproturon, respectivement. Ces concentrations n'induisent pas de variations supérieures à 30 % des différents biomarqueurs de toxicité pris en compte. Les macrophytes aquatiques placées dans les milieux contaminés ont permis la disparition maximum de 48 μ g.g⁻¹ de MF de diméthomorphe, 33 μ g.g⁻¹ de MF de pyriméthanil, 53 μ g.g⁻¹ de MF de glyphosate et 7 µg.g⁻¹ de MF d'isoproturon, après 4 jours d'exposition. L. minor s'est avérée être la plante la plus performante dans le prélèvement des fongicides. Concernant les algues, leur présence induit une disparition du milieu allant jusqu'à 40 µg de diméthomorphe.10⁻⁹ cellules, 26 µg de pyriméthanil.10⁻⁹ cellules et 1 µg d'isoproturon.10⁻⁹ cellules, après 4 jours d'exposition.

L'influence de différents paramètres sur les capacités d'épuration de *L. minor* et/ou *S. polyrhiza* vis-à-vis du diméthomorphe a été étudiée. On a montré que la concentration initiale en fongicide est corrélée positivement non seulement à la sensibilité des plantes mais aussi à leur taux de prélèvement. L'augmentation de la densité des plantes présentes dans le milieu est elle aussi, corrélée positivement à leur sensibilité. Cependant une plus grande densité végétale induira un prélèvement plus important, en quantité, du pesticide bien que l'efficacité de la plante (exprimée en $\mu g.g^{-1}$ MF) à le prélever soit moindre. Des variations de température (5 à 20°C) et d'intensité lumineuse (0 à 200 µmol m⁻².s⁻¹) n'ont pas d'effet sur la sensibilité des plantes vis-à-vis du diméthomorphe. Par contre, l'augmentation de ces deux paramètres favorise le prélèvement du fongicide par *L. minor*, indiquant que celui-ci pourrait être lié à un métabolisme actif dans la plante. Les mécanismes mis en jeu par le végétal pour détoxiquer le diméthomorphe (Cytochrome P450 et les Glucosyltransférases) semblent confirmer cette hypothèse.

Mots clés : épuration, pesticide, détoxication, phytoremédiation, plante aquatique, algue

ABSTRACT

Phytoremediation of pesticide contaminated water: tolerance and uptake capacity of aquatic

plants.

In the vineyards of Champagne, pesticide-contaminated runoff water is often collected in ponds before being released into streams or reaching ground water. These ponds help to contain and decrease pollutants concentration in natural environment. The use of aquatic plants in these ponds, could be an efficient biotechnology to remove pesticides from surface water. The study aims at understanding the sensitivity and removal capacity of five aquatic macrophytes (Cabomba aquatica, Callitriche palustris, Elodea canadensis, Lemna minor and Spirodela polyrhiza) and two unicellular algae (Scenedesmus obliquus and Scenedesmus quadricauda) towards fungicides (dimethomorph and pyrimethanil) and herbicides (glyphosate and isoproturon). After assessing the pesticides toxicity on each plant, we chose to work with a concentration of 600, 80 and 10 µg.L⁻¹ for fungicides, glyphosate and isoproturon, respectively. The presence of macrophytes induced a pesticide disappearance from the contaminated medium of up to 48 µg.g⁻¹ Fresh Weight (FW) of dimethomorph, 33 $\mu g.g^{-1}$ FW of pyrimethanil, 7 $\mu g.g^{-1}$ FW of isoproturon and 53 $\mu g.g^{-1}$ FW of glyphosate, after 4 days. L. minor was the most efficient plant in fungicide removal. Concerning algae, their presence induced a pesticide disappearance from the medium of up to 40 µg of dimethomorph. 10^{-9} cells, 26 µg of pyrimethanil. 10^{-9} cells and 1 µg of isoproturon. 10^{-9} cells, after 4 days.

Influence of different parameters on dimethomorph removal capacity of *L. minor* and/or *S. polyrhiza* has been also studied. The initial fungicide concentration was positively correlated to plant sensitivity and to removal rate. Also, increase of population density was positively correlated to plant sensitivity. The higher plant density induced an increase of removal, in $\mu g.L^{-1}$, but we observed a lower plant efficiency as expressed in $\mu g.g^{-1}$ FW. Temperature (5 to 20 °C) and light intensity (0 to 200 μ mol PAR m⁻².s⁻¹) did not affect plant sensitivity to dimethomorph. However, an increase in those two parameters stimulated the fungicide removal by *L. minor*, indicating that dimethomorph removal could be due to an active metabolism inside the plant. In fact, the observed stimulation of some mechanisms involved in the detoxification of xenobiotics in plant (e.g. Cytochrome P450 and Glucosyltransferases) seemed to confirm this hypothesis.

Keywords: uptake, pesticide, detoxification, phytoremediation, aquatic plant, algae.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPA : Acide Aminométhylphosphonique

COST : European Cooperation in Science and Technology (Réseau européen de coopération en sciences et technologies)

EPA: Environmental Protection Agency (Agence de la Protection Environementale aux Etats-Unis).

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FMN : Flavine MonoNucléotide

 F_0 : Fluorescence de base ou morte

 F_0 ': Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans le rouge lointain (735 nm)

F_m : Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité

 F_{m} ': Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue

F_s : Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue

F_v : Fluorescence variable

GSH : Glutathion

GST(s) : Glutathion S-Transférase(s)

GT(s) : GlucosylTransférase(s)

MF : Matière Fraîche

NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous forme oxydée

P450 : Cytochrome P450

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

PAR : Photosynthetically Active Radiation (Radiations Photosynthétiquement Actives)

PS : Photosystème

QA : Quinone A, accepteur primaire d'électron du PS II

 $q_{\rm N}$: « quenching » non-photochimique

 $q_{\rm P}$: « quenching » photochimique

UDP : Uridine Diphosphate

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. Pesticide Remediation Capability of Three Aquatic Plants: Lemna minor, Elodea canadensis, and Cabomba aquatica. In Gavaskar AR and Silver CF (Symposium Chairs), In Situ and On-Site Bioremediation—2007(2), pp. 1263-1270. Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Columbus (OH): Battelle Press.
- Olette R, Couderchet M, Biagianti S, Eullaffroy P. Bioextraction et effets de pesticides sur trois plantes aquatiques : *Cabomba aquatica*, *Elodea canadensis* et *Lemna minor*. *In* Oturan M et Mouchel J-M (éd.), *Pesticides : Impacts environnementaux, gestion et traitements*. Paris: Presses de l'école nationale des ponts et chaussées, 2007, p.334.
- Megateli S, Olette R, Semsari S, Couderchet M, 2009. Toxicity of copper / dimethomorph combination for *Lemna minor* and depuration of the fungicides by aquatic plant. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, in press.
- Publication I: Olette R, Couderchet M, Biagianti S, Eullaffroy P. 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere, 70(8): 1414-1421.
- Publication II: Dosnon-Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. Ecotoxicology and Environmental Safety, doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.08.010.
- Publication III: Dosnon-Olette R, Trotel-Aziz P, Couderchet M, Eullaffroy P. 2009. Pesticides removal in algal cell suspensions. (soumise)
- Publication IV : Dosnon-Olette R, Couderchet M, Oturan MA, Oturan N, Eullaffroy P. 2009. Potential use of *Lemna minor* for the phytoremediation of isoproturon and glyphosate. (soumise)
- Publication V : Dosnon-Olette R, Couderchet M, Achouak El Arfaoui, Stéphanie Sayen, Eullaffroy P. 2009. Influence of initial concentration and population density on dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species (soumise)

- Publication VI: Dosnon-Olette R, Schröder P, Bartha B, Aziz A, Couderchet M, Eullaffroy P. Enzymatic basis for fungicide removal by *Elodea canadensis*. (en préparation)
- Eullaffroy P, Dosnon-Olette R, Gagné F, Couderchet M. Tolerance of selected freshwater plants for use in pesticide bioremediation studies. (en préparation)

- Olette R, Biagianti S, Eullaffroy P. (Août 2004). Influence of nutrient supplies on the photosynthetic activity of duckweed exposed to phytosanitary products. 13th International Congress of Photosynthesis (Montreal-Canada) (poster).
- Olette R, Couderchet M, Biagianti S, Eullaffroy P. (Mai 2005). Bioaccumulation et effets de pesticides sur trois plantes aquatiques : *Cabomba aquatica*, *Elodea canadensis* et *Lemna minor*. 35^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides (Marne La Vallée-France) (poster).
- Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. (Mai 2007). Pesticide Remediation capability of three aquatic plants: *Lemna minor*, *Elodea canadensis* and *Cabomba aquatica*. The ninth international in situ and on-site bioremediation symposium (Baltimore-Etats-Unis) (poster).
- Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. (Juin 2007). Compared efficiency of five macrophytes and two algae in the removal of fungicides from water. Workshop Cost Action 859, Fate of Pollutants in the Plant/Rhizosphere System: Fundamental Aspects and Their Significance for Field Applications - Prospects and Research Needs (Vilnius-Lithuanie) (poster).
- Olette R, Lecoq M, Couderchet M, Eullaffroy P. (Octobre 2007). Influence of aquatic plants in the fate of vineyard pesticides: a potential for phytoremediation. Workshop Cost Action 859, Nutrient Biofortification and Exclusion of Pollutants in Food Plants (Sede-Boqer-Israël) (communication orale).
- Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. (Décembre 2008). Des végétaux aquatiques pour dépolluer l'eau chargée en pesticides. Conférence CARINNA (Reims-France) (communication orale).
- Olette R, Couderchet M, Aziz A, Bartha B, Eullaffroy P, Schröder P. (Avril 2009). Enzymatic basis for the removal of the fungicide, dimethomorph, from water bodies by aquatic macrophytes. Workshop Cost Action 859, Biofortification, sequestration and detoxification – An integrated approach (Szeged-Hungary) (communication orale).

- Megateli S, Olette R, Semsari S, Couderchet M. (Mai 2009). Toxicity of copper/dimethomorph combination for *Lemna minor* and depuration of the fungicides by aquatic plant. 61st International Symposium on Crop Protection (Ghent-Belgium) (communication orale).
- Megateli S, Olette R, Semsari S, Couderchet M. (Mai 2009). Cross-influence of copper and dimethomorph on their toxicity and on the depuration capacity of *Lemna minor*. SETAC Europe 19th Annual Meeting, Protecting ecosystem health: facing the challenge of a globally changing environment (Göteborg-Sweden) (poster).
- Megateli S, Olette R, Semsari S, Couderchet M. (Mai 2009). Removal of copper and dimethomorph by Duckweed (*Lemna minor L.*). La troisième Journée Scientifique sur le Traitement et la Réutilisation des Eaux (Blida-Algérie) (poster).
- Rebouh K, Olette R, Eullaffroy P, Couderchet M. (Mai 2009). Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur la phytoremédiation du diméthomorphe par Lemna minor. 39^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides (Toulouse-France) (poster).
- Olette R, Megateli S, Trotel-Aziz P, Eullaffroy P, Couderchet M. (Mai 2009). Phytoremédiation du diméthomorphe par *Lemna minor*. 39^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides (Toulouse-France) (communication orale).
- Dosnon-Olette R, Rebouh K, Couderchet M, Eullaffroy P. (Septembre 2009). Impact of aquatic plants on the fate of fungicides in water: potential for phytoremediation. 14th International Symposium on Toxicity Assessment (Metz-France) (poster).
- Dosnon-Olette R, Rebouh K, Couderchet M, Eullaffroy P. (Octobre 2009). Influence of plant density, pesticide concentration, light and temperature on dimethomorph removal by *Lemna minor*. COST ACTION 859 – PHYTO 2009 (Ascona-Suisse) (poster).

INTRODUCTION

1. Les produits phytosanitaires et les problèmes environnementaux

1.1 Le contexte général

Chaque année, des milliers de tonnes de contaminants provenant de sources domestiques, industrielles et agricoles sont déversés directement ou indirectement dans les eaux de surface. Parmi les polluants majeurs on retrouve entre autres des éléments issus des engrais (azote, phosphore), des pesticides et des métaux lourds. En France et en Europe, la préservation des ressources en eau est un enjeu majeur à l'entame du 21^{ème} siècle. C'est en ce sens que le Parlement Européen a établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (directive-cadre européenne du 23 octobre 2000). Les mesures prévues, renforcées par la charte européenne des ressources en eau adoptée par les ministres le 17 octobre 2001, ont pour principaux objectifs de prévenir la détérioration, améliorer et restaurer l'état des masses d'eau de surface, atteindre un bon état chimique et écologique de celles-ci, ainsi que de réduire la pollution due aux rejets et aux émissions de substances dangereuses. Ces objectifs devront être atteints à l'horizon 2015. Récemment, par l'intermédiaire du grenelle de l'environnement, l'état français s'est engagé à respecter les objectifs de cette directive cadre et a mis, ou va mettre, en place les mesures adéquates qui vont permettre de « retrouver une bonne qualité écologique de l'eau ». Pour cela, un des objectifs du grenelle de l'environnement est de réduire drastiquement l'émission et la dispersion dans les milieux (air, eau, sols et sédiments) des polluants connus pour leur caractère nocif pour la santé.

L'importance d'une eau de qualité pour la préservation et le développement de la vie explique que cet élément fasse partie du patrimoine de la nation française. Cependant, cette ressource naturelle se trouve menacée due à une contamination avérée notamment par les pesticides, les métaux lourds et les nutriments (Miquel, 2003).

L'Union Européenne a émis une liste de 33 substances prioritaires dans le domaine de l'eau dont 10 sont des pesticides (décision n° 2455/2001/CE du 20 novembre 2001). On s'est alors particulièrement intéressé à la pollution des eaux induites par les produits phytosanitaires.



Figure 1.1 : Le marché mondial des pesticides en 2008 (en millions de dollars), source UIPP (2009 ; Union des Industries de la Protection des Plantes).



Figure 1.2 : Principaux marchés en Europe en 2007 (en millions d'euros), source UIPP (2009).

1.2 Les problèmes environnementaux

En 2008, le marché des pesticides en Europe représentait près de 13 milliards de dollars, soit 31,7 % du marché mondial (Fig.1.1). La France est le quatrième utilisateur mondial de pesticides derrière les États-Unis, le Brésil et le Japon (UIPP, 2009). Sa grande superficie agricole (1^{ère} d'Europe) fait de la France le premier marché des pesticides en Europe avec plus de 1,8 milliards d'euros en 2007 (Fig. 1.2). Cette utilisation importante de pesticides peut induire des pollutions aiguës et chroniques des eaux superficielles et souterraines. En 2006, la présence de pesticides a été détectée et quantifiée au moins une fois sur 90 % des 1097 points interprétables du réseau des eaux superficielles françaises (Ifen, 2009a). Ceci traduit une dispersion importante de ces polluants et une présence généralisée qui se généralise dans les milieux aquatiques. On constate également que du fait de la présence des pesticides 37 % des points de ce réseau sont d'une qualité moyenne à mauvaise et 10 % d'une qualité les rendant impropres à l'utilisation pour la production d'eau potable (Ifen, 2009a). Au niveau des eaux souterraines, des pesticides ont été détectés et quantifiés au moins une fois sur 53 % des 1507 points interprétables du réseau. On constate que 24 % des points du réseau sont d'une qualité médiocre à mauvaise. Toutefois seul 1 % ont une mauvaise qualité (Ifen, 2009b).

1.3 Pollution locale par les pesticides

Les pollutions sont plus ou moins marquées selon les régions en fonction des activités économiques et de la structure des bassins versants. La région Champagne-Ardenne est une région française majeure sur le plan des activités agricoles et viticoles avec plus de 61 % de son territoire consacré à l'agriculture (3^{eme} région céréalière de France). Sa consommation en pesticides est proportionnelle à celle de ses activités puisqu'elle est la 2^{eme} région utilisatrice de produits phytosanitaires (Champagne-ardenne.developpement-durable, 2009). En 2001, l'Agence de l'Eau Seine Normandie a recensé une pollution par les pesticides dans 61 % des 409 captages d'eau du bassin dont 9 % étant contaminés de façon très importante (*i.e* concentration supérieure à 0,1 µg.L⁻¹ pour un des pesticides ou 0,5 µg.L⁻¹ pour le total des pesticides ; Agence de l'Eau Seine Normandie, 2009).

Paramètre déclassant	Nombre d'analyses déclassantes du pesticide en 2003 et 2004	Concentration en µg.L ⁻¹		
		Minimum	Médiane	Maximum
АМРА	250	2,1	3,0	48,1
Diuron	95	2,1	3,9	43,0
Glyphosate	76	2,0	3,6	165,0
Isoproturon	47	2,1	3,9	32,0
Aminotriazole	39	2,3	7,9	190,0
Norflurazon	20	2,3	3,4	28,7
Atrazine	17	2,0	2,9	13,8
Chlortoluron	17	2,3	3,7	23,0
Terbuthylazine	15	2,0	4,0	12,1
Métolachlore	12	2,1	4,3	12,8
Diméthomorphe	11	2,2	9,1	406,0

Tableau 1.1 : Les analyses déclassantes des eaux superficielles en 2003 et 2004, SEQ-eau qualité globale des eaux superficielles (Ifen, 2006).

Tableau 1.2 : Les analyses déclassantes des eaux souterraines en 2003 et 2004, SEQ-eau usage eau potable (Ifen, 2006).

Paramètre déclassant	Nombre d'analyses déclassantes du pesticide en 2003 et 2004	Concentration en µg.L ⁻¹		
		Minimum	Médiane	Maximum
Glyphosate	4	2,4	3,9	6,8
Atrazine	3	3,2	5,4	7,2
Chlortoluron	3	2,1	2,9	7,2

En rouge les pesticides ou leurs métabolites étudiés au cours de ce travail.

Introduction

Cette pollution préoccupante, est bien souvent amplifiée au niveau du vignoble champenois. En Champagne, le vignoble a la particularité d'être situé sur des coteaux, augmentant le phénomène de ruissellement et donc le transfert des polluants (pesticides) vers les eaux superficielles. De plus, la vigne, au niveau national, utiliserait de 20 à 51 % du total des produits phytosanitaires épandus sur 3,5 % de la superficie agricole selon différentes sources d'information (Cemagref, 2009; Observatoire-pesticides, 2009). Cela peut se traduire, au niveau de la Marne (rivière), par des concentrations pouvant atteindre plus de 4 μ g.L⁻¹ de pesticides si on additionne la concentration des 10 molécules les plus recherchées (Garmouna *et al.*, 1998). La Marne véhiculerait ainsi chaque année environ 14,7 à 17,5 tonnes de pesticides, issues des différents épandages, urbain et agricole (Blanchoud, 2001).

1.4 Les pesticides incriminés

Au niveau des pesticides déclassant des eaux superficielles en France en 2003 et 2004, on constate que les 10 premiers pesticides sont des herbicides ou leurs métabolites et que le onzième est un fongicide (Tab. 1.1). Concernant les eaux souterraines, trois herbicides sont responsables des analyses déclassantes (Tab. 1.2). Même si les herbicides sont souvent responsables des pollutions diffuses, on constate qu'en France les fongicides représente de 35 à 50 % des consommations de produits phytosanitaires contre 35 à 43 % pour les herbicides (selon les sources) ; sur la vigne, les fongicides représentes même 80 % des utilisés 1.2; Champagne-ardenne.developpement-durable, 2009; pesticides (Fig. Observatoire-pesticides, 2009). En 2005, une étude réalisée sur les pesticides retrouvés dans un bassin de réception des eaux de ruissellement du vignoble champenois montre la présence de trois fongicides (le soufre, le cuivre et le diméthomorphe) et d'un herbicide (le glyphosate) dans toutes les analyses (Hennebert et al., 2009).

1.5 Les moyens de lutte contre cette pollution

Face à cette pollution des eaux par les pesticides, les techniques de décontamination sont en pleine explosion. Généralement, les pollutions d'origine urbaine sont traitées en station d'épuration. Mais la majeure partie de celles-ci ne propose qu'un traitement primaire de type mécanique (dégrillage, dessablage, déshuilage-dégraissage) suivit d'un traitement secondaire (biologique à l'aide de bactéries). Il en résulte une eau qui semble de qualité, où la pollution par la matière organique a été efficacement éliminée (79 % de la matière organique, 84 % des matières en suspension), mais encore chargée en azote, phosphore, métaux lourds et pesticides (abattement de 45, 45, 35 et 10 %, respectivement). Pour réduire ces pollutions additionnelles, de nouvelles stations d'épuration commencent à s'implanter en proposant des traitements tertiaires de l'azote voir quaternaires en intégrant ozonation, filtration sur charbon actif et/ou ultrafiltration afin de traiter les micropolluants organiques. Ces techniques d'épuration sont de type physico-chimique. Elles entraînent un surcoût important pour une efficacité parfois moyenne pour les métaux lourds et les pesticides (Miretzky *et al.*, 2004), tout en amenant une pollution secondaire (Oswald, 1988 ; Yu, 2002).

Dans le cas des pollutions d'origines agricoles, l'emploi de techniques d'épuration de type physico-chimique engendreraient des coûts importants et se révèleraient difficiles à mettre en place. C'est pourquoi, il est important de réduire la charge polluante en amont, avant que cette dernière n'arrive au niveau des cours d'eau. Pour cela, des techniques d'épuration de type naturel voient le jour, avec la mise en place obligatoire, par exemple, de zone tampon près des cours d'eau (J.O. du 21/09/2006 ; projet de loi « Grennelle 1 »). Pour réduire cette pollution au niveau du vignoble champenois, des bassins de collecte des eaux de ruissellement chargées en pesticides se développent. Dans un premier temps, par processus de décantation, on observe une diminution de la charge polluante. Mais cette dernière reste insuffisante car l'eau, encore fortement chargée en pesticides (Annexe 1 : Abbassi, 2006), peut être rejetée au niveau des rivières. Dans notre étude, on se propose d'examiner et de comparer l'efficacité de plantes aquatiques dans la diminution de la charge polluante en pesticides dans le milieu et donc d'évaluer leur potentiel pour une application future en phytoremédiation des écosystèmes aquatiques d'eau douce.
2. La phytoremédiation

2.1 Historique

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé des mécanismes complexes pour absorber les substances organiques ou minérales du sol, de l'eau et de l'air à travers leurs racines et leurs feuilles, lesquelles sont ensuite transportées dans d'autres parties de la plante pour être utilisées, transformées, dégradées ou stockées (Cunningham *et al.*, 1996 ; Polessp, 2005).

On a cherché à exploiter cette propriété et à les utiliser comme agent de traitement des pollutions. Cette technique appelée phytoremédiation permet de restaurer grâce aux plantes, les ressources essentielles que sont l'eau, les sols et l'air lorsqu'elles sont contaminées. Elle a pour but d'éliminer, contenir, ou rendre moins toxique les contaminants environnementaux et permet de réduire le risque de dégradation des écosystèmes naturels. La plante devient alors un système de pompage et de filtration dont les racines et les feuilles sont les extracteurs pouvant trouver, altérer et/ou transporter des éléments et des composés contre des gradients chimiques importants.

Cette technique utilisée dès l'antiquité par les Grecs et les Romains n'a été utilisé à grande échelle qu'au début du XX^{ème} siècle, en 1901, avec la construction d'une lagune de 200 ha au Texas (San Antonio), puis en Allemagne (Munich) avec 233 ha. En 1912, la première zone humide pour l'épuration des eaux usées naît dans le Massachusetts. Puis la technique se perfectionne en Amérique du Nord et en Allemagne. Depuis les années 90, l'utilisation de la phytoremédiation pour le traitement de l'eau est en plein développement à travers le monde : la ville de New York a lancé, au début des années 2000, un grand programme de phytoremédiation visant à préserver ses ressources en eau, ce qui illustre bien le formidable potentiel de cette biotechnologie qui n'en est pourtant encore qu'à ses premiers développements.

Les années 90 ont marqué le début de nombreux projets de recherche dans le domaine de la phytoremédiation. On cherche depuis lors à évaluer le potentiel, puis à appliquer, cette biotechnologie dans le traitement de diverses pollutions avec le soutien de plusieurs gouvernements à travers le monde : Etats-Unis, Angleterre, France, Canada, Chine, Japon, ...

2.2 Les aspects économiques

Les coûts de la phytoremédiation mentionnés dans la littérature sont rares, variables et approximatifs. Il serait en moyenne de 1 euro par m³ de sol ou d'eau à dépolluer. L'avantage majeur de la phytoremédiation en terme de coût, apparaît très nettement par rapport aux autres méthodes traditionnelles (de 100 à 10 000 fois moins chère ; INRA, 2009).

Le marché américain pour la phytoremédiation est passé de 50 millions en 1999 à plus de 300 millions en 2007. Cette technologie est en pleine expansion, notamment au États-Unis où l'EPA recensait, dès 1990, 150 projets utilisant cette technique pour éliminer divers polluants comme, les solvants chlorés, les explosifs, les combustibles, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les composés d'hydrocarbures pétroliers, les radionucléides, et les métaux lourds (Pilon-Smits, 2005 ; Campos *et al.*, 2008).

La France est en retard par rapport au reste de l'Europe surtout en ce qui concerne le transfert de technologie des laboratoires au terrain (ADEME, 2006). En 1994, le chiffre d'affaires de la dépollution était estimé à 2,3 millions d'euros. En 1996, il existait 36 sociétés de dépollution, dont le chiffre d'affaires s'élevait à 45 millions d'euros. Depuis quelques années la France tend à rattraper ce retard. Par exemple, au niveau du bassin Seine Normandie, entre janvier 2004 et juin 2006, ce sont environ 136 nouveaux systèmes de traitement qui ont été subventionnés par l'Agence de l'Eau Seine-Normandie. Les filtres plantés de roseaux représentent le premier système de traitement financé avec 51 installations suivi du lagunage avec 22 installations. La majorité de ces nouvelles installations ont été réalisées pour des collectivités rurales (avec une capacité épuratoire inférieure ou égale à 500 Equivalents-habitants). Cette technologie a un avenir prometteur dans la remédiation des sites pollués.

2.3 Les différents types de remédiation

Plusieurs mécanismes permettent aux plantes l'élimination des polluants par phytoremédiation (Schnoor, 1997 ; Schröder *et al.*, 2002 ; Susurla *et al.*, 2002 ; Pilon-Smits, 2005 ; Campos *et al.*, 2008):

- La phytoextraction ou phytoaccumulation utilise des plantes qui absorbent et concentrent dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges, racines) les polluants provenant des sols ou des eaux. On utilise se terme souvent dans le cas des métaux lourds et des composés organiques, avec l'utilisation de plantes accumulatrices et/ou hyperaccumulatrices qui sont capables de tolérer et d'accumuler ces polluants.
- La phytostabilisation réduit la mobilité des contaminants. Les plantes adsorbent les polluants du sol, de l'eau ou de l'air, les retenant localement et réduisant leur biodisponibilité. C'est une méthode efficace pour empêcher la dispersion des polluants dans les eaux de surface et/ou souterraines.
- La phytotransformation ou phytodégradation utilise les propriétés de certaines plantes à produire des enzymes qui catalysent la dégradation des substances absorbées ou adsorbées, celles-ci sont alors transformées en substances moins toxiques ou non toxiques par la métabolisation des contaminants dans les tissus des plantes ou par les organismes de la rhizosphère maintenue par la plante (on parle alors de rhizodégradation, de phytostimulation ou encore de bioremédiation).
- La rhizofiltration permet la dépollution et la restauration des eaux de surface et souterraines. Les contaminants sont absorbés ou adsorbés par les racines des plantes en milieu humide. Lors de grande capacité d'absorption par ces dernières on parle de « phytopumping », on utilise le plus souvent des arbres (comme le saule ou le peuplier) pour assécher les terrains et extraire les polluants du sol.

La phytovolatilisation est le processus par lequel les plantes transforment les contaminants du sol ou des eaux polluées en éléments volatiles et les relâchent dans l'atmosphère via leurs feuilles.

2.4 Le potentiel épuratoire des plantes aquatiques

La capacité des plantes à diminuer la turbidité, la pollution par les matières organiques et les éléments nutritifs de 50 à plus de 80 % est maintenant bien reconnue (Ran *et al.*, 2004). Elles ont également une forte capacité de prélèvement des métaux avec des rendements élevés qui ont été décrits dans la littérature scientifique : le plomb (76 %), le nickel (82 %), le fer (79 %), le zinc (98 %), le manganèse (95 %), le chrome (97 %), le mercure et le cuivre (90 %) (Axtell *et al.*, 2003 ; Maury-Brachet *et al.*, 1990 ; Miretzky *et al.*, 2004). Vincent (1997) constate que des étangs filtrants au Québec donnent de meilleurs résultats d'épuration que ceux obtenus dans les stations d'épuration. Cependant, si on connaît de mieux en mieux la capacité des plantes à épurer les eaux contaminées par la matière organique, les éléments nutritifs et les métaux, nos connaissances sont plus limitées sur leur capacité à éliminer les composés organiques même si elles semblent en avoir le potentiel (Larsen *et al.*, 2005 ; Dhir *et al.*, 2009).

Les végétaux aquatiques ont montré leur efficacité dans l'élimination de polluants organiques comme les phénols, les composés organochlorés et organophosphorés, les chlorobenzènes, et même les pesticides (voir article de synthèse : Dhir *et al.*, 2009). Concernant ces derniers, les rendements d'épuration à l'aide de plantes aquatiques sont variables, de 20 à 95 %, selon les propriétés physico-chimiques des molécules et le type de plantes (Rice *et al.*, 1997 ; Gao *et al.*, 2000 ; Mitsou *et al.*, 2006 ; Tront et Saunders, 2006 ; De Carvalho *et al.*, 2007 ; Cai *et al.*, 2007). Les plantes aquatiques paraissent donc avoir un fort potentiel dans le processus de phytoremédiation des pesticides.

Concernant le prélèvement et le transport des pesticides chez les végétaux, peu de travaux ont été réalisés au regard de ceux conduit sur les métaux lourds. Cependant, depuis quelques années ces travaux se multiplient et montrent des résultats prometteurs (Gao *et al.*, 2000 ; Schröder *et al.*, 2002 ; Susurla *et al.*, 2002 ; Campos *et al.*, 2008 ; Reichenauer et Germida, 2008 ; Gerhardt *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci on peut noter ceux obtenus au laboratoire Plantes, Pesticides et Développement Durable (Université Reims Champagne-

Ardenne) lors de mon stage de master recherche (Annexe 2 : Olette *et al.*, 2008) ; ouvrant des perspectives très intéressantes pour la recherche et le développement de cette technique appliquée aux milieux aquatiques contaminés par les pesticides.

Ces polluants organiques prélevés sont transformés en composés moins toxiques voire totalement minéralisés en dioxyde de carbone, nitrate, chlore ou ammonium (Cunningham *et al.*, 1996 ; Meagher, 2000). L'extraction des pesticides par les plantes va dépendre des propriétés physico-chimiques de la molécule active, de son mode d'application, des caractéristiques du milieu, des facteurs climatiques et du type de plante. Il faut, dans l'idéal, des plantes à l'activité photosynthétique intense, hypertolérante, hyperaccumulatrice, avec une translocation et un stockage à taux élevé, une extraction rapide et un système foliaire et racinaire développé (Chaudhry *et al.*, 2002).

Nous évaluerons cette biotechnologie de remédiation des milieux aquatiques sur des produits phytosanitaires sélectionnés.

3. Les produits phytosanitaires étudiés

Quatre produits phytosanitaires ont été utilisés au cours de cette étude : deux fongicides et deux herbicides. Ils ont été choisis, en raison de leurs concentrations importantes au niveau des eaux superficielles françaises et notamment celles de la région Champagne-Ardenne, et pour trois d'entre eux également en raison de leurs utilisations au niveau du vignoble champenois. Ils seront utilisés sous leur forme commerciale.

3.1 Les fongicides

3.1.1 Le diméthomorphe

Le diméthomorphe (Fig. 3.1) est un anti-mildiou et autres maladies du genre *Phytophtora* ou *Plasmopara* ainsi que de la famille des Peronosporacées qui sont responsables de nécroses sur les parties aériennes et souterraines chez de nombreuses plantes comme la vigne, la pomme de terre ou encore la tomate. Dans le vignoble champenois, il est utilisé comme anti-mildiou contre *Plasmopara viticola*, il appartient au groupe chimique des dérivés de l'acide cinnamique. Sa cible au niveau biochimique semble encore controversée (Gisi et Sierotzky, 2008). Toutefois, il entraîne une malformation des parois cellulaires, inhibe la sporulation et le développement du mycelium du champignon phytopathogène (BASF, 2009a).

On l'utilisera sous sa forme commerciale Forum[®] (150 g.L⁻¹ de substance active, BASF, Belgique). Il est utilisé à une dose recommandée de 2 L.ha⁻¹ avec une restriction à 3 applications par an et par parcelle (E-phy.agriculture.gouv.fr, 2009).

Nous rappelons (voir partie 1.3 et 1.4) que ce sont les fréquences d'occurrence et les concentrations élevées dans les bassins de collecte des eaux de ruissellement du vignoble (Hennebert *et al.*, 2009), et celle des eaux superficielles (concentration maximale de 406 μ g.L⁻¹ relevée en 2003-2004, Tableau 1.1) qui ont incité à choisir le diméthomorphe pour notre étude.



Figure 3.1 : Structure chimique de l'isomère E du diméthomorphe ((E, Z)4-[3-(4-chlorophényl)-3-(3,4-diméthoxyphényl)-acryloyl]morpholine).



Figure 3.2 : Structure chimique du pyriméthanil (2-Pyrimidinamine, 4,6-dimethyl-N-phenyl).



Figure 3.3 : Structure chimique de l'isoproturon (N-(Isopropyl-4-phenyl)-N',N'-dimethylurée).



Figure 3.4 : Structure chimique du glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine).

3.1.2 Le pyriméthanil

Le pyriméthanil (Fig. 3.2) est un anti-botrytique appartenant au groupe chimique des anilino-pyrimidines. Il inhibe la biosynthèse de la méthionine ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse des enzymes fongiques responsables de la phytotoxicité de *Botrytis cinerea*, champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise du vignoble (BASF, 2009b).

On l'utilisera sous sa forme commerciale Scala[®] (400 g.L⁻¹ de substance active, BASF, France). Il est utilisé au vignoble à une dose recommandée de 2,5 L.ha⁻¹ avec la recommandation d'une seule application par an et par parcelle (E-phy.agriculture.gouv.fr, 2009).

Sa présence dans les bassins de collecte des eaux de ruissellement du vignoble à des concentrations moyennes de 2 à 51 μ g.L⁻¹, mais constantes (Annexe 1 : Abbassi, 2006 ; Hennebert *et al.*, 2009) a fait que nous avons retenu le pyriméthanil pour cette étude.

3.2 Les herbicides

3.2.1 L'isoproturon

L'isoproturon (Fig. 3.3) est un herbicide systémique de la famille des phénylurées. C'est un inhibiteur de la photosynthèse, il bloque le transport des électrons dans les thylakoïdes, au niveau du photosystème II (Feurtet-Mazel *et al.*, 1996).

On l'utilisera sous sa forme commerciale Matin[®] (500 g.L⁻¹ de substance active, John et Stephen B., France). Il est utilisé au niveau des grandes cultures (céréales), pour éliminer les mauvaises herbes annuelles et les graminées, à une dose recommandée de 2,4 L.ha⁻¹ avec une restriction à une application par an et par parcelle (E-phy.agriculture.gouv.fr, 2009).

On note sa présence sur la liste des 33 substances prioritaires de la directive européenne cadre sur l'eau. Cet herbicide est retrouvé à des concentrations maximales de 32 μ g.L⁻¹ et à des concentrations moyennes de 3,9 μ g.L⁻¹, en 2003-2004 (Tab. 1.1) et reste en 2006 un des pesticides les plus déclassants avec des concentrations maximale et moyennes de 61 μ g.L⁻¹ et 3,6 μ g.L⁻¹ respectivement, au niveau des eaux superficielles (Tab. 3.1).

Tableau 3.1 : Les principales molécules responsables d'un classement en qualité « mauvaise » des points de mesure des cours d'eau en 2006, SEQ-eau qualité globale eaux superficielles (Ifen, 2009a).

Molécules	Nombre de stations concernées	Concentration en μ g.L ⁻¹		
		Minimum	Médiane	Maximum
АМРА	96	2,2	3,3	27,5
Glyphosate	23	2,0	3,6	34,0
Isoproturon	20	2,0	3,6	61,0
Diuron	19	2,0	3,3	17,0
Métolachlore	11	2,1	2,8	63,0
Aminotriazole	9	2,1	2,5	31,1
Chlortoluron	6	2,1	2,4	11,0
Carbofuran	6	2,4	5,7	12,0
Tébuconazole	4	2,1	2,2	3,7
2,4-МСРА	4	2,9	3,2	18,0

3.2.2 Le glyphosate

Le glyphosate (Fig. 3.4) est un herbicide à action foliaire et systémique de la famille des amino-phosphonates. C'est un inhibiteur enzymatique de l'EPSPS (énolpyruvyl shikimate phosphate synthase), enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés aromatiques.

On l'utilisera sous sa forme commerciale Sting Pro $2^{\ensuremath{\mathbb{R}}}$ (400 g.L⁻¹ de substance active, Monsanto Agriculture, France). Il est utilisé, sur de nombreuses cultures, contre les herbes annuelles, bi-annuelles et vivaces à une dose recommandée de 2,7 à 10,8 L.ha⁻¹ selon les usages. Ce produit formulé est interdit à la vente depuis le 7 octobre 2008, mais de nombreuses formulations contenant du glyphosate restent sur le marché (E-phy.agriculture.gouv.fr, 2009).

Cette molécule est présente sur la liste des 33 substances prioritaires de la directive européenne cadre sur l'eau. Sa concentration peut atteindre 165 μ g.L⁻¹ alors que sa concentration moyenne, lorsqu'il a été détecté dans les eaux superficielles au cours des dernières années tourne autour de 3,6 μ g.L⁻¹ (Tab. 1.1 et Tab. 3.1). Son principal métabolite connut l'AMPA, est la molécule la plus souvent détectée avec des concentrations déclassantes allant jusqu'à 48,1 μ g.L⁻¹ (Tab. 1.1), il faut souligner dans le cas de l'AMPA que c'est aussi un métabolite de nombreux autres produits organiques phosphatés. Le glyphosate est également présent au niveau des eaux souterraines avec en 2003-2004 une concentration maximale de 6,8 μ g.L⁻¹ (Tab. 1.2).

Nous étudierons le potentiel « phytoremédiateur » de plantes aquatiques vis-à-vis de ces quatre produits phytosanitaires.

4. Le matériel végétal

Comme nous l'avons évoqué (voir 2.4), les plantes sélectionnées en vue d'une utilisation en phytoremédiation doivent, si possible, présenter un bon compromis des qualités suivantes (Chaudhry *et al.*, 2002) :

- être hypertolérante aux concentrations en polluants
- être hyperaccumulatrice
- avoir un système foliaire et racinaire développé
- avoir une activité photosynthétique intense
- permettre un transport et un stockage à taux élevé
- permettre une extraction rapide
- être dotée de mécanismes internes pour métaboliser des polluants
- être adaptable au climat local
- avoir une certaine résistance aux insectes et aux maladies
- permettre une facilité de gestion

Nous avons retenus pour cette étude cinq plantes aquatiques : *Cabomba aquatica*, *Callitriche palustris, Elodea canadensis, Lemna minor, Spirodela polyrhiza* ; et deux algues : *Scenedesmus obliquus* et *Scenedesmus quadricauda*.



Figure 4.1 : Photographie de *Cabomba aquatica* (Grossissement x 0,25)



Figure 4.2 : Photographie de *Callitriche palustris* (Grossissement x 0,5)

Introduction

4.1 Les plantes aquatiques

4.1.1 Cabomba aquatica

Cabomba aquatica (Fig. 4.1) est une angiosperme aquatique, de l'ordre des Nymphéales et de la famille des Cabombacées.

Cette plante n'est pas présente de façon naturelle en France, elle est originaire du continent américain. Elle se présente sous la forme de tige très délicate, avec des feuilles longues et fines. C'est une plante à croissance rapide, se multipliant par bourgeonnement, sa culture par bouturage est facile. Suite à une première expérience réussie avec cette espèce (Annexe 2 : Olette *et al.*, 2008) nous avons choisi de tester ses capacités épuratrices sur d'autres polluants.

Depuis le début de nos travaux, d'autres études ont été réalisées sur la famille des Cabombacées montrant leur potentiel pour la phytoremédiation de métaux lourds (Anawar *et al.*, 2008 ; Ebrahimpour et Mushrifah, 2008).

4.1.2 Callitriche palustris

Callitriche palustris (Fig.4.2) est une angiosperme aquatique, de l'ordre des Lamiales et de la famille des Plantaginacées.

Cette plante est présente dans presque toute la France dans les mares, fossés et ruisseaux. C'est une bonne plante oxygénante qui a la particularité d'être active en hiver (présente sous la glace lorsque les mares sont gelées). Elle se présente sous la forme d'un coussin permanent immergé avec des feuilles immergées longues et étroites et des feuilles flottantes plus courtes et ovales. C'est une plante à croissance rapide, se multipliant par bourgeonnement, sa culture par bouturage est facile.

Cette plante a été retenue du fait de sa présence locale et de sa particularité d'être encore active l'hiver. Une étude réalisée depuis le début de nos expériences montre son potentiel pour la phytoremédiation de métaux lourds (Hillermannová *et al.*, 2008).



Figure 4.3 : Photographie d'*Elodea canadensis* (Grossissement x 0,3)



Figure 4.4 : Photographie de *Lemna minor* (Grossissement x 1,5)

4.1.3 Elodea canadensis

Elodea canadensis (Fig. 4.3) est une angiosperme aquatique, de l'ordre des Hélobiales et de la famille des Hydrocharitacées.

Présente dans presque toute la France dans les eaux courantes ou stagnantes. C'est une bonne plante oxygénante qui est originaire d'Amérique du Nord (Canada), et qui a été introduite involontairement en Europe au XIX^{ème} siècle. C'est une plante à croissance rapide, se multipliant par bourgeonnement, sa culture par bouturage est facile.

Cette plante est également connue pour ses propriétés de bioconcentration notamment de métaux (Maury-Brachet *et al.*, 1990 ; Kähkönen et Manninen, 1998 ; Chandra et Kulshreshtha, 2004 ; Fritioff et Greger, 2007), mais un peu moins en ce qui concerne l'épuration des pesticides (Rice *et al.*, 1997 ; Gao *et al.*, 2000 ; Olette *et al.*, 2008).

4.1.4 Lemna minor

Lemna minor (Fig.4.4) est une angiosperme aquatique, de l'ordre des Arales et de la famille des Lemnacées.

Les lentilles d'eau sont des plantes aquatiques flottantes de petite taille qui se présentent sous forme de colonies de frondes très vertes de 2 à 6 mm de diamètre. Les colonies sont formées de 2, 3 ou 4 frondes réunies par des pédicelles, chaque fronde porte une fine racine pouvant atteindre 3 cm. Ce végétal colonise très facilement la surface des eaux douces et calmes au niveau des étangs, des chenaux, des mares ... Il est très commun sous les latitudes tempérées et est présent en Champagne-Ardenne. Il se multiplie très rapidement et de manière végétative, les frondes mères donnant naissance à des frondes filles qui arrivées à maturité se détachent des frondes mères pour donner de nouvelles colonies. Cet organisme est souvent utilisé pour les études écotoxicologiques et dans des tests normalisés (AFNOR, 1996; ISO, 2001).



Figure 4.5 : Photographie de Spirodela polyrhiza (Grossissement x 1,1)

La lentille d'eau est bien connue pour ses propriétés de bioconcentration de métaux (Wahaab *et al.*, 1995 ; Anawar *et al.*, 2008 ; Gadgil *et al.*, 2008 ; Hurd et Sternberg, 2008). Par contre, peu d'informations sont disponibles sur sa capacité à stocker les pesticides (Rice *et al.*, 1997 ; Gao *et al.*, 2000 ; Mitsou *et al.*, 2006 ; Tront et Saunders, 2006 ; De Carvalho *et al.*, 2007).

4.1.5 Spirodela polyrhiza

Spirodela polyrhiza (Fig. 4.5) est une angiosperme aquatique, comme *L. minor*, elle appartient à l'ordre des Arales et à la famille des Lemnacées.

Les spirodèles sont des plantes aquatiques flottantes, reconnaissables à leur grande taille (5 à 10 mm), à leur couleur vert foncée dessus, violacée dessous. Chaque lentille (ou fronde) possède 5 à 15 racines. Cette plante est présente dans presque toute la France, elle a une croissance rapide et le même mode de reproduction (multiplication végétative) que *L. minor*.

Elle est connue pour ses propriétés de bioaccumulation de métaux (Chandra et Kulshreshtha, 2004 ; Sharma *et al.*, 2005 ; Mishra et Tripathi, 2008 ; Duman *et al.*, 2009) et autres composés (Waranusantigula *et al.*, 2003 ; Kumar et Chandra, 2004). Mais à notre connaissance, aucune donnée n'est publiée sur son potentiel épurateur d'eau chargée en pesticides.



Figure 4.6 : Photo d'un cénobe constitué de 8 cellules de *Scenedesmus obliquus* en microscopie photonique (Grossissement x 1700).



Figure 4.7 : Photo d'un cénobe constitué de 4 cellules de *Scenedesmus quadricauda* en microscopie photonique (Grossissement x 1000).

4.2 Les algues : genre Scenedesmus

Le genre Scenedesmus appartient à l'ordre des Chlorococcales et à la famille des Scenedesmacées. Ces espèces sont très communes en France en eaux douces mais aussi saumâtres. L'importance de l'aire de répartition de ces microalgues et leur abondance au sein des communautés phytoplanctoniques font qu'elles sont utilisées pour des tests d'inhibition de croissance normalisée (NF EN ISO 8692, 2005).

Ce sont des algues unicellulaires non mobiles, dont les cellules peuvent être associées par 2, 4, 8 voire plus au sein d'un cénobe. Chaque cellule mesure environ 5 à 30 micromètres de longueur et 8 à 10 micromètres de diamètre. Sa reproduction se fait par division cellulaire.

4.2.1 Scenedesmus obliquus

Scenedesmus obliquus (SAG 276-3a, Göttingen, Allemagne; Fig. 4.6) est connu depuis peu pour son potentiel à dépolluer les eaux en nutriments et en métaux lourds (Martínez *et al.*, 1999; Çetinkaya *et al.*, 1999; Voltolina *et al.*, 2005; Pellón *et al.*, 2008; Ruiz-Marin et Mendoza-Espinosa, 2008) mais seules quelques études montrent son potentiel à remédier la pollution par les produits phytosanitaires (Cai *et al.*, 2007).

4.2.2 Scenedesmus quadricauda

Scenedesmus quadricauda (SAG 276-4b, Göttingen, Allemagne ; Fig. 4.7) est moins présente dans la littérature, on la nomme également *Scenedesmus communis* ou *Desmodesmus communis*. Elle a également été présentée comme une algue à fort potentiel dans la dépollution des métaux lourds (Fargašova *et al.*, 1999 ; Awasthi et Rai, 2005) et des pesticides (Guanzon *et al.*, 1996).

Pour optimiser le potentiel épurateur de la plante, il faut, entre autre, que celle-ci soit en bonne « santé » (Baker *et al.*, 2000 ; Sulmon *et al.*, 2007). Ainsi, un suivi de l'état physiologique des plantes sera réalisé via des mesures de toxicité des produits phytosanitaires retenus. Ces mesures nous aideront également à déterminer une concentration qui est, d'un côté, suffisamment élevée pour permettre une détection aisée des pesticides lors des analyses physico-chimiques et, de l'autre côté, acceptable pour la « santé » des plantes. Pour ce faire, nous utiliserons divers biomarqueurs tel que le taux de croissance ou encore la fluorescence chlorophyllienne.

5. La fluorescence chlorophyllienne

La photosynthèse se produit essentiellement dans les feuilles, au niveau des chloroplastes, et le transfert des électrons se fait plus particulièrement au sein des thylakoïdes. Elle fait intervenir deux photosystèmes (PS I et PS II), composés de protéines associées à des pigments chlorophylliens. Au niveau du PS la chlorophylle absorbe l'énergie solaire sous forme de photons et passe de l'état fondamental stable à l'état excité. La chlorophylle peut alors retourner à son état fondamental en émettant des électrons pour se désexciter. Ces électrons vont être impliqués dans les nombreuses réactions d'oxydo-réduction du processus photosynthétique avec pour aboutissement la réduction du CO_2 en glucose.

Cependant, il existe deux autres voies de désexcitation au niveau du PS (Fig. 5.1) :

- l'émission de chaleur (5-15 % de l'énergie lumineuse absorbée)
- la fluorescence (3-5 % de l'énergie lumineuse absorbée) : émission de photons dans le rouge et l'infra-rouge, entre 690 et 730 nm. La majeure partie de cette fluorescence est émise par le PS II.

Ces deux voies sont des pertes nettes pour le rendement photosynthétique (Krause et Weis, 1991 ; Rosenqvist et van Kooten, 2003).

Lorsqu'une plante subit un stress, la réaction photochimique diminue au profit de l'émission de fluorescence et de la production de chaleur (Lichtenthaler et Miehé, 1997). La mesure de l'émission de fluorescence a montré être une technique utilisable *in vivo* sans destruction préalable de la plante, et est décrite comme un des outils les plus sensible pour une détection rapide des composés et des conditions environnementales qui induisent un effet nocif sur la photosynthèse (Bi Fai *et al.*, 2007 ; Juneau *et al.*, 2007).

Nous avons suivi la cinétique lente de fluorescence chlorophyllienne qui permet de suivre, durant plusieurs minutes, la mise en place des différents mécanismes intervenant dans la régulation de l'activité photosynthétique (transport d'électrons, synthèse d'ATP, fixation du CO₂, etc...) d'une plante adaptée à la lumière. Elle permet également de suivre la mise en place de mécanismes permettant une meilleure efficacité de la photosynthèse qui se traduisent par une diminution de l'émission de fluorescence : les quenching photochimiques et non-photochimiques (Rohacek et Bartak, 1999).



Figure 5.1 : Voies de désexcitation des chlorophylles du centre réactionnel du PSII chez une plante placée dans des conditions optimales (haut) ou stressantes (bas).

Introduction

Cette cinétique de fluorescence est mesurée grâce à la technique fluorospectroscopique d'amplitude modulée, PAM (Pulse Amplitude Modulated). Ce type de fluorimètre, grâce à l'application de lumières d'intensité et de qualité différentes, nous permet d'observer les variations du rendement de fluorescence à partir de courbes comme celle présentée sur la figure 5.2. Avant la mesure la plante est adaptée à l'obscurité (20 min). Elle est ensuite exposée à une lumière modulée analytique de faible intensité ce qui permet de mesurer la fluorescence de base (F₀). L'application d'un flash saturant chez une plante adaptée à l'obscurité permet de déterminer le rendement maximal de fluorescence (F_m) lorsque tous les centres réactionnels sont fermés et que Q_A, comme accepteur primaire du PS II, est dans un état réduit. Ce niveau maximal de fluorescence obtenu est utilisé pour évaluer la fluorescence variable (F_v = F_m - F₀) comme indicateur de la capacité de transport d'électron du PS II quand la plante est exposée à la lumière saturante. Le rapport F_v/F_m mesure l'efficience photochimique du PS II, c'est-à-dire sa capacité à convertir sous forme chimique l'energie lumineuse reçue. On nomme ce rapport : capacité photosynthétique maximale ou rendement maximal des réactions photochimiques du PS II.

Puis, la plante est exposée à une illumination continue (lumière actinique) qui déclenche divers processus photosynthétiques. Après avoir atteint son niveau maximal, la fluorescence décroit lentement jusqu'à niveau stable F_s . Cette décroissance appelée « quenching » est la résultante de plusieurs mécanismes qui peuvent être quantifiés grâce à l'application de flash saturant (toutes les 20 sec) et permet de déterminer le rendement de fluorescence F_m '. On regroupe les mécanismes de quenching sous les termes de quenching photochimique (q_P), directement lié au fonctionnement de l'appareil photosynthétique, et quenching non-photochimique (q_N), lié majoritairement à la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. À l'état stationnaire du transport d'électrons, il est possible de déterminer la fluorescence de base (F_0 '), qui est évaluée quand la lumière actinique est éteinte et que la plante est exposée à une illumination infrarouge qui induit une oxydation totale des transporteurs d'électrons du PS II en excitant uniquement les centres réactionnels du PS I (Schreiber *et al.*, 1986 ; Rohacek et Bartak, 1999).



Figure 5.2 : Courbe de cinétique lente de fluorescence chlorophyllienne chez *Lemna minor* (d'après Frankart, 2002).

Introduction

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée permet d'évaluer différents paramètres liés à l'aspect fonctionnel du PS II et à la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée. Nous allons présenter plusieurs paramètres :

la capacité photosynthétique maximale (ou rendement maximal des réactions photochimiques du PS II), représentée par le rapport :

 $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$; pour des plantes adaptées à l'obscurité (Genty *et al.*, 1990)

- les deux types de quenching calculés selon Schreiber et al. (1986) :
 - le quenching photochimique : $q_{\rm P} = (F_{\rm m}' F_{\rm s})/(F_{\rm m}' F_{\rm o}')$
 - le quenching non-photochimique : $q_{\rm N} = 1 ((F_{\rm m}' F_{\rm o}')/(F_{\rm m} F_{\rm o}))$

Suite à la mesure de la sensibilité des plantes aquatiques et de leur efficacité dans la remédiation des produits phytosanitaires sélectionnés, nous nous sommes intéressés au processus de détoxication de ceux-ci dans les plantes présentant le plus fort potentiel phytoremédiateur.



Figure 6.1 : Schéma simplifié de détoxication des xénobiotiques, d'après Coleman *et al.* (1997)

6. Les mécanismes de détoxication

De façon générale, l'absorption du xénobiotique est un pré-requis pour avoir un contact rapproché entre le polluant et les enzymes localisées dans le cytosol des cellules végétales (Schröder et Collins, 2002). Une fois le xénobiotique entré dans le tissu végétal, le contaminant peut-être transformé par une variété de réactions biochimiques. Les plantes abritent diverses fonctions enzymatiques pouvant s'attaquer aux contaminants et les détoxiquer, ce qui est à l'origine du terme « green liver », représentant le métabolisme des xénobiotiques par les plantes (Sandermann, 1994 ; Schäffner *et al.*, 2002). La métabolisation des xénobiotiques chez les plantes se fait le plus souvent par trois étapes consécutives (Fig. 6.1 ; Sandermann, 1992, 1994 ; Coleman *et al.*, 1997) :

- Phase I: étape de conversion/activation (oxydation, réduction et hydrolyse) des composés lipophiles des xénobiotiques (Komives et Gullner, 2005) ; cette transformation est principalement régit par le cytochrome P-450 monooxygénase (P450 ; Pflugmacher *et al.*, 1999).

- Phase II : étape de conjugaison des métabolites des xénobiotiques de la phase I à des molécules endogènes hydrophiles comme les sucres, les acides aminés ou le glutathion (Coleman *et al.*, 1997 ; Dietz et Schnoor, 2001) ; cette conjugaison est principalement due aux glucosyltransférases (GTs) et aux glutathion-S-transférases (GSTs) (Pflugmacher *et al.*, 1999 ; Loutre *et al.*, 2003).

- Phase III : étape de compartimentation dans la vacuole ou de fixation aux composants de la paroi cellulaire, comme la lignine ou l'hémicellulose, des xénobiotiques modifiés (Coleman *et al.*, 1997 ; Dietz et Schnoor, 2001 ; Eapen *et al.*, 2007).

Jusqu'à présent peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes mis en jeu dans la détoxication des herbicides chez les plantes aquatiques (Field et Thurman, 1996 ; Schröder *et al.*, 2005) et à notre connaissance il n'y a pas de données pour comprendre les mécanismes de détoxication des fongicides. Dans ce travail on s'est intéressé aux deux premières phases de détoxication des pesticides avec le suivi de l'induction des P450, GTs et GSTs.



Figure 6.2 : Hydroxylation d'un substrat par le Cytochrome P450 monooxygénase

6.1 Le cytochrome P450

Les cytochromes P450 (P450, E.C. 1.14.-) représentent une superfamille d'hémoprotéines distribuée chez quasiment tous les organismes vivants. La découverte de ce type de protéine est attribuée à Klingenberg qui, à la fin des années 50, mit en évidence l'existence, dans une fraction microsomale de foie, d'un pigment présentant une forte absorbance à 450 nm en présence d'un agent réducteur et de monoxyde de carbone (Klingenberg, 1958). Cette propriété spectrale est à l'origine de leur appellation actuelle de P450, P signifiant Pigment et 450 correspondant au maximum d'absorption.

Les P450 microsomaux sont membranaires, ils font partie des membranes du réticulum endoplasmique. Leur rôle principal est la détoxication des xénobiotiques et le catabolisme de certains composés endogènes. Le P450 monooxygénase est la dernière étape d'une courte chaîne de transfert d'électrons qui catalyse principalement l'addition d'un atome d'oxygène sur un substrat. Cette réaction de monooxygénation est réalisée à partir du dioxygène et nécessite un pouvoir réducteur fournit le plus souvent par du NADPH ou du NADH. La chaîne de transfert d'électrons est représentée figure 6.2. Deux électrons sont délivrés simultanément du NADPH à la réductase. La réductase qui contient 2 flavines (FAD et FMN), transfère ensuite les électrons un par un au P450.

Au vu de la grande variété des composés organiques métabolisés et des différentes réactions réalisées pour un même substrat, il existe plusieurs P450 responsables de la détoxication dans chaque plante (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Dans notre étude nous n'avons pas considéré ces différentes isoformes, mais nous nous sommes focalisés sur l'activité globale des P450 microsomaux, via la mesure de la consommation d'oxygène.



Figure 6.3 : Les différents types de conjugaison du glucose dans les plantes, d'après Schröder et Collins (2002)

6.2 La glucosyltransférase

Les glycosyltransférases permettent la glucosylation des produits naturels des plantes dans la phase finale de leur biosynthèse. C'est une réaction communément rencontrée dans le métabolisme secondaire des plantes, contrôlant la toxicité et le stockage vacuolaire des métabolites bioactifs (Vogt et Jones, 2000).

Les plantes ont la surprenante capacité de glucosyler les xénobiotiques, qui proviennent du prélèvement ou du métabolisme des polluants organiques (Cole et Edwards, 2000). Récemment de nombreux progrès ont été réalisés en caractérisant la super famille de type 1 : les glucosyltransférases (GTs, E.C. 2.4.1.-) comme responsables de ces conjugaisons (Fig. 6.3).

La conjugaison des xénobiotiques dans les plantes comprend l'O-glucosylation des composés contenant une fonction hydroxyle, réaction catalysée par les O-GTs, et une N-glucosylation des groupes amines, régit par les N-GTs. On obtient les réactions suivantes :

- \blacktriangleright ROH + UDPG \longrightarrow RO-G + UDP
- \rightarrow RNH₂ + UDPG $\xrightarrow{\text{N-GTs}}$ RNH-G + UDP

La O-glucosylation des xénobiotiques, notamment des phénols chlorés, et l'activité associée des O-GT a été étudié en détail, notamment chez le soja et le blé (Sandermann *et al.*, 1991 ; Brazier *et al.*, 2002). Parmi les substrats connu pour cette enzyme on a retenu le 2,4,5-trichlorophénol (TCP) et la quercetine (Brazier *et al.*, 2002). Concernant l'activité des N-GT, le substrat le mieux caractérisé pour cette enzyme est le 3,4-dichloroaniline (DCA ; Cole et Edwards, 2000). Comme l'activité des O-GTs envers les phénols chlorés, l'activité des N-GTs envers le DCA est retrouvé chez de nombreuses espèces de plantes (Pflugmacher et Sandermann, 1998) et a été partiellement caractérisé chez le blé et le soja (Sandermann *et al.*, 1991 ; Schmidt *et al.*, 1995).

6.3 La glutathion S-transférase

La glutathion S-transférase (GST, EC 2.5.1.18) est une enzyme de phase II, qui joue un rôle important à la fois dans la protection anti-oxydative et dans le métabolisme des xénobiotiques. Elle catalyse la conjugaison du glutathion endogène (GSH) avec un grand nombre de structures variées, cette conjugaison induit le plus souvent une détoxication de composés cyto- et génotoxiques (Marrs, 1996). On obtient la réaction la suivante :

$$\blacktriangleright R-X + GSH \longrightarrow R-SG + H-X$$

Il s'agira ici de savoir si la GST a plutôt un rôle dans le mécanisme de détoxication des pesticides ou si elle intervient seulement comme enzyme de protection contre le stress oxydant. Pour cela nous comparerons les réponses obtenues par d'autres enzymes du stress anti-oxydatif comme l'ascorbate péroxidase (E.C. 1.11.1.11).

OBJECTIFS DU DOCTORAT

Notre travail s'inscrit dans le cadre du contrat d'objectifs AQUAL (Contrat de Projets État-Région 2007-2013) qui lutte contre les pollutions diffuses en milieu rural sur le bassin versant de la Vesle. Pour réduire cette pollution, dans un premier temps, des bassins de collecte des eaux de ruissellement du vignoble avaient été créés. Ces derniers permettent une décantation des matières organiques, des métaux lourds et des produits phytosanitaires de ces eaux avant leurs relargages au niveau des cours d'eau dont la Vesle. Mais ce dispositif s'avère insuffisant, l'eau restant encore fortement chargée en pesticides. C'est pourquoi au sein du programme AQUAL, le projet Phytorem a été lancé pour trouver des solutions afin de diminuer cette pollution via l'utilisation de plantes, technique appelée « phytoremédiation ». Cette technique a déjà montré des résultats probants pour la dépollution des sols chargés en métaux lourds. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur la dépollution des eaux, et en particulier sur celles chargées en pesticides. L'idée de mener des travaux sur l'utilisation de plantes aquatiques pour réduire cette pollution a été renforcée par les bons résultats obtenus lors de travaux préliminaires (Olette *et al.*, 2008 - **Publication I**, Annexe 2).

Dans cette étude, les capacités épuratoires de différentes plantes aquatiques ; cinq macrophytes : *Cabomba aquatica, Callitriche palustris, Elodea canadensis, Lemna minor, Spirodela polyrhiza* et deux algues : *Scenedesmus obliquus* et *Scenedesmus quadricauda* sont étudiées. Nous avons retenu quatre pesticides fortement présents dans les eaux superficielles de la région ; deux fongicides : le diméthomorphe et le pyriméthanil, et deux herbicides : l'isoproturon et le glyphosate ; étudiés sous leur forme commerciale (Forum[®], Scala[®], Matin[®] et Sting Pro 2[®], respectivement). Une expérience préliminaire de toxicité de ces produits sur les plantes est réalisée pour définir une concentration permettant une bonne détection de la molécule active sans affecter de manière trop importante la santé des plantes. Pour cela, la croissance et des paramètres de fluorescence chlorophyllienne ont été suivis. Cette concentration sera retenue pour les expériences de remédiation. On pourra également observer l'existence possible d'une relation entre la sensibilité des plantes et leur pouvoir épurateur.

Les résultats sont présentés sous forme de publications dont certaines sont déjà parues et d'autres soumises ou en préparation (soumission imminente).

26

PARTIE 1 : Toxicité et remédiation

Dans un premier temps, les capacités de remédiation des plantes aquatiques envers les quatre pesticides ont été étudiées (**PARTIE 1**). Les résultats des tests de toxicité sont présentés ici, dans le but de retenir une concentration assez élevée pour détecter les pesticides lors des analyses physico-chimique, tout en étant acceptable pour la « santé » des plantes. Une plante ne doit pas être affectée de façon trop importante par le polluant pour avoir une bonne efficacité de remédiation (Baker *et al.*, 2000 ; Sulmon *et al.*, 2007). Un seuil arbitraire de 30 % d'inhibition des paramètres mesurés a été choisi. Suite à cette concentration retenue, des expériences de remédiation ont été conduites.

Publication II : Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Philippe Eullaffroy Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate.

Nous avons testés différentes concentrations de diméthomorphe et de pyriméthanil (0-800 μ g.L⁻¹) sur l'inhibition de quelques paramètres de fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m, q_P et q_N) chez les cinq macrophytes retenues. Une concentration de 600 μ g.L⁻¹ de diméthomorphe et de pyriméthanil a été choisie pour les expériences de phytoremédiation, concentration à laquelle l'inhibition des différents paramètres restait inférieure à 30 %.

L'objectif de ce travail était d'évaluer les capacités de prélèvement des fongicides par les macrophytes en mesurant la concentration en fongicides restant dans le milieu. Pour cette expérience, différents témoins ont été choisis. Tout d'abord un témoin sans plante pour évaluer la disparition « naturelle » des fongicides dans le milieu. Également un témoin avec des plantes mortes par congélation pour essayer d'évaluer l'adsorption du pesticide sur les plantes. Une expérience à l'obscurité a été réalisée dans le but d'évaluer le côté passif ou actif du prélèvement des fongicides. Et enfin, une expérience avec les molécules pures a été conduite pour estimer l'effet des adjuvants sur la remédiation des pesticides. Ces expériences nous ont permis d'émettre des hypothèses concernant le mécanisme de prélèvement et de détoxication par les plantes, ainsi que de trouver, pour 4 des 5 plantes, une corrélation entre la sensibilité au polluant et la capacité à le remédier.
Publication III :Rachel Dosnon-Olette, Patricia Trotel-Aziz, Michel Couderchet,
Philippe Eullaffroy
Pesticides removal in algal cell suspensions.

Nous avons testé différentes concentrations de diméthomorphe, de pyriméthanil (0-800 μ g.L⁻¹) et d'isoproturon (0-20 μ g.L⁻¹) sur l'inhibition de la croissance et de paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m , q_P et q_N). Des concentrations de 600 μ g.L⁻¹ de diméthomorphe et de pyriméthanil et de 10 μ g.L⁻¹ d'isoproturon ont été choisies pour les expériences de phytoremédiation, concentrations auxquelles l'inhibition des différents paramètres restait inférieure à 30 %.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le prélèvement des fongicides et des herbicides par les algues par la mesure de la concentration en fongicides restant dans le milieu, mais également par la mesure de la concentration dans les algues. Comme dans la publication II, un témoin sans algues et un témoin avec des algues mortes par congélation ont été testés. Ces expériences nous ont également permis d'émettre des hypothèses concernant le mécanisme de prélèvement et de détoxication par les algues.

Publication IV :Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Mehmet A. Oturan, Nihal
Oturan, Philippe Eullaffroy
Potential use of Lemna minor for the phytoremediation of
isoproturon and glyphosate.

En raison de la difficulté du dosage du glyphosate, effectué au Laboratoire Géomatériaux et Géologie de l'Ingénieur, de l'Université Paris-Est ; et de la faible remédiation de l'isoproturon par les algues, cette étude sera réalisée sur *Lemna minor* (plante la plus performante de la publication II). Nous avons testé différentes concentrations d'isoproturon (0-20 μ g.L⁻¹) et de glyphosate (0-120 μ g.L⁻¹) sur l'inhibition de la croissance et de paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m, *q*_P et *q*_N). Par souci d'homogénéité avec la publication III, une concentration de 10 μ g.L⁻¹ d'isoproturon a été retenue. Pour le glyphosate, suite à l'étude de toxicité sur les 7 plantes, 80 μ g.L⁻¹ a été choisie pour les expériences de phytoremédiation, concentrations auxquelles l'inhibition des différents paramètres restait inférieure à 30 %.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'élimination des herbicides par la lentille d'eau en mesurant la concentration en herbicides restant dans le milieu. Dans cette étude, le témoin sans plante nous permettra de constater une forte baisse de la concentration en isoproturon au cours de l'expérience, et donc d'évaluer à sa juste mesure la baisse de concentration due à la présence de *Lemna minor*.

PARTIE 2 : Effet de différents paramètres sur la remédiation du diméthomorphe

Dans un second temps, des facteurs biotiques pouvant influencer les capacités de remédiation ont été étudiés (**PARTIE 2**). Suite aux questions soulevées par les publications I, II, III et IV, l'influence de la densité des plantes et de la concentration en polluant ont été étudiées. Pour cela, on a limité notre étude à un pesticide : le diméthomorphe, celui éliminé/prélevé en plus grande quantité par les plantes, et aux plantes les plus performantes : les deux Lemnacées.

Publication V :Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Achouak El Arfaoui,
Stéphanie Sayen, Philippe Eullaffroy
Influence of initial concentration and population density on
dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species.

L'effet des variations de la densité de population des plantes (0.05, 0.10, 0.15 et 0.20 g.Erlenmeyer⁻¹) et des concentrations initiales (0, 25, 50, 75, 150, 300 et 600 μ g.L⁻¹) en diméthomorphe, sur les capacités d'épuration des lentilles, a été étudié dans le but de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le prélèvement des polluants, mais également dans un souci d'optimisation des conditions d'application sur le terrain. Cette étude a été réalisée sur les deux Lemnacées : *Lemna minor* et *Spirodela polyrhiza*, car ce sont des plantes à forte croissance et avec un fort potentiel pour la phytoremédiation du diméthomorphe. Un suivi de l'inhibition de la croissance et de paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m , q_P et q_N) ; ainsi que de la concentration en diméthomorphe dans le milieu a été réalisé. Des relations ont pu être établies entre la sensibilité des plantes au diméthomorphe et leur densité initiale, et également entre la concentration disparue dans le milieu et la concentration

initiale en diméthomorphe. Des hypothèses seront également émises sur la métabolisation du diméthomorphe par les plantes.

PARTIE 3 : Compréhension des mécanismes de détoxication du diméthomorphe

Enfin, dans une troisième partie, on s'est intéressé aux mécanismes de détoxication des pesticides dans les plantes (**PARTIE 3**). En effet, suite aux études précédentes, la question d'un mécanisme de détoxication du diméthomorphe a été évoquée. Il s'agit donc dans cette partie de mesurer les enzymes potentiellement mises en jeu lors de la présence du diméthomorphe.

Publication VI :Rachel Dosnon-Olette, Peter Schröder, Bernadett Bartha, Aziz Aziz,
Michel Couderchet, Philippe Eullaffroy.Enzymatic basis for fungicide removal by Elodea canadensis.

Ce travail a été réalisé grâce au réseau développé lors des congrès du COST 859. Le COST a financé une mission scientifique de 6 semaines dans le laboratoire de Peter Schröder (Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen, Helmholtz-Zentrum München, Neuherberg, Allemagne). Dans ce laboratoire, j'ai pu réaliser les mesures de quelques enzymes intervenant dans les processus de détoxication et du stress oxydatif. La durée de la mission n'ayant pas permis d'arriver au bout de toutes les expériences et mesures, celles-ci ont été poursuivies au laboratoire, à Reims.

Dans cette étude, trois enzymes de détoxication ont été suivies, une participant à la phase I conversion/activation : le cytochrome P450 (P450) ; et deux participant à la phase II de conjugaison : la glucosyltransférase (GT) et la glutathion S-transférase (GST). La GST intervenant également en réponse au stress oxydatif, d'autres enzymes du stress oxydatif ont été suivies. Dans cet article, l'activité de l'ascorbate peroxidase sera présentée pour comparaison avec celle de la GST. Ce travail nous a permis de déterminer les enzymes intervenant ou non dans le processus de métabolisation du diméthomorphe chez *Elodea canadensis*, plante présentant une forte biomasse et un bon pouvoir épurateur.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Toxicité et remédiation

Publication II

Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate.

Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Philippe Eullaffroy

Acceptée par Ecotoxicology and Environmental Safety

Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (2009) 2096-2101



Ecotoxicology and Environmental Safety

Contents lists available at ScienceDirect

E Fotolology E financental Status

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate

Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Philippe Eullaffroy*

Laboratoire Plantes, Pesticides et Développement Durable (PPDD), URVVC-SE EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 11 March 2009 Received in revised form 2 July 2009 Accepted 17 August 2009 Available online 3 September 2009

Keywords: Pesticide Chlorophyll fluorescence Removal Phytoremediation Runoff water Toxicity

ABSTRACT

The rate of removal of two fungicides (dimethomorph and pyrimethanil) from water by five macrophyte species (*L. minor, S. polyrhiza, C. aquatica, C. palustris* and *E. canadensis*) was assessed in laboratory tests. In order to assure that these studies were performed with healthy plants the effects of the fungicides on chlorophyll fluorescence were studied as well. At exposure concentrations of $600 \,\mu g \, L^{-1}$ the effects of the fungicides on chlorophyll fluorescence were minor, so that this initial concentration level was selected for the fungicide removal rate tests. The removal yields during the 4-d test periods varied from 10% to 18% and 7% to 12% for dimethomorph and pyrimethanil, respectively. The maximum removal rate during the 4-d test period was $48 \,\mu g \, g^{-1}$ fresh weight (FW) for dimethomorph and $33 \,\mu g g^{-1}$ FW for pyrimethanil. *L. minor* and *S. polyrhiza* showed the highest removal efficiency for the two fungicides.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Extensive agricultural use of pesticides can lead to significant risk to non-target organisms within adjacent aquatic and terrestrial ecosystems. The contamination of water bodies can directly or indirectly affect human health and ecosystem integrity by inducing a significant threat to aquatic environments and drinking water resources (Dabrowski and Schulz, 2003). The cleanup of water contaminated by pesticides is expensive and energy consuming (Salvato et al., 2003). In the past 10 years, phytoremediation (the use of plants for cleaning up of xenobiotic compounds) has gained popularity as a costeffective, environmentally friendly and efficient in situ technology for a variety of pollutants (Pilon-Smits, 2005; Eapen et al., 2007) and among them, many pesticides (Schröder and Collins, 2002).

Aquatic plants have great potential to function as on-site biosinks and biofilters of aquatic pollutants because of their

quenching; Q_{N_1} non-photochemical quenching * Corresponding author. Fax: +33326913284 abundance and limited mobility (Gao et al., 2000). They have been successfully used to uptake and sequester selected heavy metals and nutrients through their root systems and plant bodies (Bragato et al., 2006). Regarding pesticide remediation, Gao et al. (2000) emphasized that organophosphorus pesticides could be taken up by aquatic plants and subsequently transformed. Investigations contrasting unvegetated systems and those with plant communities (Milam et al., 2004) have illustrated the importance of macrophytes in pesticide mitigation (Bouldin et al., 2006).

Several experiments conducted with *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza* and *Elodea canadensis* (Wahaab et al., 1995; Miretzky et al., 2004; Kähkönen and Manninen, 1998) showed their accumulation capacities and their efficiency in the phytoremediation of water contaminated with heavy metals and nutrients, but only few data are available on the effectiveness of those aquatic plants for the phytoremediation of pesticides (Gao et al., 2008).

In the present work, we report on the toxicity and remediation of two agrochemicals, dimethomorph and pyrimethanil, commonly used in agricultural and viticultural activities as fungicides against mildew and gray mould agents and frequently detected in runoff water, especially in the Champagne area (Hennebert et al., 2005). Here, toxicity investigations were conducted using in vivo chlorophyll *a* fluorescence as one of the most sensitive tool for the rapid detection of compounds and environmental conditions that exhibit harmful effects on photosynthesis (Bi Fai et al., 2007; Juneau et al., 2007).

Abbreviations: a.i., active ingredient; $F_{\rm rm}$, maximal fluorescence yield induced by a saturating light pulse in dark-adapted plant; $P_{\rm rm}$, maximum fluorescence yield induced by a saturating lash in light-adapted plant; $F_{\rm o}$, minimal fluorescence; $P_{\rm o}$, minimal fluorescence in presence of far-red light; $F_{\rm s}$, steady-state fluorescence yield; $F_{\rm v}/F_{\rm rm}$, maximum quantum yield of PSII; PSII, photosystem II; FV, fresh weight; IC50, concentration leading to 50% inhibition; $Q_{\rm P}$ photochemical

E-mail address: philippe.eullaffroy@univ-reims.fr (P. Eullaffroy).

^{0147-6513/\$ -} see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.08.010

R. Dosnon-Olette et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (2009) 2096-2101

2. Materials and methods

2.1. Plant material

L. minor and Calitriche palustris were collected from ponds in the Champagne area (France). E. canadensis and Cabomba aguatica were supplied from a specialized provider (Animalis, Cormontreuil, France) and S. polyrhiza (clone SJ) was provided by Prof. Dr. Klaus Appenroth (University of Jena, Germany).

profile (kining terms to the second second

In the fungicide removal rate experiments, 0.5 g of fresh weight (FW) for *C. palustris, E. canadensis* and *C. aquatica* and 0.03 g for *L. minor* (i.e. 20 fronds) and 0.13 g *S. polyrhiza* (i.e. 12 fronds) were placed in 100 mL of growth medium in 250-mL Erlenmeyer flasks stoppered with cotton wool to avoid evaporation. All experiments were carried out under the same conditions as those described above.

2.2. IJ fects on chlorophyll fluorescence

The effects of pesticides on plants were determined by measuring their chlorophyll fluorescence emission. For this purpose, a pulse amplitude-modulated spectrofluorometer (PAM-Walz[®], Effeltrich, Germany) was used. Before measurements, plants were placed in the dark for 15 min at 23 ± 2 °C. The maximum photosynthetic capacity (also called maximum quantum yield of photosystem II primary photochemistry) was estimated by the ratio $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ for dark-adapted leaves (Genty et al., 1990). The photochemical ($q_e = (F_m - F_o)/(F_m - F_o)$)) and non-photochemical ($q_N = 1 - ((F_m - F_o)/(F_m - F_o)))$ quenching were determined as in Schreiber et al. (1986). Chlorophyll fluorescence kinetics was recorded every 24 h, during 4 days of exposure of the aquatic plants to 0, 200, 400, 600 and 800 µg(t^{-1} of dimethomorph and pyrimethanil.

2.3. Experimental design and pesticide contamination procedure

We used formulated pesticides: dimethomorph ((E,Z)4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]morpholine) as $Forum^{\otimes}$ (BASF Agro, France, 150 gL^{-1} of active ingredient, a.i.) and pyrimethanil (N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)aniline) as $Scala^{\otimes}$ (BASF Agro, France, 400 gL^{-1} of a.i.)

The actual amount of a.i. in the source products, Forum and Scala, was analysed. We found that this amount was 16% lower $(333 \, gL^{-1})$ and 10% higher $(165 \, gL^{-1})$ than the nominal concentrations. The amount of formulated product required to achieve our nominal test concentrations was calculated on the basis of those analyses. Moreover, pesticide concentrations given in this study refer to the actual, and not to the nominal concentrations of the a.i. All stock solutions were prepared immediately before experiments.

All experiments were performed in triplicate. Three different controls were carried out in parallel: (1) plants in a pesticide free medium; (2) dead-frozen plants in a medium containing pesticides and (3) medium containing pesticides but free of plants. In control # 2, the quantity of dead-frozen plants was adjusted to simulate the increase of biomass observed in experiments using viable plant.

For each experiment, the aqueous culture media were sampled (2 mL) in triplicate for analytical chemistry immediately after spiking each exposure container (time point 0 h) and every 24h (time point 24, 48, 72 and 96 h). No pesticide was detected in control # 1.

All the phytoremediation experiments were carried out at the highest pesticide concentration inducing no more than 30% (arbitrary limit) inhibition or stimulation in the photosynthetic parameters ($F_v/F_{\rm rm}, q_v$ and q_N) tested.

2.4. Determination cf pesticide concentration in cultures

Pesticide concentration in cultures was determined in supernatants after centrifugation of 2 mL aliquots at 3000g for 10 min at 4°C. Acetonitrile (ACN, 200 μ L) was added to the supernatants (González-Barreiro et al., 2006). The samples were stored at -20°C before HPLC analysis. The removal of fungicides expressed in μ g per liter was calculated as the difference between concentration of fungicide in the control without plant (# 3) and the concentration in the medium with plants.

The removal capacity of plants was expressed as μg or as μg per gram FW (i.e. removal rate) or as percent fungicide taken up vs. total amount available in the medium at the beginning of the experiment (i.e. removal yield) per 4-day test period. All results were referred to the actual, and not to the nominal concentrations of a.i. (i.e. concentrations supplied by the producer).

2.5. HPLC analysis

A 20 μL aliquot of medium sample was injected into a Varian ProStar 410 HPLC system and analyzed using a C18 reversed phase column (100 mm \times 3 mm LD., 5 μm particle size, Kromasil 100, Varian, Les Ulis, France) and eluted isocratically with acetonitrile (60%) and water (40%) acidified with H_3PO4 (0.1%). Peaks were detected with a diode array detector (Varian, Prostar). Identification of the fungicide was confirmed by UV spectrum and concentration determined by comparison with a standard curve obtained with dimethomorph and pyrimethanil certified standards (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). The UV detection was made at 246 nm for dimethomorph and at 261 nm for pyrimethanil.

2.6. Statistical analysis

In this study, all statistical analyses were performed with SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Significant differences between controls and contaminated samples were determined by the One Way ANOVA test and *P* values <0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Ejfects on chlorophyll fluorescence

3.1.1. Maximal quantum yield of photosynthesis (F_v/F_m)

The effect of dimethomorph and pyrimethanil on plant photosynthesis is reflected in the F_{v}/F_{m} ratio inhibition (Fig. 1). After 96 h of exposure to dimethomorph, the inhibition of F_{v}/F_{m} was never higher than 2% at the lowest ($200 \,\mu g \, L^{-1}$) concentration tested but reached 11.5% at the highest ($800 \,\mu g \, L^{-1}$) concentration tested, for all five species of macrophytes (Fig. 1A). *L. minor* was the only plant not showing significant dimethomorph toxicity. *C. palustris* and *E. canadensis* were the most affected plants with an inhibition significantly different from the other plants (Fig. 1A).

In presence of $200 \,\mu g \, L^{-1}$ of pyrimethanil only *C. palustris* and *E. canadensis* were significantly affected. The maximum inhibition was observed after 96 h, at $800 \,\mu g \, L^{-1}$ (i.e. 10%; Fig. 1B). At $800 \,\mu g \, L^{-1}$, all plant species experienced significant reduction in photosynthetic activity with a maximum inhibition of 8% and 10% observed after 96 h in *E. canadensis* and *C. palustris*, respectively (Fig. 1B).

3.1.2. Photochemical quenching (q_p)

Fig. 2 presents the effect of dimethomorph and pyrimethanil on q_v After 96 h of exposure to dimethomorph no effect was detected in *L. minor*, *C. aquatica* and *C. palustris* exposed to 200 µg L⁻¹ (Fig. 2A). For the other two plants, q_v was reduced from 6% to 13%. At the highest concentration tested ($800 \mu g L^{-1}$) inhibition of q_p ranged from 8.5% to 24% (Fig. 2A). *C. palustris* and *E. canademsis* were the most affected plants.

A 4-day exposure to pyrimethanil induced an inhibition of q_p from 1% to 12% at 200 µg L⁻¹ and from 7% to 22% at 800 µg L⁻¹ (Fig. 2B). At this concentration C *palustris* and *E. canadensis* were again the most affected plants (inhibition higher than 14%).

3.1.3. Non-photochemical quenching (q_N)

The effect of dimethomorph and pyrimethanil on the non-photochemical quenching activity of plants is reflected in a q_N stimulation (Fig. 2C and D). After 96 h of exposure to dimethomorph, q_N was stimulated up to 15% and 39% at 200 and 800 μ g L⁻¹, respectively. C. *palustris* and *E. canadensis* were the most affected plants (Fig. 2C).

Maximum stimulation of q_N by pyrimethanil was 19% and 37.5% at 200 μ gL⁻¹ and 800 μ gL⁻¹, respectively. *L. minor* and *C. aquatica* were the less affected plants (Fig. 2D).

3.1.4. Choice cf pesticide concentration for the

remediation experiment

To be suitable for phytoremediation, a plant should maintain a good health status (tolerance) when exposed to contaminated water,



Fig. 1. Inhibition (%) of maximal photosynthetic capacity $(F_v/F_{\rm m})$ in *L. minor*, *S. polyrhiza*, *C. aquatica*, *C. palustris* and *E. canadensis* exposed to (A) dimethomorph and (B) pyrimethanil at 200, 400, 600 and 800 µg L⁻¹ during 4 days. Columns headed by the same letters are not significantly different from each other (*P*=0.05), the letter *a* indicates that the mean value is not statistically different from the control.

to maximize efficiency of the purification process (Baker et al., 2000; Sulmon et al., 2007). Therefore, we have arbitrarily chosen to conduct all phytoremediation experiments at the highest pesticide concentration inducing no more than 30% change in all chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_{rm} , q_v and q_N). Since at 800 µg L⁻¹ dimethomorph and pyrimethanil *C* palustris and *E* canadensis showed a stimulation of q_N higher than 30%, 600 µg L⁻¹ was the concentration chosen for the subsequent phytoremediation studies (Table 1)

3.1.5. Removal cf fungicides

Fig. 3 shows the quantity of fungicides removed by the aquatic plants after 96 h of exposure. The removal quantity was calculated as the difference between concentration of fungicide in biomass-free flask (control) and flask containing plants. In all cases, removal of fungicides by frozen plants (i.e. dead plants), was never significantly different from the control without plant (Fig. 3A and B).

After 1 day a significant dimethomorph removal was observed for all plants, and after 4 days all plants but *C. aquatica* had removed $8-10 \,\mu g$ of dimethomorph (Fig. 3A). The five plants tested showed a time-dependent fungicide removal.

 $4-7 \,\mu\text{g}$ of pyrimethanil were removed after 96 h while after 24 h no significant uptake was observed. Only *L. minor* showed a significant pyrimethanil removal after 48 h compared to the control (*P*<0.05). As observed for dimethomorph removal of pyrimethanil was time-dependent.

Except for *C* aquatica, the dimethomorph removal capacity of plants was significantly higher than for pyrimethanil (Table 1). Indeed dimethomorph removal yield was between 15% and 18%, except for *C*. aquatica (10%), compared to 7% and 12% for pyrimethanil. Similarly, removal rate was between 9–48 and $3-33 \,\mu g \, g^{-1}$ of FW for dimethomorph and pyrimethanil, respectively, after 96 h (Table 1). The most efficient plants in the removal of these two fungicides were *L. minor* and *S. polyrhiza*.

4. Discussion

4.1. Toxicity

In our study, as observed in many other studies testing toxicity using chlorophyll fluorescence, $F_{\rm V}/F_{\rm m}$ and $q_{\rm e}$ decreased with



Fig. 2. Inhibition (%) of photochemical quenching (q_P) (A and B) and stimulation (%) of non-photochemical quenching (q_N) (C and D) in *L. minor, S. polyrhiza, C. aquatica, C. palustris* and *E. canadensis* exposed to (A and C) dimethomorph and (B and D) pyrimethanil at 200, 400, 600 and 800 µg L⁻¹ during 4 days. Columns headed by the same letters are not significantly different from each other (P < 0.05), the letter *a* indicates that the mean value is not statistically different from the control.

2098

R. Dosnon-Olette et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (2009) 2096-2101

Table

imethomorph and pyrimethanil removal	yield (%) and removal rate (μ g/g FW)	of plant species after 96 h of incubation.

I	ninov. C. nol	minima C accestion	C maluetain	E samadoneia Eestan alante
	aalua 3, Dun	Ullizd U. duudulu	L. Dajusu is	E. LUMUUUMSIS FIUZUM DIAMUS
***************************************	***************************************	***************************************		***************************************
Removal (%)				
THE THE PERI [70]				
The second se		10 1	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	1
Inmelnomorph	+::::::::::::::::::::::::::::::::::		15.+1	16 + 1
		···········		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
Durimothanil 17.4	т.1	-	S 1 1	······································
I VIIIICLIMIII	「「「」、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
Kemoval (Hø/ø Evv)				
1011000000 (18/8)				
Dimathamank	P. O	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
DINECIONUUDA 40 +	TZ ZITI	······································	1号十二	10 + 1
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
n	1. Martin Contractor Contractor Contractor Contractor			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
PVFIMPFDARII 55+	+			······································
	÷		·····	······································

Values given for frozen plants are the mean value for all species.



Fig. 3. Quantity of (A) dimethomorph and (B) pyrimethanil removed (in μ g) by aquatic plants: frozen plants, *L* minor, *S* polyrhiza, *C* aquatica, *C* palustris and *E*. canadensis during a 4-day experiment. Columns headed by the same letter are not significantly different from each other (*P*<0.05), the letter *a* indicates that the mean value is not statistically different from the control. Initial quantity of fungicide in the medium was 60 µg. Values given for frozen plants are the mean value for all species.

contaminant concentration; while q_N increased (Demming and Winter, 1988; Frankart et al., 2002; Olette et al., 2008).

The F_v/F_m inhibition indicates that the PSII functioning was slightly affected by fungicides (% of inhibition never higher than 12%). Photochemical quenching inhibition was higher (up to 25%), showing that the redox state of the quinones was affected; while the increase of q_N (up to 30%) may represent a disruption in the electron transport necessary for energy dissipation by non-photochemical processes (transthylakoid pH gradient formation, antenna movements, photoinhibition) (Horton and Hague, 1988; Ruban and Horton, 1995; Müller et al., 2001). A q_N stimulation in

aquatic plants exposed to pollutants was reported earlier (Juneau et al., 2002; Frankart et al., 2003).

As far as fluorescence parameters are concerned, dimethomorph and pyrimethanil can be considered as pesticides of low toxicity owing to the high concentrations tested. Our results are in agreement with previous data showing the minor impact of fungicides on the photosynthetic activity of aquatic plants (Dewez et al., 2005; Olette et al., 2008). Moreover, we confirmed the high IC50 found for these two fungicides in different studies (i.e. 29 mg L^{-1} for dimethomorph on *Scenedesmus* sp. after 96 h (Agritox, 1999) and 8 mg L⁻¹ for pyrimethanil on *Lemna* sp. after 72 h (Pmep, 2005)).

A comparison of the relative sensitivity of the aquatic plants studied suggests that *C. aquatica*, *L. minor* and *S. polyrhiza* are less sensitive to both fungicides than *C. palustris* and *E. canadensis*.

4.2. Removal cf fungicides

The aquatic macrophytes tested showed an efficient removal of fungicides, involving absorption and/or adsorption processes, and a potential for pesticide phytoremediation. Among the five plants tested the two Lemnaceae species, *L. minor* and *S. polyrhiza*, were the most efficient for removing dimethomorph and pyrimethanil (up to ten times better than the others) from contaminated water, in our laboratory condition.

The higher removal efficiency of *L. minor* and *S. polyrhiza* can be explained by the concentration/biomass ratio. Demirezen et al. (2007) showed that heavy metal accumulation was significantly affected by plant density, with a higher removal at the lowest density tested. Here, the two Lemnaceae have a lower concentration/biomass ratio (1:0.05; mg L⁻¹ g⁻¹ FW) compared to the others (1:0.83).

Dimethomorph was removed more efficiently than pyrimethanil. Differences in dimethomorph and pyrimethanil removal are not due to a sorption phenomenon on plant surface since fungicide removal by dead-frozen plants was not significantly different from that of the control without plant. Gao et al. (2000) also noticed this slight removal of pesticides by dead plant. Moreover, no significant removal was observed with living plant kept in the dark during the 96h experiment (data not shown) suggesting that plants should be photosynthetically active for an efficient removal of pesticides. Phytoremediation of organic contaminants can be achieved through passive or active plant uptake and may be followed by plant metabolism of these contaminants (phytotransformation or phytodegradation) leading to partial degradation or transformation of the compound. A plant-assisted microbial degradation by microorganisms living in and around the roots and/or the chemical structure of the fungicidal molecule can also explain the differences in the removal efficiencies of dimethomorph and pyrimethanil (Reichenauer and Germida, 2008).

2100

It is well known that there is a relationship between $\log K_{ow}$ and the uptake of pesticides (Briggs et al., 1982). The octanolwater partition coefficient $(\log K_{ow})$ is nearly the same for dimethomorph and pyrimethanil: 2.63-2.73 and 2.84, respectively. Thus it seems unlikely to consider this parameter as the main reason explaining the difference in the removal of these molecules. Since we used formulated pesticide, adjuvants may have influenced the removal efficiency of the active molecules. Among adjuvants, surfactants are some of the most important components used to improve their biological activity by modifying spray droplet size, retention and spreading on leaf surfaces or by enhancing uptake and translocation of the a.i. to crop (Knowles, 2001; Katagi, 2008). When we ran a comparable experiment with L minor exposed to pure dimethomorph and pyrimethanil, active molecules removal efficiency after 96 h was low and similar for both fungicides (i.e. $7\pm1\%$). In contrast, in the presence of formulated fungicides, dimethomorph was removed more efficiently than pyrimethanil. It therefore appears that the quantity of formulated fungicides removed from the water is influenced by the type of adjuvants added to the active ingredient.

When analyzing the potential correlation between toxicity and removal rate, we noticed that L. minor and S. polyrhiza, as the less sensitive plants, were also the most efficient in removing dimethomorph and pyrimethanil from the medium. In contrast E. canadensis and C. palustris, as the most sensitive plants, were less efficient in our phytoremediation experiments. For four plants out of five, our results suggest that a correlation between the degree of toxicity and removal rate of these fungicides is likely. Further studies should be conducted to confirm this relationship.

Plants combining a high tolerance to pollutants with a good removal rate should have an effective inner detoxification process, allowing those plants to metabolize the contaminant and then, decrease the inside (bioaccumulated portion) toxicity of these fungicides. Roy et al. (1992) indicate that peroxidase activity was related with pollution tolerance and showed that the high tolerance of Callitriche sp. and Elodea sp. to pollutants was correlated with an intense peroxidase activity. Peroxidase enzymes play an important role in the oxidative metabolism of xenobiotics in plants and play a role as an oxidative stress enzyme (Lamoureux and Frear, 1979; Roy et al., 1992). Dewez et al. (2005) found negligible effects of fungicide on photosynthetic parameters, but strong antioxidative activities associated with cytosol enzymes such as ascorbate peroxidase and glutathione-S-transferase. Cytochrome P450, glutathione-S-transferase or glucosyltransferase have also been found to be involved in the detoxification process of pesticides (Coleman et al., 1997; Pflugmacher et al., 1999; Brazier-Hicks et al., 2007). At this time no data are available concerning the metabolization (e.g. enzymatic activities) of dimethomorph and pyrimethanil. It would be of interest, in the near future, to investigate some specific enzymatic activities in aquatic macrophytes to see if those activities appear to be a critical determinant of their tolerance to diverse contaminants such as pesticides.

In case of on-site experiments, it must be kept in mind that the water retention time can be longer than 4 days with not necessarily constant but fluctuating concentrations of toxic substances over time. Future studies should also seek to study the effects of long-term toxicity of pesticides on aquatic plants as well as their recovery potential (Drost et al., 2007; Mohammad et al., 2008).

Five aquatic macrophytes were compared to assess their capabilities to remove fungicides from water. Among those plants, duckweeds (L. minor and S. polyrhiza) emerged as the best species for removal of dimethomorph and pyrimethanil. Results indicated that dimethomorph was more efficiently removed than pyrimethanil. Moreover, it appeared (at least for 4 plants) that a correlation existed between the toxicity of the tested fungicides to aquatic plants and their removal rate. Once this correlation is confirmed, such information may prove beneficial to facilitate phytoremediation management based on these macrophytes.

Acknowledgments

This work is a part of the "Contrat d'objectifs AQUAL" and is funded by the city of Reims and the Agence de l'Eau Seine-Normandie. The authors are grateful to Prof. E. Guillon (ICMR-GCC, University of Reims) for the HPLC equipment and to Prof. Dr. Appenroth (University of Jena, Germany) for the generous gift of Spirodela polyrhiza.

References

Agritox, 1999. < http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/sa.php?source=CYANAMI</pre> D+A&sa=1112

- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C., 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Banuelos, G. (Eds.), Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Lewis Publishers CRC, Boca Raton, pp. 85–107.
- Bi Fai, P., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1520–1531. Bouldin, J.L., Farris, J.L., Moore, M.T., Smith Jr., S., Cooper, C.M., 2006. Hydroponic
- Boulini, J.L., Paris, J.L., Mole, M.L., Sintin JL, S., Coper, C.M., Zobe, Pyuropoint uptake of atrazine and lambda-cyhalothrin in *Juncus ejfusus* and *Ludwigia peploides*. Chemosphere 65, 1049–1057.
 Bragato, C., Brix, H., Malagoli, M., 2006. Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel and *Bolioschoenus maritimus* (L) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. Environ. Pollut. 144, 967–975.
- Brazier-Hicks, M., Offen, W.A., Gershater, M.C., Revett, T.J., Lim, E.K., Bowles, D.J., Davies, G.J., Edwards, R., 2007. Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. PNAS 104, 20238–20243.
 Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., 1982. Relationships between lipophilicity
- and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. Pestic. Sci. 42, 209–222.
- Chollet, R., 1993. Screening of inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with a *Lemna* assay. In: Böger, P., Sandmann, C. (Eds.), Target Assay for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds. Lewis Publisher, London, UK, pp. 143–149. Coleman, J.O.D., Blake-Kalff, M.M.A., Davies, T.G.E., 1997. Detoxification of
- xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci. 2, 144–151.
- Dabrowski, I.M., Schulz, R., 2003. Predicted and measured levels of zinphosmethyl in the Lourens River, South Africa: comparison of runoff and spray drift. Environ. Toxicol. Chem. 22, 494-500.
- Demirezen, D., Aksoy, A., Uruç, K., 2007. Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae). Chemosphere 66, 553–557. Demming, B., Winter, K., 1988. Characterisation of three components of non-
- photochemical fluorescence quenching and their response to photoinhibition. Aust. J. Plant Physiol. 15, 163–177.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga Scenedesmus obliquus. Aquat. Toxicol. 74, 150–159. Drost, W., Matzke, M., Backhaus, T., 2007. Heavy metal toxicity to Lemna minor:
- studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. Chemosphere 67, 36–43.
- Eapen, S., Singh, S., D'souza, S.F., 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. Biotechnol. Adv. 25, 442–451.
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., 2002. Photosynthetic responses of Lemna minor exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. Ecotoxicol. Environ. Saf. 53, 439-445.
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in Lemna minor. Environ. Exp. Bot. 49, 159–168.
- Gao, J., Wayne Garrison, A., Hoehamer, C., Mazur, C.S., Lee Wolfe, N., 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. J. Agric. Food Chem. 48, 6114–6120. Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1990. The relationship between
- non-photochemical quenching of fluorescence and the relation potential photochemistry in leaves. Photosynth. Res. 25, 249–257. nzález-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2006. Removal of triazine
- herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. Environ. Pollut. 44, 266-271.

R. Dosnon-Olette et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (2009) 2096-2101

- Hennebert, P., Clarin, N., Pottecher, G., Foesser, F., Groff, H., 2005. < http://www. groupeirhenvironnement.com/IRH-Environnement/telediag/SWAP-CPP/pdf/ Resume_Presentation_GFP_05_2006.pdf >.
- Horton, P., Hague, A., 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching.
- isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching. Biochim. Biophys. Acta 932, 107–115.
 Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R., 2002. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris, Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydo-monas reinhardtii* to copper. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42, 155–164.
 Juneau, P., Qiu, B., Deblois, C.P., 2007. Use of chlorophyll fluorescence as a tool for deter-mination of herbicide toxic effect: review. Toxicol. Environ. Chem. 89, 609–625.
 Kähkönen, M.A., Manninen, P.K.G., 1998. The uptake of nickel and chromium from unter the Holdon consulting this fluorescence as the other sense.
- water by Elodea canadensis at different nickel and chromium exposure levels. Chemosphere 36, 1381–1390.
- Katagi, T., 2008. Surfactant effects on environmental behavior of pesticides. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 194, 71–177.
- Knowles, A., 2001. Trends in pesticide formulation. Agrow Report DS-215. FJB Publications, Surrey. Lamoureux, G.L., Frear, D.S., 1979. Pesticide metabolism in higher plants: in vitro
- Lamoureux, G.L., Frear, D.S., 1979. restricture metabolism in nigner plants: in vitro enzyme studies. In: Paulson, C.D., Frear, D.S., Marks, E.P. (Eds.), Xenobiotics Metabolism: In Vitro Methods, American Chemical Society Symposium Series, 97. American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp. 77–128.
 Milam, C.D., Bouldin, J.L., Farris, J.L., Schulz, R., Moore, M.T., Bennett, E.R., Cooper, C.M., Smith Jr, S., 2004. Evaluating acute toxicity of methyl parathion application in constructed wetland mesocosms. Environ. Toxicol. 19, 471–479.
- Miretzky, P., Saralegui, A., Cirelli, A.F., 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metal. Chemosphere 57, 997–1005.Mohammad, M., Itoh, K., Suyama, K., 2008. Comparative effects of different families of herbicides on recovery potentials in Lemna sp. J. Pestic. Sci. 33, 171-174.

- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol. 125, 1558–1566.Olette, R., Couderchet, M., Biagianti, S., Eullaffroy, P., 2008. Toxicity and removal of
- pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere 70, 1414–1421. Pflugmacher, S., Wiencke, C., Sandermann, H., 1999. Activity of phase I and phase II
- detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. Marine Environ. Res. 48, 23–36. Pmep, 2005. (http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/febuconazole-sulfur/ pyrimethanil/pyrimethanil_let_405.html>.
 Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15–39.
- Reichenauer, T.G., Germida, J.J., 2008. Phytoremediation of organic contaminants in
- soil and groundwater. ChemSusChem 1, 708–717. r, S., Ihantola, R., Hänninen, O., 1992. Peroxidase activity in lake macro-phytes and its relation to pollution tolerance. Environ. Exp. Bot. 32, Roy, 457-464
- Ruban, A.V., Horton, P., 1995. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. Aust. J. Plant Physiol. 22, 221–230. Salvato, J.A., Nemerow, N.L., Agardy, F.J., 2003. Environmental Engineering. Wiley,
- Salvato, J.A., Nemerow, N.L., Agardy, F.J., 2003. Environmental Engineering. Wiley, New York, USA 1584 p.
 Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10, 51–62.
 Schröder, P., Collins, C., 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. Int. J. Phytorem. 4, 247–265.
 Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., El Amrani, A., Couee, I., 2007. Sucross amendment enbances phytoaccumulation of the berbridde atrazine in
- Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. Environ. Pollut. 145, 507–515. Wahaab, A.R. Lubberding, H.J., Alaerts, G.J., 1995. Copper and chromium (III) uptake by duckweed. Water Sci. Technol. 32, 105–110.

Publication III

Pesticides removal in algal cell suspensions.

Rachel Dosnon-Olette, Patricia Trotel-Aziz, Michel Couderchet, Philippe Eullaffroy

Soumise

Pesticides removal in algal cell suspensions.

Rachel Dosnon-Olette, Patricia Trotel-Aziz, Michel Couderchet and Philippe Eullaffroy*

Laboratoire Plantes Pesticides et Développement Durable (PPDD), URVVC-SE EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

*Corresponding author: philippe.eullaffroy@univ-reims.fr

Abstract

Remediation capacities of two freshwater microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda*, were assessed for the removal of two fungicides (dimethomorph and pyrimethanil) and one herbicide (isoproturon) from their medium. To ensure these studies were performed with healthy algae, pesticide effects where first apprehended on chlorophyll *a* fluorescence emission and growth rate. After a 4 day-exposure to 600 μ g/L of dimethomorph or pyrimethanil, or to 10 μ g/L of isoproturon, algal growth rate and some of their photosynthetic processes were weakly affected (< 30% variation). The pesticide removal percentage of *Scenedesmus* cells reached a maximum of 10, 24 and 58% for pyrimethanil, dimethomorph and isoproturon, respectively. In parallel, the maximum removal rate was 36 and 40 μ g/10⁹ cells for dimethomorph, 17 and 26 μ g/10⁹ cells for pyrimethanil, 2 and 2 μ g/10⁹ cells for isoproturon, in the presence of *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda*, respectively. Results showed that *Sc. quadricauda* was more effective in the removal of dimethomorph and pyrimethanil compared to *Sc. obliquus*.

Keywords: Chlorophyll Fluorescence, Phytoremediation, Scenedesmus, Toxicity, Uptake

1. Introduction

In intensively cultivated areas, agriculture and viticulture are significant sources of surface water contamination by pesticides via spray drift and/or run-off (Groenendijk et al., 1994; Kloeppel et al., 1997; Shultz, 2001). Once in the aquatic environment, these chemicals have the potential to induce adverse effects on ecosystem health (Moore et al., 2007). To minimize the impact of this pollution, it is important to develop innovative technologies to clean up the contaminated water. In recent years, the use of plants to remediate polluted soils and water (so-called phytoremediation) has gained attention and popularity as a cost-effective, environmentally friendly and efficient *in situ* technology for a variety of pollutants (Cunningham et al., 1995; He et al., 2005; Pilon-Smits, 2005; Rai, 2009), and among them, many pesticides (Schröder and Collins, 2002; Dhir et al., 2009).

Phytoremediation with microalgae have been utilized for areas polluted with nutrients or heavy metals (Zhou et al., 1998; Awasthi and Rai, 2005; Perales-Vela et al., 2006), however increasing environmental pollution by pesticides may lead to consider microalgae as good candidates to remove these contaminants from water at low cost (Tang et al., 1998; Friesen-Pankratz et al., 2003; Weiner et al., 2004; González-Barreiro et al., 2006).

In the present study, owing to their common use in agriculture and viticulture, dimethomorph and pyrimethanil (used for control of mildew and grey mould on grapes), and isoproturon (used for controlling broad leaf weeds and grasses in cereal crops), were selected as model pesticides. Considering a phytoremediation approach to remove the selected pesticides, we chose two species of microalgae known to bio-accumulate nutrients and heavy metals: *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* (Awasthi and Rai, 2005; Pellón et al., 2008; Ruiz-Marin and Mendoza-Espinosa, 2008). Few data exist, however, regarding their capacity to remove pesticides (Guanzon et al., 1996; Cai et al., 2007). Algal sensitivity to selected pesticides was also investigated using growth rate an also chlorophyll *a* fluorescence measurement as a non-invasive, highly sensitive, fast and easy to apply tool to probe the degree of algal injury by pesticides (Dewez et al., 2005; Juneau et al., 2007).

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Scenedesmus obliquus and *Scenedesmus quadricauda* (SAG 276-3a and 276-4b; Göttingen, Germany) were maintained in batch cultures containing 400 mL of mineral growth medium (pH 6.5; Couderchet and Böger, 1993) in 1 L Erlenmeyer flasks.

Flasks were maintained in a growth chamber at 23 ± 2 °C under continuous light (65 µmol photosynthetic active radiation m⁻² s⁻¹) provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania Gro Lux F36W, Germany). Microalgal suspensions were placed on an orbital shaker (110 rpm). All experiments were performed with exponentially growing cell cultures and were inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL culture medium (Couderchet and Böger, 1993) with an initial concentration of 1.4 10⁶ cells per mL (1.2 µg/mL of chlorophyll).

2.2 Experimental design and pesticide contamination procedure

We used formulated pesticides: dimethomorph ((E,Z)4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]morpholine) as Forum[®] (BASF Agro, Belgique, 150 g/L of active ingredient, a.i.), pyrimethanil (N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)aniline) as Scala[®] (BASF Agro, France, 400 g/L of a.i.) and isoproturon (3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea) as Matin[®] (John et Stephen B., France, 500 g/L of a.i.). The actual amount of the a.i. in the source products Forum[®], Scala[®] and Matin[®] was analysed. We found that this amount was 10% higher (165 g/L), 16% lower (333 g/L) and 10% higher (550 g/L) than the nominal concentrations, respectively. The amount of formulated product required to achieve

our nominal test concentrations was calculated on the basis of those analyses. Pesticides concentrations given in this study refer to the actual, and not to the nominal concentrations of the a.i. All stock solutions were prepared immediately before initiating experiments.

All experiments were repeated three times and each sample was run in triplicate. Three different controls were carried out in parallel: # 1, algae in a pesticide free medium; # 2, dead-frozen algae in a medium containing pesticides, and # 3, medium containing pesticides but free of algae. In control # 2, the quantity of dead-frozen algae was adjusted to simulate the increase of biomass observed in the experiment using viable algae. One batch was analysed immediately after spiking each exposure container (time point 0 h) and four other batches every 24 h (time point 24, 48, 72, 96 h). No pesticide was detected in control # 1.

2.3 Toxicity assessments

Pesticide effects on algal suspension were determined by measuring growth rate and algal chlorophyll fluorescence emission. Growth was determined using spectrophotometric determination of optical density. Optical density was measured at 680 nm (OD680). Kasai et al. (1993) reported that cell numbers and OD680 are highly correlated. A strong correlation between optical densities and cell densities of the algae tested was confirmed in this experiment, with r^2 values > 0.97 for all algal species tested. Optical density was then used as a surrogate for growth (cell density) for each freshwater alga. A pulse amplitude modulated spectrofluorometer (PAM-Walz[®], Effeltrich, Germany) was used for chlorophyll a fluorescence measurement. After a 15-min adaptation to the dark at 23 ± 2 °C, the minimal and maximal fluorescence yield (F_o and F_m) were determined by a modulated low light and a saturating flash, respectively. The algal solution was then continuously illuminated and the minimal and maximal light-adapted fluorescence level (F'o, F'm) determined. Each measurement was made with a given volume of algal suspension filtered on a glass-fiber filter (Millipore[®] AP20013) in order to obtain 7.10⁶ cells on the filter. The maximum photosynthetic capacity (also called maximum quantum yield of photosystem II primary photochemistry) was estimated by the ratio $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ for dark adapted leaves (Genty et al., 1990). The photochemical $(q_{\rm P} = (F'_{\rm m} - F_{\rm s})/(F'_{\rm m} - F'_{\rm o}))$ and non-photochemical $(q_{\rm N} = 1 - ((F'_{\rm m} - F'_{\rm o})/(F_{\rm m} - F_{\rm o})))$ quenching were determined as in Schreiber et al. (1986).

Growth rate and chlorophyll fluorescence were recorded every 24 hours, during the 4day exposure of the algal suspension to 0, 200, 400, 600 and 800 μ g/L of dimethomorph and pyrimethanil; and to 0, 5, 10 and 20 μ g/L of isoproturon.

2.4 Sample preparation

Pesticide concentration in medium was determined in supernatants after centrifugation of 7 mL aliquots at 3000 g for 15 min at 4 °C. Acetonitrile (ACN) was added, 10% (v/v), to the supernatant for dimethomorph and pyrimethanil determinations. The samples were stored at -20 °C before HPLC analysis. Isoproturon determination required the addition of 3 mL dichloromethane to 5 mL of supernatant. After vigorous agitation, dichloromethane extracts containing isoproturon were collected. Then another 3 mL of dichloromethane was added to the extract and collected after agitation. The eluent was gently evaporated with nitrogen and residues were dissolved again in 0.5 mL of ACN, and then stored at -20 °C before HPLC analysis.

A 80 mL aliquot of each culture was required to determine the pesticide quantity inside the microalgal biomass. Following a centrifugation at 3000 g for 15 min at 4 °C, the pellet was resuspended in 40 mL of fresh medium, shaken vigorously and centrifuged (at the end of the process no pesticide was found in the supernatant). This step was repeated twice. The final pellet was resuspended in 5 mL of pure methanol, which was kept in darkness for 48 h. Methanol suspension was centrifuged again to obtain a clean supernatant, *i.e.* free of cell debris. The supernatant was evaporated under nitrogen stream and 0.5 mL of ACN was added before pesticide analysis (González-Barreiro et al., 2006).

The removal rate of the algae was expressed as the quantity of pesticide removed from the medium per one billion cells (μ g/10⁹ cells) and as percentage of contaminant taken up per total available in solution and per day (removal yield). The quantity found in algae was reported as a percentage of the quantity that had disappeared from the medium.

2.5 HPLC analysis

A 20 μ L-aliquot of sample was injected into a Varian ProStar 410 HPLC system and analysed using a C18 reversed phase column (100 mm × 3 mm, 5 μ m particle size, Kromasil 100, Varian, Les Ulis, France) and eluted isocratically with acetonitrile (60%) and water (40%) acidified with H₃PO₄ (0,1%). Peaks were detected with a diode array detector (Varian, Prostar). Identification of pesticide was confirmed by UV spectrum and concentration was determined by comparison with a standard curve obtained with dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon certified standards (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). The UV detection was made at 246 nm for dimethomorph, 261 nm for pyrimethanil and 242 nm for isoproturon.

2.6 Statistical analysis

In this study, all statistical analyses were performed with SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Significant differences between controls and contaminated samples were determined by One Way ANOVA tests and P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1 Toxicity

3.1.1 Maximum Quantum Yield of Photosynthesis (F_v/F_m)



Figure 1: Inhibition (%) of F_v/F_m in *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* exposed 4 days to A) dimethomorph, B) pyrimethanil and C) isoproturon. The symbol * is for data significantly different from control and \dagger for data significantly different between the two algae (*P* < 0.05).

The effect of dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon on plant photosynthesis is reflected in the F_v/F_m ratio inhibition percentage in Figure 1A, 1B and 1C, respectively. After 96 h of experiment, obliquus and Sc. Sc. quadricauda were slightly or not affected by any of the studied pesticides with an F_v/F_m inhibition always lower than 6%. Sc. obliquus and Sc. quadricauda were not significantly different in sensitivity.

3.1.2 Photochemical Quenching (q_P)

After 96 h, $q_{\rm P}$ was significantly affected by dimethomorph, pyrimethanil isoproturon with а maximum and inhibition of 9%, 13% and 23%. respectively (Fig. 2). Sc. obliquus was significantly (P < 0.05) more sensitive to pyrimethanil than Sc. quadricauda. However, no significant difference in sensitivity among the 2 Scenedesmus species was noticed for dimethomorph and isoproturon.

3.1.3 Non-Photochemical Quenching (q_N)

The effect of dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon on q_N is reflected in a q_N stimulation (Fig. 3). After a 96 h-experiment, the q_N stimulation reached a maximum of 25%; 37% and 20% in algae exposed to dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon, respectively.



Figure 2: Inhibition (%) of q_P in *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* exposed 4 days to A) dimethomorph, B) pyrimethanil and C) isoproturon. The letter * is for data significantly different from control and † for data significantly different between the two algae (P < 0.05).

Sc. significantly obliquus was (P < 0.05)more sensitive than Sc. quadricauda when exposed to 200 and 400 µg/L of dimethomorph. However, Sc. obliquus was more tolerant than Sc. quadricauda in the presence of pyrimethanil (200)800 $\mu g/L$) to or isoproturon (5 μ g/L).



Figure 3: Stimulation (%) of q_N in *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* exposed 4 days to A) dimethomorph, B) pyrimethanil and C) isoproturon. The letter * is for data significantly different from control and † for data significantly different between the two algae (P < 0.05).

3.1.4 Growth rate

After 4 days of exposure at the highest concentration tested the growth rate inhibition reached a maximum of 31%, 24% and 39% in algal solutions containing dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon, respectively (Fig. 4). The growth rate of *Sc. obliquus* was significantly more affected than that of *Sc. quadricauda* in the presence of 200, 600 and 800 µg/L of dimethomorph and 15 and 20 µg/L of isoproturon.



Figure 4: Growth rate inhibition (%) of *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* exposed 4 days to A) dimethomorph, B) pyrimethanil and C) isoproturon. The letter * is for data significantly different from control and † for data significantly different between the two algae (P < 0.05).

3.1.5 Choice of pesticide concentration for the remediation experiment.

То be suitable for phytoremediation, a plant should maintain a good health status (tolerance) when to contaminated exposed water. to maximize efficiency of the purification process (Baker et al., 2000; Sulmon et al., 2007). We have arbitrarily chosen to conduct all phytoremediation experiments at the highest pesticide concentration inducing no more than 30% change in all chlorophyll fluorescence parameters $(F_v/F_m, q_P \text{ and } q_N)$ and growth rate. Therefore, in regard of the results obtained from toxicity tests, the concentrations chosen for subsequent the phytoremediation studies for fungicides and herbicide were 600 and 10 µg/L, respectively.

3.2 Removal

3.2.1 Removal of dimethomorph

During the 96 h of experiment there was no significant difference between the disappearance of dimethomorph from the medium in presence of dead algae and the control medium without algae (data not shown). The presence of living *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* had a significant effect on the disappearance from the medium of the pesticide (Tab. 1).

Table 1: Quantity of dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon: A) disappeared from the
medium in presence of algae expressed as $\mu g/10^9$ cells and as percentage of contaminant
eliminated per total available in solution and per day. B) found in algae in $\mu g/10^9$ cells and as
percentage (%) of pesticide eliminated from the medium. The symbol * is for data
significantly different from control (dead algae for $\mu g/10^9$ cells and without algae for
percentage) and \dagger for data significantly different between the two algae ($P < 0.05$).

		A) Quantity disappeared from the medium			B) Quantity found in algae				
Incubation Time (d)		1	2	3	4	1	2	3	4
Dimethomorph									
Sc. Obliquus	µg/10 ⁹ cells	17 ± 2 [*]	27 ± 2 *†	31 ± 2 ^{*†}	36 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	3±1 [†]	5 ± 1 ^{*†}
	%	5 ± 1 *	12 ± 1 ^{*†}	19 ± 2 ^{*†}	24 ± 2 ^{*†}	13 ± 1 ^{*†}	9±1 ^{*†}	11 ± 1 ^{*†}	15 ± 1 ^{*†}
Sc.	µg/10 ⁹ cells	17 ± 2 [*]	36 ± 2 ^{*†}	39 ± 2 ^{*†}	40 ± 2 [*]	3 ± 1	7 ± 1 ^{*†}	8 ± 1 ^{*†}	9±1 ^{*†}
Quadricauda	%	5 ± 1 [*]	8 ± 1 ^{*†}	12 ± 1 ^{*†}	15 ± 1 ^{*†}	18 ± 1 ^{*†}	21 ± 1 ^{*†}	20 ± 1 ^{*†}	23 ± 1 ^{*†}
Pyrimethanil									
Sc. Obliquus	µg/10 ⁹ cells	6 ± 1 [*]	11 ± 1 ^{*†}	14 ± 1 ^{*†}	17 ± 1 ^{*†}	5 ± 1 *	9 ± 1 *	12 ± 1 [*]	13 ± 1 [*]
	%	1 ± 1	3 ± 1	5 ± 1 [*]	7 ± 1 [*]	87 ± 8 [*]	87 ± 8 ^{*†}	88 ± 8 ^{*†}	77 ± 7 ^{*†}
Sc.	µg/10 ⁹ cells	8 ± 1 [*]	24 ± 2 ^{*†}	25 ± 2 ^{*†}	26 ± 2 ^{*†}	6 ± 1 [*]	9 ± 1 *	13 ± 1 [*]	11 ± 1 [*]
Quadricauda	%	2 ± 1	6 ± 1 [*]	8 ± 1 [*]	10 ± 1 [*]	80 ± 8 [*]	40 ± 4 ^{*†}	51 ± 5 ^{*†}	44 ± 4 ^{*†}
Isoproturon									
Sc. Obliquus	µg/10 ⁹ cells	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	nd	nd	nd	nd
	%	6 ± 5	57 ± 5	54 ± 5	58 ± 5	nd	nd	nd	nd
Sc. Quadricauda	µg/10 ⁹ cells	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	nd	nd	nd	nd
	%	6 ± 5	54 ± 5	49 ± 5	43 ± 4	nd	nd	nd	nd

nd: not detected

The percentage of dimethomorph eliminated increased from day 1 to day 4 of exposure. After 2 days, *Sc. obliquus* removed a percentage of dimethomorph significantly higher than *Sc. quadricauda*, and reached a maximum removal yield of 24 and 15% (*i.e.* 36 and 40 μ g/10⁹ cells), respectively, after 4 days.

The quantity of dimethomorph found in the algal biomass increased with time from 2 to 5 and 3 to 9 μ g/10⁹ cells, during the 4 d-experiment, in *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda*, respectively. The percentage of dimethomorph accumulated in algae with regard to the quantity removed was lower in *Sc. obliquus* (15%) than in *Sc. quadricauda* (23%) after 96 h.

3.2.2 Removal of pyrimethanil

As observed for dimethomorph, the presence of dead algae did not induce a significant pyrimethanil disappearance from the medium (data not shown). The presence of living *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* had a significant effect on pyrimethanil removal as early as day 1. Pyrimethanil removal rate was significantly higher in the presence of *Sc. quadricauda* (26 μ g/10⁹ cells) compared to *Sc. obliquus* (17 μ g/10⁹ cells), after 4 days, with a maximal

removal yield of 10% and 7% in suspension of *Sc. quadricauda* and *Sc. obliquus*, respectively (Tab. 1).

Accumulation of pyrimethanil in algae was time-dependent reaching 13 and 11 $\mu g/10^9$ cells (*i.e.* 77 and 44%) in *Sc. obliquus* and *Sc. quadricauda* algae suspension, respectively, at the end of the experiment. This accumulation was significant after one day and the concentration was significantly higher in *Sc. quadricauda* after 2 days.

3.2.3 Removal of isoproturon

Ninety six hours were not sufficient to observe any significant removal rate of herbicide with living algae (P > 0.05). However, expressed as a percentage of contaminant taken up per total available in solution and per day, this removal became significant, with 43 to 58% (*i.e.* 1 and 1 µg/10⁹ cells) of isoproturon disappearing during the initial 96 h in the *Sc. quadricauda* and *Sc. obliquus* suspension, respectively (Tab. 1). The maximal percentage of isoproturon eliminated seemed to be reached as early as day 2. No herbicide was detected inside the algal cells.

4. Discussion

The potential efficiency of PSII (F_v/F_m) was slightly or not impacted in algae exposed to dimethomorph, pyrimethanil and isoproturon, indicating that photosystem II functioning was slightly to non-affected by these pesticides at the concentration tested. Photochemical quenching was more affected by these pesticides, especially in algae exposed to isoproturon (23% inhibition at 20 µg/L) showing that the redox state of the quinone pool was modified by pesticides. The stimulation, up to 37%, of q_N , may represent a disruption in the electron transport necessary for energy dissipation by non-photochemical processes (transthylakoid pH gradient formation, antenna movements, photoinhibition) (Horton and Hague, 1988; Ruban and Horton, 1995; Müller et al., 2001).

The effect of dimethomorph and isoproturon on growth seemed more pronounced for *Sc. obliquus* suggesting that this *Scenedesmus* species was more sensitive than *Sc. quadricauda*. However, *Sc. obliquus* exposed to pyrimethanil did not differ from *Sc. quadricauda* in sensitivity. In regard to the low concentration tested the damages incurred by isoproturon on chlorophyll *a* fluorescence and growth rate were important. This could be directly linked to its mode of action. Indeed, isoproturon binds specifically to the D1 protein of PSII inhibiting the photosynthetic electron transport.

The minor impact of fungicides on chlorophyll *a* fluorescence and growth in regard to the high concentrations tested are in agreement with previous experiments on algae and aquatic plants (Dewez et al., 2005; Olette et al., 2008; Dosnon-Olette et al., 2009) confirming that fungicides can be considered as pesticides of low toxicity for these organisms.

Based on the observed differences in photosynthetic parameters and growth rates, we can conclude that *Sc. obliquus* was more sensitive than *Sc. quadricauda* to dimethomorph and isoproturon. This difference between the two algae is less pronounced for pyrimethanil.

Among the two fungicides dimethomorph was more easily removed from contaminated water than pyrimethanil. Previous studies on dimethomorph and pyrimethanil removal by aquatic macrophytes reported the same fact (Dosnon-Olette et al., 2009). In this other work, the difference in removal was attributed to the type of adjuvant used in the formulation, since no difference was found in experiments using the pure molecule.

Between the two algal species, *Sc. quadricauda* was more efficient in dimethomorph and pyrimethanil removal than *Sc. obliquus*, when results were expressed in μg per billion cells. However, *Sc. quadricauda* removed a lesser percentage of dimethomorph than *Sc. obliquus* due to a higher growth rate reflected by a higher number of cells.

A small amount of the molecule that had disappeared from the medium was found inside the algal body. The remaining amount was possibly adsorbed on the cell wall and was washed out during the preparation of the algal sample for extraction. In dead algae a slight but non significant amount of fungicide was recovered in that fraction, which was attributed to adsorption of fungicide to the cell surface. During pesticide analysis some other peaks were observed on the chromatograms (data not shown), indicating a possible metabolisation of pesticides that had occurred inside the algae. Here, we work with axenic cultures so microbial activity can not play a role in this pesticide degradation. After 4 days, the percentage of dimethomorph found in *Sc. obliquus* was significantly lower than in *Sc. quadricauda (i.e.* 15 and 23%, respectively); contrary to pyrimethanil (*i.e.* 77 and 44%, respectively). This could be explained by a possibly more effective inner detoxification process, leading to improved metabolisation of dimethomorph by *Sc. obliquus* and pyrimethanil by *Sc. quadricauda*.

Differences in quantity found between the two algae may also be due to different morphological and physiological characteristics of the cells, such as the lipid content of cell membranes and composition of cell walls as proposed by Tang et al. (1998). Indeed, a microscopical observation easily shows the major morphological differences between the two species. *Sc. obliquus* are fusiform cells with no spine in contrary to *Sc. quadricauda*, which

shows 4 corner spines. Moreover, *Sc. quadricauda* is often found forming coenobia (four cells connected into one unit). Do the specific coenobia structure of *Sc. quadricauda* and the spines have an effect on removal efficiency of algal cells? More studies will be necessary to better explain why such differences exist in the removal of pesticides between these two species (*e.g.* lipid content). Other works revealed that the difference in the speed of entrance of various pesticides was due to their capacity of dilution into the lipids of cell membranes (Rioboo et al., 2002). As shown in our work, rate of entrance of pesticides into cells depends on both the microalgal species involved and the type of pesticide assayed (Tab. 1). Some authors state that the first step in the absorption of organic compounds is mainly a passive process involving a chemical partitioning into the hydrophobic biomass (Briggs et al., 1982; Amy et al., 1998). Based on the octanol–water partition coefficient of dimethomorph (log K_{ow} 2.63-2.73) and pyrimethanil (log K_{ow} 2.84), pyrimethanil is slightly more lipophilic than dimethomorph. This could explain the higher quantity of pyrimethanil found within the two algal species.

Concerning the herbicide tested, isoproturon removal was higher when algae were present in the medium but this increase of the quantity removed from the medium was not significant. This could be explained by the standard deviation, and a high disappearance of isoproturon in the control without algae (40% after 4 days, data not shown). Nevertheless, after 96 h, we noticed a removal of 58 and 43% of the total isoproturon available in solution when Sc. obliquus and Sc. quadricauda, were present in the medium, respectively. Isoproturon is slightly more hydrophilic (log K_{ow} 2.5) than the two fungicides and may penetrate less easily into the membrane. This might explain why only 1 µg of isoproturon per 10^9 cells disappeared from the medium and no herbicide molecule was detected in the algal cells. More experiments were conducted to better understand the elimination of isoproturon in the medium without plant, in the dark or with ultrapure water instead of nutritive medium. The results showed the same trend in terms of kinetics and rate of elimination. Therefore, isoproturon elimination can not be due to photolysis or adsorption on mineral particles present in the nutritive medium. No significant pesticide was found on the Erlenmeyer glass and microbial activity can not play a role, since this experiment was done under axenic conditions. The few other studies on the fate of isoproturon found a slower degradation in controls without plant with a 9% degradation in 21 days with 60 μ g/L as initial concentration (Böttcher and Schroll, 2007), or a half-life ranging from 13 to 35 days with 10 µg/L as initial concentration (Merlin et al., 2002). In the natural environment, this herbicide is not rapidly degraded inducing a persistent water pollution explaining why it was placed on the priority substance list in the water framework directive of the EU (article 16; Appendix X, WFD, EC, 2000).

It is interesting to notice that some studies found a positive or a negative relationship between sensitivity of microalgal species to a herbicide and their removal capacity (Tang et al., 1998; Baker et al., 2000; Weiner et al., 2004; Sulmon et al., 2007). Here, no such correlation was found. Nevertheless, our results are in agreement with those obtained in studies on heavy metal toxicity and removal since they found that the relationship between internal pollutant concentration and fluorescence emission was algal species and pollutantspecific (Baumann et al., 2009).

5. Conclusions

Between the two *Scenedesmus* species, *Sc. quadricauda* seems to be more efficient in the removal of the fungicides dimethomorph and pyrimethanil from the medium. Concerning the herbicide, isoproturon, the two species removed the same slight quantity (1 to 2 μ g per billion cells, after 1 to 4 days). Here, no correlation was found between sensitivity to the pesticides and removal rate, likely owing to the low effect of the concentration retained for these experiments.

Acknowledgement

This work is a part of the "Contrat d'objectifs AQUAL" and is funded by the city of Reims and the Agence de l'Eau Seine-Normandie. The authors are grateful to Pr. E. Guillon (ICMR-GCC, University of Reims) for the HPLC equipment.

References

Amy, G.L., Bryant, C.W., Alleman, B.C., Barkley, W.A., 1998. Biosorption of organic halide in a Kraft mill generated lagoon. J. Water Pollut. Control Fed. 60, 1445–1457.

Awasthi, M., Rai, L.C., 2005. Toxicity of nickel, zinc, and cadmium to nitrate uptake in free and immobilized cells of *Scenedesmus quadricauda*. Ecotox. Environ. Safe. 61, 268–272.

Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C., 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In:Terry, N., Baňuelos, G. (Eds.), Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers CRC, Boca Raton, pp. 85–107.

Baumann, H.A., Morrison, L., Stengel, D.B., 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM—Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. Ecotox. Environ. Safe. 72, 1063-1075.

Böttcher, T., Schroll, R., 2007. The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. Chemosphere 66, 684–689..

Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. Pestic. Sci. 42, 209–222.

Cai, X., Liu, W., Jin, M., Lin, K., 2007. Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures. Environ. Toxicol. Chem. 26, 970–975.

Couderchet, M., Böger, P., 1993. Changes in fatty acid profile induced by herbicide. In: Böger, P., Sandmann, G. (Eds.), Target Assays for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds. Lewis Publisher, Boca Raton, pp. 176–181.

Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. Trends Biotechnol. 13, 393–397.

Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. Aquat. Toxicol. 74, 150–159.

Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 39, 754–781.

Dosnon-Olette, R., Couderchet, M., Eullaffroy, P., 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate. Ecotox. Environ. Safe. doi:10.1016/j.ecoenv. 2009.08.010

EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for the Community action in the field of water policy. Official J European Communities L 327, 1–72.

Friesen-Pankratz, B.B., Doebel, C.C., Farenhorst, A.A., Goldsborough, L.G., 2003. Interactions between algae (*Selenastrum capricornutum*) and pesticides: implications for managing constructed wetlands for pesticide removal. J. Environ. Sc. Health B. 38, 147–155.

Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1990. The relationship between non-photochemical quenching of fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. Photosynth. Res. 25, 249–257.

González-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. Environ. Pollut. 44, 266–271.

Groenendijk, P., van der Kolk, J.W.H., Travis, K.Z., 1994. Prediction of exposure concentration in surface waters. In: Hill, I.R., Heimbach, F., Leeuwangh, P., Matthiessen, P., (Eds.), Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals. Lewis Publisher, Boca Raton, pp. 105–125.

Guanzon Jr., N.G., Fukuda, M., Nakahara, H., 1996. Accumulation of Agricultural Pesticides by Three Freshwater Microalgae. Fisheries Sci. 62, 690–697.

He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. J. Trace Elem. Med. Biol. 19, 125–140.

Horton, P., Hague, A., 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching. Biochim. Biophys. Acta 932, 107–115.

Juneau, P., Qiu, B., Deblois, C.P., 2007. Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. Toxicol. Environ. Chem. 89, 609–625.

Kasai, F., Takamura, N., Hatakeyama, S., 1993. Effects of simetryne on growth of various freshwater algal taxa. Environ. Pollut. 79, 77–83.

Kloeppel, H., Koerdel, W., Stein, B., 1997. Herbicide transport by surface runoff and herbicide retention in a filter strip rainfall and runoff simulation studies. Chemosphere 35, 129–141.

Merlin, G., Vuillod, M., Lissolo, T., Clement, B., 2002. Fate and bioaccumulation of isoproturon in outdoor aquatic microcosms. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1236–1242.

Moore, M.T., Cooper, C.M., Smith Jr., S., Cullum, R.F., Knight, S.S., Locke, M.A., Bennett, E.R., 2007. Diazinon mitigation in constructed wetlands: Influence of vegetation. Water Air Soil Pollut. 184, 313–321.

Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol. 125, 1558–1566.

Olette, R., Couderchet, M., Biagianti, S., Eullaffroy, P., 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere 70, 1414–1421.

Pellón, A., del Carmen Espinosa, M., Cañizares, R.O., Frades, J., Chacón, A., Pérez, E., Oña, A., Ramos-Alvariño, C., Mayarí, R., Escobedo, R., 2008. Use of a reactor for the removal of chromium and cadmium with immobilized *Scenedesmus obliquus*. Ing. Hidraul. Mex. 23, 139–150.

Perales-Vela, H.V., Peňa-Castro, J.M., Caňizares-Villanueva, R.O., 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 64, 1–10.

Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15–39.

Rai, P.K., 2009. Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 39, 697–753.

Rioboo, C., González, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. Aquat. Toxicol. 59, 225–235.

Ruban, A.V., Horton, P., 1995. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. Aust. J. Plant Physiol. 22, 221–230.

Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., 2008. Ammonia removal and biomass characteristics of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. Fresen. Environ. Bull. 17, 1236–1241.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10, 51–62.

Schröder, P., Collins, C., 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. Int. J. Phytorem. 4, 247–265.

Shultz, R., 2001. Comparison of spray drift- and runoff-related input of azinphos-methyl and endosulfan from fruit orchards into the Lourens River, South Africa. Chemosphere, 45, 543–551.

Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., El Amrani, A., Couée, I., 2007. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. Environ. Pollut. 145, 507–515.

Tang, J., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D., 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. Environ. Toxicol. Chem. 17, 1085–1090.

Weiner, J.A., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat. Toxicol. 68, 121–128.

Zhou, J.L., Huang, P.L., Lin, R.G., 1998. Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. Environ. Pollut. 1001, 67–75.

Publication IV

Potential use of *Lemna minor* for the phytoremediation of isoproturon and glyphosate.

Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Mehmet A. OTURAN, Nihal OTURAN, Philippe EULLAFFROY

Soumise
Potential use of *Lemna minor* for the phytoremediation of isoproturon and glyphosate.

Rachel DOSNON-OLETTE¹, Michel COUDERCHET^{1*}, Mehmet A. OTURAN², Nihal OTURAN² and Philippe EULLAFFROY¹

¹Laboratoire Plantes, Pesticides et Développement Durable (PPDD), URVVC-SE EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

²Université Paris-Est, Laboratoire Géomatériaux et Géologie de l'Ingénieur, 5 Bd Descartes, 77454 Marne-la-Vallée Cedex 2, France

*Corresponding author: michel.couderchet@univ-reims.fr

ABSTRACT

Pesticides are being detected in water bodies on an increasingly frequent basis. The present study focused on toxicity and phytoremediation potential of aquatic plants to remove phytosanitary products from contaminated water. We investigated the capacity of *Lemna minor (L. minor)* to eliminate two herbicides isoproturon and glyphosate from their medium. Since phytoremediation relies on healthy plants, pesticide toxicity was evaluated by exposing plants to 5 concentrations (0–20 μ g L⁻¹ for isoproturon and 0–120 μ g L⁻¹ for glyphosate) in culture media for 4 d using growth rate and chlorophyll *a* fluorescence as endpoints. At exposure concentrations of 10 μ g.L⁻¹ for isoproturon and 80 μ g.L⁻¹ for glyphosate, effects on growth rate and chlorophyll fluorescence were minor (< 25 %), so that this initial concentration was selected to study herbicide removal. After a 4-d incubation, removal yields were 25 % and 8 % for isoproturon and glyphosate, respectively.

KEYWORDS: Pesticides, Chlorophyll Fluorescence, Uptake, Duckweed, Herbicide, Xenobiotic.

INTRODUCTION

The wide application of herbicides to control weeds in crop plants is a major cause of water bodies contamination due to their being continuously discharged into aquatic environments via surface runoff (Kloeppel, Koerdel, and Stein, 1997). When entering the aquatic environment, these chemicals may affect directly or indirectly human and ecosystem health by inducing a significant threat to aquatic environments and drinking water resources (Dabrowski and Schulz, 2003; Moore *et al.*, 2007).

The cleanup of water contaminated by herbicides is expensive and energy consuming (Salvato, Nemerow, and Agardy, 2003). In the past ten years, the use of plants to remediate contaminated soils and water (so-called phytoremediation) has gained popularity as a cost-effective, environmentally friendly and efficient *in situ* technology for a variety of pollutants (Cunningham, Berti, and Huang, 1995; He, Yang, and Stoffella, 2005; Pilon-Smits, 2005; Eapen, Singh, and D'souza, 2007; Dhir, Sharmila, and Saradhi, 2009) and among them, some pesticides (Gao *et al.*, 2000; Schröder and Collins, 2002.; De Carvalho, Bromilow, and Greenwood, 2007; Dosnon-Olette, Couderchet, and Eullaffroy, 2009).

Most of the work in phytoremediation has been carried out with plants such as cattails and other reeds. Among aquatic macrophytes water hyacinth is the most popular (Gao *et al.*, 2000; Tront and Saunders, 2006) but lemnaceae have recently demonstrated their high capacity for pesticide remediation (Gao *et al.*, 2000; De Carvalho *el al.*, 2007; Olette *et al.*, 2008). Among them, *Lemna minor* was chosen as the representative plant because it is a widespread, free-floating, easy to handle and culture, and fast-growing aquatic macrophyte.

Phytoremediation technologies do have certain limiting factors. Among them is the toxicity encountered in establishing and maintaining plants on site (Dietz and Schnoor, 2001). In this study, toxicity investigations were conducted using growth rate and *in vivo* chlorophyll a fluorescence measurement. The latter endpoint was described as one of the most sensitive tool for the rapid detection of compounds and environmental conditions that exhibit harmful effects on photosynthesis (Bi Fai, Grant, and Reid, 2007; Juneau, Qiu, and Deblois, 2007). Isoproturon and glyphosate were chosen as models because of their common use in agricultural and viticultural activities, their different modes of action, and their frequent detection in runoff water (Hennebert et al., 2009; Kolpin et al., 2005). Isoproturon is a pre or post-emergence systemic herbicide from the phenyl urea family used to control annual grasses and broad-leaved weeds in wheat, barley and rye. Its phytotoxic action is based on the inhibition of the photodependent electron transport in thylakoids, at the photosystem II (PS II) level (Ducruet, 1991; Vermaas, 1993; Feurtet-Mazel et al., 1996). Glyphosate a non-selective, broad spectrum herbicide is the most widely used herbicide in the world (Baylis, 2000; 2005). Glyphosate inhibits Woodburn, 2000; Kolpin *et al.*, the EPSPS (5enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) a key enzyme in the shikimate biosynthetic pathway, which is necessary for the production of the aromatic amino acids, auxins, phytoalexins, folic acid, lignin, plastoquinones and many other secondary products in plants. Some experiments showed the potential of L. minor in isoproturon remediation (Böttcher and Schroll, 2007; De Carvalho el al., 2007). However, to our knowledge, for glyphosate only toxicity test experiments were conducted using L. minor (Peterson et al., 1994; Cedergreen and Streibig, 2005).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Lemna minor was collected from ponds in the Champagne area (France) and cleaned thoroughly under gentle running water to remove adhering algae and insect larva. Cultures of *L. minor* were maintained in large PVC aquaria containing growth medium (Chollet, 1993) at pH 6.5 \pm 0.5. All aquaria were maintained in a growth chamber at 23 \pm 2°C under continuous light (65 µmol photosynthetic active radiation (PAR) m⁻² s⁻¹) provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania Gro Lux F36W, Germany). The plants were subcultured twice a week.

In the experiments, 0.03 g of *L. minor* (*i.e.* 20 fronds) were placed in 100 mL of growth medium in 250-mL Erlenmeyer flasks stoppered with cotton wool to avoid evaporation. All experiments were carried out under the same conditions as those described above.

Experimental design and pesticide contamination procedure

We used formulated pesticides: isoproturon (3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea) as Matin[®] (John et Stephen B., France, 500 g.L⁻¹ of active ingredient, a.i.) and glyphosate (2-(phosphonomethylamino)acetic acid) as Sting Pro 2[®] (Monsanto Agriculture, France, 400 g.L⁻¹ of a.i.). All pesticide concentrations shown here refer to the active ingredient. All stock solutions were prepared immediately before the experiments.

All experiments were performed in triplicate. Two different controls were carried out in parallel: (# 1) plants in a pesticide free medium; (# 2) medium containing pesticides but free of plants. The aqueous culture media were sampled (7 mL) every 24 h, for pesticides analysis. No pesticide was detected in control # 1.

Toxicity assessments

Growth rate of duckweed was calculated by counting the number of fronds with a coefficient applied in function of their development stage: 1 for a mature frond to 0.25 for a young frond. Growth rates were calculated according to the equation:

 $r = ((\ln x_{t2} - \ln x_{t1}) / (t_2 - t_1)) \times 100;$

where x_{t1} is the number of fronds at day t_1 , x_{t2} is the number of fronds at day t_2 .

In vivo chlorophyll fluorescence measurements were used to study the functioning of the photosynthetic apparatus of plants exposed to pesticides. For this purpose, a pulse

amplitude modulated spectrofluorometer (PAM-Walz[®], Effeltrich, Germany) was used. Before measurements, plants were placed in the dark for 15 min at 23 ± 2°C. The maximum photosynthetic capacity (also called maximum quantum yield of photosystem II primary photochemistry) was estimated by the ratio $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ for dark adapted leaves (Genty *et al.*, 1990). The photochemical ($q_P = (F'_m - F_s)/(F'_m - F'_o)$) and non-photochemical ($q_N = 1 - ((F'_m - F'_o)/(F_m - F_o))$) quenching were determined as in Schreiber, Schliwa, and Bilger (1986).

Toxicity kinetics were recorded every 24 hours, during 4 days of exposure of the aquatic plants to 0, 5, 10, 15 and 20 μ g.L⁻¹ of isoproturon and to 0, 20, 40, 80 and 120 μ g.L⁻¹ of glyphosate.

Sample preparation and isoproturon analysis

Pesticide concentration in medium was determined in supernatants after centrifugation of 7 mL aliquots at 3000 g for 15 min at 4 °C. Isoproturon was extracted by addition of 3 mL dichloromethane to 5 mL of supernatant. After vigorous agitation, dichloromethane extracts containing isoproturon were collected. Then another 3 mL of dichloromethane was added to the extract and collected after agitation. The solvent was gently evaporated under nitrogen and residues were redissolved in 0.5 mL of ACN, and then stored at -20 °C before HPLC analysis. Extraction yield was 97.3 %.

For the analysis, a 20 μ L-aliquot of sample was injected into a Varian ProStar 410 HPLC system equipped with a C18 reversed phase column (100 mm × 3 mm I.D., 5 μ m particle size, Kromasil 100, Varian, Les Ulis, France) and eluted isocratically with acetonitrile (60%) and water (40%) acidified with H₃PO₄ (0,1%). Peaks were detected with a diode array detector (Varian, Prostar). Identification of pesticide was confirmed by UV spectrum and concentration was determined at 242 nm by comparison with a standard curve obtained with isoproturon certified standards (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Sample preparation and glyphosate analysis

Glyphosate concentration was determined by ion chromatography (IC) as described by Balci *et al.* (2009) using a Dionex ICS 1000 system fitted with an IonPac ICE-AS1, 25 cm x 9 mm, acidic column, linked to a column guard, and coupled with a DS6 conductivity detector containing a cell heated at 35 °C under control through Chromeleon SE software. The sensitivity of this detector was improved by electrochemical suppression. Measurements were

conducted by injecting 25 μ L of the samples, with 1mM heptafluorobutyric acid solution circulating at 0.8 mL min⁻¹ as the mobile phase. Samples were filtered onto a hydrophilic membrane (Millex-GV Millipore, 0.22 μ m) prior to analysis.

Statistical analysis

In this study, all statistical analyses were performed with SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Significant differences between controls and contaminated samples were determined by the One Way ANOVA test and P values <0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect on growth

After 24 h exposure, the growth rate of L. minor was inhibited from 17 and 33 % in presence of 5 and 20 μ g.L⁻¹ of isoproturon, respectively (Fig. 1A). For longer incubation (96 h) we noticed a non significant decrease of the inhibition to 12 and 28 % (P > 0.05), respectively. The same was observed in presence of glyphosate (Fig. 2A), with a decrease of the growth rate inhibition from 14 to 12 % at 20 μ g.L⁻¹ and from 26 to 24 % at 120 μ g.L⁻¹ of glyphosate after 24 and 96 h, respectively. These slight decreases might have been related to the decrease of herbicide concentration in the medium (see Fig. 4). Herbicide toxicity was concentration-dependent. The results for isoproturon were comparable to those of Kirby and Sheahan (1994) who found an IC_{50} of 40 $\mu g.L^{\text{-1}}$ after 10 days.



Figure 1 Inhibition (%) of A) growth rate, B) F_v/F_m , and C) q_P in presence of 5, 10, 15 and 20 µg.L⁻¹ of isoproturon in *Lemna minor*. * indicates a significant difference with the control.

For glyphosate, growth rate inhibition was slightly higher than observed in Lemna gibba exposed to a different glyphosate formulation (Sobrero, Rimoldi, and Ronco, 2007; IC₂₅ was 0.5 to 0.9 mg/L⁻¹ of Roundup[®] after 2 days) but lower than observed for algal species with technical glyphosate (Vendrell et al., 2009 ; IC50 at 26 to 40 mg.L⁻¹ after 3 days).



Figure 2 Inhibition (%) of A) growth rate, B) F_v/F_m , and C) q_P in presence of 20, 40, 80 and 120 µg.L⁻¹ of glyphosate in *Lemna minor*. * indicates a significant difference with the control.

Effect on chlorophyll a fluorescence

Inhibition of maximum quantum yield of photosynthesis (F_v/F_m) was low, under 7 % in presence of isoproturon and glyphosate (Fig. 1B and 2B). This little inhibition indicates that the PS II functioning was only slightly affected by these concentrations (under 20 and 120 µg.L⁻¹ for isoproturon and glyphosate, respectively). The maximum of inhibition was reached after 24 h.

Inhibition of photochemical quenching $(q_{\rm P})$ increased during the 4-day experiment and concentrationwas dependent, from 6 to 10 % and 17 to 20 % in presence of 5 and 20 μ g.L⁻¹ of isoproturon, respectively (Fig. 1C); and from 1 to 3 % and 9 to 11 % in presence of µg.L⁻¹ 20 and 120 of glyphosate, respectively (Fig. 2C). The photochemical quenching was used to estimate the proportion of PS II reaction centers that are 'open' (reflecting the relative oxidation state of Q_A, the first stable quinone electron acceptor of PS II reaction centers) or 'closed' (thought to reflect the relative reduction state of PS II) (Huner, Oquist, and Sarhan, 1998). According to the interpretation of Adams, Hoehn, and Demmig-Adams (1995) both herbicides induced a significant change in PS II excitation pressure of L. minor even at low concentration.

The non-photochemical quenching $(q_{\rm N})$ stimulation during the 4-day experiment, was concentration-dependent (Fig 3). The $q_{\rm N}$ stimulation was comprised between 2 and 17 % in presence of 5 to 20 $\mu g.L^{-1}$ of isoproturon (Fig. 3A); and between 13 to 27 % in presence of 20 to 120 μ g.L⁻¹ of glyphosate (Fig. 3B). The variation of the stimulation during the 4day experiment was not significant (P >0.05). The non-photochemical quenching stimulation may represent a disruption in the electron transport necessary for energy non-photochemical dissipation by processes (transthylakoid pH gradient formation, antenna movements, photoinhibition) (Horton and Hague, 1988; Ruban and Horton, 1995; Müller, Li, and Niyogi, 2001). A q_N stimulation in aquatic plants exposed to pollutants was reported earlier (Juneau, El Berdey, and Popovic, 2002; Frankart, Eullaffroy, and Vernet, 2003, Olette et al., 2008).

Lower effective concentrations for isoproturon than for glyphosate were probably due to the fact that isoproturon acts directly on PS II. Indeed, isoproturon is an inhibitor of the photosynthetic electron transport at the PS II receptor site. In contrast glyphosate may act indirectly on the photochemistry of photosynthesis as an inhibitor of EPSP synthase, which leads to depletion of key amino acids that are necessary for protein synthesis and plant



Figure 3 Stimulation (%) of q_N in presence of A) 5, 10, 15 and 20 µg.L⁻¹ of isoproturon or B) 20, 40, 80 and 120 µg.L⁻¹ of glyphosate in *Lemna minor*. * indicates a significant difference with the control.

growth and of course photosynthesis. Among parameters tested, growth rate was the most affected parameter by these two herbicides.

Choice of herbicide concentration for the remediation experiments

To be suitable for phytoremediation, a plant should maintain a good health status (tolerance) when exposed to contaminated water, to maximize efficiency of the purification process (Baker *et al.*, 2000; Sulmon *et al.*, 2007). Therefore, regarding the results of the toxicity experiment we have chosen to conduct all phytoremediation experiments at 10 μ g.L⁻¹ isoproturon and 80 μ g.L⁻¹ glyphosate. At these concentrations, the variations in the parameters tested, were low and always under 25 % for glyphosate and isoproturon.

Removal of isoproturon

Decrease of isoproturon concentration in the medium, with or without plant, was rapid decreasing from 10 to approximately 6 μ g.L⁻¹ after 1 day. After 2 days, decrease of isoproturon concentration was even faster when plants were present. However, even after 4 days the difference of isoproturon concentration between medium containing or not L. minor was not significant (Fig. 4A; P > 0.05), even though the medium contained 12 % less isoproturon after 96 h in the presence of L. minor. The removal rate was 7.1 µg.g⁻¹ Fresh Weight (FW), 96 exposure. The after h high disappearance of isoproturon in the control without plants (52 %, after 4 days) was also observed in case the experiment was repeated in the dark, in sterile condition or with ultrapure water instead of medium. Since no significant pesticide amount could be found adsorbed on the glass container, high degradation is suspected, which cannot be due to photosynthetic activity (similar experiments run in the dark showed same result) nor to microbial



Figure 4 Concentration $(\mu g.L^{-1})$ of A) Isoproturon and B) Glyphosate in the medium after incubation without plant (control) or in presence of *Lemna minor*.

activity due to axenic condition.

This experiment indicates a much higher disappearance of isoproturon than was observed after 21 days by Böttcher and Schroll (2007), this may be due to the higher initial concentration ($60 \ \mu g.L^{-1}$) used by these authors, which according to our toxicity experiments represent a serious stress for the plants. The part of isoproturon disappearance that could be attributed to the presence of plants was probably due to accumulation inside the plants of parent herbicide since it is poorly metabolized by *L. minor* (Böttcher and Schroll, 2007) and its half life ranges from 13 to 35 days (10 μ g.L⁻¹ as initial concentration; Merlin *et al.*, 2002) in microcosms.

chemical Among properties, hydrophobicity is one of the most important for the removal potential of plants. Organic chemicals with an octanolwater partition coefficient $(\log K_{ow})$ between 0.5 and 3 are considered hydrophobic compounds that are able to move through the lipid bilayer of membranes, but still water-soluble enough to travel into the cell fluids (Cedergreen et al., 2005). Isoproturon, with a log K_{ow} of 2.5, can enter plants rapidly, explaining why the maximum removal rate was reached within 24 - 48 h. This was also observed with Elodea densa (Feurtet-Mazel et al., 1996), with a maximum of bioaccumulation occurring after 2 days. The slow disappearance of isoproturon between day 2 and day 4 could be explained by a recent study in which the H-bonding factors may influence the uptake process over and above simple partitioning (De Carvalho el al., 2007), a possible slow degradation of the herbicide inside the plant could not be totally excluded.

Removal of glyphosate

The decrease of glyphosate concentration in the medium was slow

during the 4-d experiment (Fig. 4B), and this decrease was not significant (P >0.05). Nevertheless, glyphosate concentration decreased 8 % in the medium of the control without plant and additional observed an 11 % we disappearance in presence of plants, after 4 days. After 96 h of exposure the removal rate was 53.2 μ g.g⁻¹ FW. With a low octanol-water partition coefficient (log = -3.2), glyphosate is Kow more than isoproturon. hydrophilic As а consequence, it is more difficult for glyphosate to pass through membranes and infiltrate plants than it is for isoproturon (Pilon-Smits, 2005). A lower uptake could explain why glyphosate was eliminated slowly and constantly by L. minor. Some authors found a relationship between sensitivity of plants and removal, due to the toxic effect of internal pollution (Tang, Hoagland, and Siegfried, 1998; Weiner, DeLorenzo, and Fulton, 2004). Here, plants were moderately sensitive to glyphosate, and no significant variation of this sensitivity was noticed during the 4-d experiment. This could be due at least in part to the low removal of herbicide by L. moderate sensitivity minor. The to glyphosate might also be due to the short duration of experiment since; plants treated with glyphosate slowly die over a period of days or weeks (Bresnahan et al., 2003).

CONCLUSIONS

Toxicity of isoproturon and glyphosate are concentration-dependent regardless of the parameter taken into consideration (growth rate or chlorophyll *a* fluorescence). We found 25 % and 8 % disappearance of isoproturon and glyphosate due to the presence of *L. minor* after 4 days of experiment. The higher disappearance of isoproturon could be due to the difference of log K_{ow} but a possible degradation inside the plants could not be excluded. Here, low sensitivity to the herbicides tested during the 4-d experiment may be related to a low uptake of herbicides by *L. minor*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is a part of the "Contrat d'objectifs AQUAL" and is funded by the city of Reims and the Agence de l'Eau Seine-Normandie. The authors are grateful to Pr. E. Guillon (ICMR-GCC, University of Reims) for the HPLC equipment.

REFERENCES

Adams, W.W., Hoehn, A., Demmig-Adams, B. 1995. Chilling temperatures and the xanthophyll cycle. A comparison of warm-grown and overwintering spinach. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 75–85.

Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*, pp. 85–107 (Terry, N. and Baňuelos, G., Eds.). Lewis Publishers CRC, Boca Raton.

Balci, B., Oturan, M.A., Oturan, N., Sirés, I. 2009. Decontamination of Aqueous Glyphosate, (Aminomethyl) phosphonic Acid, and Glufosinate Solutions by Electro-Fenton-like Process with Mn²⁺ as the Catalyst. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4888–4894.

Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weakness and prospects. *Pest Manag. Sci.* 56, 299–308.

Bi Fai, P., Grant, A., Reid, B. 2007. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1520–1531.

Böttcher, T., Schroll, R. 2007. The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. *Chemosphere* 66, 684–689.

Bresnahan, G.A., Manthey, F.A., Howatt, K.A., Chakraborty, M. 2003. Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). *J. Agr. Food Chem.* 51, 4004–4007.

Cedergreen, N., Streibig, J.C. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: Assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag. Sci.* 61, 1152–1160.

Cedergreen, N., Andersen, L., Olesen, C.F., Spliid, H.H., Streibig, J.C. 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on Kow or mode of action? *Aquat. Toxicol.* 71, 261–271.

Chollet, R. 1993. Screening of inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with a *Lemna* assay. In: *Target Assay for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds*, pp. 143–149 (Böger, P. and Sandmann, G., Eds.). Lewis Publisher, London, UK.

Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393–397.

Dabrowski, J.M., Schulz, R. 2003. Predicted and measured levels of azinphosmethyl in the Lourens River, South Africa: Comparison of runoff and spray drift. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 494–500.

De Carvalho, R.F., Bromilow, R.H., Greenwood, R. 2007. Uptake of pesticides from water by curly waterweed *Lagarosiphon major* and lesser duckweed *Lemna minor*. *Pest. Manag. Sci.* 63, 789–797.

Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P.P. 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 39, 754–781.

Dietz, A.C., Schnoor, J.L. 2001. Advances in phytoremediation. Environ. *Health Perspect*. 109 (Suppl. 1), 163–168.

Dosnon-Olette, R., Couderchet, M., Eullaffroy, P. 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate. *Ecotox. Environ. Safe*. in press.

Ducruet, J.M. 1991. Les herbicides inhibiteurs du photosynstème II. In: *Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation*, pp. 79-114 (Scalla, R. ; Eds.), Paris, INRA.

Eapen, S., Singh, S., D'souza, S.F. 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.* 25, 442–451.

Feurtet-Mazel, A., Grollier, T., Grouselle, M., Ribeyre, F., Boudou, A. 1996. Experimental study of bioaccumulation and effects of the herbicide isoproturon on freshwater rooted macrophytes (*Elodea densa* and *Ludwigia natans*). *Chemosphere* 32, 1499–1512.

Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environ. Exp. Bot.* 49, 159–168.

Gao, J., Garrison, A.W., Hoehamer, C., Mazur, C.S., Wolfe, N.L. 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6114–6120.

Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1990. The relationship between non-photochemical quenching of fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. *Photosynth. Res.* 25, 249–257.

He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125–140.

Hennebert, P., Clarin, N., Pottecher, G., Foesser, F., Groff, H. 2009. Runoff of 42 pesticides in Champagne vine during 2005 and proposal for agro-environmental actions – project LIFE SWAP-CPP. In: *Pesticides*, (Grégoire *et al.* Eds), Presses de l'ULP, Strasbourg, France, in press.

Huner, N.P.A., Oquist, G., Sarhan, F. 1998. Energy Balance and Acclimation to Light and Cold. *Trends Plant Sci.* 3, 224–230.

Horton, P., Hague, A., 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 932, 107–115.

Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R. 2002. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 155-164.

Juneau, P., Qiu, B., Deblois, C.P. 2007. Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. *Toxicol. Environ. Chem.* 89, 609–625.

Kirby, M.F., Sheahan, D.A. 1994. Effects of atrazine, isoproturon, and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmus subspicatus*. *B. Environ. Contam. Tox.* 53, 120-126.

Kloeppel, H., Koerdel, W., Stein, B. 1997. Herbicide transport by surface runoff and herbicide retention in a filter strip rainfall and runoff simulation studies. *Chemosphere* 35, 129–141.

Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer, S.T. 2005. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Sci. Total Environ.* 354, 191–197.

Merlin, G., Vuillod, M., Lissolo, T., Clement, B. 2002. Fate and bioaccumulation of isoproturon in outdoor aquatic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1236–1242.

Moore, M.T., Cooper, C.M., Smith Jr., S., Cullum, R.F., Knight, S.S., Locke, M.A., Bennett, E.R. 2007. Diazinon Mitigation in Constructed Wetlands: Influence of Vegetation. *Water Air Soil Pollut*. 184, 313–321.

Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566.

Olette, R., Couderchet, M., Biagianti, S., Eullaffroy, P. 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. *Chemosphere* 70, 1414–1421.

Peterson, H.G., Boutin, C., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., Moody, M.J. 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at Expected Environmental Concentrations. *Aquat. Toxicol.* 28, 275–292.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15–39.

Ruban, A.V., Horton, P. 1995. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 221–230.

Salvato, J.A., Nemerow, N.L., Agardy, F.J. 2003. In: *Environmental Engineering*, pp. 1584 (Wiley, Eds.). New York, USA.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51–62.

Schröder, P., Collins, C. 2002. Conjugating Enzymes Involved in Xenobiotic Metabolism of Organic Xenobiotics in Plants. *Int. J. Phytorem.* 4, 247–265.

Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., El Amrani, A., Couée, I. 2007. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in Arabidopsis thaliana. *Environ. Pollut.* 145, 507–515.

Sobrero, M.C., Rimoldi, F., Ronco, A.E. 2007. Effects of the Glyphosate Active Ingredient and a Formulation on *Lemna gibba* L. at Different Exposure Levels and Assessment End-Points. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 537–543.

Tang, J., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D. 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1085–1090.

Tront, J.M., Saunders, F.M. 2006. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5-trichlorophenol. *Chemosphere* 64, 400–407.

Vendrell, E., Gómez de Barreda Ferraz, D., Sabater, C., Carrasco, J.M. 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of Phytoplankton: A Microplate Bioassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 538–542.

Vermaas, W. 1993. Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 457–481.

Weiner, J.A., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H. 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat. Toxicol.* 68, 121–128.

Woodburn, A. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag. Sci.* 56, 309–312.

Dans cette **PARTIE 1**, l'étude de la toxicité des quatre pesticides sur les sept plantes aquatiques nous a permis de déterminer les concentrations en polluants auxquelles nous avons mené nos expériences de phytoremédiation. Ces concentrations n'induisent aucune variation supérieure à 30% des paramètres de toxicité testés (taux de croissance, F_v/F_m , q_P et q_N). Ce seuil arbitraire retenu, permet d'avoir un bon compromis entre des plantes dans un état physiologique satisfaisant et des concentrations en polluants suffisantes pour permettre de les quantifier aisément dans le milieu voire même dans les plantes (cas des fongicides).

Les plantes sélectionnées ont montré différentes sensibilité vis-à-vis des pesticides testés. On constate que *C. aquatica*, *L. minor* et *S. polyrhiza* sont plus tolérantes que *C. palustris* et *E. canadensis* au diméthomorphe et au pyriméthanil. Chez les algues, on n'observe pas de différence de sensibilité en présence de pyriméthanil; par contre, *Sc. obliquus* est plus sensible que *Sc. quadricauda* vis à vis du diméthomorphe et de l'isoproturon, aux concentrations testées.

Ces études nous ont permis de vérifier le faible impact des fongicides sur les plantes, puisque la concentration retenue pour ces derniers est relativement importante (*i.e.* 600 μ g.L⁻¹). Les herbicides testés, au contraire, montrent une toxicité élevée même à de faibles concentrations. C'est notamment le cas de l'isoproturon qui agit directement au niveau du PS II. Ainsi, nous avons retenu comme concentrations pour le glyphosate et l'isoproturon, 80 et 10 μ g.L⁻¹, respectivement. Dans la publication IV, un seuil de variation des biomarqueurs de 25% a été retenu pour avoir une homogénéité au niveau de la concentration en isoproturon avec la **publication III**. Ces concentrations sont en relation avec celles détectées dans les eaux superficielles et celles des bassins de collecte des eaux de ruissellement du vignoble de la région. En effet, ces concentrations peuvent atteindre 406 μ g.L⁻¹ pour le diméthomorphe, 353 μ g.L⁻¹ pour le pyriméthanil, 165 μ g.L⁻¹ pour le glyphosate et 32 μ g.L⁻¹ pour l'isoproturon (Tab. 1.1 ; **ANNEXE 1** : Abbassi, 2006).

Les témoins sans plante, avec plantes mortes ou mises à l'obscurité, nous ont permis d'évaluer la quantité de pesticides adsorbée et/ou absorbée par les plantes, notamment pour les fongicides. La présence des macrophytes permet une disparition du milieu de 9 à 48 μ g.g⁻¹ de MF de diméthomorphe, de 3 à 33 μ g.g⁻¹ de MF de pyriméthanil, de 7 μ g.g⁻¹ de MF d'isoproturon et 53 μ g.g⁻¹ de MF de glyphosate, après 4 jours d'exposition. La présence des algues induit une disparition du milieu de 36 et 40 μ g de diméthomorphe pour 10⁹ cellules, de 17 et 26 μ g de pyriméthanil pour 10⁹ cellules et de 1 et 1 μ g d'isoproturon pour 10⁹ cellules en présence de *Sc. obliquus* et de *Sc. quadricauda*, respectivement après 4 jours d'exposition. On constate le faible prélèvement de l'isoproturon par les plantes. De plus, ce dernier disparait du milieu de façon très importante chez le témoin sans plante, *i.e.* 52 % après 4 jours. Cette forte disparition, dont nous ne connaissons pas les causes, est en contradiction avec d'autres résultats de la littérature.

Que ce soit chez les macrophytes ou chez les algues, on observe un prélèvement plus important du diméthomorphe que du pyriméthanil alors que les expériences sont réalisées avec la même quantité initiale de substances actives (600 μ g.L⁻¹) et la même biomasse. Cette différence serait principalement due aux adjuvants présents dans les solutions commerciales et plus particulièrement aux surfactants qui ont pour rôle de faciliter la pénétration du pesticide dans la plante. En effet, la même expérience réalisée avec les deux molécules actives pures montrent le prélèvement d'une quantité plus faible, mais surtout identique, de celles-ci (7 %). Les produits formulés seraient donc plus efficacement « phytoremédiés ».

Les lemnacées sont plus performantes que les autres macrophytes dans le prélèvement des deux fongicides. Une des hypothèses avancée est leur faible ratio biomasse/concentration. Cette hypothèse va être vérifiée dans la **PARTIE 2** avec l'étude de l'effet de la concentration initiale en pesticide et de la variation de la densité de population sur la toxicité et le prélèvement du diméthomorphe.

On note également que les plantes qui prélèvent le plus de pesticides, ne présentent pas forcément de signe de toxicité dû à cette accumulation. Une des hypothèses avancées serait qu'elles possèdent un mécanisme de détoxication des pesticides plus efficace. De plus, les quantités de pesticides retrouvées dans les plantes (**ANNEXE 3** et **publication III**) sont, dans la plupart des cas, nettement inférieures à celles disparues du milieu. Une détoxication des fongicides semblerait donc avoir lieu au sein des plantes. Les mécanismes mis en jeu au cours de cette détoxication seront étudiés dans la **PARTIE 3**.

Partie 2 : Effet de différents paramètres sur la remédiation du diméthomorphe

Publication V

Influence of initial concentration and population density on dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species.

Rachel Dosnon-Olette, Michel Couderchet, Achouak El Arfaoui, Stéphanie Sayen, Philippe Eullaffroy

Soumise

Influence of initial concentration and population density on dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species.

Rachel Dosnon-Olette¹, Michel Couderchet¹, Achouak El Arfaoui², Stéphanie Sayen², and Philippe Eullaffroy^{*1}

¹Laboratoire Plantes, Pesticides et Développement Durable (PPDD), URVVC-SE EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims, Cedex 2, France.

²Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR, UMR CNRS 6229), Groupe Chimie de Coordination, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims, Cedex 2, France.

*Corresponding author: philippe.eullaffroy@univ-reims.fr

Abstract

Aquatic plants take up, transform and sequester organic contaminants and may therefore be used in phytoremediation for the removal of pollutants from wastewaters. A better understanding of factors affecting the rate of contaminant uptake by aquatic plants is needed to improve engineered systems for removal of pollutants from wastewaters. This work focused on the influence of initial concentration and population density on toxicity and uptake of the fungicide dimethomorph by two duckweed species. An increase of sensitivity to dimethomorph was observed with increasing population density. Less light, due to crowding, may explain this higher sensitivity and reduced removal rate. A positive relationship was also found between toxicity or contaminant uptake and initial pesticide concentration with a maximal removal of 41 and 26 μ g.g⁻¹ fresh weight of dimethomorph (at 600 μ g.L⁻¹ of dimethomorph and an initial density of 0.10 g.E-flask⁻¹) by <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>, respectively. This research also indicates that these aquatic plants can efficiently eliminate organic contaminants and may ultimately serve as phytoremediation agents in the natural environment.

Keywords: accumulation, aquatic plant, biomass, pesticide, remediation, xenobiotic.

1. Introduction

Phytoremediation is an emerging cost-effective and eco-friendly technology that utilizes plants to remove, transform, or stabilize a variety of contaminants located in water, sediments, or soils (Greger, 1999; Prasad et al., 2006). The aquatic and wetland plant species gained importance worldwide as they depict exorbitant efficiency to remove variety of contaminants, including heavy metals, radionuclides, explosives, and organic/inorganic pollutants from wastewaters (Dhir et al., 2009; Peng et al., 2009). However data showing the potential of aquatic plants for remediating pesticide contaminated media emerged recently (Gao et al., 2000; De Carvalho, et al., 2007; Dosnon-Olette et al., 2009; Moore et al. 2009).

Among aquatic plant species, duckweeds are characterized as plants with high remediation capacities for heavy metals and nutrients (Gaur et al., 1994; Cedergreen and Madsen, 2002; Axtell et al., 2003; Miretzky et al., 2004). Recently, it has been shown that Lemnaceae species may also be considered as good candidates to efficiently remove pesticides from contaminated water (Gao et al., 2000; Fujisawa et al., 2006; De Carvalho et al., 2007; Olette et al., 2008; Dosnon-Olette et al., 2009).

It has been shown in previous phytoremediation studies on heavy metals that initial population density, metal concentration, and plant sensitivity may influence removal rate (Mallick and Rai, 1993; Pradhan and Rai, 2000; Weng et al., 2005; Dasgupta-Schubert et al., 2007; Demirezen et al., 2007; Natarajan et al., 2008). For pesticides, only few studies are available on the influence of such parameters on removal ability of aquatic macrophytes (Wolverton et al., 1975; Grollier et al., 1997; Knuteson et al., 2002; Amaya-Chávez et al., 2006; Moore et al., 2009). Therefore, before running full-scale phytoremediation field applications, it is important to understand the influence of pollutant load and plant density on pesticide toxicity and removal efficiency of aquatic plants.

In the present work, the influence of initial population density and pesticide concentration on sensitivity and removal efficiency of some selected aquatic plants (<u>i.e.</u> <u>Lemna minor</u> and <u>Spirodela polyrhiza</u>) was studied using dimethomorph as model pesticide. Dimethomorph is a fungicide commonly used in agricultural and viticultural activities to control downy mildew on vines, and to control late blight on tomatoes and potatoes (Albert et al., 1991). It is a cinnamic acid derivative and a member of the morpholine chemical family. Although its biochemical mode of action is not clearly elucidated (Gisi and Sierotzky 2008), it has been described as inhibiting cell wall formation of fungi. Dimethomorph is one of the most frequently detected compound in runoff water in the Champagne area (Hennebert et al., 2009).

2. Materials and Methods

2.1 Plant Material

<u>Lemna minor</u> was collected from ponds in the Champagne area (France) and <u>Spirodela</u> <u>polyrhiza</u> (clone SJ) was kindly provided by Prof. Dr. Klaus Appenroth (University of Jena, Germany). Cultures of duckweeds (<u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>) were maintained in large crystallizing dishes containing growth medium (Chollet, 1993) at pH 6.5 \pm 0.5 and placed at 23 \pm 2°C under continuous light (65 µmol photosynthetic active radiation (PAR) m⁻² s⁻¹) provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania Gro Lux F36W, Germany). The plants were subcultured twice a week.

For experiment, different population densities were used: 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 g of Fresh Weight (FW) per Erlenmeyer flask (E-flask) for <u>L. minor (i.e.</u> 32, 64, 96 and 128 fronds) and <u>S. polyrhiza (i.e.</u> 6, 12, 18 and 24 fronds). Duckweeds were placed on 100 mL of growth medium in 250-mL Erlenmeyer flasks (<u>i.e.</u> surface area: 50.3 cm^2) stoppered with cotton wool to limit evaporation.

2.2 Experimental design and pesticide contamination procedure

Dimethomorph ((E,Z)4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl] morpholine) was used formulated as Forum[®] (150 g.L⁻¹ of active ingredient, a.i. BASF Agro, France). The actual amount of the a.i. in the source products Forum [®] was analysed; we found that this amount was 10% higher (165 g.L⁻¹) than the nominal concentration. The amount of formulated product required to achieve our nominal test concentrations was calculated on the basis of this analysis. Moreover, pesticide concentrations given in this study always refer to the actual concentration of a.i., and not to its nominal concentrations. All stock solutions were prepared immediately before the experiments.

In this study, different concentrations of dimethomorph were tested: 25, 50, 75, 150, 300 and 600 μ g.L⁻¹. All experiments were performed in triplicate. Two different controls were carried out in parallel: (# 1) plants in a pesticide free medium; (# 2) medium containing pesticides but free of plants. The aqueous culture media were sampled (2 mL) every 24 h, for pesticides analysis. No pesticide was detected in control # 1.

2.3 Toxicity assessments

Growth rate of duckweed was assessed by counting the number of fronds with a coefficient applied in function of their development stage: 1 for a mature fully expanded frond to 0.25 for a young growing frond. Growth rates were calculated according to the equation:

 $\mathbf{r} = \left(\left(\ln x_{t2} - \ln x_{t1} \right) / \left(t_2 - t_1 \right) \right) \times 100 ;$

where x_{t1} is the number of fronds at day t_1 , x_{t2} is the number of fronds at day t_2 .

In vivo chlorophyll fluorescence emissions were recorded to study the functioning of the photosynthetic apparatus of plants exposed to pesticides. For this purpose, a pulse amplitude modulated spectrofluorometer (PAM-Walz[®], Effeltrich, Germany) was used. Before measurements, plants were placed in the dark for 15 min at 23 ± 2 °C. The maximum photosynthetic capacity (also called maximum quantum yield of photosystem II primary photochemistry) was estimated by the ratio $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ for dark adapted leaves (Genty et al., 1990). The photochemical ($\underline{q}_P = (F'_m - F_s)/(F'_m - F'_o)$) and non-photochemical ($\underline{q}_N = 1 - ((F'_m - F'_o)/(F_m - F_o))$) quenching were determined as in Schreiber et al. (1986). Plant health status was monitored every 24 hours.

2.4 Determination of dimethomorph concentration in cultures

Pesticide concentration in cultures was determined in supernatants after centrifugation of 2 mL aliquots at 3000*g* for 10 min at 4 °C. Acetonitrile (200 μ L) was added to the supernatants (Gonzáles-Barreiro et al., 2006). The samples were stored at -20 °C before HPLC analysis. The removal of dimethomorph expressed in μ g per liter was calculated as the difference between concentration of dimethomorph in the control without plant (# 2) and the concentration in the medium with plants. The removal capacity of plants was also expressed as μ g per gram FW (<u>i.e.</u> removal rate).

2.5 HPLC analysis

A 20 μ L-aliquot of medium sample was injected into a Varian ProStar 410 HPLC system equipped with a C18 reversed phase column (100 mm × 3 mm, 5 μ m particle size, Kromasil 100, Varian, Les Ulis, France) and eluted isocratically with acetonitrile (60%) and water (40%) acidified with H₃PO₄ (0.1%). Peaks were detected with a diode array detector (Varian, Prostar). Identification of the fungicide was confirmed by UV spectrum and concentration was determined at 246 nm by comparison with a standard curve obtained with dimethomorph certified standard (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.6 Statistical analysis

In this study, all statistical analyses were performed with SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Significant differences between controls and contaminated samples were determined by One Way ANOVA and P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1 Effect on growth rate

The increase of dimethomorph concentration (25 to 600 μ g.L⁻¹) in the medium resulted in a decrease of the growth rate, with an inhibition up to 21% and 19% at 600 μ g.L⁻¹ for <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> after 4 days of exposure, respectively (Tab 1). Growth rate was significantly (P < 0.05) affected from 300 μ g.L⁻¹ for <u>L. minor</u> and from 150 μ g.L⁻¹ for <u>S. polyrhiza</u>. However, no significant difference of sensitivity was observed between the two plants. The growth rate was strongly correlated to the concentration (r² = 0.976 and r² = 0.990 for <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>, respectively), following an exponential regression model

(growth rate = $-1.83 \ln [dimethomorph] + 38.74$ and growth rate = $-1.82 \ln [dimethomorph] + 41$ for <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>, respectively).

Dimethomorph $(\mu g.L^{-1})$	Lemna minor		Spirodela polyrhiza		
	Growth rate	Inhibition (%)	Growth rate	Inhibition (%)	
0	33 ± 1	0	36 ± 1	0	
25	32 ± 1	3 ± 3	35 ± 1	3 ± 3	
50	32 ± 1	3 ± 3	34 ± 1	6 ± 3	
75	31 ± 1	6 ± 3	33 ± 1	8 ± 3	
150	30 ± 1	9 ± 3	$32 \pm 1^*$	11 ± 3	
300	$29 \pm 1^*$	$12 \pm 3^{*}$	$31 \pm 1^*$	$14 \pm 3^{*}$	
600	$26 \pm 1^*$	$21 \pm 3^{*}$	$29 \pm 1^*$	$19 \pm 3^{*}$	

Table 1: Growth rate and growth rate inhibition (%) of <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> exposed 96 h to dimethomorph at 25, 50, 75, 150, 300, and 600 μ g.L⁻¹, in presence of 0.10 g.E-flask⁻¹ as initial plant density. * significantly different from control (P < 0.05).

An increase of the initial population density (from 0.05 to 0.20 g.E-flask⁻¹) influenced the toxicity of 600 μ g.L⁻¹ of dimethomorph (Tab. 2). The growth rate inhibition of <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> was directly correlated to the initial plant density (r² = 0.966 and r² = 0.981, respectively). A 4-fold increase of the initial population density induced an increase of approximately 1.5 times of the growth rate inhibition (Tab. 2). A significant increase in dimethomorph toxicity was observed in <u>L. minor</u> and in <u>S. polyrhiza</u> with the increase of the initial plant density (P < 0.05). However, no significant difference in sensitivity was observed between the two plants. The study of control and contaminated plant morphogenesis showed that plant size and root length were remarkably reduced by an increase in plant density, especially for <u>L. minor</u>.

Table 2: Growth rate and growth rate inhibition (%) of <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> exposed 96 h to dimethomorph at 600 μ g.L⁻¹, in presence of 0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 g.E-flask⁻¹ as initial plant density. * significantly different from control (P < 0.05).

	Lemna minor			<u>Spirodela polyrhiza</u>		
Plant density	Gr	owth rate	Inhibition	Growth rate		Inhibition
(g.E-flask ⁻¹)	Control	Contaminated	(%)	Control	Contaminated	(%)
0.05	35 ± 1	$31 \pm 1^{*}$	$16 \pm 3^{*}$	38 ± 1	$32 \pm 1^{*}$	$16 \pm 3^{*}$
0.10	33 ± 1	$26 \pm 1^*$	$21 \pm 3^{*}$	36 ± 1	$29 \pm 1^*$	$19 \pm 3^{*}$
0.15	30 ± 1	$23 \pm 1^*$	$23 \pm 3^*$	32 ± 1	$25 \pm 1^*$	$22 \pm 3^{*}$
0.20	27 ± 1	$20\pm1^{*}$	$26 \pm 3^*$	29 ± 1	$22 \pm 1^*$	$24 \pm 3^{*}$





Figure 1: Inhibition (%) of a) the maximal quantum yield of photosynthesis (F_v/F_m) and b) the photochemical quenching (q_P); and c) stimulation (%) of the non-photochemical quenching (q_N) in <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> exposed 96 h to dimethomorph at 25, 50, 75, 150, 300, and 600 µg.L⁻¹, in presence of 0.10 g.E-flask⁻¹ as initial plant density. * significantly different from control (P < 0.05).



Figure 2: Inhibition (%) of a) the maximal quantum yield of photosynthesis (F_v/F_m) and b) the photochemical quenching (q_P); and c) stimulation (%) of the non-photochemical quenching (q_N) in <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> exposed 96 h to dimethomorph at 600 µg.L⁻¹, in presence of 0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 g.E-flask⁻¹ as initial plant density. * significantly different from control (P < 0.05).

The increase of dimethomorph concentration in the medium had an effect on plant photosynthesis as reflected by a slight F_v/F_m ratio inhibition, which was lower than 4 % after 96 h (Fig. 1a). This inhibition of F_v/F_m was significant compared to the control from 75 µg.L⁻¹ and 600 µg.L⁻¹ for <u>S. polyrhiza</u> and <u>L. minor</u>, respectively. <u>S. polyrhiza</u> was significantly (P < 0.05) more sensitive than <u>L. minor</u> for concentration from 150 to 600 µg.L⁻¹.

The increase of initial plant density (0.05 to 0.20 g.E-flask⁻¹) induced a higher F_v/F_m inhibition (Fig. 2a). This inhibition was significant compared to the control regardless of the initial densities exposed to 600 µg.L⁻¹. <u>S. polyrhiza</u> was significantly (P < 0.05) more

sensitive than <u>L. minor</u> at 600 μ g.L⁻¹ for an initial plant density comprised between 0.05 and 0.15 g.E-flask⁻¹.

3.3 Effect on Photochemical Quenching (\underline{q}_{P})

The increase of dimethomorph concentration in the medium induced an increase of \underline{q}_{p} inhibition, up to 9 % after 96 h (Fig. 1b). This inhibition was significant compared to the control from 75 µg.L⁻¹ and 300 µg.L⁻¹ for <u>S. polyrhiza</u> and <u>L. minor</u>, respectively. However, no significant difference of sensitivity was observed between the two plants.

The increase of initial plant density (0.05 to 0.20 g.E-flask⁻¹) induced an increase of \underline{q}_{p} inhibition (Fig. 2b). This inhibition was significant for all the initial densities tested at 600 μ g.L⁻¹. A slight increase of \underline{q}_{p} inhibition was observed that was correlated with an increase of the initial population density ($r^{2} = 0.920$ and $r^{2} = 0.998$ for <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>, respectively). It seemed that \underline{q}_{p} was more affected in <u>S. polyrhiza</u> than in <u>L. minor</u>. However, a significant difference between the two duckweed species was only observed at 0.05 g.E-flask⁻¹ of Lemnaceae (P < 0.05).

3.4 Effect on Non-Photochemical Quenching (\underline{q}_N)

The increase of dimethomorph concentration in the medium induced an increase of \underline{q}_N stimulation, up to 14 and 18 % after 96 h, for <u>S. polyrhiza</u> and <u>L. minor</u>, respectively (Fig. 1c). This stimulation was significant compared to the control from 150 µg.L⁻¹ and 300 µg.L⁻¹ for <u>S. polyrhiza</u> and <u>L. minor</u>, respectively. <u>S. polyrhiza</u> was significantly (P < 0.05) more sensitive than <u>L. minor</u>, after 96 h, in presence of an initial concentration of 50 and 75 µg.L⁻¹ of dimethomorph.

With the lowest plant density tested, \underline{q}_N was stimulated by dimethomorph and a significant stimulation of \underline{q}_N was noticed regardless of the initial population density exposed to dimethomorph. The increase of initial <u>L. minor</u> density induced an increase of \underline{q}_N stimulation, up to 18 % after 96 h (Fig. 2c). No significant influence of this initial biomass was observed on the \underline{q}_N stimulation of <u>S. polyrhiza</u>. However, <u>S. polyrhiza</u> was significantly (P < 0.05) more sensitive than <u>L. minor</u> at 0.05 g.E-flask⁻¹ as initial plant density.

3.5 Effect on dimethomorph removal

	Lemna minor		Spirode	Spirodela polyrhiza		
Dimethomorph $(\mu g.L^{-1})$	Removal (µg.L ⁻¹)	Removal (µg.g ⁻¹ FW)	Removal (µg.L ⁻¹)	Removal (µg.g ⁻¹ FW)		
25	9 ± 1	3 ± 1	8 ± 1	2 ± 1		
50	14 ± 1	4 ± 1	13 ± 1	3 ± 1		
75	20 ± 1	6 ± 1	17 ± 1	4 ± 1		
150	33 ± 2	10 ± 2	21 ± 1	6 ± 1		
300	60 ± 3	19 ± 2	39 ± 2	11 ± 2		
600	115 ± 4	41 ± 4	83 ± 3	26 ± 2		

Tab 3: Removal rate of dimethomorph (in $\mu g.L^{-1}$ and in $\mu g.g^{-1}$ FW) by <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u> exposed 96 h to dimethomorph at 25, 50, 75, 150, 300, and 600 $\mu g.L^{-1}$, in presence of 0.10 g.E-flask⁻¹ as initial plant density.

With the increase of dimethomorph initial concentration (25 to 600 μ g.L⁻¹) we observed an augmentation of the removal rate from 9 to 115 μ g.L⁻¹ (<u>i.e.</u> 3 to 41 μ g.g⁻¹ FW) for <u>L. minor</u> and from 8 to 83 μ g.L⁻¹ (<u>i.e.</u> 2 to 26 μ g.g⁻¹ FW) for <u>S. polyrhiza</u> (Tab 3). Between 150 and 600 μ g.L⁻¹ <u>L. minor</u> was significantly (P < 0.05) more efficient in the removal of dimethomorph than <u>S. polyrhiza</u>. The removal rate was positively correlated with the initial concentration of dimethomorph (r² > 0.99).

Tab 4: Removal rate of dimethomorph (in $\mu g.L^{-1}$ and in $\mu g.g^{-1}$ FW) by <u>L. minor</u> and <u>S.</u> <u>polyrhiza</u> exposed 96 h to dimethomorph at 600 $\mu g.L^{-1}$, in presence of 0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 g.E-flask⁻¹ as initial plant density.

	Lemna minor			Spirodela polyrhiza		
Plant density	Removal	Removal		Removal	Removal	
(g.E-flask ⁻¹)	$(\mu g.L^{-1})$	$(\mu g.g^{-1} FW)$	_	$(\mu g.L^{-1})$	$(\mu g.g^{-1} FW)$	
0.05	88 ± 3	52 ± 4		49 ± 2	27 ± 2	
0.10	115 ± 4	41 ± 4		83 ± 3	26 ± 2	
0.15	122 ± 4	32 ± 3		99 ± 3	24 ± 2	
0.20	133 ± 4	30 ± 3		105 ± 4	22 ± 2	

Dimethomorph elimination was stimulated by an increase of the initial population density (from 0.05 to 0.20 g.E-flask⁻¹) to reach a maximum of 133 μ g.L⁻¹ and 105 μ g.L⁻¹ removed from contaminated water by <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>, respectively (Tab 4). The elimination was correlated to the initial population density (r² > 0.89; [removal] = 284 x plant density + 79 and [removal] = 368 x plant density + 38 for <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>,

respectively). However, per gram of plant fresh weight a negative relationship was found between density and fungicide removal efficiency of the two Lemnaceae species (from 52 down to 30 μ g.g⁻¹ FW and from 27 down to 22 μ g.g⁻¹ FW for <u>L. minor</u> and <u>S. polyrhiza</u>, respectively). This decrease in efficiency per g of FW was only significant for <u>L. minor</u>.

4. Discussion

4.1 Dimethomorph toxicity

The toxicity of dimethomorph is concentration-dependent regardless of the parameter taken into consideration. According to Adams et al. (1995), the slight effect on F_v/F_m and q_P showed that the PS II functioning and excitation pressure was little affected by dimethomorph although the quenching process of the chlorophyll fluorescence not related to photochemistry (i.e. q_N) was stimulated indicating a dissipation of the excess-radiant energy into heat in the PSII antenna complexes (Roháček, 2002; Stefanov and Terashima, 2008). Overall, this morpholine fungicide affected very moderately all endpoints tested with a maximum effect on growth rate (i.e. 21% inhibition) despite the high concentrations tested, up to 600 μ g.L⁻¹. These results confirm previous experiments which concluded on the minor impact of fungicides on growth rate and chlorophyll <u>a</u> fluorescence in aquatic plants (Frankart et al., 2002; Dewez et al., 2005; Olette et al. 2008; Dosnon-Olette et al. 2009).

Our laboratory experiments showed that there is a relationship between crowding and toxicity, especially for growth rate. Indeed, increasing initial plant density was directly correlated with decreasing growth rate. Moreover, from a morphogenetic point of view, plant size and root length were remarkably reduced by an increase in plant density. These results are in agreement with previous studies which showed that the reduction of plant size may be caused by a stronger intraspecific competition of the plants (Schäfer and Honermeier, 2006; Demirezen et al., 2007). It is also likely that, at increased plant density, light becomes a limiting factor due to overlapping fronds; they are piled up in several layers inducing a light limitation in the lower ones (Clatworthy and Harper, 1962; Weiner, 1990; Driever et al., 2005). Light limitation, due to crowding, may also explain the decrease of the photosynthetic performance (i.e.: F_v/F_m , g_N , g_P).

4.2 Dimethomorph removal

As it could have been expected, higher initial dimethomorph concentration resulted in higher removal rates (expressed as μ g.L⁻¹ or μ g.g⁻¹ FW). Such positive relationship between initial concentration and removal had already been observed in experiments on heavy metal (Weng et al., 2005; Dasgupta-Schubert et al., 2007; Skinner et al., 2007) and organic pollutants (Pavlostathis et al., 1998; Medina et al., 2000; Cai et al., 2008).

Dimethomorph appeared more toxic to S. polyrhiza than to L. minor. However, results revealed L. minor as the most efficient for the removal of this fungicide. In scientific literature the relationship between plant sensitivity and uptake capacity is unclear (Tang et al., 1998; Baker et al., 2000; Weiner et al., 2004; Sulmon et al., 2007). Here, Lemnaceae sensitivity towards dimethomorph was correlated with their ability to remove it from water. An increase of removal (in $\mu g.L^{-1}$) was correlated with the increase of growth rate inhibition (r² > 0.86). Plants, like L. minor, combining a good tolerance to pollutants with a high removal rate probably have an effective inside detoxification process, allowing them to metabolise the contaminant and then, to decrease the inside toxicity of these fungicides (Tront and Saunders, 2006). At this time no data are available about the metabolisation of dimethomorph in these aquatic plants. It could involve enzymes such as cytochrome P450 oxygenases, glucosyltransferases, glutathione S-transferases that are known to be involved in the detoxification process of pesticides (Coleman et al., 1997; Pflugmacher et al., 1999; Brazier-Hicks et al., 2007). The investigation of some detoxifying enzyme activities in aquatic macrophytes would shed some light on their tolerance to various contaminants such as pesticides and in turn explain the elimination of dimethomorph and other pesticides from the aquatic environment.

The dimethomorph removal rate of <u>L. minor</u> (expressed as $\mu g.g^{-1}$ FW) was significantly and negatively affected by plant density. Nevertheless, the quantity removed (in $\mu g.L^{-1}$) was higher at higher plant density. With their work on nickel remediation by <u>Lemna</u> gibba, Demirezen et al. (2007) already showed a negative relationship between plant density and their accumulation capacity (expressed as $\mu g.g^{-1}$). In their study, they observed a decrease of <u>Lemna</u>'s ability to accumulate metals at high population densities. Similarly, it is interesting to notice here that the quantity of dimethomorph removed (expressed as $\mu g.g^{-1}$ FW) was always significantly lower in flasks containing high plant density. This result could be explained by the increase of dimethomorph toxicity with the increase of plant density possibly due to light deprivation in crowded flasks. Plant photosynthesis uses light as the

energy source leading to the production of biochemical energy (e.g. ATP) and reducing power (NADPH), which in turn are used for carbon fixation. The contribution of this electron source to the transformation of organic compound like explosive materials was assessed by Pavlostathis et al. (1998), who concluded that light deprivation decreased both the rate and extent transformation of TNT. Furthermore, removal experiment in the dark with <u>L. minor</u> and dimethomorph showed no significant removal activity when compared to the control without plant (Dosnon-Olette et al., 2009). So it could be proposed that light reduction/limitation due to crowding may lead to a decrease of detoxification enzyme activities causing the observed increase in plant sensitivity toward the morpholine fungicide and the lower elimination of the fungicide from the medium. Investigations on the effects of light intensity on detoxifying enzyme activity should be conducted to test this hypothesis.

The results of this study show that to accurately assess the accumulation ability of a plant and/or in case of a full scale bioremediation field experiment, crowding must be taken into consideration to optimize the process (tolerance and uptake capacity of plant). In our laboratory condition, a density of 0.10 g.E-flask⁻¹ (<u>i.e.</u> $20g/m^2$) seemed to be optimal for a good removal capacity. As far as pollutant concentration is concerned, it seemed with the example of dimethomorph, that <u>L. minor</u> was still capable to eliminate the fungicide as long as the concentration does not become too toxic.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is a part of the "Contrat d'objectifs AQUAL" and is funded by the city of Reims and the Agence de l'Eau Seine-Normandie. The authors are grateful to Pr. Dr. Appenroth (University of Jena, Germany) for the generous gift of <u>Spirodela sp</u>.

REFERENCES

Adams WW, Hoehn A, Demmig-Adams B. Chilling temperatures and the xanthophyll cycle. A comparison of warm-grown and overwintering spinach. Aust J Plant Physiol 1995; 22: 75–85.

Albert G, Thomas A, Guhne M. Fungicidal activity of dimethomorph on different stages in the life cycle of <u>Phytophthora infestans</u> and <u>Plasmopara viticola</u>. ANPP—Third International Conference on Plant Diseases, Bordeaux, 1991.

Amaya-Chávez A, Martínez-Tabche L, López-López E, M. Galar-Martínez M. Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by <u>Typha latifolia</u> in water and artificial sediments. Chemosphere 2006; 63: 1124–1129.

Axtell NR, Sternberg SPK, Claussen K. Lead and nickel removal using <u>Microspora</u> and <u>Lemna minor</u>. Bioresource Technol 2003; 89: 41–48.

Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In:

Terry N, Baňuelos G, editors. Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers CRC, Boca Raton, 2000, pp. 85–107.

Brazier-Hicks M, Offen WA, Gershater MC, Revett TJ, Lim EK, Bowles DJ, Davies GJ, Edwards R. Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. PNAS 2007; 104: 20238–20243.

Cai QY, Mo CH, Zeng QY, Wu QT, Férard JF, Antizar-Ladislao B. Potential of <u>Ipomoea aquatica</u> cultivars in phytoremediation of soils contaminated with di-<u>n</u>-butyl phthalate. Environ Exp Bot 2008; 62: 205–211.

Cedergreen N, Madsen TV. Nitrogen uptake by the floating macrophyte <u>Lemna minor</u>. New Phytol 2002; 155: 285–292.

Chollet R. Screening of inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with a <u>Lemna</u> assay. In: Böger P, Sandmann G, editors. Target Assay for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds. Lewis Publisher, London, 1993, pp. 143–149.

Clatworthy JN, Harper JL. Comparative biology of closely related species living in same area. 5. Interand intraspecific interference within cultures of <u>Lemna</u> spp. and <u>Salvinia natans</u>. J Exp Bot 1962; 13: 307–324.

Coleman JOD, Blake-Kalff MMA, Davies TGE. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci 1997; 2: 144–151.

Dasgupta-Schubert N, Whelan T, Reyes MA, Lloren C, Brandt TT, Persans MW. Light quanta modulated characteristics of Ni uptake by <u>Brassica juncea</u> seedlings: the interdependence of plant metal concentration and biomass. Int J Phytorem 2007; 9: 207–225.

De Carvalho RF, Bromilow RH, Greenwood R. Uptake of pesticides from water by curly waterweed Lagarosiphon major and lesser duckweed Lemna minor. Pest Manag Sci 2007; 63: 789–797.

Demirezen D, Aksoy A, Uruç K. Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of Lemna gibba (Lemnaceae). Chemosphere 2007; 66: 553–557.

Dewez D, Geoffroy L, Vernet G, Popovic R. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga <u>Scenedesmus</u> <u>obliquus</u>. Aquat Toxicol 2005; 74: 150–159.

Dhir B, Sharmila P, Saradhi PP. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. Crit Rev Env Sci Tec 2009; 39: 754–781.

Dosnon-Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate. Ecotoxicol Environ Saf 2009; doi:10.1016/j.ecoenv.2009.08.010.

Driever SM, van Nes EH, Roijackers RMM. Growth limitation of <u>Lemna minor</u> due to high plant density. Aquat Bot 2005; 81: 245–251.

Frankart C, Eullaffroy P, Vernet G. Photosynthetic responses of <u>Lemna minor</u> exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. Ecotoxicol Environ Saf 2002; 53: 439–445.

Fujisawa T, Kurosawa M, Katagi T. Uptake and transformation of pesticide metabolites by duckweed (Lemna gibba). J Agric Food Chem 2006; 54: 6286–6293.

Gao J, Wayne Garrison A, Hoehamer C, Mazur CS, Lee Wolfe N. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. J Agric Food Chem 2000; 48: 6114–6120.

Gaur JP, Noraho N, Chauhan YS. Relationship between heavy metal accumulation and toxicity in <u>Spirodela polyrhiza</u> (L.) Schleid. and <u>Azolla pinnata</u> R. Br. Aquatic Bot 1994; 49: 183–192.

Genty B, Harbinson J, Briantais JM, Baker NR. The relationship between non-photochemical quenching of fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. Photosynthetic Res 1990; 25: 249–257.

Gisi U, Sierotzky H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. Eur J Plant Pathol 2008; 122:157–167.

González-Barreiro O, Rioboo C, Herrero C, Cid A. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. Environ pollut 2006; 44: 266–271.

Greger M. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, editors. Heavymetal stress in plants—from molecules to ecosystems. Springer, Berlin, 1999, pp. 1–27.

Grollier T, Feurtet-Mazel A, Boudou A, Ribeyre F. Role of temperature on isoproturon bioaccumulation and effects on two freshwater rooted macrophytes: <u>Elodea densa</u> and <u>ludwigia</u> <u>natans</u>. Ecotoxicol environ saf 1997; 36: 205–212.

Hennebert P, Clarin N, Pottecher G, Foesser F, Groff H. Runoff of 42 pesticides in Champagne vine during 2005 and proposal for agro-environmental actions – project LIFE SWAP-CPP. In: Grégoire et al., editors. Pesticides. Presses de l'ULP, Strasbourg, 2009, in press.

Knuteson SL, Whitwell T, Klaine SJ. Influence of plant age and size on simazine toxicity and uptake. J Environ Qual 2002; 31: 2096–2103.

Mallick N, Rai LC. Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized <u>Anabaena doliolum</u> and <u>Chlorella vulgaris</u>. World J Microb Biot 1993; 9: 196–201.

Medina VF, Larson SL, Bergstedt AE, McCutcheon SC. Phyto-removal of trinitrotoluene from water with batch kinetic studies. Wat Res 2000; 34: 2713–2722.

Miretzky P, Saralegui A, Fernandez Cirelli A. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metal. Chemosphere 2004; 57: 997–1005.

Moore MT, Kröger R, Cooper CM, Smith Jr S. Ability of four emergent macrophytes to remediate permethrin in mesocosm experiments. Arch Environ Contam Toxicol 2009; 57: 282–288.

Natarajan S, Stamps RH, Saha UK, Ma LQ. Phytofiltration of arsenic-contaminated groundwater using <u>Pteris vittata</u> L.: Effect of plant density and nitrogen and phosphorus levels. Int J Phytorem 2008; 10: 222–235.

Olette R, Couderchet M, Biagianti S, Eullaffroy P. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere 2008; 70: 1414–1421.

Pavlostathis SG, Comstock KK, Jacobson ME, Saunders FM. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by the aquatic plant <u>Myriophyllum spicatum</u>. Environ Toxicol Chem 1998; 17: 2266–2273.

Peng JF, Song YH, Yuan P, Cui XY, Qiu GI. The remediation of heavy metals contaminated sediment. J Hazard Mater 2009; 161: 633–640.

Pflugmacher S, Wiencke C, Sandermann H. Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. Marine Environ Res 1999; 48: 23–36.

Pradhan S, Rai LC. Optimization of flow rate, initial metal ion concentration and biomass density for maximum removal of Cu2+ by immobilized <u>Microcystis</u>. World J Microb Biot 2000; 16: 579–584.

Prasad MNV, Greger M, Aravind P. Biogeochemical cycling of trace elements by aquatic and wetland plants: Relevance to phytoremediation. In: Prasad MNV, Sajwan KS, Naidu R, editors. Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology and bioremediation. CRC Press, Florida, 2006, pp. 451–482.

Roháček K. Chlorophyll Fluorescence Parameters: The Definitions, Photosynthetic Meaning, and Mutual Relationships. Photosynthetica 2002; 40: 13–29.

Schäfer T, Honermeier B. Effect of sowing date and plant density on the cell morphology of hemp (<u>Cannabis sativa</u> L.). Ind Crop Prod 2006; 23: 88–98.

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth Res 1986; 10: 51–62.

Skinner K, Wright N, Porter-Goff E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. Environ pollut 2007; 145: 234–237.

Stefanov D, Terashima I. Non-photochemical loss in PSII in high- and low-light-grown leaves of <u>Vicia faba</u> quantified by several fluorescence parameters including LNP, F_0/F'_m , a novel parameter. Physiol Plantarum 2008; 133: 327–338.

Sulmon C, Gouesbet G, Binet F, Martin-Laurent F, El Amrani A, Couée I. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in <u>Arabidopsis thaliana</u>. Environ Pollut 2007; 145: 507–515.

Tang J, Hoagland KD, Siegfried BD. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. Environ Toxicol Chem 1998; 17: 1085–1090.

Tront JM, Saunders FM. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5-trichlorophenol. Chemosphere 2006; 64: 400–407.

Weiner J. Asymmetric competition in plant populations. Trend Ecol Evol 1990; 5: 360–364.

Weiner JA, Delorenzo ME, Fulton MH. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat Toxicol 2004; 68: 121–128.

Weng G, Wu L, Wang Z, Luo Y, Christie P. Copper uptake by four <u>Elsholtzia</u> ecotypes supplied with varying levels of copper in solution culture. Environ Int 2005; 31: 880–884.

Wolverton BC, McDonald RC, Gordon J. Water hyacinth and alligator weeds for final filtration of sewage. NASA Tech Memo 1975, TM-X-72724.

Dans cette **PARTIE 2**, l'effet de la concentration initiale en diméthomorphe et de la densité initiale de *L. minor* et de *S. polyrhiza* sur leur sensibilité et leur capacité de prélèvement a été étudié. La concentration initiale en fongicide est corrélée positivement à la sensibilité des plantes et à leur taux de prélèvement. L'augmentation de la densité des plantes induit une augmentation de la quantité de diméthomorphe prélevée même si l'efficacité des plantes, exprimée en $\mu g.g^{-1}$ MF, est moindre. On constate ici, que l'hypothèse émise dans la **PARTIE 1** est vérifiée : la performance des Lemnacées est en partie due à leur faible ratio biomasse/concentration. Il est à noter que l'augmentation de la densité des plantes et de la longueur des racines, ainsi que d'une baisse des paramètres de fluorescence chlorophyllienne.

Aux concentrations testées *S. polyrhiza* est plus sensible que *L. minor*. Cela peut s'expliquer par la plus grande quantité de diméthomorphe retrouvée chez *S. polyrhiza* (40% après 96h, **ANNEXE 3**). Chez *L. minor* après 96h on retrouve seulement 10% de la quantité disparue du milieu. Cette dernière pourrait posséder un mécanisme de détoxication plus efficace que celui de *S. polyrhiza*.

On observe également dans cette étude qu'une augmentation de la densité initiale en plante induit une sensibilité plus marquée de celle-ci et diminue sa capacité à prélever le pesticide lorsqu'exprimée en $\mu g.g^{-1}$ de MF. L'augmentation de la densité induit notamment une baisse de la lumière atteignant la surface des frondes due à leur empilement. Ce paramètre pourrait jouer un rôle sur les activités enzymatiques de détoxication et donc ralentir la métabolisation du pesticide à l'intérieur de la plante. Une étudiante de Master 2 Recherche, Kahina Rebouh, que j'ai co-encadré avec le Pr M. Couderchet et le Dr P. Eullaffroy, a effectué des travaux pour répondre à cette hypothèse. Les résultats ont été présentés lors du Congrès du GFP (Groupe Français des Pesticides, 2009) et compilés dans un manuscrit initiulé : « Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur la phytoremédiation du diméthomorphe par *Lemna minor* L. », (voir **ANNEXE 4**) qui sera publié dans le livre (compte-rendu) du Congrès. On comprend alors mieux l'influence de la température (5, 15 et 20°C) et de l'intensité lumineuse (0, 65, 100 et 200 µmol PAR m⁻².s⁻¹) sur le taux de croissance, F_v/F_m et le taux de prélèvement. Les faibles températures (5-15°C) ont un effet sur F_v/F_m et le taux de croissance alors que l'obscurité n'a un effet que sur ce dernier. Par contre,
dans ces différentes conditions il n'y a pas d'amplification significative de la toxicité du diméthomorphe, excepté à 5°C sur le taux de croissance.

La disparition du diméthomorphe dans le milieu en présence ou non de plantes (de 6 à 19% et de 3 à 9 %, respectivement) est accélérée lorsque la température augmente. Ceci serait dû à une activité biochimique plus élevée dans la plante, à un taux de croissance stimulé et donc à une biomasse plus élevée, lorsque la température augmente, ce qui entrainerait une meilleure efficacité de remédiation. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents puisque ici on atteint une densité de plante identique à celle de la **publication V**, pour l'expérience à 0,10 g.Erlenmeyer⁻¹.

Avec l'augmentation de l'intensité lumineuse, on observe la disparition d'une plus grande quantité de diméthomorphe en présence ou non de plantes (de 5 à 25 % et de 2 à 12 %, respectivement). Ceci ne peut, cette fois, s'expliquer par l'augmentation de biomasse. L'intensité lumineuse pourrait jouer un rôle sur l'efficacité des mécanismes de détoxication.

Ces résultats feront prochainement l'objet d'une publication : « Light and temperature effects on dimethomorph toxicity and removal by *Lemna minor* » par R. Dosnon-Olette, K. Rebouh, P. Eullaffroy et M. Couderchet.

Les informations amenées dans cette **PARTIE 2** pourront contribuer à l'optimisation des conditions de mise en place des bassins de phytoremédiation. Pour une meilleure efficacité ces derniers devront être entretenus régulièrement pour éviter une trop forte densité de population. Les conditions climatiques idéales, pour un bon pouvoir épurateur de ces plantes, seraient une température supérieure à 20° C et une intensité lumineuse suffisante (supérieure à 65μ mol PAR m⁻².s⁻¹). Cependant, le travail montre que les lentilles, même si elles sont moins efficaces, sont encore capables de phytoremédiation à faible température et faible luminosité qui pourraient correspondre aux conditions automnales voire hivernales de notre région.

Partie 3 : Compréhension des mécanismes de détoxication du diméthomorphe

Publication VI

Enzymatic basis for fungicide removal by Elodea canadensis.

Dosnon-Olette R, Schröder P, Bartha B, Aziz A, Couderchet M, Eullaffroy P.

En préparation

Enzymatic basis for fungicide removal by *Elodea canadensis*.

Rachel Dosnon-Olette¹, Peter Schröder², Bernadett Bartha², Aziz Aziz¹, Michel Couderchet¹ and Philippe Eullaffroy^{1*}

¹Laboratoire Plantes, Pesticides et Développement Durable (PPDD), URVVC-SE EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

²Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen, Helmholtz-Zentrum München, D-85758 Neuherberg, Germany

*Corresponding author: philippe.eullaffroy@univ-reims.fr

Abstract

Aquatic plants can absorb a diversity of natural and man-made toxic compounds for which they have developed diverse detoxification mechanisms. It is known that plants are able to metabolize and detoxify a wide array of xenobiotics by oxidation, sugar conjugation, glutathione conjugation and more complex reactions. In this study, uptake and detoxification mechanisms of dimethomorph, a fungicide currently found in aquatic media were studied in *Elodea canadensis*. For the first time in aquatic plants, cytochrome P450 activities (catalyzing phase I reactions of the detoxification process) were shown to be induced by fungicides suggesting a role in the metabolization of dimethomorph. O- and N-Glucosyltransferases (catalyzing phase II of the detoxification process) were also involved in the dimethomorph detoxification process. Glutathione S-transferase (GST), another enzyme involved in phase II reactions of detoxification, which is also involved in plants exposed to dimethomorph. It seems likely that the observed GST stimulation was a response to an oxidative stress caused by dimethomorph formulated as Forum[®].

Keywords: cytochrome P450, detoxification, glucosyltransferase, Glutathione S-Transferase, pesticide, phytoremediation

Abbreviations: APOX, ascorbate peroxidase; P450, cytochrome P450; DCA, 3,4dichloroaniline; DMM, dimethomorph; GST, glutathione S-Transferase; GT, glucosyltransferases; IPU, isoproturon.

1. Introduction

In intensively cultivated areas, agriculture and viticulture are significant sources of surface water contamination by pesticides via spray drift and/or run-off (Groenendijk et al., 1994; Kloeppel et al., 1997; Shultz, 2001). When entering the aquatic environment, these chemicals may affect directly or indirectly human and ecosystem health by inducing a significant threat to aquatic environments and drinking water resources (Dabrowski and Schulz, 2003; Moore et al., 2007).

For pesticide contaminated soil or groundwater restoration, most of the chemical methods may be prohibitively expensive or even impracticable, and the resulting products may not always be safer than the parent compounds (Chaudhry et al., 2002). To minimize the impact of this pollution, it is important to develop innovative technologies to clean up the contaminated water. In recent years, the use of plants to remediate polluted soils, air and water (so-called phytoremediation) has gained popularity as a cost-effective, environmentally friendly and efficient *in situ* technology for a variety of pollutants (Cunningham et al., 1995; He et al., 2005; Pilon-Smits, 2005; Dhir et al., 2009), and among them, many pesticides (Gao et al., 2000; Schröder and Collins, 2002; De Carvalho, et al., 2007; Dosnon-Olette et al., 2009; Moore et al., 2009).

Because plants are static and live in a competitive and sometimes hostile environment, they have evolved mechanisms that protect them from environmental abiotic stress, including the detoxification of xenobiotic compounds (Sandermann, 2004). Plant metabolism is extremely diverse and can be exploited to treat recalcitrant pollutants, not degradable by bacteria or fungi, and plants may therefore be considered as 'green livers', acting as an important global sink for environmental pollutants, in many cases detoxifying them (Sandermann, 2004). Since there is often an analogy of structure between xenobiotics and plant secondary metabolites, it is likely that the metabolism of xenobiotics uses at least partially secondary metabolic pathways (Singer et al., 2003). It is known that plants often metabolize xenobiotic pollutants by three sequential steps (Sandermann, 1992, 1994; Coleman et al., 1997):

- Phase I involves conversion/activation (oxidation, reduction and hydrolysis) of lipophilic xenobiotic compounds (Komives and Gullner, 2005); this transformation is mostly done by cytochrome P450 monooxygenases (Pflugmacher et al., 1999).

- Phase II involves conjugation of xenobiotic metabolites of Phase I to endogenous hydrophilic molecules such as sugars, aminoacids and glutathione (Coleman et al., 1997;

Dietz and Schnoor, 2001); this conjugation is mostly done by glucosyltransferases (GTs) and glutathione S-transferases (GSTs) (Pflugmacher et al., 1999; Loutre et al., 2003).

- during Phase III modified xenobiotics are compartmentalized in vacuoles or getting bound to cell wall components such as lignin or hemicellulose (Coleman et al., 1997; Dietz and Schnoor, 2001; Eapen et al., 2007).

Presently, little information is available to understand the mechanisms that may be involved in the detoxification of fungicides in aquatic plants. The present study investigated mechanisms that could participate in the metabolism of dimethomorph (*Figure 1*) in *Elodea canadensis*, an aquatic macrophyte efficient in the removal of phytosanitary products (Gao et al., 2000) particularly dimethomorph (Dosnon-Olette et al., 2009). The possible role of cytochrome P450 monooxygenases, glucosyltransferases and glutathione S-transferases in the metabolism of dimethomorph was investigated. GSTs are also known to be involved in antioxidative stress defense, with glutathione peroxidizing activity or a general induction in the presence of reactive oxygen species. To understand the role of GSTs in dimethomorph metabolism, another oxidative stress enzyme was assayed, the ascorbate peroxidase (APOX) activity.



Figure 1: Chemical Structure of E-Dimethomorph

2. Materials and Methods

2.1 Plant material and cultivation

Cultures of *Elodea canadensis* were maintained in large PVC aquaria containing growth medium (Chollet, 1993) at pH 6.5 \pm 0.5. All aquaria were maintained at 23 \pm 2°C under continuous light (65 µmol photosynthetic active radiation m⁻² s⁻¹) provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania Gro Lux F36W).

2.2 Measurement of Cytochrome P450 (P450) activity

Twenty four hours before extraction, 20 g of plants were incubated either with dimethomorph (30 μ M) or isoproturon (1 μ M) or without pesticide. Frozen plant tissue was homogenized under liquid nitrogen with mortar and pestle to a fine powder and extracted at 4°C in ten volumes (w/v) of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, containing 10 mM DTE (1,4-Dithioerythritol), 1mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride), 1 mM EDTA (Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid), 250 mM sucrose and 40 mM ascorbic acid. Then the crude extract was filtered with Miracloth (50 μ m) and centrifuged at 10,000 g for 15 min (4°C). The supernatant was filtered again and ultra-centrifuged at 100,000 g for 1 h (4°C). The pellets were resuspended in 1 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 20% glycerol and stored at -20°C.

For the quantification of P450 (E.C. 1.14.-), the assay used standard BD^{TM} Oxygen Biosensor system (BD Biosciences) according to the method utilized by Page and Schwitzguébel (2009). Briefly, the reaction was started by adding dimethomorph (25, 50, 75 and 100 μ M) or isoproturon (50 and 100 μ M) as substrate; a control was run without substrate. Calculation of oxygen consumption converted from fluorescence changes during the assay, to evaluate the enzymatic activity towards the different substrates, was made according to Olry et al. (2007).

Isoproturon in this experiment was taken as a reference molecule, previous study found that isoproturon was used as substrate by P450 (Siminszky, 2006).

2.3 Measurement of Glucosyltransferase (GT) activity

For the GT (E.C. 2.4.1.-) experiments 10 g of plants were taken after incubation or not with dimethomorph at 1.55 μ M during 24 h. Frozen plant tissue was homogenized under liquid nitrogen with mortar and pestle to a fine powder and extracted at 4°C in ten volumes (w/v) of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.5, containing 10 mM DTE, 1 mM EDTA, 2

mM MgCl₂, 1 mM PMSF, and 1% PVP (polyvinyl-pyrrolidone, K30). After 30 min extraction, the crude extract was centrifuged at 20,000 g and 4°C for 30 min. Protein in the supernatant was precipitated by stepwise addition of solid ammonium sulphate to 35% and in a second step to 75% saturation. After each step the extracts were centrifuged at 18,500 g and 4°C for 30 min and the final pellets were suspended in 2.3 mL of 200 mM Tris/HCl buffer pH 7.3, containing 1mM DTE, and 2 mM MgCl₂. The extracts were desalted and further purified by passing through gel-filtration columns (PD 10, Pharmacia, Freiburg, Germany). Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Glucosyltransferase (GT) activity was assayed as the conjugation of activated glucose to a substrate. Two substrates known for conjugation with O-glucosyltransferase were tested 2,4,5-TCP (2,4,5-Trichlorophenol) and quercetin, as well as a substrate of the Nglucosyltransferase DCA (3,4-dichloroaniline), and the pesticide of interest, dimethomorph. The reaction mixture consisted of a Tris/HCl buffer (50 µL, 0.2 M, pH 7.3), the substrate (10µL, 2mM), UDPG (Uridine 5'-diphosphoglucose, 20 µL, 20 mM), 4-NPG (4-nitrophenyl β -glucoside, 10 µL, 25 mM), Salicin (10 µL, 25 mM) and the enzyme extract (100 µL). After different incubation times, the reaction was stopped with phosphorous acid (85%, 10 µl), diluted 1:4 (v:v) with ultrapure water, centrifuged (10,000 g, 1 min), and the supernatant injected into the HPLC system. Elution was carried out at 1 mL.min⁻¹ with a gradient of A (H₂O and 0.1% of TFA, trifluoro acetic acid) and B (acetonitrile and 0.1% of TFA), B increased from 8 to 100 % in 16 min and remained stable at 100 % during 3 min.

2.4 Measurement of Glutathione S-Transferase (GST) and ascorbate peroxidase (APOX) activities

For GST (E.C. 2.5.1.18) and APOX (E.C. 1.11.1.11) experiments, 5 g of plants were taken after 24 or 96 h incubation with or without dimethomorph at 1.55 μ M. Frozen plant tissue was homogenized under liquid nitrogen with mortar and pestle to a fine powder and extracted at 4°C in ten volumes (w/v) of 0.1 M Tris/HCl buffer pH 7.8, containing 5 mM DTE, 5 mM EDTA, 1% Nonidet, and 1% PVP. After 30 min, the crude extract was centrifuged at 20,000 g for 30 min (4°C). Protein in the supernatant was precipitated by stepwise addition of solid ammonium sulphate to 40% and in a second step to 80% saturation. After each step the extracts were centrifuged at 18,500 g for 30 min (4°C) and the pellets were resuspended in 2.3 mL of 25 mM Tris/HCL buffer pH 7.8. The extracts were desalted

and further purified by passing through the PD10 gel-filtration columm. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

GST activity was evaluated as the increase of absorbance at 345 nm due to the conjugation of glutathione (GSH) to CDNB (1-chloro, 2-4-dinitrobenzene) catalyzed by GST. The reaction mixture contained Tris/HCl buffer (0.1 M, pH 6.4), CDNB (1.0 mM), GSH (1.1 mM) and enzyme extract (10 μ L in a final volume of 200 μ L of the mixture). Activity was measured spectrophotometrically by following the increase of the absorbance for 5 min at 25°C due to the conjugation of the GSH with the substrate CDNB. The amount of conjugated substrate was determined using the extinction coefficient ϵ (conjugate GSH/CDNB = 9.6 mM⁻¹cm⁻¹).

Ascorbate peroxidase (APOX) activity was assessed as the decline of absorbance at 290 nm due to the decrease in ascorbate concentration and activity was calculated using the extinction coefficient ε (2.8 mM⁻¹ cm⁻¹ for ascorbate). The reaction mixture contained Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.0), Na-ascorbate (645 μ M), H₂O₂ (0.1%). The enzymatic reaction was started by addition of the enzyme extract (10 μ L in a final volume of 200 μ L of the mixture) and the absorbance decrease was recorded for 5 min at 25 °C.

After each extraction the protein content was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin for calibration.

2.5 Statistical analysis

In this study, all statistical analyses were performed with SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Significant differences between controls and contaminated samples were determined by the One Way ANOVA test and p values <0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

3.1 Cytochrome P450 activities

Without pre-incubation (*Figure* 2A), addition of dimethomorph (25-100 μ M) or isoproturon (50-100 μ M) as substrate increased Cytochrome P450 (P450) activity in a concentration-

dependent manner. These results confirmed the fact that isoproturon is taken as substrate by the P450 (Siminszky, 2006). Addition of 100 μ M of dimethomorph induced a significantly higher activity (*i.e.* oxygen consumption) compared to the control, indicating that the fungicide was recognized as substrate by P450.

A 24-h pre-incubation with 30 μ M dimethomorph (*Figure 2B*) resulted in higher P450 activity. P450 activity was significantly higher (p < 0.05) with dimethomorph (50 to 100 μ M) or isoproturon (50 and 100 μ M) as substrates than in control plants. For 50 to 100 μ M



Figure 2: Cytochrome P450 activity in *Elodea* exposed to dimethomorph (25-100 μ M DMM) or isoproturon (50-100 μ M IPU) as substrates: (A) without pre-incubation; (B) after 24 h pre-incubation with dimethomorph (DMM, 30 μ M) and (C) after 24 h pre-incubation with isoproturon (IPU, 1 μ M). * indicates a significant difference with the control (one-way ANOVA, *p* < 0.05).

dimethomorph as substrate the increase due to pre-incubation was significant compare to the results without preincubation, while it was not significant for isoproturon as substrate. The higher activity detected in *Elodea* after 24 h of exposure to dimethomorph indicated an induction of these enzymes when plants were grown in the presence of this fungicide.

expected with As incubation isoproturon increased P450 activity in a concentration-dependent manner with both pesticides as substrates (*Figure 2C*), since isoproturon is known to induce P450 activity (Siminszky, 2006). However, the higher activity observed in control or with dimethomorph as substrate was not significantly different from that observed in Elodea without pre-incubation (Figure 2A) or with dimethomorph incubation (*Figure 2B*). However, significant increase of P450 activity was noticed with isoproturon as substrate compare to the two previous results.

Incubation with dimethomorph alone induced a higher activity with dimethomorph as substrate and the same was observed for isoproturon. It seems here, that each pesticide activated a specific P450. This was in agreement with other work showing the existence of a multitude of P450 involved in the detoxification process in plants (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000)

Here, P450 is likely to participate in the phase I (activation/conversion) of dimethomorph detoxification processes.

3.2 Glucosyltransferases activities

Different substrates were tested (*Table 1*) to identify the activity of O- and N-glucosyltransferases (O-GT and N-GT) in response to dimethomorph incubation: 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP) and quercetin are known to be substrates for the O-GT (Brazier et al., 2003) and 3,4-dichloroaniline (DCA) for the N-GT (Lao et al., 2003).

We observed a significant decrease in substrate concentration with *Elodea* enzyme extract. For all substrates, except dimethomorph, this decrease was significantly higher when Elodea was preincubated with dimethomorph (24 h, 1.55 µM). The amount of glucoside-products was significantly higher formed in presence of enzyme extract after Elodea was incubated with dimethomorph. This was not the case when dimethomorph was used as substrate (Figure 3).

From these results it appeared that these enzymes had little affinity for dimethomorph. Pre-incubation with dimethomorph induced a higher activity of O- and N-GT, it is therefore likely that both enzymes participate in the phase II (conjugation) of dimethomorph detoxification process.

Table 1: Concentrations of substrates and glucoside-products resulting from GT activity in the presence of different substrates: dimethomorph, 2,4,5-TCP, quercetin and DCA, with enzyme extract from *Elodea* incubated 24 h (+ DMM) or not (no DMM) with dimethomorph (1.55 μ M) and without enzyme extract as control. * indicates that mean value is significantly different from control (without enzyme extract) and [†] indicates a significant difference between *Elodea* no DMM and *Elodea* + DMM (p < 0.05).

	Control		Elodea no DMM		Elodea + DMM	
	Substrate (µM)	Glucoside- Product (µM substrate eq/ mg protein)	Substrate (µM)	Glucoside- Product (µM substrate eq/ mg protein)	Substrate (µM)	Glucoside- Product (µM substrate eq/ mg protein)
Dimethomorph	98.5	0	94.8*	7.2*	93.9*	8.4*
2,4,5-TCP	102.5	0	94.9* [†]	72.5* [†]	98.3* [†]	$161.0^{*^{\dagger}}$
Quercetin	99.4	0	90.9* [†]	0.6^\dagger	$80.8^{*^{\dagger}}$	$6.9^{*^{\dagger}}$
DCA	100.4	0	95.5* [†]	26.3* [†]	85.5* [†]	35.4* [†]



Figure 3: Example of HPLC elution profile obtained after 1h of incubation with TCP as substrate with or without enzyme extract.

3.3 Glutathione-S-Transferases and ascorbate peroxidases activities

Other enzymes known to be involved in the phase II of pesticide detoxification process are Glutathione S-Transferases (GSTs). However, GST activity was not stimulated by incubation with DMM (*Figure 4A*).

The effect of pre-incubation (24 h or 96 h) with 1.55 μ M DMM on *Elodea* GSTs was similar to that of ascorbate peroxidase (APOX, *Figure 4B*). APOX is an oxidative stress enzyme. These results suggest that in this case, GST is more likely to play a role in response to oxidative stress (if any occurs) rather than participate directly in the dimethomorph detoxification process by conjugation.



Figure 4: Activity of A) GST and B) APOX in *Elodea* exposed 24h or 96 h to dimethomorph. * indicates a significant difference with the control (p < 0.05).

4. Conclusions

Concerning the enzyme catalyzing phase I reactions of the detoxification process, the incubation of *Elodea* with dimethomorph induced an increase of the P450 activity. Hence it is very likely that the cytochrome P450 system plays a role in the metabolism of dimethomorph. It seems that dimethomorph and isoproturon did not induce the same enzyme of the P450 family. Our finding is the first evidence of dimethomorph and isoproturon activation of Cytochrome P450 multienzyme family in an aquatic plant, *i.e. Elodea*.

Experiments on Glucosyltransferases, enzymes catalyzing phase II reactions in the metabolism of xenobiotics, indicates that incubation with dimethomorph induced a higher glucosylation with either O- and N-GT. This is also consequent in light of the previous activation (*i.e.* hydroxylation) of the DMM molecule by P450.

The glutathione S-transferase is known as an enzyme involved in phase II reactions of detoxification. However, its activity was not stimulated by dimethomorph suggesting that GST does not participate in dimethomorph detoxification. In plants exposed to dimethomorph, comparable responses were observed for GST and APOX activities showing that the GST was more likely to play a role in response to oxidative stress.

Acknowledgements

This work is a part of the "Contrat d'objectifs AQUAL" and is funded by the city of Reims and the Agence de l'Eau Seine-Normandie. A part of this work was funded by the COST 859 (European Cooperation in Science and Technology; STSM-859-03760). The authors are grateful to Rudolf Harpaintner and Christian Huber (Helmholtz-Zentrum München, Germany) for their help with the HPLC analysis of glycosylated substrates and to Valérie Page (University of Berne, Switzerland) for P450 protocol.

References

- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
- Brazier M., Cole D.J., Edwards R., Partial purification and characterisation of a 2,4,5-trichlorophenol detoxifying O-glucosyltransferase from wheat, Phytochemistry 64 (2003) 419-424.
- Chaudhry Q., Schröder P., Werck-Reichhart D., Grajek W., Marecik R., Prospects and limitations of Phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment, Environ. Sci. Poll. Res. 9 (2002) 4-7.
- Chollet R., Screening of inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with a *Lemna* assay. In: Böger P., Sandmann G. (Eds), Target Assay for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds. Lewis Publisher, London, 1993, pp. 143-149.
- Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E., Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation, Trends Plant Sci. 2 (1997) 144-151.

- Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W., Phytoremediation of contaminated soils, Trends Biotechnol. 13 (1995) 393-397.
- Dabrowski J.M., Schulz R., Predicted and measured levels of zinphosmethyl in the Lourens River, South Africa: Comparison of runoff and spray drift, Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 494-500.
- Dietz A.C., Schnoor J.L., Advances in phytoremediation, Environ. Health Persp. 109 (2001) 163-168.
- De Carvalho R.F., Bromilow R.H., Greenwood R., Uptake of pesticides from water by curly waterweed *Lagarosiphon major* and lesser duckweed *Lemna minor*, Pest. Manag. Sci. 63 (2007) 789-797.
- Dosnon-Olette R., Couderchet M., Eullaffroy P., Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate, Ecotox. Environ. Safe. 2009, in press.
- Dhir B., Sharmila P., Saradhi P.P., Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment, Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 39 (2009) 754-781.
- Eapen S., Singh S., D'Souza S.F., Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants, Biotechnol. Adv. 25 (2007) 442-451.
- Gao J., Garrison A.W., Hoehamer C., Mazur C.S., Wolfe N.L., Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants, J. Agri. Food Chem. 48 (2000) 6114-6120.
- Groenendijk P., van der Kolk J.W.H., Travis K.Z., Prediction of exposure concentration in surface waters. In: Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P., Matthiessen P. (Eds.), Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals. Lewis Publisher, Boca Raton, 1994, pp. 105-125.
- He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J., Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, J. Trace Elem. Med. Biol. 19 (2005) 125-140.
- Kloeppel H., Koerdel W., Stein B., Herbicide transport by surface runoff and herbicide retention in a filter strip rainfall and runoff simulation studies, Chemosphere 35 (1997) 129-141.
- Komives T., Gullner G., Phase I Xenobiotic Metabolic Systems in Plants, Zeitschrift für Naturforschung [c] 60 (2005) 179-185.
- Lao S-H., Loutre C., Brazier M., Coleman J.O.D., Cole D.J., Edwards R., Theodoulou F.L., 3,4-Dichloroaniline is detoxified and exported via different pathways in *Arabidopsis* and soybean, Phytochemistry 63 (2003) 653–661.
- Loutre C., Dixon D.P., Brazier M., Slater M., Cole D.J., Edwards R., Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline, Plant J. 34 (2003) 85-493.
- Moore M.T., Cooper C.M., Smith Jr. S., Cullum R.F., Knight S.S., Locke M.A., Bennett E.R., Diazinon mitigation in constructed wetlands: Influence of vegetation, Water Air Soil Pollut. 184 (2007) 313-321.
- Moore M.T., Kröger R., Cooper C.M., Smith Jr S., Ability of four emergent macrophytes to remediate permethrin in mesocosm experiments, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 57 (2009) 282-288.
- Olry A., Schneider-Belhaddad F., Heintz D., Werck-Reichhart D., A medium-throughput screening assay to determine catalytic activities of oxygen-consuming enzymes: A new tool for functional characterization of cytochrome P450 and other oxygenases, Plant J. 51 (2007) 331-340.
- Page V., Schwitzguébel J-P., The role of cytochromes P450 and peroxidases in the detoxification of sulphonated anthraquinones by rhubarb and common sorrel plants cultivated under hydroponic conditions, Environ. Sci. Pollut. Res. (2009) DOI 10.1007/s11356-009-0197-2.
- Pflugmacher S., Wiencke C., Sandermann H., Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae, Mar. Environ. Res. 48 (1999) 23-36.
- Pilon-Smits E., Phytoremediation, Annu. Rev. Plant Biol. 56 (2005) 15-39.
- Sandermann H., Plant metabolism of xenobiotics, Trends Biochem. Sci. 17 (1992) 82-84.
- Sandermann H., Higher plant metabolism of xenobiotics: the green liver concept. Pharmacogenetics 4 (1994) 225-241.
- Sandermann H., Molecular ecotoxicology of plants, Trends Plant Sci. 9 (2004) 406-413.
- Schröder P., Collins C., Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants, Int. J. Phytorem. 4 (2002) 247-265.
- Shultz R., Comparison of spray drift- and runoff-related input of azinphos-methyl and endosulfan from fruit orchards into the Lourens River, South Africa, Chemosphere 45 (2001) 543-551.
- Siminszky B., Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism, Phytochem. Rev. 5 (2006) 445-458.
- Singer A.C., Crowley D.E., Thompson I.P., Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation, Trends Biotechnol. 21 (2003) 123-130.
- Werck-Reichhart D., Feyereisen R., Cytochromes P450: a success story, Genome Biol. 1 (2000) REVIEWS 3003.1-3003.9.

Dans cette **PARTIE 3**, l'étude d'activités enzymatiques spécifiques à la détoxication des composés organiques nous a permis de mieux comprendre les voies de métabolisation du diméthomorphe (la même étude a été en partie réalisée chez *Lemna minor* – voir **ANNEXE 5**). Elle montre une très faible activité des cytochromes P450 dans les extraits enzymatiques, incubés ou non avec du diméthomorphe ou de l'isoproturon. Dans ces extraits on a pourtant quantifié de 0,45 à 0,72 pour *L. minor* et de 0,14 à 0,30 mg de protéine.mL⁻¹ pour *E. canadensis*. Ses résultats ne sont donc pas dus à une faible quantité de protéines présentes chez *L. minor* mais plutôt à une activité moyenne en présence d'une forte quantité de protéine dans l'extrait. Contrairement aux résultats d'*E. canadensis*, ceux de *L. minor* n'ont pu être répétés.

L'activité des glucosyltransférases chez *L. minor* montre que, comme cela se passe chez *E. canadensis*, cette enzyme a très peu d'affinité pour le diméthomorphe. Par contre le 2,4,5-TCP et la quercetine sont pris comme substrat par les O-GTs de la lentille. Les produitglucosides sont moins importants chez *L. minor* que chez *E. canadensis* en présence de diméthomorphe et de 2,4,5-TCP, l'inverse se produit en présence de la quercetine.

Chez *L. minor* on note une stimulation des GST et de l'activité APOX après 24h, la ressemblance des réponses est moins évidente que chez *E. canadensis*.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions

Notre étude avait pour objectifs d'évaluer la tolérance et la capacité d'élimination des pesticides par des plantes aquatiques. Pour y répondre, nous avons dans un premier temps étudié la tolérance des plantes vis à vis du diméthomorphe, du pyriméthanil, du glyphosate et de l'isoproturon. Pour cela, nous avons suivi quelques paramètres de fluorescence chlorophyllienne et le taux de croissance des plantes sélectionnées (*Cabomba aquatica, Callitriche palustris, Elodea canadensis, Lemna minor, Spirodela polyrhiza, Scenedesmus obliquus* et *Scenedesmus quadricauda*). Suite à ces résultats, nous avons retenu, pour les expériences de phytoremédiation, une concentration qui induisait une variation inférieure à 30% de ces paramètres (seuil arbitraire). Nous avons alors montré les capacités d'élimination des pesticides par les plantes aquatiques présentes dans le milieu contaminé. Ensuite, nous avons évalué l'influence de facteurs tels que la concentration initiale en polluant, la densité des plantes, l'intensité lumineuse et la température, sur la capacité d'élimination des plantes en vue d'une optimisation de celle-ci. Enfin, on s'est intéressé aux mécanismes de détoxication du diméthomorphe chez *E. canadensis* et *L. minor*.

Toxicité des quatre pesticides étudiés

Cette toxicité a été étudiée à l'aide de la mesure de la fluorescence chlorophyllienne et du taux de croissance. Sachant qu'une plante sera d'autant plus performante en remédiation qu'elle est dans un bon état physiologique (Baker *et al.*, 2000 ; Sulmon *et al.*, 2007), nous nous sommes appuyés sur les résultats de toxicité obtenus via la cinétique lente de fluorescence chlorophyllienne et ses paramètres retenus : F_v/F_m , q_N et q_P , ainsi que sur le taux de croissance, pour déterminer une concentration en pesticides ne diminuant pas de plus de 30% les « indicateurs » de l'état de santé de la plante. Les concentrations ainsi retenues pour les expériences de phytoremédiation sont de 600 µg.L⁻¹ pour le diméthomorphe et le pyriméthanil, 80 µg.L⁻¹ pour le glyphosate et 10 µg.L⁻¹ pour l'isoproturon.

Les deux fongicides (diméthomorphe et pyriméthanil) ont un faible impact sur la physiologie des plantes, même à forte concentration (600 μ g.L⁻¹), contrairement aux herbicides. Cela est dû au mode d'action des herbicides qui est spécifique au monde végétal : le glyphosate cible la synthèse d'acides aminés clés et l'isoproturon inhibe le transport d'électrons au niveau du PS II. Les fongicides étant synthétisés dans un but de contrôler les champignons phytopathogènes sans toutefois porter atteinte à la plante, il n'est alors pas surprenant de constater leur faible impact sur celle-ci.

Tableau 7.1 : Tolérance, élimination, avantages et inconvénients des végétaux étudiés, en fonction des résultats obtenus avec les fongicides (Publication II et III).

Plantes	Tolérance	Elimination	Avantages	Inconvénients
C. aquatica	++	+		Plante non locale
C. palustris	+	++	Plante locale	
E. canadensis	+	++		Plante invasive
L. minor	++	+++	Plante locale	Faible biomasse
S. polyrhiza	++	++	Plante locale	Faible biomasse
Scenedesmus sp.	+	+++	Plante locale	Problème d'entretien

Tableau 7.2 : Exemple de possibilité d'élimination du diméthomorphe en présence des plantes les plus performantes, après 4 jours d'expérience (extrapolation).

Plantes	Masse sur 1m ² (kg)	Quantité éliminée (mg.m ⁻²)
L. minor	0,8	38,4
S. polyrhiza	1,1	23,1
C. palustris	3,3	46,2

✓ Capacité d'élimination des pesticides du milieu

On a montré que la présence des macrophytes permettait une disparition du milieu de 9 à 48 μ g.g⁻¹ de MF de diméthomorphe, de 3 à 33 μ g.g⁻¹ de MF de pyriméthanil, de 7 μ g.g⁻¹ de MF d'isoproturon et de 53 μ g.g⁻¹ de MF de glyphosate, selon les macrophytes et après 4 jours d'exposition. Concernant les algues, leur présence induit une disparition du milieu de 36 et 40 μ g.10⁻⁹ cellules de diméthomorphe, de 17 et 26 μ g.10⁻⁹ cellules de pyriméthanil et de 1 et 1 μ g.10⁻⁹ cellules d'isoproturon en présence de *Sc. obliquus* et de *Sc. quadricauda*, respectivement après 4 jours d'exposition.

La plante la plus performante est *Lemna minor* avec une capacité d'élimination du glyphosate, du diméthomorphe, du pyriméthanil et de l'isoproturon de 53, 48, 33 et 7 μ g.g⁻¹ MF, respectivement.

Les différents témoins, plantes mortes ou plantes vivantes mises à l'obscurité, induisent une élimination non significative des pesticides du milieu. Ceci montrerait que la majeure partie des pesticides éliminés du milieu en présence des plantes serait principalement due à un processus photo-dépendant. Ce processus est-il lié à l'absorption du polluant et/ou à sa métabolisation ? Pour répondre à cette question, des expériences complémentaires seront nécessaires. En attendant le résultat de ces expériences complémentaires, on retrouve un pourcentage important de la quantité de pesticides éliminée, à l'intérieur des plantes : de 5 à 68% pour le diméthomorphe et de 7 à 77% en présence du pyriméthanil après 4 jours d'exposition (Publication III et Annexe 3).

Dans cette étude, il n'a pas été trouvé de relation entre le coefficient de partage eau/octanol (log K_{ow}) et l'élimination des pesticides, comme montré par de nombreux auteurs (Briggs *et al.*, 1982 ; Cedergreen et al., 2005 ; Pilon-Smits, 2005 ; Schröder *et al.*, 2008). Ces études montrent qu'un composé organique avec un log K_{ow} entre 0,5 et 3 présente un fort taux de remédiation par les plantes et que pour un log K_{ow} inférieur à 0,5 le composé est plus hydrophile et pénètre donc moins facilement la bicouche lipidique membranaire. Cependant, dans notre étude avec des log K_{ow} de -3,2 ; 2,5 ; 2,63-2,73 et 2,84 on obtient une élimination chez la lentille de 53, 7, 48 et 33 μ g.g⁻¹ MF, en présence de glyphosate, isoproturon, diméthomorphe et pyriméthanil, respectivement. Ici, il n'y a donc pas de relation entre le log K_{ow} des molécules et leur élimination du milieu. Cela pourrait être dû à l'effet de la formulation des pesticides, le log K_{ow} étant lié à la substance active.

Lors de notre étude, il a été difficile de comparer le potentiel de chaque plante car il varie en fonction de la biomasse, de la concentration initiale, de la lumière, de la température... Ainsi, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature et de comparer les résultats des différents auteurs les uns avec les autres. En effet, les conditions expérimentales ne sont pas souvent identiques (biomasse, concentration, temps d'exposition, température, lumière,...). Il serait donc intéressant de créer une « norme » avec des conditions précises pour pouvoir comparer le réel potentiel de chaque plante.

✓ Choix des plantes pour application sur le terrain

Ce travail nous a permis de sélectionner les plantes les plus performantes, pour l'élimination des deux fongicides étudiés. En attendant des expérimentations sur les autres pesticides des bassins de rétention des eaux de ruissellement du vignoble et aussi sur l'utilisation d'autres plantes, nous pouvons proposer une première sélection de plantes pour un ensemencement des bassins. Cette sélection est basée sur la tolérance, la capacité d'élimination et divers avantages et inconvénients liés spécifiquement à une plante donnée (Tab. 7.1). Malgré ses bons résultats, *E. canadensis* ne peut être retenue car elle est considérée comme une plante invasive par l'Agence de l'Eau Seine Normandie ; quant à *C. aquatica*, elle montre de faibles capacités d'élimination. Les algues étudiées ont montré de bonnes capacités d'élimination, mais des études sont encore nécessaires, notamment concernant leur mise en place et leur entretien avant de les mettre en place sur le terrain. *L. minor, S. polyrhiza* et *C. palustris* ont une tolérance bonne à moyenne et une bonne capacité d'élimination des fongicides, de plus elles présentent l'avantage d'être des plantes locales ; c'est donc vers ces 3 plantes que nous pencherions dans le cadre d'une mise en place sur le terrain.

En extrapolant les résultats, *L. minor*, *S. polyrhiza* et *C. palustris*, ont la capacité d'extraire 38, 23 et 46 mg de diméthomorphe par mètre carré (Tab. 7.2). A plus large échelle, leur application dans un bassin de 75 m³ (15 x 5 x 1 m) contaminé à 59 μ g.L⁻¹ de diméthomorphe (Annexe 1, valeur maximale en 2002) et entièrement végétalisé, permettrait une disparition de 65, 39 et 78% en 4 jours, en présence de *L. minor*, *S. polyrhiza* et *C. palustris*, respectivement. Nous conseillons donc un mélange de *L. minor* et de *C. palustris*, les deux plantes les plus performantes en conditions contrôlées.

✓ Optimisation des conditions pour une meilleure élimination des pesticides par les plantes

Dans le but de mener à bien des expériences sur le terrain, il était important d'étudier l'effet de paramètres tels que la concentration en polluant, la densité des plantes, l'intensité lumineuse ou encore la température sur l'élimination des pesticides par les végétaux. On a réalisé cette étude sur les fongicides.

On remarque que dans la gamme de concentrations choisie, la concentration initiale en fongicide est corrélée positivement à la sensibilité des plantes et à leur taux d'élimination.

La densité des végétaux est corrélée positivement à la sensibilité des plantes et à leur taux d'élimination en $\mu g.L^{-1}$ mais négativement en $\mu g.g^{-1}$ MF. L'entretien régulier des bassins de phytoremédiation permettra une baisse de la densité (biomasse) et donc de la sensibilité des plantes, et *in fine* une meilleure efficacité d'élimination de ces dernières rapportée à la biomasse.

La température est corrélée positivement à la sensibilité des plantes et à leur capacité d'élimination même si l'abattement de la pollution à 5°C n'est pas négligeable. Cette étude n'a été réalisée que sur 4 jours, une expérimentation plus longue serait nécessaire pour infirmer ou non le potentiel de remédiation des plantes pendant la période hivernale.

L'intensité lumineuse n'a pas d'effet significatif sur la sensibilité des plantes (selon les paramètres étudiés). Seule l'obscurité induit une baisse très importante du taux de croissance. L'intensité lumineuse est corrélée positivement à la capacité d'élimination des plantes. Cette étude démontre également que sur une courte période de temps une faible intensité lumineuse permet quand même un bon taux d'élimination.

Les effets de ces paramètres sur l'élimination des pesticides tendent à montrer que cette dernière n'est pas due uniquement à un simple phénomène d'adsorption ou de diffusion passive à travers la plante et semble indiquer qu'il existe un mécanisme dépendant de l'activité des végétaux, par exemple la métabolisation des xénobiotiques par les plantes.

✓ Compréhension des mécanismes de détoxication du diméthomorphe

Dans cette étude on a pu montrer qu'une partie de la quantité de pesticides disparue du milieu était absorbée par les plantes. Cette absorption est un pré-requis pour avoir un contact rapproché entre le polluant et les enzymes localisées dans le cytosol des cellules végétales (Schröder et Collins, 2002). Une fois le xénobiotique entré dans le tissu végétal, sa métabolisation chez les plantes se fait le plus souvent via trois étapes consécutives (Sandermann, 1992, 1994 ; Coleman *et al.*, 1997) : la phase I : étape de conversion/activation, la phase II : étape de conjugaison et la phase III : étape de compartimentation dans la vacuole ou de fixation aux composants de la paroi cellulaire.

A notre connaissance, avant cette étude, il n'y avait aucune donnée nous permettant de comprendre les mécanismes de détoxication des fongicides chez les plantes aquatiques. Nous avons pu montrer que la détoxication du diméthomorphe se faisait à l'aide du Cytochrome P450 et des glucosyltransférases. Apparemment, les gluthation-S-transférases interviennent ici comme enzyme du stress oxydatif et non comme enzyme de détoxication. L'étude de ces activités enzymatiques spécifiques de la détoxication nous a permis de comprendre les voies de métabolisation du diméthomorphe. En revanche, cette étude ne permet pas de conclure sur une éventuelle relation entre l'activité des enzymes de détoxication chez la plante et leur potentiel à éliminer les pesticides du milieu.

Perspectives

Perspectives

L'utilisation de plantes aquatiques dans le cadre de la phytoremédiation de pesticides semble prometteuse. Suite à ce travail, la compréhension des mécanismes régissant cette ingénierie verte et son optimisation ouvrent de nombreuses perspectives :

✓ Le mélange des plantes. Les plantes ont montré, individuellement, de bonnes performances dans l'élimination des pesticides étudiés. Une étude sur le mélange des plantes les plus performantes permettrait d'estimer leur action synergique ou antagoniste dans l'élimination des pesticides du milieu, et leur capacité à se développer ensemble. Peu d'études ont été réalisées pour évaluer l'efficacité épuratoire d'un mélange de plantes ; parmi celles-ci Fraser *et al.* (2004) ont montré une petite synergie due au mélange des plantes sur le prélèvement de l'azote et du phosphore. Phillips *et al.* (2009) trouvent, au contraire, un effet antagoniste de ce mélange sur la phytoremédiation d'hydrocarbures.

✓ Le mélange de polluants. À notre connaissance, peu d'études ont permis d'évaluer la capacité épuratoire des plantes vis à vis de mélanges de pesticides. Pourtant, en vue d'une application sur le terrain et dans le but de mimer la réalité, cette étude s'avère indispensable dans un futur proche. En plus des pesticides, les eaux de ruissellement du vignoble sont chargées en métaux lourds, et plus particulièrement en cuivre. On a montré lors de précédents résultats le potentiel de *L. minor* dans l'élimination de ce métal (Olette *et al.*, 2008 : Annexe 2). L'effet du cuivre sur l'élimination du diméthomorphe a été étudié au laboratoire par S. Mégateli qui a constaté une baisse de l'élimination du diméthomorphe lorsque la concentration en cuivre augmente (Megateli *et al.*, 2009). Celle-ci a été attribuée à la toxicité importante du cuivre sur la plante réduisant l'absorption du fongicide. De leur point de vue, Schröder *et al.* (2009) décrivent un phénomène de compétition entre les métaux et les composés organiques, notamment au niveau des enzymes de détoxication. Les composés organiques ne semblent donc pas tous avoir le même comportement, des expériences permettant de mieux comprendre les raisons de la baisse d'absorption des composés organiques en présence de métaux seraient souhaitables.

 \checkmark Le rôle de la formulation des pesticides. Toutes les expériences présentées dans cette thèse ont été réalisées avec des pesticides formulés. L'influence de la formulation dans la phytoremédiation des pesticides reste encore mal connue. A certaines occasions à fin de vérification, des essais ont été conduits avec les molécules actives pures, on a constaté par exemple que *L. minor* éliminait le diméthomorphe et le pyriméthanil à hauteur de 17 et 12%

de la concentration initiale lorsqu'ils étaient formulés et de 7 et 7% quand ils étaient sous forme de molécule pure. Les produits appliqués sur les cultures sont formulés, de façon à faciliter la pénétration du produit dans la plante. Dans notre étude, la formulation est peut-être la cause de l'absence de lien entre le log K_{ow} et la quantité de produit éliminée. Des expériences avec les molécules pures permettraient ou non de confirmer cette hypothèse. Dans le cas de la disparition rapide de l'isoproturon dans le témoin sans plante (52 % en 4 jours, publication III et IV), des expériences avec la molécule pure permettrait de comprendre le rôle de la formulation dans cette disparition.

✓ Relation entre la sensibilité et l'élimination des pesticides par les plantes. Cette relation dans la littérature ne semble pas clairement établie (Tang *et al.*, 1998 ; Baker *et al.*, 2000 ; Weiner *et al.*, 2004 ; Sulmon *et al.*, 2007). Dans notre étude, il a été constaté une corrélation négative entre la sensibilité des plantes et la quantité de fongicide éliminée pour quatre des cinq macrophytes (*C. palustris, E. canadensis, L. minor* et *S. polyrhiza* ; voir Publication II). Dans ce sens, il a été montré que la tolérance aux herbicides chez de nombreuses plantes est due à l'action des enzymes de détoxication (Verkleig *et al.*, 2009). D'autre part, l'augmentation de la sensibilité des plantes, entraîne une meilleure élimination du diméthomorphe (exprimé en μ g.L⁻¹, Publication V). Dans ce cas, on a donc une corrélation positive entre la sensibilité des plantes et la quantité de fongicide éliminée qui peut apparaître comme une contradiction. Des données complémentaires, en particulier avec une gamme de concentration plus large, permettraient d'établir une relation plus claire entre la sensibilité des remédiation.

✓ Compréhension des mécanismes d'absorption par les plantes aquatiques. Nous avons vu que les végétaux aquatiques non pas tous les mêmes capacités d'élimination des pesticides. Il semble que cela soit lié à la différence de capacité d'absorption et de métabolisation des molécules. L'analyse des différences entre les espèces dans leur capacité à métaboliser les pesticides, dans les propriétés de leurs membranes (composition lipidique, structure de la paroi…), ou encore dans leur capacité de stockage, permettrait une meilleure compréhension de ces différences. L'utilisation de la radioactivité semble dans ce cas un outil incontournable pour mener à bien ces études complémentaires.

Perspectives

✓ L'optimisation des conditions de culture. L'optimisation des conditions de culture pourrait être développée notamment avec des températures et des intensités lumineuses plus fortes, pour mimer toutes les conditions naturelles possibles. L'étude pourra être réalisée en conditions semi-contrôlées et/ou sur une période plus longue. D'autres facteurs peuvent avoir des répercussions sur la capacité d'élimination des pesticides par les plantes. En effet, Sulmon *et al.* (2007) ont démontré que l'ajout de saccharose permettrait une meilleure tolérance des plantes, une plus grande disparition du milieu et peut-être une activation des enzymes de détoxication. Les premiers tests réalisés au laboratoire semblent prometteurs, notamment sur l'élimination du diméthomorphe du milieu. D'autres paramètres peuvent être étudiés comme l'influence du pH (Schnoor *et al.*, 1995), de la matière organique (Moore *et al.*, 2009), ou encore, de la concentration en nutriments (Sun *et al.*, 2007).

✓ Interaction plantes/micro-organismes. Les expériences réalisées avec les macrophytes n'ont pas été réalisées dans des conditions axéniques, il ne faut donc pas négliger la part de l'élimination des pesticides due à la présence de micro-organismes et à leurs interactions avec les plantes. En effet, ces derniers sont connus pour leur capacité à dégrader les pesticides et autres composés organiques seuls ou en collaboration avec les plantes (voir les récents articles de synthèse : Hussain *et al.*, 2009 ; Vangronsveld *et al.*, 2009). Les prélèvements et les processus de transport au niveau des plantes, de même que leur association avec les micro-organismes, ne sont pas encore bien connus et devront être investigués (Schwitzguébel, 2001 ; Siciliano et Germida, 1998 ; Mehmannavaz *et al.*, 2002). Un travail de thèse sur ce genre de sujet, mais avec des plantes terrestres, vient de commencer au laboratoire PPDD.

✓ Potentiel de « récupération » par les plantes. Les expériences ont été réalisées sur une période de 4 jours et avec une contamination continue. Il serait intéressant d'étudier le potentiel des plantes à retrouver leur état initial (au niveau physiologique et en concentration interne en polluants) après une période d'exposition aux pesticides. Ces expériences permettraient d'analyser la tolérance et les performances d'élimination des xénobiotiques par les plantes dans le cadre de contaminations cycliques, comme c'est le cas dans les conditions naturelles. Le peu de résultats dans ce domaine semble indiquer que le potentiel de récupération est lié à la toxicité du composé et à sa nature (Drost *et al.*, 2007 ; Mohammad *et al.*, 2008). Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour évaluer ce potentiel chez les plantes aquatiques en fonction des polluants.

Perspectives

✓ Mise en place sur le terrain. L'une des finalités de notre étude est la mise en place des plantes au niveau des bassins. Cette dernière devrait pouvoir débuter prochainement mais pour bien faire il faudrait deux bassins de rétention des eaux de ruissellement (un bassin témoin sans plantes et un autre « végétalisé ») ayant les mêmes caractéristiques. De plus, cette étude doit inclure des analyses régulières des eaux pour évaluer l'efficacité d'élimination des pesticides due à la présence des plantes.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbassi L, 2006. Pollution par les pesticides dans un bassin viticole : exemple de Reuil sur Marne, analyse de données de l'Agence de l'Eau Seine Normandie (AESN). Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, Mémoire de Master 1, 7 p.
- ADEME, 2006. http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=1&cid=96&m=3&catid= 14231&p1=00&p2=11 ; Traitement des sols pollués : taux d'utilisation et coût des techniques [13/09/2009].
- AFNOR (Association Française de Normalisation), Essais Ecotoxicologiques, 1996. Détermination de l'inhibition de croissance de *Lemna minor*, norme XP T 90-337, Normalisation Française, AFNOR, Paris, 2, 437-446.
- Agence de l'Eau Seine Normandie, 2009. http://www.eau-seine-normandie.fr/ index.php?id=1602 [6/07/2009].
- Anawar HM, Garcia-Sanchez A, Tari Kul Alam M, Majibur Rahman M, 2008. Phytofiltration of water polluted with arsenic and heavy metals. Int J Environ Pollut 33, 292-312.
- Awasthi M, Rai LC, 2005. Toxicity of nickel, zinc, and cadmium to nitrate uptake in free and immobilized cells of *Scenedesmus quadricauda*. Ecotoxicol Environ Safe 61, 268-272.
- Axtell NR, Sternberg SPK, Claussen K, 2003. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. Bioresource Technol 89, 41-48.
- Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC, 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In Terry N, Baňuelos G. (Eds), Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers CRC, Boca Raton, pp. 85–107.
- BASF, 2009a. http://gpd.basf-agro.fr/fiches/technique/forum.pdf [12/06/2009].
- BASF, 2009b. http://gpd.basf-agro.fr/fiches/technique/scala.pdf [12/06/2009].
- Bi Fai P, Grant A, Reid B, 2007. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. Environ Toxicol Chem 26, 1520-1531.
- Blanchoud H, 2001. Apports et transfert de pesticides en milieux agricole et urbain dans le bassin versant de la Marne : vers une évaluation globale. Ecole nationale des ponts et chaussées, Paris, Thèse, 98 p.
- Brazier M, Cole DJ, Edwards R, 2002. O-Glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistance and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). Phytochemistry 59, 149-156.

- Briggs GG, Bromilow RH, Evans AA, 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. Pestic Sci 42, 209-222.
- Cai X, Liu W, Jin M, Lin K, 2007. Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures. Environ Toxicol Chem 26, 970-975.
- Campos VM, Merino I, Casado R, Pacios LF, Gómez L, 2008. Review. Phytoremediation of organic pollutants. Span J Agric Res 6, 38-47.
- Cedergreen N, Andersen L, Olesen CF, Spliid HH, Streibig JC, 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on K_{ow} or mode of action? Aquat Toxicol 71, 261-271.
- Cemagref, 2009. http://www.cemagref.fr/Informations/DossiersThematiques/ PollutionEpuration/Recherche06.htm [6/07/2009].
- Çetinkaya Dönmez G, Aksu Z, Öztürk A, Kutsal T, 1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. Process Biochem 34, 885-892.
- Champagne-ardenne.developpement-durable, 2009. http://www.champagne-ardenne. developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Plaq_phytosanitaires_cle78a55f.pdf [6/07/2009].
- Chandra P, Kulshreshtha K, 2004. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. Bot Rev 70, 313-327.
- 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. Environ Sci Pollut R 9, 4-7.
- Cole DJ, Edwards R, 2000. Secondary metabolism of agrochemicals in plants. In Roberts TR (Eds), Agrochemicals and Plant Protection. John Wiley and Sons, London, pp.107–154.
- Coleman JOD, Blake-Kalff MMA, Davies TGE, 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci 2, 144-151.
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab P, Hsu FC, 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Adv Agron 56, 55-114.

- De Carvalho RF, Bromilow RH, Greenwood R, 2007. Uptake of pesticides from water by curly waterweed *Lagarosiphon major* and lesser duckweed *Lemna minor*. Pest Manag Sci 63, 789-797.
- Dhir B, Sharmila P, Saradhi P, 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. Crit Rev Env Sci Tec 39, 754-781.
- Dietz AC, Schnoor JL, 2001. Advances in phytoremediation. Environ Health Persp 109, 163-168.
- Drost W, Matzke M, Backhaus T, 2007. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. Chemosphere 67, 36-43.
- Duman F, Leblebici Z, Aksoy A, 2009. Bioaccumulation of nickel, copper, and cadmium by *Spirodela polyrhiza* and *Lemna gibba*. J Freshwater Ecol 24, 177-179.
- Eapen S, Singh S, D'Souza SF, 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. Biotechnol Adv 25, 442-451.
- Ebrahimpour M, Mushrifah I, 2008. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. Environ Geol 54, 689-698.
- E-phy.agriculture.gouv.fr, 2009. http://e-phy.agriculture.gouv.fr/ [12/07/2009].
- Fargašova A, Bumbálová A, Havránek E, 1999. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Mo⁶⁺, Ni²⁺, V⁵⁺) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Chemosphere 38, 1165-1173.
- Feurtet-Mazel A, Grollier T, Grouselle M, Ribeyre F, Boudou A, 1996. Experimental study of bioaccumulation and effects of the herbicide isoproturon on freshwater rooted macrophytes (*Elodea densa* and *Ludwigia natans*). Chemosphere 32, 1499-1512.
- Field JA, Thurman EM, 1996. Glutathione conjugation and contaminant transformation. Environ Sci Technol 30, 1413-1418.
- Frankart C, 2002. Impacts sur un végétal aquatique non-cible, la lentille d'eau (*Lemna minor*), de quelques produits phytosanitaires pulvérisés sur le vignoble champenois. Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, Thèse, 40 p.
- Fraser LH, Carty SM, Steer D, 2004. A test of four plant species to reduce total nitrogen and total phosphorus from soil leachate in subsurface wetland microcosms. Bioresource Technol 94, 185-192.

- Fritioff A, Greger M, 2007. Fate of cadmium in *Elodea canadensis*. Chemosphere 67, 365-375.
- Gadgil K, Kaur L, Sharma S, 2008. Simulated studies on lead uptake by *Lemna minor* with varying lead concentrations in different alkaline range. Indian J Environ Protect 28, 961-966.
- Gao J, Garrison AW, Hoehamer C, Mazur CS, Wolfe NL, 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. J Agr Food Chem 48, 6114-6120.
- Garmouna M, Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M, 1998. Spatial and temporal variations of herbicides (triazines and phenylureas) concentration in catchment basin of the Marne river (France). Sci total environ 224, 93-107.
- Genty B, Harbinson J, Briantais JM, Baker NR, 1990. The relationship between nonphotochemical quenching of fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. Photosynthetic Res 25, 249-257.
- Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM, 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Sci 176, 20-30.
- Gisi U, Sierotzki H, 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. Eur J Plant Pathol 122, 157-167.
- Guanzon Jr NG, Fukuda M, Nakahara H, 1996. Accumulation of Agricultural Pesticides by Three Freshwater Microalgae. Fisheries Sci 62, 690-697.
- Hennebert P, Clarin N, Pottecher G, Foesser F, Groff H, 2009. Runoff of 42 pesticides in Champagne vine during 2005 and proposal for agro-environmental actions – project LIFE SWAP-CPP. In Grégoire *et al.* (Eds), Pesticides. Presses de l'ULP, Strasbourg, in press.
- Hillermannová M, Kopp R, Sukop I, Vítek T, 2008. Accumulation of trace metals by aquatic macrophytes and their possible use in phytoremediation techniques. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 56, 97-104.
- Hurd NA, Sternberg SPK, 2008. Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor*. Int J Phytorem 10, 278-288.

- Hussain S, Siddique T, Arshad M, Saleem M, 2009. Bioremediation and phytoremediation of pesticides: recent advances. Crit Rev Env Sci Tech 39, 843-907.
- Ifen, 2006. Les pesticides dans les eaux, données 2003 et 2004. Les dossiers Ifen 5, 1-38.
- Ifen, 2009a. http://www.ifen.fr/acces-thematique/eau/les-pesticides-dans-les-eaux/la-qualite-des-cours-d-eau-en-france-metropolitaine.html [17 juillet 2009].
- Ifen, 2009b. http://www.ifen.fr/acces-thematique/eau/les-pesticides-dans-les-eaux/la-qualite-des-eaux-souterraines-en-france-metropolitaine.html [17 juillet 2009].
- INRA, 2009. http://taste.versailles.inra.fr/inapg/phytoremed/eco/index.htm [28 juillet 2009].
- ISO (Organisation Internationale de Normalisation), Water Quality, 2001. Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*). Duckweed growth inhibition test, ISO TC 147/SC 5 N, ISO/CD 20079.
- Juneau P, Qiu B, Deblois CP, 2007. Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. Toxicol Environ Chem 89, 609-625.
- Kähkönen MA, Manninen PKG, 1998. The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea canadensis* at different nickel and chromium exposure levels. Chemosphere 36, 1381-1390.
- Klingenberg M, 1958. Pigments of rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys 75, 376-386 (reprinted in Arch Biochem Biophys 2003, 409, 2-6).
- Komives T, Gullner G, 2005. Phase I Xenobiotic Metabolic Systems in Plants. Zeitschrift für Naturforschung [c] 60, 179-185.
- Krause GH, Weis E, 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis. Annu Rev Plant Phys 42, 313-349.
- Kumar P, Chandra R, 2004. Detoxification of distillery effluent through *Bacillus thuringiensis* (MTCC 4714) enhanced phytoremediation potential of *Spirodela polyrrhiza* (L.) schilden. B Environ Contam Tox 73, 903-910.
- Larsen M, Ucisik AS, Trapp S, 2005. Uptake, metabolism, accumulation and toxicity of cyanide in willow trees. Environ Sci Technol 39, 2135-2142.
- Lichtenthaler HK, Miehé JA, 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. Trends Plant Sci 2, 316-320.

- Loutre C, Dixon DP, Brazier M, Slater M, Cole DJ, Edwards R, 2003. Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. Plant J 34, 485-493.
- Mars K, 1996. The functions and regulations of glutathione S-transferases in plants. Annu Rev Plant Phys 47, 127-158.
- Martínez ME, Jiménez JM, El Yousfi F, 1999. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technol 67, 233-240.
- Maury-Brachet E, Ribeyre F, Boudou A, 1990. Actions and interactions of temperature and photoperiod on mercury accumulation by *Elodea densa* from sediment source. Ecotox Environ Safe 20, 141-155.
- Meagher RB, 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. Curr Opin Plant Biol 3, 153-162.
- Megateli S, Olette R, Semsari S, Couderchet M, 2009. Toxicity of copper / dimethomorph combination for *Lemna minor* and depuration of the fungicides by aquatic plant. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, in press.
- Mehmannavaz R, Prasher SO, Ahmad D, 2002. Rhizospheric effects of alfalfa on biotransformation of polychlorinated biphenyls in a contaminated soil augmented with *Sinorhizobium meliloti*. Process Biochem 37, 955-963.
- Miquel G, 2003. Qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Rapport du Sénat n°215.
- Miretsky P, Saralegui A, Fernandez Cirelli A, 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metal. Chemosphere 57, 997-1005.
- Mishra VK, Tripathi BD, 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. Bioresource Technol 99, 7091-7097.
- Mitsou K, Koulianou A, Lambropoulou D, Pappas P, Albanis T, Lekka M, 2006. Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. Chemosphere 62, 275-284.
- Mohammad M, Itoh K, Suyamaj K, 2008. Comparative effects of different families of herbicides on recovery potentials in *Lemna* sp. Pestic Sci 33, 171-174.

- Moore MT, Kröger R, Cooper CM, Smith Jr S, 2009. Ability of four emergent macrophytes to remediate permethrin in mesocosm experiments. Arch Environ Contam Toxicol 57, 282-288.
- NF EN ISO 8692, 2005. Qualité de l'eau : essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires, 15 p.
- Observatoire-pesticides, 2009. http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php? pageid=378 [7/07/2009].
- Olette R, Couderchet M, Biagianti S, Eullaffroy P, 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere 70, 1414-1421.
- Oswald WJ, 1988. Micro-algae and waste-water treatment. In Borowitzka and Borowitzka (Eds), Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, pp. 305–328.
- Pellón A, del Carmen Espinosa M, Cañizares RO, Frades J, Chacón A, Pérez E, Oña A, Ramos-Alvariño C, Mayarí R, Escobedo R, 2008. Use of a reactor for the removal of chromium and cadmium with immobilized *Scenedesmus obliquus*. Ingenieria Hidraulica en Mexico 23, 139-150.
- Pflugmacher S, Sandermann H, 1998. Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. Phytochemistry 49, 507-511.
- Pflugmacher S, Wiencke C, Sandermann H, 1999. Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. Mar Environ Res 48, 23-36.
- Phillips LA, Greer CW, Farrell RE, Germida JJ, 2009. Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments. Appl Soil Ecol 42, 9-17.
- Pilon-Smits E, 2005. Phytoremediation. Annu Rev Plant Biol 56, 15-39.
- Polessp, 2005. http://www.polessp.org/pdf/etudes/phyto.pdf [12 mars 2005].
- Ran N, Agami M, Oron G, 2004. A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel. Water Res 38, 2241-2248.
- Reichenauer TG, Germida JJ, 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. ChemSusChem 1, 708-717.

- Rice PJ, Anderson TA, Coats JR, 1997. Phytoremediation of herbicide-contaminated surface water with aquatic plants. ACS Symposium Series 664, 133-151.
- Rohacek K, Bartak M, 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. Photosynthetica 37, 339-363.
- Rosenqvist E, van Kooten O, 2003. Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In DeEll JR, Toivonen PMA. (Eds), Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. Kluwer, Dordrecht, pp. 32–77.
- Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa LG, 2008. Ammonia removal and biomass characteristics of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. Fresenius Environ Bullet 17, 1236-1241.
- Sandermann H, Schmitt R, Eckey H, Bauknecht T, 1991. Plant biochemistry of xenobiotics isolation and properties of soybean O-Glucosyl and N-Glucosyl and O-Malonyltransferase and N-Malonyltransferase for chlorinated phenols and anilines. Arch Biochem Biophys 287, 341-350.
- Sandermann H, 1992. Plant metabolism of xenobiotics. Trends Biochem Sci 17, 82-84.
- Sandermann H, 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the green liver concept. Pharmacogenetics 4, 225-241.
- Schäffner A, Messener B, Langebartels C, Sandermann H, 2002. Genes and enzymes for *inplanta* phytoremediation of air, water and soil. Acta Biotechnol 22, 141-151.
- Schmidt B, Rivero C, Thiede B, 1995. 3,4-Dichloroaniline N-glucosyl- and Nmalonyltransferase activities in cell cultures and plants of soybean and wheat. Phytochemistry 39, 81-84.
- Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH, 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. Environ Sci Technol 29, 318A-323A.
- Schnoor JL, 1997. Phytoremediation. Technology Evaluation Report.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W, 1986. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Res 10, 51-62.
- Schröder P, Collins C, 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. Int J Phytorem 4, 247-265.

- Schröder P, Harvey PJ, Schwitzguébel JP, 2002. Prospects for the phytoremediation of organic pollutants in Europe. Environ Sci Pollut Res 9, 1-3.
- Schröder P, Maier H, Debus R, 2005. Detoxification of Herbicides in *Phragmites australis*. Zeitschrift für Naturforschung [c] 60, 317-32.
- Schröder P, Daubner D, Maier H, Neustifter J, Debus R, 2008. Phytoremediation of organic xenobiotics – Glutathione dependent detoxification in *Phragmites* plants from European treatment sites. Bioresource Technol 99, 7183-7191.
- Schröder P, Lyubenova L, Huber C, 2009. Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plants? Environ Sci Pollut Res, DOI 10.1007/s11356-009-0168-7.
- Schwitzguébel JP, 2001. Hype or hope: the potential of phytoremediation as an emerging green technology. Remediation 11, 63-78.
- Sharma KP, Sharma K, Kumar S, Sharma S, Grover R, Soni P, Bhardwaj SM, Chaturvedi RK, Sharma S, 2005. Response of selected aquatic macrophytes towards textile dye wastewaters. Indian J Biotechnol 4, 538-545.
- Siciliano SD, Germida JJ, 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. Environ Rev 6, 65-79.
- Sulmon C, Gouesbet G, Binet F, Martin-Laurent F, El Amrani A, Couée I, 2007. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. Environ Pollut 145, 507-515.
- Sun L, Niu Z, Sun T, 2007. Effects of amendments of N, P, Fe on phytoextraction of Cd, Pb, Cu, and Zn in soil of Zhangshi by mustard, cabbage, and sugar beet. Environ Toxicol 22, 565-571.
- Susarla S, Bacchus ST, Medina VF, Mccutcheon SC, 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. Ecol Eng 18, 647-658.
- Tang J, Hoagland KD, Siegfried BD, 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. Environ Toxicol Chem 17, 1085-1090.
- Tront JM, Saunders FM, 2006. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5-trichlorophenol. Chemosphere 64, 400-407.
- UIPP, 2009. http://www.uipp.org/Chiffres-cles [12/09/2009].

- Vincent G, 1997. Les capacités naturelles d'épuration des écosystèmes aquatiques. Quatre-Temps 20, 38-41.
- Vogt T, Jones P, 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. Trends Plant Sci 5, 380-386.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M, 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. Environ Sci Pollut Res, DOI 10.1007/s11356-009-0213-6.
- Verkleij JAC, Golan-Goldhirsh A, Antosiewisz DM, Schwitzguébel J-P, Schröder P, 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. Environ Exp Bot 67, 10-22.
- Voltolina D, Gomez-Villa H, Correa G, 2005. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. Bioresource Technol 96, 359-362.
- Wahaab AR, Lubberding HJ, Alaerts GJ, 1995. Copper and chromium (III) uptake by duckweed. Wat Sci Tech 32, 105-110.
- Waranusantigula P, Pokethitiyooka P, Kruatrachuea M, Upathama ES, 2003. Kinetics of basic dye (methylene blue) biosorption by giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). Environ Pollut 125, 385-392.
- Weiner JA, Delorenzo ME, Fulton MH, 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat Toxicol 68, 121-128.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R, 2000. Cytochromes P450: a success story. Genome Biol. 1 (REVIEWS3003.1-3003.9).
- Yu JJ, 2002. Removal of organophosphate pesticides from wastewater by supercritical carbon dioxide extraction. Water Res 36, 1095-1101.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Extrait du mémoire de Master 1 de L. Abbassi : Pollution par les pesticides dans un bassin viticole : exemple de Reuil sur Marne, analyse de données de l'Agence de l'Eau Seine Normandie (AESN)

Réalisé au Laboratoire PPDD, URVVC, Université de Reims sous la direction du Pr M. Couderchet

Extrait de la liste des différentes substances actives présentes au niveau des 19 analyses, sur les déversoirs, bassin de décantation et sur la rivière Marne lors de la première campagne de suivi : Année 2002.

Substances actives	Fréquence de détection	Valeur limite de détection µg/L ⁻¹	Valeur minimum	Valeur maximum	Valeur moyenne
Glyphosate	18	0,05	0,17	43,78	15,23
Ampa	19	0,05	0,28	14,69	5,98
Diméthomorphe	17	0,10	2,44	59,34	17,98
Pyriméthanil	17	0,05	1,15	353,62	51,32

Extrait de la liste des différentes substances actives présentes au niveau des 44 analyses, sur les déversoirs, bassin de décantation et sur la rivière Marne lors de la deuxième campagne de suivi : Année 2003.

Substances actives	Fréquence de	Valeur limite de	Valeur	Valeur	Valeur
	détection	détection µg/L⁻¹	minimum	maximum	moyenne
Glyphosate	32	0,05	0,10	18,50	3,28
Ampa	33	0,05	0,41	8,27	2,69
Diméthomorphe	29	0,10	0,40	22,60	2,83
Isoproturon	1	0,05	0,13	0,13	0,13
Pyriméthanil	32	0,05	0,60	56,50	6,09

ANNEXE 2 : Publication I

Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants.

Rachel Olette, Michel Couderchet, Sylvie Biagianti, Philippe Eullaffroy

Chemosphere 2008; 70: 1414-1421

Annexe 2



Available online at www.sciencedirect.com



CHEMOSPHERE

Chemosphere 70 (2008) 1414-1421

www.elsevier.com/locate/chemosphere

Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants

Rachel Olette^a, Michel Couderchet^a, Sylvie Biagianti^b, Philippe Eullaffroy^{a,c,*}

^a Laboratoire Plantes Pesticides et Développement Durable (PPDD), UPRES 2069 (URVVC), Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039,

51687 Reims Cedex 2, France

^b Laboratoire d'Ecotoxicologie, UPRES 2069 (URVVC), Université de Reims Champagne–Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France ^c Environnement Canada, Centre Saint-Laurent, 105 rue McGill, Montréal, QC, Canada H2Y 2E7

> Received 9 March 2007; received in revised form 6 September 2007; accepted 10 September 2007 Available online 5 November 2007

Abstract

Pesticides are being detected in water bodies on an increasingly frequent basis. The present study focused on the phytoremediation potential of selected aquatic plants to remove phytosanitary products from contaminated water. We investigated the uptake capacity of *Lemna minor* (*L. minor*), *Elodea canadensis* (*E. canadensis*) and *Cahomba aquatica* (*C. aquatica*) on three pesticides: copper sulphate (fungicide), flazasulfuron (herbicide) and dimethomorph (fungicide). Pesticide toxicity was evaluated by exposing plants to five concentrations (0–1 mg L⁻¹) in culture media for 7 d using chlorophyll fluorescence as a biomarker. The toxicity of the contaminants was the same for all the aquatic plants studied and occurred in this descending order of toxicity: flazasulfuron > copper > dimethomorph. We found that *L. minor* had the most efficient uptake capacity, followed by *E. canadensis* and then *C. aquatica*. The maximum removal rate ($\mu g g^{-1}$ fresh weight d⁻¹) of copper, flazasulfuron and dimethomorph was 30, 27 and 11, respectively. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Remediation; Pesticides; Copper; Water; Macrophyte; Chlorophyll fluorescence

1. Introduction

The use of phytosanitary products in agricultural activities is the major cause of pesticide contamination in water due to their being continuously discharged into aquatic environments via surface runoff (Kloeppel et al., 1997). It is well-known that these pollutants have adverse effects on aquatic organisms and ecosystems (He et al., 2005).

To minimize the impact of this pollution, it is important to develop innovative technologies to clean the contaminated water. Existing techniques for remediation of such polluted water are based on physical and/or electrochemical treatments (Jia et al., 2006). These methods are sometimes effective, but always expensive (Business Publishers Inc., 2004). In addition, they commonly produce hazardous by-products that must be shipped to landfills for disposal (Qian et al., 1999). In the past ten years, the use of plants to remediate contaminated soils and water (so-called phytoremediation) has gained popularity as a cost-effective, environmentally friendly and efficient in situ technology for a variety of pollutants (Cunningham et al., 1995; He et al., 2005; Pilon-Smits, 2005). Indeed, some plants have a natural ability to absorb and hyperaccumulate trace elements in their tissues (Zayed et al., 1998; Qian et al., 1999; Gao et al., 2000).

Aquatic plants have great potential to function as on-site biosinks and biofilters of aquatic pollutants because of their abundance and limited mobility (Gao et al., 2000). They have been successfully used to sequester selected heavy metals and nutrients through their root systems and by uptake through their plant bodies (Bragato et al., 2006). *Lemna minor* (*L. minor*), *Elodea canadensis* (*E. canadensis*) and *Cabomba aquatica* (*C. aquatica*) are widespread, free-floating, easy to cultivate and fast-growing aquatic macrophytes. Many experiments conducted on the first two

^{*} Corresponding author. Address: Laboratoire d'Ecotoxicologie, UP-RES 2069 (URVVC), Université de Reims Champagne–Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France. Tel.: +33 3 26 91 85 25; fax: +33 3 26 91 32 84.

E-mail address: philippe.eullaffroy@univ-reims.fr (P. Eullaffroy).

^{0045-6535/\$ -} see front matter @ 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.016

showed their very good accumulation capacities and their efficiency in the phytoremediation of water contaminated with heavy metals and nutrients (Wahaab et al., 1995; Kähkönen and Manninen, 1998). However, little or no data are available on the effectiveness of these three plants for the phytoremediation of pesticides (Gao et al., 2000; Tront and Saunders, 2006).

In the present study, the three pesticides, copper sulfate, dimethomorph and flazasulfuron were chosen as models because of their common use in agricultural and viticultural activities and because of their different modes of action. Copper sulfate is an anti-mildew fungicide with a mode of action attributed to its ability to alter cellular proteins and deactivate enzyme systems in fungi (Tomlin, 2000). Dimethomorph, a systemic anti-sporulant fungicide, protects plants from downy mildew. It is a cinnamic acid derivative inhibiting cell wall formation of fungi (Albert et al., 1998). Flazasulfuron is a member of the sulfonylurea herbicide family, which is known to inhibit protein synthesis via inhibition of branched-chain amino-acids (Shimizu et al., 2002); flazasulfuron was reported to affect the pool of chlorophylls and leaf gas exchange (Frankart et al., 2003).

To our knowledge, only phytoremediation experiments involving copper have been conducted using *L. minor* and *E. canadensis* (Wahaab et al., 1995; Fritioff et al., 2005). The sole remediation experiments that have been realized on dimethomorph used lignocellulose from wheat as a remediation agent (Antoine et al., 2003), and no data are available on the remediation of flazasulfuron.

Phytoremediation technologies do have certain limiting factors, however. Among them is the toxicity encountered in establishing and maintaining plants on site (Dietz and Schnoor, 2001). In this study, the toxicity investigations were conducted by applying the saturating pulse method (pulse-amplitude-modulate fluorometer) commonly used to study photosynthesis and to produce reliable information on the effect of abiotic stress on plant physiology and thus plant health (Geoffroy et al., 2004; Eullaffroy et al., 2007).

We examined and compared the capacity of three cultivated aquatic macrophytes, *L. minor*, *E. canadensis* and *C. aquatica* (this being the first time this last species is being considered in toxicity and phytoremediation studies), in the remediation of three pesticides by assessing their toxicity and characterizing their uptake.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Duckweed (*L. minor*), an aquatic angiosperm of the Lemnaceae family, was collected from ponds in the Ardennes area of France. Before initiating the experiments, the fronds were disinfected by immersion in NaOCl 1% (v/v) and Tween 0.01% (v/v) for 3 min and then rinsed with distilled water for 5 min.

Specimens of *E. canadensis* and *C. aquatica*, aquatic angiosperms of the Hydrocharitaceae and the Cabombaceae families, respectively, were supplied by a specialized provider (Animalis, Cormontreuil, France). They were thoroughly cleaned under gentle running water to remove adhering algae and insect larva and then planted in a sterilized substrate composed of Fontainebleau sand (185 ± 5 g per 1.5 L aquaria). Cultures of *L. minor, E. canadensis* and *C. aquatica* were maintained in large PVC aquaria containing growth medium for at least one week prior to their use in the toxicity and remediation experiments.

The nutrient medium consisted of (mg L^{-1}): Ca²⁺, 106; Mg²⁺, 3.8; Na⁺, 3.5; K⁺, 13.8; HCO₃⁻, 272; SO₄²⁻, 58.9; Cl⁻, 3.8; NO₃⁻, 22.

All aquaria were maintained in a growth chamber at 22 ± 2 °C under continuous light (35 µmol photosynthetic active radiation (PAR) m⁻² s⁻¹) provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania Gro Lux F36W, Germany). The plants were subcultured twice a week.

2.2. Experimental design and agrochemical contamination procedure

Copper sulfate was used as $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Fontenay sous Bois, France). We used formulated pesticides: flazasulfuron (*N*-[[(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl-2-yl)-3-(3-trifluoromethyl-2-pyridylsulfo-nyl)urea]]) as Katana[®] (Zeneca Sopra, France, 25% of active ingredient, a.i.) and dimethomorph ((*E*,*Z*)4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl) acryloyl]morpholine) as Forum[®] (BASF Agro, France, 150 g L⁻¹ of a.i.). All pesticide concentrations shown here refer to the active ingredient. A total of 1.7 g (fresh weight) of leaf per liter of growth medium was exposed to 0, 12, 24, 40 and 100 µg L⁻¹ of copper; 0, 10, 20, 40 and 100 µg L⁻¹ of flazasulfuron and 0, 20, 40, 400 and 1000 µg L⁻¹ of dimethomorph. All stock solutions were prepared just prior to initiating the experiments. Each experiment was conducted three times.

2.3. Toxicity assessment

The effects of copper sulphate, dimethomorph and flazasulfuron on duckweed, *E. canadensis* and *C. aquatica* were determined by measuring the chlorophyll fluorescence emission from the upper faces of the leaves. For this purpose, we used a pulse amplitude modulated spectrofluorometer (PAM-Walz[®], Effeltrich, Germany). Before the experiments, three fully developed leaves were placed in the dark for 15 min at 22 ± 2 °C. After recording the steady F_0 -level (ground fluorescence level) by turning on the probing light beam, a single saturating flash (1 s, $4500 \mu mol PAR m^{-2} s^{-1}$) was applied to reach F_m (maximal fluorescence). Maximum photosynthetic capacity (also called maximum quantum yield of photosystem II primary photochemistry) was estimated by the ratio $F_v/$ $F_m = (F_m - F_0)/F_m$ for dark adapted leaves (Genty et al., 1990). Chlorophyll fluorescence kinetics were recorded after 1, 4 and 7 d of exposure. All the phytoremediation experiments were carried out at the highest pesticide concentration not inducing more than a 10% inhibition in the maximum photosynthetic capacity of the plant.

2.4. Determination of pesticide concentration in cultures and removal capacity of plants

Pesticide concentrations were assessed every 24 h in samples of contaminated growth medium. The removal capacity of the plant was expressed as μg per gram of fresh weight (FW) by day (removal rate) and percentage of contaminant taken up per total available in solution by day (removal yield). In the *E. canadensis* and *C. aquatica* remediation experiments, sand was collected and washed to detect pesticide traces possibly adsorbed onto sand particles. For the 4-d duration of the remediation experiments, no significant pesticide degradation was observed in the control aquaria.

2.4.1. Copper

After adding HNO₃ (32%) to the samples (De Moraes Flores et al., 2004), the copper concentration was estimated by atomic absorption spectroscopy with electrothermic atomization (SpectrAA Zeeman 220, Varian[®], France). Equipment was operated with the SpectrAA 220 2.10 FS software on Windows 98.

2.4.2. Dimethomorph

An aliquot of the contaminated medium was taken and then injected and analyzed by a Gynkotech-Dionex HPLC system (Voisins le Bretonneux, France). Molecule and metabolites were separated using a C18 reversed phase column (250 mm \times 3 mm; Kromasil 100; 5 µm – CIL-Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France) and eluted isocratically with acetonitrile (60%) and water (40%) acidified with H₃PO₄ (1%). Peaks were detected with a diode array detector (UVD 340; Gynkotech-Dionex). Identification of the compound was confirmed by its UV spectrum and concentration determined according to an external calibration curve based on reference samples. The UV detection was made at 246 and 300 nm.

2.4.3. Flazasulfuron

An aliquot of 10 mL was taken and added to 100 μ L of HPO₃, 1 g of NaCl and 6 mL of hexane. After vigorous agitation, hexane extracts containing flazasulfuron were collected and another 6 mL of hexane was added. The eluent was gently evaporated with nitrogen and residues were redissolved in 0.5 mL of acetonitrile and then injected into the HPLC system. Molecule and metabolites were analyzed as described before for dimethomorph except for the UV detection fixed at 242 nm.

2.5. Statistical analysis

In this study, all statistical analyses were performed with SigmaStat 3.0 (SPSS Science Software GmbH, Germany) for Windows. Significant differences between controls and contaminated samples were determined by the Turkey test and P values <0.05 were considered significant (asterisks [*] indicate significant values).

3. Results

3.1. Toxicity

3.1.1. Copper

The effect of copper toxicity on the photosynthetic activity of plants is reflected in the F_v/F_m ratio inhibition percentage. After 1-d exposure to copper, photosynthetic activity was reduced by 0.4%, 5% and 3% at the lowest concentration tested (12 µg L⁻¹) and reached 8%, 7.5% and 12%, after a 7-d exposure period at the highest concentration tested (100 µg L⁻¹), in *L. minor*, *E. canadensis* and *C. aquatica*, respectively (Fig. 1).

At the highest copper concentration tested, *C. aquatica* showed an F_v/F_m inhibition greater than 10% (arbitrary limit fixed to conduct our remediation experiments) after 7 d of contamination. Toxicity should be low in phytoremediation studies to maximize efficiency of the purification process. Thus, a copper concentration of 40 µg L⁻¹ was chosen for the subsequent phytoremediation studies.



Fig. 1. Inhibition (%) of the maximal photosynthetic capacity $(F_{\sqrt{F_m}})$ in (a) *Lemna minor*, (b) *Elodea canadensis* and (c) *Cabomba aquatica* exposed to copper at 12 µg L⁻¹ (\square), 24 µg L⁻¹ (\square), 40 µg L⁻¹ (\blacksquare) and 100 µg L⁻¹ (\blacksquare). *Significantly different from control (P < 0.05).

3.1.2. Dimethomorph

After 1-d exposure to dimethomorph, *E. canadensis* was the only plant to demonstrate significant inhibition (4%) of the F_v/F_m ratio at the lowest concentration tested (20 µg L⁻¹). The inhibition reached 13.5%, 12.5% and 12% after a week of exposure at the highest concentration tested (1000 µg L⁻¹) in *L. minor*, *E. canadensis* and *C. aquatica*, respectively (Fig. 2).

At the highest tested concentration of dimethomorph, *L.* minor, *E. canadensis* and *C. aquatica*, showed an F_v/F_m inhibition above 10. The 400 µg L⁻¹ dimethomorph concentration was therefore selected for the subsequent phytoremediation studies.

3.1.3. Flazasulfuron

A 24-h exposure to flazasulfuron induced an inhibition of F_v/F_m by 0.7%, 8% and 7% at the lowest concentration tested (10 µg L⁻¹) in *L. minor*, *E. canadensis* and *C. aquatica*, respectively (Fig. 3). The maximum photosynthetic capacity reduction reached 16% after an exposure of 7 d at the highest concentration tested (100 µg L⁻¹) in *L. minor*. However, *E. canadensis* and *C. aquatica*, for the same incubation period, showed a less pronounced decrease in their photosynthetic capacity compared to the 24 h exposure (2% and 4%, respectively; Fig. 3).



Fig. 2. Inhibition (%) of the maximal photosynthetic capacity $(F_{\sqrt{F_m}})$ in (a) *Lemna minor*, (b) *Elodea canadensis* and (c) *Cabomba aquatica* exposed to dimethomorph at 20 µg L⁻¹ (\square), 40 µg L⁻¹ (\blacksquare), 400 µg L⁻¹ (\blacksquare) and 1000 µg L⁻¹(\blacksquare). *Significantly different from control (P < 0.05).



Fig. 3. Inhibition (%) of the maximal photosynthetic capacity (F_{\vee}/F_m) in (a) *Lemma minor*, (b) *Elodea canadensis* and (c) *Cabomba aquatica* exposed to flazasulfuron at 10 µg L⁻¹ (\square), 20 µg L⁻¹ (\blacksquare), 40 µg L⁻¹ (\blacksquare) and 100 µg L⁻¹ (\blacksquare). *Significantly different from control (P < 0.05).

Duckweed, *E. canadensis* and *C. aquatica* all showed an F_v/F_m inhibition higher than 10% during the course of the 7-d experiment when exposed to the highest concentration tested (100 µg L⁻¹). Therefore, the 40 µg L⁻¹ flazasulfuron concentration was selected to conduct the subsequent phytoremediation experiments.

3.2. Pesticide removal capacity of aquatic plants

The data reveal that maximum photosynthetic capacity in plants, based on fluorescence emission, was altered by exposure to pesticides. The toxicity of these contaminants at the selected concentration of 40 μ g L⁻¹ was as follows, in descending order of toxicity: flazasulfuron > copper > dimethomorph, for all the studied aquatic plants. To be suitable for phytoremediation, a plant should maintain a high rate of photosynthesis when exposed to contaminated water. We therefore selected the following pesticide concentrations, which induced less than a 10% reduction in plant photosynthetic activity, to conduct the remediation experiments: 40 μ g L⁻¹ for dimethomorph.



Fig. 4. Removal yield (percentage of total available in solution) of copper, dimethomorph and flazasulfuron in *L. minor* (\Box), *C. aquatica* (\equiv) and *E. canadensis* (\blacksquare).

3.2.1. Copper

The kinetics of copper removal in a given aquatic plant based on percentage of total available copper and fresh weight are shown in Fig. 4. In *L. minor*, rapid removal occurred during the first 24 h of the experiment. At that time, the maximum removal yield was reached, with values of 50% (Fig. 4). Thereafter, the removal yield decreased for *L. minor* after 4 d (25%). In *C. aquatica* and *E. canadensis*, the maximum removal yield was observed within 3 d of initiating the experiment, reaching values of 24.5% and 16.5%, respectively (Fig. 4).

The highest copper removal yield, based on fresh weight, was achieved by *L. minor* $(30 \ \mu g \ g^{-1} \ FW \ d^{-1})$ after 1-d exposure. Duckweed is 2–3 times more efficient in remov-

Table 1 Plant pesticide maximum removal rate ($\mu g g^{-1} FW$)

ing copper than *C. aquatica* and *E. canadensis* (15 and $10 \ \mu g \ g^{-1} \ FW \ d^{-1}$, respectively) (Table 1).

3.2.2. Dimethomorph

In *L. minor* and *C. aquatica*, rapid removal occurred within the first 24 h of the experiment (Fig. 4). At that time, the maximum removal yield was reached, with values of 11.5% and 2.5%, respectively. The removal yield fell within the next 4 d (6.5% and 2.3%, respectively). In *E. canadensis*, the maximum removal yield was observed 2 d into the experiment, reaching 5.5% (Fig. 4), decreasing thereafter.

The highest dimethomorph removal yield based on fresh weight was achieved by *L. minor* (27 µg g⁻¹ FW d⁻¹) after 1-d exposure. Duckweed was 2–4 times more efficient in removing dimethomorph than *C. aquatica* and *E. canadensis*, for which maximum removal rates were 13 and $6 \mu g g^{-1}$ FW d⁻¹, respectively (Table 1).

3.2.3. Flazasulfuron

The flazasulfuron removal yield in *L. minor*, *C. aquatica* and *E. canadensis* increased as the exposure period increased and reached its maximum after 4 d, with values of 42%, 17% and 12%, respectively (Fig. 4).

The highest flazasulfuron removal yield, based on fresh weight, was achieved by *L. minor* (11 μ g g⁻¹ FW d⁻¹) after 4 d of exposure. Duckweed is 3–4 times more efficient in removing flazasulfuron than *C. aquatica* and *E. canadensis*, showing maximum removal rates of 4 and 3 μ g g⁻¹ FW d⁻¹, respectively (Table 1).

3.2.4. Conclusions on removal capacities

Duckweed demonstrated the greatest potential for removing the three selected pesticides. The overall remediation capacity of *C. aquatica* and *E. canadensis* was similar. However, *C. aquatica* is more efficient than *E. canadensis* in removing copper, while *E. canadensis* is more efficient than *C. aquatica* regarding the uptake of dimethomorph. Among the pesticides, copper and dimethomorph were most efficiently taken up by the selected aquatic plants.

4. Discussion

The aquatic macrophyte species studied here demonstrated different sensitivities to copper, dimethomorph and

This posicide maximum ferro fur fute (#5.5 - 1 +)						
Plant species	Copper		Dimethomorph		Flazasulfuron	
	Maximum removal rate (µg g ⁻¹ FW)	Time to reach the maximum (day)	Maximum removal rate (µg g ⁻¹ FW)	Time to reach the maximum (day)	Maximum removal rate (µg g ⁻¹ FW)	Time to reach the maximum (day)
Lemna minor	30 ± 4	1	27 ± 3	1	11 ± 1	4
Cabomba aquatica	15 ± 2	3	6 ± 1	1	4 ± 0.5	4
Elodea canadensis	10 ± 2	3	13 ± 2	2	3 ± 0.5	4

flazasulfuron, based on the observed differences in their respective maximum photosynthetic capacity inhibition.

4.1. Toxicity of copper

Copper was found to be a strong inhibitor of the photosynthetic capacity of plants, as evidenced by the significant inhibition of F_v/F_m after a day of exposure to 12 or 24 μ g L⁻¹ of copper. Copper is an oligoelement essential for plants (stimulating photosynthetic activity at low concentrations), but it can become a strong inhibitor of photosynthesis when present in excessive amounts. Numerous sites were identified as targets of copper action in chloroplasts (Ruban and Horton, 1995). Copper influences growth and pigment content, and the photosynthetic apparatus is particularly sensitive to it. This heavy metal is known to inhibit electron flow in the oxygen-evolving complex, to induce a low photosynthetic rate, and to reduce the maximum photosynthetic capacity (F_v/F_m) of plants exposed to it (Pätsikkä et al., 2001; Frankart et al., 2002). In this study, E. canadensis and C. aquatica were found to be more sensitive to copper than L. minor. Previous studies have shown that sensitivity to a contaminant can be positively correlated to plant root systems (Lewis, 1995). This finding was confirmed here, with highly branched rooted macrophytes (E. canadensis, C. aquatica) seemingly more sensitive to copper than floating plants like duckweed, whose root system is composed of only a single, thin root. It is also possible that the copper accumulated by the plant during the 7 d of the experiment reached a high enough concentration to be toxic. Accordingly, the copper concentration fell in the growth medium (Fig. 4).

Our results agree with those of Frankart et al. (2003), who found an inhibition of 14% of F_v/F_m after 72 h for *L. minor* exposed to 200 µg L⁻¹ of copper. No studies have ever been conducted on *E. canadensis* or *C. aquatica* at concentrations lower than 100 µg L⁻¹.

4.2. Toxicity of dimethomorph

The fungicide dimethomorph can be considered a pesticide of low-grade toxicity relative to the high concentrations tested. Our results confirmed previous experiments showing the minor impact of fungicides on the photosynthetic activity of aquatic plants (Frankart et al., 2002). This was expected, since fungicides are designed to have an impact on target fungi and not to be phytotoxic. To our knowledge, this is the first report of a dimethomorph toxicity study on higher aquatic plants.

4.3. Toxicity of flazasulfuron

As previously reported (Frankart et al., 2003), the lowest flazasulfuron concentration induced no marked effect on F_v/F_m of duckweed at the start of the experiment. However, after a few days, flazasulfuron significantly affected the maximum photosynthetic capacity of *L. minor*. This herbicide acts indirectly on the photochemistry of photosynthesis as an inhibitor of branched-chain amino-acid and protein synthesis and may lead to a disruption in the assembly of chlorophyll-protein complexes included in light harvesting complex of photosystem II (Frankart et al., 2003). At this time, it is still not clear why the toxicity of flazasulfuron in E. canadensis and C. aquatica decreased as the exposure time increased. Degradation of the herbicide is a possible explanation. The half-life of flazasulfuron was reported to be short (a few days) (Couderchet and Vernet, 2003; Oliveira et al., 2005), and appears to depend greatly on pH. In our study, the pH remained stable throughout the experiment and at a value (pH 6.5-7.5) inducing a slow hydrolysis of this molecule. In contrast, the increasing effect of flazasulfuron on L. minor photosynthesis, in parallel to a rapid decrease in herbicide concentration (up to 42% per day; Fig. 4) in the medium, suggests that flazasulfuron is infiltrating L. minor and causing a toxic effect. This is not the case for the other two plants. Further research is needed to clarify this point.

The data revealed that the relative toxicity of these pesticides was the same for all the studied plants, as follows (in descending order): flazasulfuron > copper > dimethomorph.

4.4. Copper removal

The maximum removal percentage for copper loading in duckweed was 50% (i.e. $\overline{30} \ \mu g \ g^{-1} FW \ d^{-1}$). This rate is lower than what Zayed et al. (1998) found, but within the range observed by Qian et al. (1999). For E. canadensis, a 16.5% (10 μ g g⁻¹ FW d⁻¹) reduction in total copper concentration was noted, and this is close to the results obtained by Fritioff et al. (2005). C. aquatica, being used for the first time in a remediation study, showed a higher copper removal rate (15 μ g g⁻¹ FW d⁻¹) than *E. canadensis* or Myriophyllum aquaticum (Qian et al., 1999). The net removal rate of the plants is greatest in the earliest days, after which it decreases or stabilizes as exposure time increases. This trend was often noted in other studies on heavy metal remediation (Kähkönen and Manninen, 1998; Zayed et al., 1998). We know that inorganic compounds usually exist as ions and cannot pass through membranes without the aid of membrane transporter proteins. Because uptake of inorganics depends on a discrete number of membrane proteins, their uptake is saturable (Pilon-Smits, 2005). This mechanism may explain why the removal rate is close to being stable in E. canadensis and C. aquatica after a few days.

Moreover, over the 4 d of the experiment, the plants continued to grow (biomass increasing), lowering the concentration/biomass ratio. This phenomenon may also have an impact on the removal efficiency of plants (Tang et al., 1998). Some studies reported a release of extracted contaminants when their concentration was lower in the medium compared to within the body of the plant, or when the toxicity induced by the products reached a certain level (Wahaab et al., 1995). This could explain the lower removal rate of copper in duckweed within the first few days of the experiment.

4.5. Dimethomorph removal

The maximum removal yield of dimethomorph reached 11.5% with duckweed. It is low compared to the removal yields of copper and flazasulfuron, and to other investigations using a duckweed species (*Spirodela oligorrhiza*) to remove pesticides from contaminated water (Gao et al., 2000).

However, the maximum removal rates for dimethomorph in duckweed and *E. canadensis* (27 and $13 \ \mu g \ g^{-1} \ FW \ d^{-1}$, respectively) are similar to those for copper (30 and 10 $\ \mu g \ g^{-1} \ FW \ d^{-1}$, respectively).

As seen with copper, the maximum yield for dimethomorph removal was rapidly reached (within 24–48 h of incubation), regardless of the plant species. Equilibrium is then noted in *E. canadensis* and *C. aquatica*, with a slight decrease for duckweed. Table 1 shows that duckweed and *Elodea* demonstrated a similar potential to extract dimethomorph and copper. However, *C. aquatica* is less efficient in removing dimethomorph from water than is copper.

Organic pollutants are usually man-made, and xenobiotic to plants. As a consequence, there are no specific transporters for these compounds in plant membranes. Organic pollutants therefore tend to move into and within plant tissues, driven, most of the time, by simple diffusion, depending on their chemical properties. Among these properties, hydrophobicity is one of the most important to the removal potential of plants. Organic chemicals with an octanolwater partition coefficient $(\log K_{ow})$ between 0.5 and 3 are considered hydrophobic compounds able to move through the lipid bilayer of membranes, but still water-soluble enough to travel into the cell fluids (Cedergreen et al., 2005). Dimethomorph, with a $\log K_{ow}$ of 2.63, can enter plants rapidly, explaining why the maximum removal rate is reached within 24–48 h.

4.6. Flazasulfuron removal

A maximum reduction rate of 42% of total flazasulfuron was achieved by duckweed on day four of the experiment. This reduction is similar to findings for other pesticides using aquatic macrophytes (Gao et al., 2000).

With a low octanol-water partition coefficient $(\log K_{ow} = -0.06 \text{ at pH 7})$, flazasulfuron is more hydrophilic than dimethomorph $(\log K_{ow} = 2.63-2.73)$. As a consequence, it is more difficult for flazasulfuron to pass through membranes and infiltrate plants than it is for dimethomorph (Pilon-Smits, 2005). This may in part account for the differences in extraction of these two pesticides and why flazasulfuron was removed more slowly but continuously by the plants.

Despite its low $\log K_{ow}$, it was able to penetrate the plant surface, indicating that the $\log K_{ow}$ value was not the sole

factor determining bioaccumulation property or plant removal capacity (Renner, 2002).

Our study found that the difference in the extraction capacity of plants depended on plant type and the nature of the pesticide. Furthermore, the capacity of a compound to be removed from water, and the consequent removal performance of a given plant, may also depend on other factors such as initial pollutant concentration, framework, anatomy and root system of the plant (Chaudhry et al., 2002).

Since copper, dimethomorph and flazasulfuron affected photosynthesis, we may consider that the removal of these molecules from water is not due to an adsorption process on the plant surface alone, but also to an absorption one into the plant. However, the data presented here do not allow for any conclusions to be made on the extent of either phenomena. A possible adsorption of the molecule on the substrate or dishes can be excluded since no pesticide was detected when washing the sand or dishes with acetone (dimethomorph and flazasulfuron) or nitric acid (copper).

5. Conclusions

Duckweed showed better potential for removing copper, dimethomorph and flazasulfuron than did *E. canadensis* and *C. aquatica*. *C. aquatica*, being used for the first time in a remediation experiment, demonstrated an efficiency similar to that of *E. canadensis* in extracting the test pesticides.

Our study indicated that copper, dimethomorph and flazasulfuron can be taken up by aquatic plants. Removal percentages of the pesticide loads for all species tested ranged from 2.5% to 50% during 4 d of incubation. It was not surprising that copper, an inorganic compound and potential nutrient for the plant, was the most efficiently removed from water by the plants.

These results demonstrate the interesting potential use of these aquatic plants in the phytoremediation of pesticides. However, further studies are needed to better understand the mechanisms involved at the plant level and to optimize the plants' capacity for pesticide phytoremediation, before confirming this innovative technology for efficient use in cleaning pesticide-contaminated water.

Acknowledgment

This work is a part of the "Contrat d'objectifs AQUAL" of Europol'Agro.

References

- Albert, G., Curtze, J., Drandarevski, Ch.A., 1998. Dimethomorph (CME 151): a novel curative fungicide. Proceedings of the British Crop Protection Conference. Pests Dis. 1, 17–24.
- Antoine, M., Flogeac, K., Guillon, E., Dumonceau, J., Aplincourt, M., 2003. Sorption of isoproturon and dimethomorph on lignocellulose from wheat. Environ. Chem. Lett. 1, 175–178.
- Bragato, C., Brix, H., Malagoli, M., 2006. Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex. Steudel and

R. Olette et al. / Chemosphere 70 (2008) 1414-1421

Bolboschoenus maritimus (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. Environ. Pollut. 144, 967–975.

- Business Publishers Inc., 2004. ERH allows cleanup crews to extract contamination. Hazardous waste superfund report 26, Washington.
- Cedergreen, N., Andersen, L., Olesen, C.F., Spliid, H.H., Streibig, J.C., 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on *K*_{ow} or mode of action? Aquat. Toxicol. 71, 261–271.
- 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. Environ. Sci. Pollut. Res. 9, 4–7.
- Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 271–277.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. Trends Biotechnol. 13, 393–397.
- De Moraes Flores, E.M., Fleig Saideles, A.P., De Moraes Flores, E.L., Mesko, M.F., Pedroso, M.P., Dressler, V.L., Bittencourt, C.F., Da Costa, D.B., 2004. Determination of copper in medicinal plants used as dietary supplements by atomic absorption spectrometry with direct flame solid analysis. Microchem. J. 77, 113–118.
- Dietz, A.C., Schnoor, J.L., 2001. Advances in phytoremediation. Environ. Health Perspect. 109 (Suppl. 1), 163–168.
- Eullaffroy, P., Frankart, C., Biagianti, S., 2007. Toxic effect assessment of pollutant mixtures in *Lemma minor* by using polyphasic fluorescence kinetics. Toxicol. Environ. Chem. 89, 683–696.
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., 2002. Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. Ecotoxicol. Environ. Saf. 53, 439–445.
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. Environ. Exp. Bot. 49, 159–168.
- Fritioff, A., Kautsky, L., Greger, M., 2005. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. Environ. Pollut. 133, 265–274.
- Gao, J., Garrison, A.W., Hoehamer, C., Mazur, C.S., Wolfe, N.L., 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. J. Agric. Food Chem. 48, 6114– 6120.
- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1990. The relationship between non-photochemical quenching of fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. Photosynth. Res. 25, 249–257.
- Geoffroy, L., Frankart, C., Eullaffroy, P., 2004. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to flumioxazin herbicide. Environ. Pollut. 131, 233– 241.

- He, Z.L., Yanga, X.E., Stoffellab, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. J. Trace Elem. Med Biol. 19, 125–140.
- Jia, Z., Li, Y., Lu, S., Peng, H., Ge, J., Chen, S., 2006. Treatment of organophosphate-contaminated wastewater by acidic hydrolysis and precipitation. J. Hazard. Mater. 129, 234–238.
- Kähkönen, M.A., Manninen, P.K.G., 1998. The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea canadensis* at different nickel and chromium exposure levels. Chemosphere 36, 1381–1390.
- Kloeppel, H., Koerdel, W., Stein, B., 1997. Herbicide transport by surface runoff and herbicide retention in a filter strip rainfall and runoff simulation studies. Chemosphere 35, 129–141.
- Lewis, M.A., 1995. Use of freshwater plants for toxicity testing: a review. Environ. Pollut. 87, 319–336.
- Oliveira, M.F., Prates, H.T., Sans, L.M.A., 2005. Sorption and hydrolysis of flazasulfuron. Planta Daninha 23, 101–113.
- Pätsikkä, E., Aro, E.M., Tyystjärvi, E., 2001. Mechanism of copperenhanced photoinhibition in thylakoid membranes. Physiol. Plantarum 113, 142–150.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15-39.
- Qian, J.-H., Zayed, A., Zhu, Y.-L., Yu, M., Terry, N., 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and phytoaccumulation of ten trace elements by twelve plant species. J. Environ. Qual. 28, 1448–1455.
- Renner, R., 2002. The K_{ow} controversy. Environ. Sci. Technol. 36, 411– 413.
- Ruban, A.V., Horton, P., 1995. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. Aust. J. Plant Physiol. 22, 221–230.
- Shimizu, T., Nakayama, I., Nagayama, K., Miyazawa, T., Nezu, Y., 2002. Acetolatate synthase inhibitors. In: Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K. (Eds.), Herbicide Classes in Development. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany, pp. 1–41.
- Tang, J., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D., 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. Environ. Toxicol. Chem. 17, 1085–1090.
- Tomlin, C.D.S., 2000. The Pesticides Manual, 12th ed. British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Tront, J.M., Saunders, F.M., 2006. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5-trichlorophenol. Chemosphere 64, 400–407.
- Wahaab, A.R., Lubberding, H.J., Alaerts, G.J., 1995. Copper and chromium (III) uptake by duckweed. Water Sci. Technol. 32 (11), 105–110.
- Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N., 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. J. Environ. Qual. 27, 715– 721.

ANNEXE 3 :

Quantité en fongicides dans les macrophytes

Quantité de diméthomorphe disparue (en μ g) en présence des différentes plantes, quantité retrouvée à l'intérieure des plantes (en μ g) et pourcentage de diméthomorphe retrouvé dans les plantes par rapport à la quantité disparue dans le milieu, au cours des 4 jours d'exposition.

		Durée d'exposition (jour)			
		1	2	3	4
Quantité disparue	L. minor	$3,1 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,6$	$9,5 \pm 0,6$
	S. polyrhiza	$3,0\pm0,5$	$4,\!6\pm0,\!6$	$6{,}6\pm0{,}7$	$8,3\pm0,7$
du milieu en	C. aquatica	$2,5\pm0,8$	$4{,}3\pm0{,}7$	$4,8\pm0,8$	$5,3\pm0,9$
plantes (µg)	C. palustris	$3,9\pm0,7$	$7{,}3\pm0{,}9$	$7{,}9\pm0{,}9$	$8,8\pm0,\!9$
	E. canadensis	$3,6\pm0,9$	6,8 ± 1,1	$9,1\pm0,9$	$9,9 \pm 1,1$
	L. minor	$0,1\pm0,1$	$0,6\pm0,1$	$0,9\pm0,1$	$1,0 \pm 0,1$
Ouantité	S. polyrhiza	$2,1\pm0,1$	$1,8\pm0,1$	$1,9\pm0,1$	$3,3\pm0,1$
retrouvée dans	C. aquatica	$2,1\pm0,1$	$4,\!4\pm0,\!1$	$5,3\pm0,1$	$3,6 \pm 0,1$
les plantes (µg)	C. palustris	$2,2\pm0,1$	$4,1\pm0,1$	$2,1\pm0,1$	$3,4\pm0,1$
	E. canadensis	$2{,}9\pm0{,}1$	$\textbf{4,8} \pm \textbf{0,1}$	$5,1\pm0,1$	$5,6\pm0,1$
Ouantité	L. minor	3 ± 3	12 ± 4	14 ± 4	10 ± 3
retrouvée dans les plantes par rapport à celle disparue du milieu (%)	S. polyrhiza	70 ± 14	39 ± 8	29 ± 5	40 ± 5
	C. aquatica	84 ± 24	102 ± 26	110 ± 19	68 ± 12
	C. palustris	56 ± 11	56 ± 9	27 ± 5	39 ± 13
	E. canadensis	81 ± 15	71 ± 11	56 ± 6	57 ± 7

Quantité de pyriméthanil disparue (en μ g) en présence des différentes plantes, quantité retrouvée à l'intérieure des plantes (en μ g) et pourcentage de pyriméthanil retrouvé dans les plantes par rapport à la quantité disparue dans le milieu, au cours des 4 jours d'exposition.

		Durée d'exposition (jour)			
		1	2	3	4
Quantité disparue du milieu en présence des	L. minor	$1,9\pm1,0$	$5,6\pm1,0$	$6,7\pm1,0$	$6,7 \pm 1,2$
	S. polyrhiza	$2,0 \pm 1,0$	$2,7 \pm 1,2$	$4{,}5\pm1{,}0$	$6,1 \pm 1,0$
	C. aquatica	$1,3\pm1,0$	$3,2 \pm 1,1$	$4,1 \pm 1,3$	$6,1 \pm 1,3$
plantes (µg)	C. palustris	$1,6 \pm 1,1$	$2,3\pm1,5$	$2,7 \pm 1,3$	$4,2 \pm 1,0$
	E. canadensis	1,5 ± 1,0	$2,4 \pm 1,1$	$3,4 \pm 1,4$	$4,1 \pm 1,2$
	L. minor	$0,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
Quantité	S. polyrhiza	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2\pm0,1$	$1,6 \pm 0,1$
retrouvée dans	C. aquatica	$0,\!4 \pm 0,\!1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2\pm0,1$	$0,\!4 \pm 0,\!1$
les plantes (µg)	C. palustris	$0,5 \pm 0,1$	$0,7\pm0,1$	$0,7\pm0,1$	$0,7\pm0,1$
	E. canadensis	$0,7 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
Quantité	L. minor	26 ± 5	27 ± 5	25 ± 5	51 ± 9
retrouvée dans les plantes par rapport à celle disparue du milieu (%)	S. polyrhiza	10 ± 5	7 ± 5	4 ± 3	26 ± 5
	C. aquatica	31 ± 18	6 ± 3	5 ± 3	7 ± 3
	C. palustris	31 ± 16	30 ± 15	26 ± 11	17 ± 5
	E. canadensis	47 ± 22	17 ± 9	32 ± 13	20 ± 7

ANNEXE 4 :

Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur la phytoremédiation du diméthomorphe par *Lemna minor*.

Kahina Rebouh, Rachel Olette, Philippe Eullaffroy, Michel Couderchet

39^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides (Mai 2009, Toulouse-France)

Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur la phytoremédiation du diméthomorphe par *Lemna minor*.

REBOUH Kahina, DOSNON-OLETTE Rachel, EULLAFFROY Philippe et COUDERCHET Michel

Laboratoire plantes, pesticides et développement durable, URVVC-SE UFR Sciences. Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims, France.

Résumé

L'utilisation de plantes aquatiques pourrait être une technique efficace pour éliminer les pesticides des eaux de ruissellement à moindre coût et restaurer la qualité des milieux aquatiques. Pour améliorer la phytoremédiation et comprendre les mécanismes impliqués, on s'est intéressé à l'effet de facteurs abiotiques tels que la température et l'intensité lumineuse sur le prélèvement d'un pesticide. L'effet de ces facteurs est donc étudié sur la disparition du diméthomorphe dans le milieu en présence de *L. minor* et sur la quantité retrouvée dans les plantes toutes les 24h pendant 4 jours. Dans le même temps, l'étude de l'impact de ces différents paramètres sur la croissance, la fluorescence chlorophyllienne a été réalisée dans le but de suivre la toxicité de ce produit selon les conditions et d'éventuellement la relier à l'efficacité de la remédiation.

Mots-clés : épuration, détoxication, plante aquatique, toxicité, lumière, température.

1. Introduction

Malgré le développement de certaines méthodes alternatives de protection des cultures, l'emploi des produits phytosanitaires reste encore incontournable en viticulture. De ce fait, les eaux de ruissellement des vignobles sont souvent très chargées en pesticides, entrainant la dégradation des milieux aquatiques, réceptacles finaux des eaux de ruissellement. Cette pollution peut alors être une source de stress pour les organismes non cibles. Restaurer ces milieux devient une nécessité. Différentes mesures sont possibles, essayer de réduire l'utilisation de ces intrants en premier lieu et d'appliquer en même temps d'autres techniques pour éliminer et extraire ces substances du milieu naturel. La phytoremédiation, une technique efficace et performante a attiré l'attention des chercheurs

Annexe 4

ces dernières années vue sa facilité de mise en œuvre et son faible coût. De plus, la capacité épuratrice des plantes aquatiques est maintenant prouvée (Wahaab *et al.*, 1995, Alvarado *et al.*, 2008). Cependant, peu de données sont disponibles sur le pouvoir épurateur de ces dernières vis-à-vis des pesticides (Gao *et al.*, 2000, Turgut, 2005). Des études ont montré que parmi une sélection de plantes aquatiques régulièrement utilisées en phytoremédiation, la lentille d'eau (*Lemna minor*) présente un bon pouvoir épurateur en particulier envers les fongicides tels que le diméthomorphe, fongicide fréquemment rencontré des les eaux de ruissellement du vignoble champenois (Olette *et al.*, 2008).

Pour améliorer la phytoremédiation et comprendre les mécanismes impliqués, on s'est intéressé à l'effet de facteurs abiotiques tels que la température et l'intensité lumineuse sur le prélèvement de diméthomorphe.

2. Matériels et Méthodes

2.1 Matériel végétal et conditions de culture

Les plantes sont cultivées comme indiqué dans Dosnon-Olette et al., 2009.

2.2 Exposition des plantes

Les expériences sont réalisées dans des erlenmeyers contenant 100 mL de milieu nutritif en présence ou non de lentilles d'eau (*Lemna minor*). Pour étudier l'effet de la température, les plantes sont placées dans une chambre de culture à 5, 15 ou 20°C avec une intensité lumineuse continue (100 μ mol PAR m⁻².s⁻¹). Quant à l'effet de la lumière il est évalué à 20°C sous différentes intensités lumineuses (0, 65, 100 et 200 μ mol PAR m⁻².s⁻¹).

Le diméthomorphe (DMM) (600 μ g.L⁻¹), est utilisé est sous sa forme commerciale, Forum[®] (150 g.L⁻¹ de substance active), cependant les concentrations indiquées sont toujours celles de la substance active.

Les prélèvements de milieu (900 μ L) ont été effectués toutes les 24 heures et stockés au réfrigérateur après ajout de 100 μ L d'acétonitrile. Pour le dosage du DMM dans les plantes, celui-ci est réalisé après 96h. Après broyage des plantes dans l'azote liquide, elles sont extraites 24h dans 5 mL de méthanol, évaporé et repris dans 0,7 mL d'ACN (Gonzalez -Barreiro *et al.*, 2006). La concentration du fongicide dans le milieu et dans les plantes est déterminée par HPLC (cf. Olette *et al.*, 2008).
Parallèlement, l'effet du DMM sur les plantes a été suivi par l'intermédiaire du taux de croissance et de la fluorescence chlorophyllienne. Le taux de croissance (μ) est déterminé par le nombre de frondes au début de l'expérimentation (N₀) et à l'instant t (N_t) chez les plantes témoins et contaminées selon la formule suivante :

 $\mu = 100 \; x \; (ln \; N_t - ln \; N_0) \; / \; n$

où n est le nombre de jours de l'expérience.

La fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m) est déterminée comme dans Olette *et al.* (2008).

3. Résultats

3.1 Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur le taux de croissance et la capacité photosynthétique maximale (Fv/Fm)



Figure 1. Effet de la température (A) et de l'intensité lumineuse (B) sur le taux de croissance de L. minor en présence (ligne pleine) ou non (ligne pointillée) de DMM.

A 5°C, on note une baisse significative du taux de croissance au cours du temps de 5 à 3,5 % chez le témoin et de 1,5 à 0,5 % en présence de DMM (Fig. 1A). A cette température, la présence de DMM entraîne une inhibition significative de la croissance de 80%. Au contraire, à 15°C, le taux de croissance augmente significativement au cours des 3 premiers jours puis se stabilise autour de 19 % chez le témoin et de 21 % chez le contaminé. A 20°C, le taux de croissance est voisin de 35% et ne semble pas non plus être affecté par la présence de DMM.

A l'obscurité on observe une baisse non significative du taux de croissance de 12 à 4 % chez le témoin et les contaminées (Fig. 1B). La présence du DMM n'affecte pas le taux de croissance de la lentille. Quelque soit l'intensité lumineuse (65, 100 ou 200 µmol PAR m⁻².s⁻

Annexe 4

¹), le taux de croissance de la lentille se situe entre 30 et 40 % qu'elle soit contaminée ou non par le DMM. On n'observe pas de différence significative entre les 3 intensités lumineuses.

La capacité photosynthétique maximale est affectée par une faible température, puisqu'elle passe de 0,8 en moyenne au début de l'expérience à 0,2 après 3 jours d'exposition à 5°C chez les plantes témoins (Fig. 2A). En présence de DMM, F_v/F_m diminue également au cours des 3 premiers jours. De plus, elle est significativement supérieure à celle du témoin après 48h.



Figure2. Effet de la température (A) et de l'intensité lumineuse (B) sur la capacité photosynthétique maximale (F_v/F_m) de L. minor en présence (ligne pleine) ou non (ligne pointillée) de DMM

A 15°C et 20°C F_v/F_m est compris entre 0,60 et 0,75 et 0,68 et 0,78, respectivement. On n'observe pas de variations significatives de F_v/F_m en présence du DMM.

La capacité photosynthétique maximale des lentilles contaminées ou non varie entre 0,64 et 0,78. De plus, cette capacité n'est pas affectée par la variation de l'intensité lumineuse $(0, 65, 100 \text{ et } 200 \text{ }\mu\text{mol} \text{ PAR m}^{-2}.\text{s}^{-1})$ ni par la présence de DMM (Fig.2B).

3.2 Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur le prélèvement du DMM

A 5°C la disparition du diméthomorphe dans le milieu de culture est faible en présence ou en absence de *L. minor* (Fig. 3A). Elle est de 3 % dans le milieu sans plantes et de 6 % en présence des lentilles. A 15°C, la disparition de DMM est légèrement plus importante dans le témoin sans plante (6 %) et dans le milieu en présence de plante (10 %).

Annexe 4

Une température élevée (20°C) permet une augmentation de la disparition du pesticide dans le milieu sans plantes (9%) et en présence de *L. minor* (19%).



Figure 3. Effet de la température (A) et l'intensité lumineuse (B) sur le prélèvement de DMM en présence (ligne pleine) ou non (ligne pointillée) de L. minor.

En l'absence de lumière, la disparition du DMM n'est pas significative que ce soit avec ou sans plantes (Fig. 3B). Elle est cependant de 5% en présence des lentilles. A 65 µmol PAR m⁻².s⁻¹, l'élimination de DMM devient significative en présence des plantes après 72h (10%), et elle atteint 15 % après 96h. Cet effet de la lumière s'accentue à 100 µmol PAR m⁻ ².s⁻¹, on constate une baisse de la concentration de DMM retrouvée dans le milieu avec *L. minor* (19% après 96h). Pour la plus forte intensité lumineuse testée on observe une disparition de 12% après 96 heures dans le milieu sans plante. En présence de plante on observe une disparition de DMM de 8% dès 24 heures qui augmente au cours du temps pour atteindre 25% après 96h.

3.3 Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur l'incorporation de DMM dans les plantes

Les quantités de DMM retrouvées dans *L. minor* sont résumées dans le tableau 1. Celles-ci augmentent avec la température et avec l'intensité lumineuse jusqu'à 100 μ mol PAR m⁻².s⁻¹. En effet, on passe de 0,07 μ g de DMM à 5°C à 0,29 μ g à 20°C. A l'obscurité, la quantité détectée dans les plante est de 0,05 et atteint 0,29 à une intensité de 100 μ mol PAR m⁻².s⁻¹.

	Température (°C)			Intensité lumineuse (µmol PAR m ⁻² .s ⁻¹)			
	5	15	20	0	65	100	200
DMM (µg)	0,07	0,14	0,29	0,05	0,08	0,29	0,24

Tableau 1. Quantité de DMM (µg) retrouvée dans L. minor exposée à différentes températures et intensités lumineuses.

N.B : Ces données sont issues d'une seule expérience et non pas pu être confirmées avant la soumission de ce résumé étendu

4. Discussion

Les résultats obtenus montrent l'impact des faibles températures sur le taux de croissance des lentilles d'eau confirmant l'augmentation du taux de croissance entre 5 et 25°C observée par Lasfar *et al.* (2007). Pour ce qui est de l'effet de l'intensité lumineuse, seule l'obscurité réduit la croissance des plantes. La contamination par le DMM ne montre pas d'effet significatif sur la croissance de *L. minor*.

La capacité photosynthétique maximale (F_v/F_m) est la quantité d'énergie lumineuse convertie en énergie chimique. Les résultats mettent en évidence que seule la température de 5°C a un effet négatif sur F_v/F_m . Aucun effet significatif de l'intensité lumineuse n'est remarqué. Avec ce paramètre également, le DMM ne semble pas avoir d'effet sur les plantes.

La gamme de température choisie ne semble donc pas induire de stress important sur les plantes comparable à ceux décrits par Kreslavski *et al.* (2008) pour qui les températures élevées combinées à des intensités lumineuses importantes induisent des dommages irréparables sur les plantes.

En l'absence de *L. minor* on observe une faible disparition du DMM dans le milieu, celle-ci n'est toutefois jamais significative et l'élimination observée en présence des plantes n'est donc pas simplement due à cette disparition. L'augmentation de la température entraine la diminution de la concentration du DMM dans le milieu avec *L. minor*. Des effets similaires sont obtenus par Fritioff *et al.* (2005) sur le prélèvement des métaux lourds par *Elodea canadensis*. Selon Fritioff *et al.* (2005), la hausse de la température va augmenter la biomasse, de ce fait la surface d'absorption des plantes accroîtra également d'où l'augmentation de la quantité des substances prélevées. Au contraire, pour Grollier *et al.* (1997) la température peut accélérer le processus de dégradation de la substance dans les tissus des plantes.

Annexe 4

Comme il a été observé pour *Scenedesmus acutus* dans le cas de l'absorption du chrome (Gorbi et *al.*, 2001), la concentration du diméthomorphe dans le milieu diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse, une photosynthèse active semble donc nécessaire à l'élimination du fongicide. Dans ce cas on n'observe pas de relation entre le taux de croissance qui ne varie pas avec l'augmentation de la luminosité (Fig. 1B) alors que l'élimination augmente (Fig. 3B). Il semble donc qu'il n'y ait pas de rapport direct entre le taux de croissance (ou la biomasse) et l'élimination contrairement à ce qui est proposé pour *E. canadensis* (Fritioff *et al.* 2005). La stimulation par la lumière serait donc liée à d'autres mécanismes.

5. Conclusion

A 600 μ g.L⁻¹ le DMM n'affecte ni la croissance ni la capacité photosynthétique maximale. L'augmentation de la température entraine une augmentation de la disparition du DMM dans le milieu et du taux de croissance sans affecter la photosynthèse. L'augmentation de l'intensité lumineuse entraine l'augmentation de la disparition du DMM sans affecter la croissance ni la photosynthèse.

Le pouvoir épurateur de *L. minor* dépend de la température et de l'intensité lumineuse. L'élimination semble donc être au moins partiellement, un phénomène énergiedépendant, confirmant ainsi les résultats du laboratoire (Dosnon-Olette *et al.*, 2009). La métabolisation du fongicide par la plante pourrait avoir un rôle dans son élimination.

D'un point de vue pratique pour une phytoremédiation efficace il faudrait une température d'au moins 20°C avec une intensité lumineuse suffisante.

Références :

- Alvarado S., Guédez M., Lué-Merú M.P., Nelson G. et Alvaro A. 2008. Arsenic removal from water by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia Crassips*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). Bioresources Technology 99:8436-8440.
- Dosnon-Olette R., Couderchet M. et Eullaffroy P. 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate. Ecotoxicology and Environmental Safety, doi:10.1016/j.ecoenv.2009.08.010.
- Fritioff A., Kautsky L. et Greger M. 2005. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. Environmental Pollution 133:265-274.
- Gao J., Garrison A.W., Hoehamer C., Mazur C.S., Wolfe N.L. 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 6114-6120.
- González-Barreiro O., Rioboo C., Herrero C. et Cid A. 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. Environmental pollution 44: 266-271.

- Gorbi G., Corradi M.G., Invidia M. et Bassi M. 2001. Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedensmus acutus* (Chlorophyceae). Ecotoxicology and Environmental Safety 48: 36-42.
- Grollier T., Feurtet-Mazel A., Boudou A. et Ribeyre F. 1997. Role of temperature on isoproturon bioaccumulation and effects on two freshwater rooted macrophytes: *Elodea densa* and *Ludwigia natans*. Ecotoxicological and Evironmental Safety 36: 205-212.
- Kreslavski V., Tatarinzev N., Shabnova N., Semenova G. et Kosobryukhuv A. 2008. Characterization of nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings from short-term dark heat exposures subjected and analysis of mode acclimation to different light intensities. Journal of Plant Physiology 165: 1592-1600.
- Lasfar S., Monette F., Millette L. et Azzouz A. 2007. Intrinsic growth rate: A new approach to evaluate the effects of temperature, phytoperiod and phosphorus-nitrogen concentration on duckweed growth under controlled eutrophication 41: 2333-2340.
- Olette R., Couderchet M., Biagianti S. et Eullaffroy P. 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere 70: 1414-1421.
- Turgut C. 2005. Uptake and modeling of pesticides by roots and shoots of parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). Environmental Science and Pollution Research 12: 342-346.
- Wahaab A.R., Lubberding H.J. et Alaerts G.J. 1995. Copper and chromium (III) uptake by duckweed. Water Sciences and Technology 32: 105-110.

ANNEXE 5 :

Résultats : enzymes de détoxication chez Lemna minor.



Activité du Cytochrome P450 chez *Lemna* en présence de diméthomorphe (100 μ M DMM) ou d'isoproturon (100 μ M IPU) comme substrats : (A) sans pré-incubation ; (B) après 24 h de pré-incubation avec du diméthomorphe (DMM, 30 μ M) et (C) après 24 h de pré-incubation avec de l'isoproturon (IPU, 1 μ M). * indique que le résultat est significatif par rapport au témoin (p < 0.05).

Concentrations de substrats et de produit-glucoside résultant de l'activité des GT en présence de différent substrats : diméthomorphe, 2,4,5-TCP et quercetin, avec ou sans extrait enzymatique de *Lemna*. * indique que le résultat est significatif par rapport au témoin sans extrait enzymatique (p < 0.05).

		Témoin	Lemna		
	Substrat (µM)	Produit-Glucoside (µM substrat eq/ mg protéine)	Substrat (µM)	Produit-Glucoside (µM substrat eq/ mg protéine)	
Diméthomorphe	100,4	0	99,3	4,0*	
2,4,5-TCP	101,4	0	84,0*	45,3*	
Quercetin	97,8	0	70,7*	132,6*	



Activités des A) GST et B) APOX chez Lemna exposée 24 et 96 h à du diméthomorphe.

* indique que le résultat est significatif par rapport au témoin (p < 0.05).