AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnements Continentaux
UMR CNRS 7360 LIEC

Ecole Doctorale Sciences et Ingénieries
Ressources Procédés Produits Environnement
RP2E ED 410

THESE

Pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Soutenue publiquement par :

Andréïna NUTTENS

le 26 Août 2016

Etude des effets de l'interaction entre polluants et ressources sur *Myriophyllum spicatum* grâce à une approche couplant écotoxicologie et écologie chimique

Membres du jury

GROSS Elisabeth M., Université de Lorraine, France	**Directrice de thèse**
BORNETTE Gudrun, Université de Franche-Comté, France	**Rapporteur**
ELGER Arnaud, Université de Toulouse 3, France	**Rapporteur**
SCHMITT-JANSEN Mechthild, UFZ, Allemagne	**Examinatrice**
MUYLAERT Koenraad, Université de Leuven, Belgique	**Examinateur**
HUSSNER Andreas, Université de Düsseldorf, Allemagne	**Invité**

LIEC - Bâtiment IBISE, Campus Bridoux, 8 av. du général Delestraint, 57070 Metz

Remerciements

Quand on fini sa thèse, je crois qu'on ne se rappelle que du meilleur, en tous cas c'est mon cas. Le meilleur, le voici ...

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse **Elisabeth M. Gross**. C'est avec toi que toute cette aventure a commencé. Le 20 Juillet 2012, je venais passer l'oral pour la thèse dans cette contrée lointaine et, je le pensais à l'époque, inaccessible, qu'était la Lorraine. Merci de m'avoir choisie pour ce travail, merci d'avoir tenu à me mettre à l'aise dès le départ, de m'avoir fait découvrir Metz dès le premier jour. Cela m'a permis de quitter ma Bretagne adorée plus confiante. Merci aussi pour ces 4 ans : merci de m'avoir fait grandir, de m'avoir fait gagner en assurance, d'avoir toujours pris du temps pour moi alors que tu avais d'autres choses à faire, d'avoir été une directrice humaine, à qui je pouvais parler de mes problèmes professionnels, ou personnels, en cas de besoin. Et surtout merci pour la dernière ligne droite de la rédaction où tu m'as épaulée, soutenue, coachée, boostée. Merci pour tes conseils avisés qui ont permis à ce manuscrit de thèse d'être ce qu'il est aujourd'hui. Je voudrais évoquer un souvenir qui m'a marqué : tu te souviens de la SETAC 2014? On s'est retrouvées le dimanche soir à 22h sans avoir mangé car les restaurants étaient fermés, dans nos chambres d'hôtel à travailler nos communications qui avaient lieu le lendemain matin tôt. Je me souviendrais toujours que nous avons mis en commun nos maigres victuailles : 2 ou 3 biscuits et une pomme afin de pouvoir travailler le ventre moins vide. Ça à l'air bête mais c'est un souvenir qui même aujourd'hui me touche beaucoup et que je voulais graver pour la postérité. Donc voilà, plein de petits merci pour finalement un grand merci général pour ces 4 ans. Un très grand merci aussi à **Luc** ton mari, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ses blagues et ses coups de main qui nous ont aussi tellement aidé durant ces 4 ans.

Je voudrais également remercier chaleureusement les différents membres de mon jury : **Gudrun Bornette** et **Arnaud Elger** qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je sais que vos commentaires seront très constructifs et m'apporteront un nouveau regard sur mes résultats.

I would also like to thanks warmly **Mechtild Schmitt-Jansen** and **Koenraad Muylaert** who have accepted to examine this work, even if a major part is in French. I look forward to our interesting discussions about my PhD work.

Merci également à **Andreas Hussner** d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour nos discussions toujours très enrichissantes lors de vos passages à Metz, pour votre gentillesse, et merci également d'avoir toujours été disponible pour des questions, un point de vue sur un article, ou sur une invasion de plantes exotiques. J'ai choisi d'écrire mes remerciements vous concernant en français car je sais que vous le parlez très bien maintenant.

Je remercie le Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, ainsi que l'ANSES, les programmes EC2CO et la Zone Atelier Moselle pour leur soutien financier sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour.

Merci également à l'équipe de direction du LIEBE devenu LIEC qui m'a accueilli durant ces 4 ans, merci à **Pascale Bauda** et **Fabien Thomas** : vous avez toujours été disponibles en cas de besoin et m'avez permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions.

Quand je suis arrivée en Lorraine, je n'y connaissais personne : aucune famille, aucun ami. Ce n'est plus le cas aujourd'hui, et c'est vraiment le cœur gros que je vais devoir quitter ce labo. Ce labo est devenu chez moi, mes collègues sont devenus ma famille et mes amis. Bien sûr on se reverra mais une page se tourne, une page que j'aurai voulu infinie.

Je voulais te remercier **Marie-Christine**, la première personne à qui j'ai parlé à Metz après Elisabeth. Merci pour toutes nos discussions, nos papotages, nos échanges littéraires et culinaires, ton réconfort aussi. Merci de m'avoir fait découvrir le "Rescue" cela m'a beaucoup aidé ces derniers jours.

Merci à tous les copains, et dieu sait qu'ils sont nombreux. D'abord merci à **Pierre**, alias K-Pi, à **Jen** la reine du cannelée (et autres recettes toujours réussies malgré ces dires) et **Veronica**, notre belle andalouse, car ce sont les premières personnes avec qui j'ai pu découvrir Metz "by night". K-Pi et Jen : on a commencé en même temps cette fabuleuse mais éreintante aventure qu'est la thèse, vous êtes maintenant docteurs et moi la retardataire, mais j'espère pouvoir partager votre titre d'ici quelques mois.

Cette thèse a été l'occasion de fabuleuses rencontres, notamment **Julio** (alias Papito) et **Evelyne**. Je suis fière de vous compter parmi mes amis. Merci pour tout plein de choses, et j'en oublierai : nos discussions, nos soirées, votre soutien sans faille, d'ailleurs mention spéciale à toi Evelyne pour le temps que tu as consacré aux corrections de français de cette thèse. Je vous souhaite vraiment le meilleur. Merci aussi à **Stéphane**, "ami de moi". Merci pour toutes nos discussions, nos parties de rigolades au bureau, le geocaching, et nos échanges ciné et/ou culinaires. Et merci à **Sarah**, ta chérie que tu m'a permis de rencontrer et que j'apprécie beaucoup. Je vous souhaite également le meilleur.

Je voudrais pouvoir écrire un paragraphe pour chaque personne mais si je le faisais il y aurait autant de remerciements que de "thèse" à proprement parler.

Alors un grand merci à **Emilie**, ma presque coloc d'un an, merci de m'avoir supportée, de m'avoir fait découvrir l'Allemagne, rappelle-toi toujours notre périple à Leipzig et Berlin : le fiat vert devant la porte de Brandebourg! Et merci à tous les copains du bureau passés ou présents : **Imad** (et ta petite famille, courage pour ta fin de thèse, ça va le faire), **Nanou**, (notre optimiste adorée), **Justine** (merci pour le coaching), **Hela** (que l'on ne voit jamais assez), **Théo**, **Karen**, **Elisabeth**, **Laure**, **Emmanuel**, **Marc**, **Loïc**. Une mention spéciale aux deux loulous que j'ai cités en dernier : merci de m'avoir accompagné dans mes nocturnes au labo, et de m'avoir autant fait rire dans ces derniers instants pas toujours faciles. Merci à toi **Béné** d'avoir été à l'écoute, merci pour les soirées, les conseils, pour tout quoi.

Merci à tous les copains d'en face : **Carole** (Bertrand) ma bretonne préférée que j'adore. Merci pour ton soutien et ton coaching. Milles merci à **Crecre**, bon, on sera jamais d'accord sur le cidre et le Mont Saint-Michel, mais c'est pas grave!! Courage à toi aussi. **Marine** et **Dan** (promis je ne donnerai plus de pain aux canards), **Kéwin** (le papy de mon chat), **Alice** et **Fanny** (vivement la prochaine soirée filles), **Malouf** et **Faufau** (merci pour toutes les découvertes culinaires, les soirées. Ne changez rien, j'espère vous revoir bientôt), **Vanessa** (à quand la leçon de couture?), **Nico** (tu m'apprendras ta célèbre danse de l'épaule?) et puis aussi toutes les personnes que j'oublie.

Je voudrais également remercier les post-docs, maîtres de conférences et professeurs du laboratoire : **Floriane**, **Elise**, **Albin**, **Romain**, j'ai hâte de pouvoir vous recroiser autour d'une bonne bière. Un merci spécial à **Simon** et **Sandrine** : pour leur grande aide durant cet ATER, et Simon un méga merci pour m'avoir permis d'appréhender ce vaste monde que sont les statistiques. Mention spéciale à vous et **Christophe** : mes MudCompagnons! Merci également à **Florence** et **Michael** : vos coups de mains et nos discussions m'ont beaucoup aidés. Merci à **Jean-François** (Masfaraud) : merci pour tes conseils avisés et ton soutien quand j'en ai eu besoin. Merci à **Marie** (Lejean) pour les coups de main, il faudra vraiment que j'essaye le yoga. Merci à **Sylvie**, et **Carole** (Cossu) : votre aide pour les enseignements a été précieuse. Merci à **François** (Rodius) pour avoir adapté mon service d'ATER autant qu'il a pu à mon profil de végétaliste, et à **François** (Guérold) pour m'avoir fait voyager en Afrique le temps d'une ou deux discussions. Merci à **Laure** pour le coaching qui tombait toujours à point nommé. Merci également à **Davide**, et **Eric** pour leur gentillesse, et à toi **Vincent** pour tous tes mots de réconforts et d'encouragement.

Merci également à **Marie-Andrée** (une cuisinière hors-pair), **Danièle** (ton punch me manquera), **Philippe** (Wagner, pour m'avoir fait découvrir les Vosges), **Philippe** (Rouselle, pour nous avoir fait voyager dans l'espace), **Clément**, **Etienne**, et **Jean-François** (Poinsaint). Merci également à **Maryline**, **Catherine**, **Valérie**, **Nathalie** (Kleinen, partie trop tôt), **Nathalie**, et **Rosie**. Sans vous tous le laboratoire et l'enseignement ne tourneraient pas. Merci pour votre aide, et votre gentillesse.

Durant cette thèse j'ai eu l'occasion d'encadrer de nombreux stagiaires, qu'ils travaillent ou non sur ma thèse. Ce fut un réel plaisir, vous m'avez permis de prendre conscience de mon goût pour la transmission du savoir. Je suis heureuse de compter plusieurs d'entre vous comme amis aujourd'hui. Je pense à **Sonia** notamment, bonne chance dans la vie et bisous à ta poupette. **Hillary** plein de bonheur avec K-Pi, **Marie** et **Marion** (on se fait le final de GoT ensemble, c'est promis!!) ou encore **Gaétan** alias "jeune Padawan". Merci à vous tous et à ceux que je n'ai pas cité.

Merci à mes encadrants de stage rennais : **Cécile Sulmon-Maisonneuve**, **Gwenola Gouesbet-Jan** et **Ivan Couée**. Vous m'avez fait découvrir et aimer le monde de la recherche, vous m'avez toujours soutenu et vous me soutenez encore. Si j'en suis là c'est aussi grâce à vous, alors merci!

Merci à toi **Magali**, tu m'as tellement manqué durant ces 4 ans. J'ai hâte de pouvoir te revoir, et rencontrer le petit Dimitri que je ne connais toujours pas.

Enfin je voudrais remercier ma famille (la vraie). **Papa**, **Maman**, merci de m'avoir toujours poussée, soutenue, d'avoir tenu bon malgré les épreuves qui nous ont touchées ces dernières années. Vous êtes un modèle et une source d'inspiration pour moi. Merci à mes frangins **Toto**, **Pounet**, et **Chichou** (oui oui tout le monde va connaître vos petits surnoms) pour toutes les parties de rigolades, et nos aventures de toujours. Et puis merci à **Papy** et **Mamy**. J'ai hâte de tous vous revoir après ces 7 mois passés loin de vous.

Merci également à ma belle-famille : **Claude** et **Charline** pour m'avoir accueilli chaleureusement et m'avoir confiée votre Bastien.

Bastien, mon amour, comme on dit, "last but not least". Merci pour tout, merci d'être toi, de permettre ce nous. Tu as été mon pilier cette année, pardon d'avoir eu si peu de temps à te consacrer, de ne pas avoir toujours été facile à vivre, de t'avoir un peu secoué. Le plus dur est derrière nous, l'avenir nous souris, je t'aime.

Résumé

La contamination des écosystèmes aquatiques par des polluants et des nutriments d'origine anthropique est un problème majeur, mais leurs effets combinés sur les plantes aquatiques (ou macrophytes) sont encore méconnus. L'objectif de cette thèse était d'étudier les effets de deux types de polluants : les herbicides et les éléments trace métalliques (ETM), en combinaison avec des conditions de ressources différentes : variation des macronutriments (azote et phosphore), ou sources de carbone différentes, sur une macrophyte d'intérêt : *Myriophyllum spicatum*, récemment identifiée comme nouvel organisme test de l'OCDE. Afin d'avoir une vue plus complète des effets combinés des deux facteurs de stress, une approche pluridisciplinaire a été utilisée dans laquelle des paramètres tirés de l'écologie chimique (stœchiométrie, métabolites secondaires) ont été combinés aux paramètres classiquement utilisés en écotoxicologie (croissance et pigments). Les expérimentations conduites sur l'isoproturon (IPU) et le mésosulfuron-méthyl (MSM), deux herbicides ayant des modes d'actions différents, ont permis de montrer des effets contrastés de ces deux molécules avec une accumulation de pigments, mais une réduction du contenu en matière sèche et du ratio C:N induite par l'IPU, et l'effet inverse induit par le MSM. Le mélange de ces deux herbicides n'a pourtant pas conduit à un masquage des effets, ou une toxicité accrue comme nous l'attendions. Au contraire, nos résultats ont montré que sa toxicité était similaire à celle du MSM. En mélange, la toxicité de l'IPU semble donc masquée par le MSM. Dans les deux cas, herbicides seuls ou en mélange, l'enrichissement en nitrate du milieu a modifié les effets des herbicides par rapport au milieu normal. Les expérimentations sur le cuivre, l'arséniate et le cadmium quant à elles n'ont pas permis de mettre en évidence de réelle toxicité de ces éléments aux doses testées, pourtant connues pour induire des effets chez *M. spicatum* et d'autres espèces de Myriophylle. Mais cela peut s'expliquer par le fait que *M. spicatum* est une plante connue pour tolérer et accumuler les métaux. En revanche, des modifications des ressources comme le nitrate ou le saccharose (ressource carbonée dans les milieux axéniques) ont induit des effets importants sur la physiologie et la stœchiométrie du Myriophylle. Ces modifications sont susceptibles d'altérer et finalement conduire à des changements imprévisibles des réponses de la plante à un stress supplémentaire, comme les pollutions. En conclusion, les résultats de cette thèse suggèrent qu'il est nécessaire de prendre en compte les ressources pour l'évaluation des effets des polluants ayant différents modes d'actions sur les macrophytes. Ce travail démontre en outre la nécessité d'ajouter des paramètres plus informatifs, tels que les paramètres physiologiques et écologiques dans les tests afin de répondre aux enjeux du stress multiple et améliorer l'évaluation du risque environnemental.

Mot clés : Myriophylle, herbicide, ETM, ressource, stœchiométrie, écotoxicologie

Abstract

Aquatic ecosystem contamination by either anthropogenic pollutants or nutrients is a major issue, but their combined effects on aquatic plants (or macrophytes) are still poorly known. The main objective of this thesis was thus to study the effects of two types of pollutants widely found in aquatic ecosystems: herbicides and trace metal elements (TME), in combination with different resource conditions, like variations in the macronutrients nitrogen and phosphorus, or different carbon sources on *Myriophyllum spicatum,* a macrophyte of interest and also recently identified as new OECD test organism. In order to have a more complete view of the combined effects of the two stressors, a multidisciplinary approach was used in which parameters derived from chemical ecology (stoichiometry, secondary metabolites) were combined with parameters conventionally used in ecotoxicology (growth or pigments). Experiments conducted with isoproturon (IPU) and mesosulfuron-methyl (MSM), two herbicides with different modes of action, have shown contrasting effects of these molecules. An accumulation of pigments but reduced dry matter content and C:N ratio were induced by IPU, whereas opposite effects were induced by MSM. Yet the mixture of these two herbicides did not lead to a masking effect or increased toxicity as we postulated. On the contrary, our results showed that the overall toxicity was similar to that of MSM. Thus, in mixture IPU effects seem to be masked by MSM. For all conditions, single contamination or herbicide mixture, nitrate enrichment had modified herbicide effects compared to the normal medium. On the other hand, experiments with copper, arsenate and cadmium failed to demonstrate actual toxicity of these elements at the tested doses however known to induce effects in *M. spicatum* and other watermilfoil species. But this might be explained by the fact that *M. spicatum* is known to tolerate and accumulate metals. In contrast, significant effects on physiology and stoichiometry were induced by changes in resource conditions such as nitrate or sucrose (carbon resource in axenic media). These resource-induced changes in physiology may alter, and ultimately lead to unforeseen changes in the responses of the plant to additional stressors, like pollution. In conclusion, the findings of this thesis suggest that resource conditions need to be taken into account when assessing the effects of pollutants with different modes of action on macrophytes. This work also demonstrates the need to add more informative parameters such as physiological and ecological endpoints in tests to address the challenges of multiple stressor situations, and to improve environmental risk assessment.

Keywords : Watermilfoil, herbicide, TME, resource, stoichiometry, ecotoxicology

Table des matières

INTRODUCTION 1

I. Les écosystèmes aquatiques : points de convergence des pollutions anthropiques 3

II. Prise de conscience de la dégradation des écosystèmes aquatiques et mesures législatives 4

III. Enjeux actuels 5

CHAPITRE I : Analyse bibliographique 7

I. Les macrophytes : un compartiment clé dans l'étude du devenir des écosystèmes aquatiques 9

I.1 Généralités 9

I.2 Un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques 9

I.3 Pourquoi s'intéresser aux macrophytes en évaluation des risques? 10

I.4 Myriophyllum spicatum : un nouveau modèle d'intérêt pour l'évaluation des risques 11

II. L'écotoxicologie une discipline en pleine évolution 15

II.1 Généralités et historique 15

II.2 Limites des approches écotoxicologiques "classiques" 16

II.3 Mettre plus d'écologie en écotoxicologie : Quelles solutions ? 18

III. L'étude du stress multiple 20

III.1 Concepts de stress et stresseur 20

III.2 Les stresseurs en milieux aquatiques 21

III.3 Challenges posés par l'évaluation de risque des stress multiples 24

IV. Effets de deux facteurs de stress prédominant : les polluants et les nutriments sur les macrophytes 30

IV.1 Effets isolés des herbicides et des ETM 31

IV.2 Interactions entre les herbicides ou ETM et les nutriments 44

OBJECTIFS DE LA THESE 55

CHAPITRE II : Démarche scientifique 61

I. Choix d'un système plante-eau en conditions axéniques 63

II. Choix du milieu de culture 63

III. Choix des paramètres étudiés 64

CHAPITRE III : Effets des nutriments sur la toxicité de deux herbicides 67

I. La présence de nitrate affecte-t-elle les réponses biologiques d'une plante aquatique à deux herbicides communs ? 69

I.1 Abstract 71

I.2 Introduction 72

I.3 Materials and methods 75

I.4 Results 79

I.5 Discussion 85

I.6 Conclusions 89

I.7 Supplementary data 91

II. Mise en évidence des effets de l'exposition à des herbicides en mélange combinés, avec un enrichissement en nitrate, après seulement une semaine d'exposition 97

II.1 Abstract 99

II.2 Introduction 100

II.3 Materials and methods 102

II.4 Results 107

II.5 Discussion 109

II.6 Supplementary data 112

CHAPITRE IV : Effets des nutriments sur la toxicité de différents ETM 115

I. Effets des nitrates sur la toxicité du cuivre, un élément essentiel largement utilisé comme fongicide 117

I.1 Abstract 119

I.2 Introduction 119

I.3 Materials and methods 122

I.4 Results 124

I.5 Discussion 131

II. Effets des variations en azote et phosphore sur les effets de l'arséniate 135

II.1 Abstract 137

II.2 Introduction 138

II.3 Materials and methods 140

II.3 Results 144

II.4 Discussion 152

III. Conséquences de doses variables de saccharose dans les milieux de culture sur les effets du cadmium 155

III.1 Abstract 157

III.2 Introduction 158

III.3 Materials and methods 160

III.4 Results 163

III.5 Discussion 165

III.6 Conclusion 170

III.7 Supplementary material 171

CHAPITRE V : Discussion générale 175

I. Chaque polluant a-t-il une empreinte spécifique? 177

II. Est-ce que les nutriments modifient les réponses du Myriophylle aux polluants? 179

III. Quels sont les apports d'une approche couplant écotoxicologie et écologie chimique? 181

IV. Quelles sont les conséquences pour les écosystèmes aquatiques? 183

V. L'évaluation du risque de demain : faut-il revoir certaines approches? 185

V.1. Quel type de test choisir? 185

V.2. Quel milieu choisir? 186

PERSPECTIVES 191

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 195

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 Principales sources de pollutions aboutissant dans les milieux aquatiques 3

CHAPITRE I : Analyse bibliographique

Figure I.1 Myriophylle à épi 12

Figure I.2 Structure de la tellimagrandine II, le composé phénolique majoritaire de Myriophyllum spicatum responsable de l'inhibition de ses compétiteurs et de ses herbivores 13

Figure I.3 Canopée dense de *Myriophyllum spicatum* à la surface d'un lac 14

Figure I.4 Influence de l'intensité d'une variable sur la réponse d'un organisme, et mise en évidence du stress et des facteurs de stress 21

Figure I.5 Proportions du nombre total des masses d'eau classées (rivières, lacs, eaux côtières et eaux de transition) présentant des pressions significatives clairement identifiées (colonne de gauche) ainsi que leur impacts (colonne de droite) 22

Figure I.6 Fréquences d'apparition de combinaisons à deux stresseurs dans les eaux de surface 23

Figure I.7 Nombre de groupes de facteurs de stress simultanés retrouvés dans les milieux aquatiques des publications analysées par Nõges et al., (2016) 24

Figure I.8 SSD (Species Sensitivity Distribution) réalisée à partir de données de tests de toxicité à court-terme de plusieurs espèces aquatiques à l'atrazine (A), au diquat (C) et au 2,4-D (E). Les graphiques (B), (D), et (F) présentent les mêmes données mais cette fois séparées par groupe : algues, macrophytes, invertébrés et vertébrés 25

Figure I.9 Potentiels modèles d'effet de l'intensification des pratiques agricoles sur la diversité des espèces non-cibles. Les lettres a à f de l'axe des abscisses représentent l'état de gestion depuis "a" un écosystème sans gestion particulière, jusqu'à "f" une agriculture intensive et industrialisée. L'intensification a tendance à réduire la diversité, mais cette diminution peut prendre différentes trajectoires 26

Figure I.10 L'intensité et la fréquence de chaque type de facteurs de stress (chimiques, biologiques et physiques) diffèrent et influencent la réversibilité de leurs effets 27

Figure I.11 Etats stables alternatifs. Les perturbations peuvent modifier l'écosystème (représenté par la balle ; du schéma 1 à 4) de telle sorte qu'il passe d'un état stable nominal à un nouvel état stable dit alternatif (les état stables sont représentés par les "vallées") 28

Figure I.12 Interactions entre les facteurs de stress au sein de situation de multistress pour différents environnements aquatiques. TraC - eaux de transition et côtières ; GW - eaux souterraines 29

Figure I.13 Concentrations de cuivre mesurées dans des tiges de *M. spicatum* et effet sur la croissance (longueur de la tige) suite à leur l'exposition à différentes concentrations de Cu pendant 4 jours (10 µM Cu = 635,46 µg/L) 38

CHAPITRE III : Effets des nutriments sur la toxicité de deux herbicides

Figure III.1 Relative growth rate by length, (RGR-Length; **a** & **f**, including EC_{50} values), dry matter content (DMC; **b** & **g**), total chlorophyll content, (Chl_{a+b}; **c** & **h**), anthocyanin content (**d** & **i**) and C:N molar ratio (**e** & **j**) in *Myriophyllum spicatum* in response to isoproturon (IPU; **a** to **e**) and mesosulfuron-methyl (MSM; **f** to **j**) concentrations, in media NP-25 (dark circles) and NP-100 (white circles), after 14 days of exposure 83

Figure III.2 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum*. **a -** Correlation circle, **b** - effect of nitrate level of the medium, **c** - effect of herbicide: isoproturon (IPU) and mesosulfuron-methyl (MSM), **d** - all treatment combinations; after 14 days of exposure to herbicide concentrations from 0 (control) to 1000 µg L^{-1} 84

Figure III.3 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum* after 7 days of exposure (**T7**; **a** to **d**) or after 14 days of exposure (**T14**; **e** to **h**). **a & e -** Correlation circles, **b & f** - effects of nitrate level of the medium (N:P = **25:1** or **100:1**), **c & g** - effect of herbicide: isoproturon (**IPU**), mesosulfuron-methyl (**MSM**) or mixture of both (**Mix**), **d & h** - all treatment combination: medium, herbicide and concentration (**1** = 0.5 or 5 µg L^{-1} of MSM or IPU respectively; and **2** = 5 or 50 µg L^{-1} of MSM or IPU respectively, alone or in mixture) 106

CHAPITRE IV : Effets des nutriments sur la toxicité de différents ETM

Figure IV.1. Response of *Myriophyllum spicatum* to increasing copper concentrations (additional copper added to normal media concentrations), in media with standard medium nitrate levels (NP-25; dark circles) and high nitrate levels (NP-100; white circles), after 14 days of exposure 127

Figure IV.2. Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum*. **a -** Correlation circle, **b** - all treatment combinations; after 14 days of exposure to copper additions from 0 (control) to 1000 µg L^{-1} 131

Figure IV.3 Effects of As(V) at two concentrations (47 and 468 µg L-1; grey and black bars, respectively) compared to controls (white bars) for four endpoints and two sampling dates. The selection of endpoints has been based on the results of the Partial Least-Squares (PLS) analysis shown in **Table IV.4**. Data are shown as means ± 1 SEM. No letter code for differences between conditions are given for this type of statistical analysis 145

Figure IV.4 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum* exposed to different arsenate levels (control = 0; low level = I, high level = II) in five different media (N10, N40, NP25, P10 and P40 based on modifications of either the nitrogen or phosphorus content and the respective N:P molar ratios). **a, c -** Correlation circles for day 7 and day 14, **b, d** - all treatment combinations; after 7 or 14 days of exposure 147

Figure IV.5 Evolution of pH (**A**) and conductivity (**B**) in the five different media after 0, 7 or 14 days of exposure: N:P = 10:1 with modifications of N (N10) or P (P10), N:P = 25:1 (25), or N:P = 40:1 with modifications of N (N40) or P (P40); regardless of arsenate level applied. Data are expressed as single value for T0, and as means ± 1 SEM with n = 3 for T7 and T14. 152

Figure IV.6 Responses of axenic *Myriophyllum spicatum* to sucrose and cadmium addition after seven days of exposure. **A**) Relative growth rate by length (RGR-L), **B**) total chlorophyll content (Chl a+b), **C**) carbon content, **D**) phosphorus content, **E**) dry matter content (DMC), **F**) nitrogen content, **G**) carbon to nitrogen molar ratio (C:N ratio), and **H**) carbon to phosphorus molar ratio of plant (C:P ratio) 166

Figure IV.7 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum* to increasing concentrations of sucrose in medium (**0**, **3**, and **30** g L^{-1}), in presence (**Cd**) or absence (**Control**) of 5.5 µM Cd after 7 days of exposure 167

<u>CHAPITRE V</u> : Discussion générale

Figure V.I Analyse en composante principale (ACP) des trois polluants testés dans des conditions identiques sur *Myriophyllum spicatum* : l'isoproturon (IPU), un herbicide inhibiteur de la photosynthèse, le mésosulfuron-méthyl (MSM), un herbicide inhibiteur de la synthèse des acides aminés branchés, et le cuivre (Cu) un élément trace métallique (ETM) utilisé comme fongicide 179

Figure V.II Outils expérimentaux utilisés en écotoxicologie aquatique 186

Liste des tableaux

CHAPITRE I : Analyse bibliographique

Tableau I.1 Principaux facteurs limitants des tests standardisés en laboratoire et questions posés pour l'extrapolation des résultats en conditions naturelles 17

Tableau I.2 Avancées théoriques importantes en écologie des communautés et applications potentielles en écotoxicologie 19

Tableau I.3 Classification des effets des combinaisons de facteurs de stress proposée par Piggott et al, 2015 d'après Crain et al, 2008 29

Tableau I.4 Synthèse des effets connus des herbicides sur le genre *Myriophyllum* 32

Tableau I.5 Synthèse des effets connus des ETM sur le genre *Myriophyllum* 39

Tableau I.6 Synthèse des effets connus des herbicides et ETM combinés aux nutriments sur les organismes photosynthétiques d'eau douce 47

CHAPITRE II : Démarche scientifique

Tableau II.I. Composition élémentaire du milieu 1/2 Min A 64

CHAPITRE III : Effet des nutriments sur la toxicité de deux herbicides

Table III.1 Isoproturon and mesosulfuron-methyl results of the statistical analysis (2 way-ANOVAs or Kruskal-Wallis for non-parametric data) to assess respective effects of nitrate level and herbicide concentration and their interactive effects on measured parameters after 14 days of exposure 81

Table III.2 Results for all measured endpoints based on different herbicide concentrations and nitrate level. Data are presented as means ± 1 SEM with n = 3. Results of Tukey post-hoc tests after 2-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA (see Table 1) are indicated by letter code. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ 91

Table III.3 Modified table 1 to represent only herbicide concentration ranging from 0 to 500 µg L^{-1}. Isoproturon and mesosulfuron-methyl results of the statistical analysis (2 way-ANOVAs or Kruskal-Wallis for non-parametric data) to assess respective effects of nitrate level and herbicide concentration ranging from 0 to 500 µg L^{-1} and their interactive effects on measured parameters after 14 days of exposure. Residual df = 34 95

Table III.4 Results of a three-way MANOVA analysis based on three factors and all endpoints measured in *Myriophyllum spicatum*. Results are given for effects of medium type (NP-25 and NP-100 based on respective N:P molar ratios), herbicide type (isoproturon = IPU, mesosulfuron = MSM, or mixture of both = Mix) and herbicide level (5 and 50 µg L^{-1} for IPU and 0.5 and 5 µg L^{-1} for MSM for levels 1 and 2, respectively), and all interaction terms after 7 or 14 days of exposure 105

Table III.5 Hotelling test results (significant differences at $p < 0.05$) for pair-wise comparisons of PCA groups defined by the combination of the three studied factors on *Myriophyllum spicatum*: medium (NP-25 and NP-100 based on respective N:P molar ratios), herbicide type (isoproturon = IPU, mesosulfuron = MSM, or mixture of both = Mix) and herbicide level (5 and 50 µg L^{-1} for IPU and 0.5 and 5 µg L^{-1} for MSM for levels 1 and 2, respectively) after 7 or 14 days of exposure 109

Table III.6 Results for all measured endpoints based on different nitrate levels and treatments: isoproturon at 5 (IPU I) or 50 µg L^{-1} (IPU II); mesosulfuron-methyl at 0.5 (MSM I) or 5 µg L^{-1} (MSM II), or mixture of both at 5 and 0.5 µg L^{-1} of IPU and MSM respectively (Mix I) or at 50 and 5 µg L^{-1} of IPU and MSM (Mix II). Data are presented as means ± 1 SEM with n = 6 for controls and n = 3 for treatments 112

<u>CHAPITRE IV</u> : Effets des nutriments sur la toxicité de différents ETM

Table IV.1 Results for nitrate and copper effects and the interaction of both factors on *Myriophyllum spicatum* endpoints based on 2 way-ANOVAs or Kruskal-Wallis ANOVAs (for non-parametric data) after 14 days of exposure 125

Table IV.2. Results for all measured endpoints in *Myriophyllum spicatum* based on different copper additions (indicated in µg L^{-1} in the left-hand column) and nitrate level (N:P = 25:1 and 100:1). Data are presented as means ± 1 SEM with n = 3. Results of Tukey post-hoc tests after 2-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA (see **Table IV.1**) are indicated by letter code 128

Table IV.3 Nitrogen and phosphorus sources and concentrations of the five different media in which *Myriophyllum spicatum* was cultivated 141

Table IV.4 Results of Partial Least-Squares (PLS) conducted with experimental groups after 7 days of exposure (T7) or 14 days of exposure (T14). Variable Important in the Projection (VIP) in bold reflecting the most important predictor biomarkers, R^2 assessing the quality of representation of each variable and Weight axis used to define the contribution of each variable and the correlation sign 143

Table IV.5 Respective effects of each factor (medium and arsenate) and their interactive effects on *Myriophyllum spicatum* (two-way multivariate analysis of variance - MANOVA, significant differences at $p < 0.05$), after 7 (T7) and 14 (T14) days of exposure 144

Table IV.6 Hotelling test results (significant differences at $p < 0.05$) for pair-wise comparisons of PCA groups defined by the combination of the two studied factors on *M. spicatum*: (i) in five different media (N10, N40, NP25, P10 and P40 based on modifications of either the nitrogen or phosphorus content and the respective N:P molar ratios; and (ii) arsenate: 0, 0.625 (I) or 6.250 µM (II); after 7 (T7) or 14 (T14) days of exposure 148

Table IV.7 Results for all measured endpoints based on different media: N:P = 10: 1 with modifications of N (N10) or P (P10), N:P = 25 (25), or N:P = 40 with modifications of N (N40) or P (P40); and arsenate concentrations of zero (0), 0.625 (I) or 6.250 µM (II) 149

Table IV.8 Results of the statistical analyses (2-way ANOVA) assessing the effects of cadmium or sucrose and their interactive effects on different growth and physiological endpoints in *Myriophyllum spicatum* after 7 days of exposure. For acronyms used, please see table 2 or Material & Methods section. Molar ratios for C, N and P are shown here 162

Table IV.9 Results for all measured endpoints not shown in Fig. 1. Data are presented as means ± 1 SEM. Results of Tukey post-hoc tests after 2-way ANOVA (see Table 1) are indicated by letter code 162

Table IV.10 Results of the statistical analyses (1- or 2-way ANOVA) for medium conditions after 7 days of exposure. Data are shown as means ± 1 SD. Results of Tukey post-hoc tests are indicated by letter code. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ .. 171

Table IV.11 Cadmium concentrations in different compartments measured in the supplementary experiment. Only one replicate per cadmium condition was used. The nominal initial Cd concentration was 30.65 µg per flask of 50 mL (613 µg L^{-1}). Data below are related to the measured initial Cd concentrations in the media 173

INTRODUCTION

I. Les écosystèmes aquatiques : points de convergence des pollutions anthropiques

Ces deux derniers siècles ont connu un développement technologique sans pareil. Les innovations tant agricoles (révolution verte), qu'industrielles (révolution industrielle), ou numériques ont permis un accroissement de la population mondiale très important. Mais face aux besoins d'une population toujours grandissante, il a fallu produire plus, et plus vite. Aujourd'hui répondre aux besoins alimentaires et matériels de la population mondiale reste ainsi un enjeu majeur (Mózner et al., 2012).

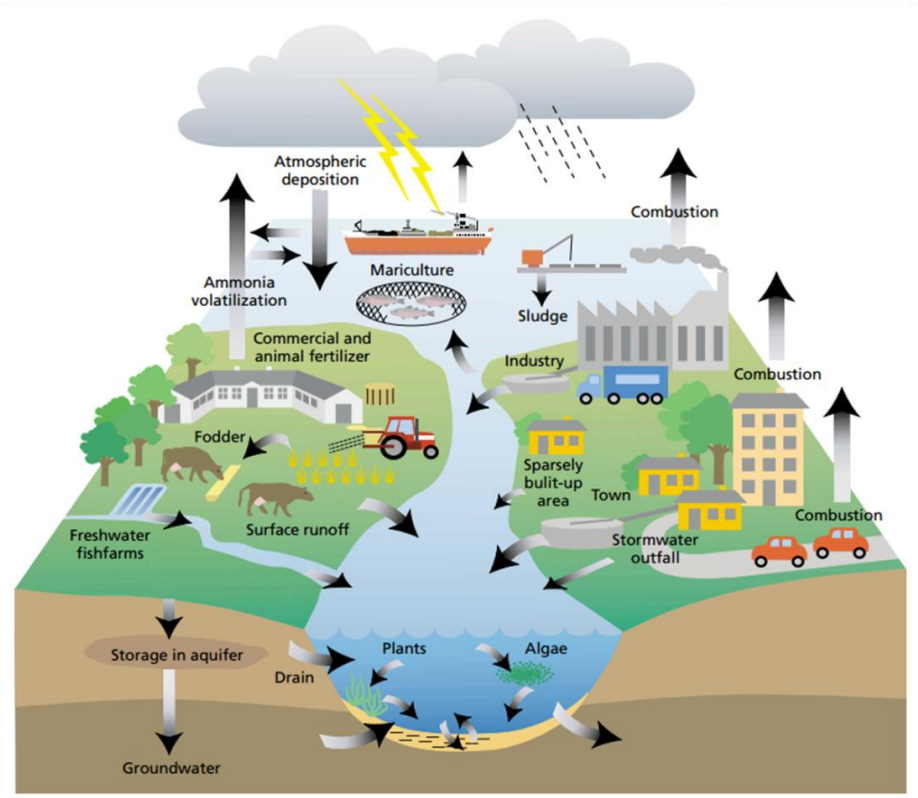


Figure 1 Principales sources de pollutions aboutissant dans les milieux aquatiques (tiré de Ærtebjerg et al., 2003).

Or les activités anthropiques utilisent et/ou génèrent des molécules polluantes : hydrocarbures, pesticides, éléments traces métalliques (ETM), nanoparticules et bien d'autres encore ; qui se retrouvent directement ou indirectement (via des phénomènes de ruissellement, de lessivage, d'infiltration, de volatilisation ou de déposition) dans les milieux aquatiques (**Figure 1**). La multiplicité des voies d'entrée, à la fois directes et indirectes de ces

molécules, font des écosystèmes aquatiques un point de convergence de l'ensemble des différentes pollutions anthropiques.

II. Prise de conscience de la dégradation des écosystèmes aquatiques et mesures législatives

Malgré le constat de rejets dans les milieux aquatiques de molécules aujourd'hui qualifiées de polluants, la prise de conscience de leurs effets néfastes sur les organismes a peinée à émerger. Le livre de Rachel Carlson "Silent Spring" paru en 1963 a largement aidé à faire connaître le problème. En effet, cette biologiste américaine a pour la première fois alerté le public sur les effets secondaires toxiques des insecticides organochlorés, comme le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), largement utilisés durant la révolution verte. Les résidus de ces pesticides ont été trouvés persistant dans les chaînes trophiques, atteignant des concentrations plus élevées, et donc pouvant avoir des effets beaucoup plus graves aux niveaux trophiques supérieurs. Ces résidus ont été identifiés comme étant la cause du déclin rapide des populations de rapaces, comme le faucon pèlerin et l'épervier, par l'amincissement des coquilles d'œufs (Krebs et al., 1999). Ce livre, tel un pavé dans la mare, a participé à faire prendre conscience des nombreuses conséquences environnementales de l'accumulation de ces substances toxiques, notamment via l'induction d'effets délétères chez des espèces non-cibles, la bioaccumulation de ces substances le long des réseaux trophiques, et donc la perturbation du fonctionnement global des écosystèmes aquatiques. Quelques années plus tard, en 1969, était créé un nouveau champ disciplinaire qui ne cesse de croître et se développer aujourd'hui : l'écotoxicologie (Bard, 2008; Molle, 1984). Cette discipline, dont je parlerai en détail dans le **chapitre I** de ce manuscrit, littéralement : toxicologie environnementale, a pour but d'étudier et d'évaluer les effets des polluants sur les organismes et les écosystèmes.

La plupart des études écotoxicologiques corroborant les faits rapportés par Rachel Carlson ont fini par alerter les autorités quant aux conséquences dramatiques des rejets de molécules polluantes. Ces premières prises de conscience des autorités ont permis la mise en place de systèmes de retraitement des eaux et ont permis de réduire les quantités de polluants rejetés. Mais, parallèlement les avancées technologiques ont multiplié les sources

de pollutions. Ainsi nous sommes passés de situations avec de fortes doses de quelques contaminants à des situations avec des doses plus faibles d'une multitude de contaminants (Schmitt-Jansen et al., 2008; Van Straalen, 2003). C'est pourquoi, afin de limiter ces contaminations, des législations environnementales ont été mises en place dans le monde et notamment en Europe. Parmi elles, la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE) du 23 Octobre 2000 (directive 2000/60/CE) s'intéresse aux quantités de molécules dans les cours d'eau, et visait l'atteinte du bon état écologique des masses d'eau en 2015. Pour atteindre les objectifs de qualité des eaux définis par la DCE des actions peuvent être menées à deux niveaux. D'abord, réduire les émissions et applications de molécules. C'est notamment ce que propose de faire le plan Ecophyto 2018, qui vise à réduire de 50 % l'utilisation des pesticides d'ici 2018 (ce plan est aujourd'hui reporté à 2025, Ecophyto 2). Et d'autre part de promouvoir la mise en place de systèmes permettant de limiter les flux de polluants pouvant atteindre les cours d'eau et les nappes phréatiques, comme par exemple la mise en place de bandes enherbées préconisées par la Politique Agricole Commune (PAC), ou bien la création de dispositifs de filtration des eaux de drainage. Cependant, la mise en place de systèmes tels que les bandes enherbées, ou les dispositifs de filtration des eaux de drainage, censés réduire les émissions de polluants dans les environnements aquatiques nécessitent d'étudier l'efficacité réelle de ces systèmes et de trouver les assemblages d'espèces les plus tolérants et ayant les meilleures capacités d'épuration afin d'optimiser leur efficacité.

III. Enjeux actuels

Le cadre législatif de la DCE et du plan Ecophyto, décrit précédemment, a grandement contribué à la réduction des rejets de polluants dans l'environnement, et donc à une amélioration de la qualité des eaux. Néanmoins, les apports de polluants, bien que réduits, existent toujours, et continueront d'exister tant qu'une solution alternative n'aura pas été trouvée. De plus, la contamination de nombreuses nappes phréatiques constitue une source de molécules toxiques non négligeable pour les années à venir. Subséquemment, les études d'écotoxicologie restent plus que nécessaires, notamment pour l'évaluation des risques environnementaux.

Or, les avancées récentes concernant la compréhension du fonctionnement des écosystèmes, mais aussi des effets des polluants sur ces derniers suggèrent de plus en plus la

nécessité de prendre en compte la réalité environnementale dans toute sa complexité. Aussi, il convient aujourd'hui d'appréhender l'écotoxicologie de façon intégrée, en tenant compte de tous les facteurs (biotiques, abiotiques ou anthropiques) pouvant influencer la toxicité des polluants et/ou la réponse des organismes à ces polluants au sein des écosystèmes. C'est pourquoi certains scientifiques parlent maintenant d'écologie du stress (**Chapitre II** ; Van Straalen, 2003), ou d'étude du stress multiple (**Chapitre III** ; Hering et al., 2015; Segner et al., 2014) plutôt que d'écotoxicologie. En effet, les activités anthropiques n'ont pas pour seule conséquence l'apport de contaminants dans les écosystèmes, elle sont également responsables des changements climatiques, de changements d'usage des terres et de l'eau, de problème d'acidification, de salinisation, ou d'enrichissement en nutriments entrainant de nombreux problèmes d'eutrophisation des milieux aquatiques, etc ... (Artigas et al., 2012; Ban et al., 2014; Crain et al., 2008). Or ces différents stresseurs sont susceptibles d'interagir entre eux, et avec les pressions naturelles, et de modifier les réponses des organismes aux polluants (Heugens et al., 2001; Rotter et al., 2013; Segner et al., 2014). Les enjeux actuels sont donc d'une part, d'identifier, de comprendre, voire de prédire les réponses des organismes aux contaminants dans un contexte de stress multiples, et d'autres part d'estimer les répercussions d'éventuels impacts sur les organismes, et à plus large échelle, sur le fonctionnement des écosystèmes (**Chapitre III**).

CHAPITRE I

Analyse bibliographique

I. Les macrophytes : un compartiment clé dans l'étude du devenir des écosystèmes aquatiques

I.1 Généralités

Les macrophytes aquatiques sont un compartiment végétal constitué d'un assemblage divers de plantes suffisamment grandes pour être visibles à l'œil nu, et adaptées à une vie partielle ou totale dans l'eau. Ce groupe comprend des bryophytes (mousses), des ptéridophytes (fougères), des sphénophytes (prêles), et des phanérogames (plantes à fleurs), aussi bien que des macroalgues comme les Characées. Néanmoins, les plantes à fleurs comprenant des monocotylédones et des dicotylédones constituent le groupe majoritaire (Haury et al., 2001). Dans les milieux aquatiques des régions tempérées, les monocotylédones, comme les potamots et hydrocharidacées, sont souvent le groupe dominant en termes d'espèces présentes, principalement parmi les plantes immergées, et seules quelques espèces de dicotylédones comme les Myriophylles sont retrouvées (Chambers et al., 2008; Cook, 1999).

Les macrophytes peuvent être classées de différentes façons. Par exemple selon leur inféodation à l'eau, auquel cas on distinguera les hydrophytes, totalement immergées ; les amphiphytes ou plantes amphibies ; et les hélophytes, dont seule la partie basale (racine, rhizome) est immergée. Ou bien selon leur mode de croissance, on distingue notamment les macrophytes émergées, enracinées avec feuilles flottantes, flottant librement ou bien submergées et enracinées (Haury et al., 2001; Maltby, 2010). Ce sont ces dernières, les macrophytes submergées et enracinées, qui nous ont intéressées dans ce travail de thèse.

I.2 Un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques

Les macrophytes immergées, en tant qu'organismes sessiles, sont des éléments clés des écosystèmes aquatiques. En effet, elles ont des effets importants sur l'environnement à différents niveaux. D'un point de vue physique les macrophytes peuvent influencer les conditions de luminosité, de température, d'écoulement de l'eau, ou bien encore la stabilité du substrat. D'un point de vue chimique, elles ont des effets majeurs sur l'oxygénation de la colonne d'eau et les cycles biogéochimiques du carbone et des nutriments. En tant que source de nourriture (directe ou via l'épiphyton), mais aussi en tant qu'abris ou substrat, les

macrophytes tiennent un rôle primordial dans le maintien de nombreuses espèces aquatiques (Carpenter and Lodge, 1986; Lewis, 1995). Les macrophytes sont aussi essentielles dans le maintien de la clarté des eaux stagnantes peu profondes (Coutris et al., 2011; Scheffer et al., 1993), car elles inhibent efficacement le développement du phytoplancton via la compétition pour les nutriments et l'émission de composés allélopathiques (Gross, 2003a). Elles déterminent également le potentiel récréatif et de navigation des systèmes aquatiques (Mohan and Hosetti, 1999; Wersal et al., 2010). Ainsi, en cas de réduction des macrophytes, il faut s'attendre à des impacts important sur l'ensemble de l'écosystème mais aussi la qualité de l'eau, ainsi que les usages récréatifs des plans d'eau et la navigation (Lewis, 1995; Mohan and Hosetti, 1999).

I.3 Pourquoi s'intéresser aux macrophytes en évaluation des risques?

En raison de leur caractère sessile, leur capacité à accumuler les composés chimiques, le fait qu'elles soient visibles à l'œil nu et soient faciles à récolter et manipuler, les macrophytes sont depuis longtemps utilisées dans les études écologiques en tant que bioindicateurs *in-situ* de la qualité de l'eau (Haury et al., 2001; Lewis, 1995). Mais, pour les mêmes raisons, elles sont également les premières impactées par les contaminations anthropiques (Ferrat et al., 2003). Or, comme vu précédemment, les macrophytes ont un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (Carpenter and Lodge, 1986; Lewis, 1995). Ainsi tout impact sur les macrophytes se répercutera sur l'ensemble de l'écosystème. C'est pourquoi, l'évaluation des risques des polluants sur ce compartiment est primordiale.

L'évaluation des risques dans les milieux aquatiques a longtemps et dans de nombreux pays, été réalisée en prenant les microalgues comme représentantes de l'ensemble des organismes photosynthétiques. Ces algues font l'objet de plusieurs tests d'écotoxicité standardisés, comme par exemple la ligne directrice n°201 de l'OCDE (OECD, 2006a). Or en tant qu'organismes unicellulaires, les microalgues sont peu représentatives des plantes supérieures pluricellulaires, au développement plus long, fixées ou non au substrat (Coutris et al., 2011). C'est pourquoi de nouveaux tests d'écotoxicité ont été développés sur des macrophytes flottantes du genre *Lemna* : ligne directrice n°221 (OECD, 2006b), et tout récemment sur une macrophyte enracinée : *Myriophyllum spicatum* L.. Cette dernière fait l'objet de deux tests standardisés, l'un basé sur un système plante - eau en culture axénique

: LD n°238 (OECD, 2014a), et l'autre basé sur un système plante - eau - sédiment en culture non-axénique : LD n°239 (OECD, 2014b).

I.4 *Myriophyllum spicatum* : un nouveau modèle d'intérêt pour l'évaluation des risques

I.4.1 Présentation

Le Myriophylle en épi (*Myriophyllum spicatum L.* ou Eurasian watermilfoil en anglais ; **figure I.1**) est une macrophyte aquatique de la famille des Haloragacées (Angiospermes dicotylédones). Originaire d'Europe, d'Asie et d'Afrique du Nord, *M. spicatum* se retrouve aujourd'hui également largement en Amérique du Nord (Grace and Wetzel, 1978) et même sur d'autres continents comme l'Australie, où elle constitue une espèce exotique envahissante (http://www.cabi.org/isc/datasheet/34941). Cette plante pérenne immergée et enracinée dans le sédiment est caractérisée par de longues tiges souples, des feuilles finement découpées et des racines adventives. On les retrouve dans les lacs et les rivières à des profondeurs comprises entre 1 et 4 m (parfois même jusqu'à 10 m). Cette espèce peut aussi bien se multiplier par des moyens sexués qu'asexués. Cependant, la dispersion végétative par fragmentation de la tige (naturelle : autofragmentation, ou provoquée par un facteur extérieur : allo-fragmentation) et formation de rhizomes reste le mode de dispersion majoritaire, notamment pour les moyennes et longues distances ainsi que pour la colonisation de nouveaux habitats. La formation de graines via la reproduction sexuée (pollinisation anémophile) est beaucoup moins utilisée, mais elle permet d'une part, des dispersions à longue distance, et d'autre part de protéger les populations contre l'extinction locale. Le Myriophylle est connu pour avoir une croissance rapide, avec un maximum de croissance dans des conditions de faible luminosité et de haute température (Grace and Wetzel, 1978; Muller et al., 1997; Peltre et al., 2002; Smith and Barko, 1990).



Figure I.1 Myriophylle en épi. A - Port de la plante ; B - verticille de feuille ; C - une partie de l'inflorescence montrant les fleurs mâles sur la partie haute et les fleurs femelles sur la partie basale ; D - fruit immature et E - fruit mature (tiré de Grace and Wetzel, 1978, d'après Correll and Correll, 1975).

Myriophyllum spicatum est une macrophyte très compétitrice au sein des écosystèmes aquatiques, d'abord en raison de ses propriétés de croissance rapide et de reproduction asexuée efficace ; mais aussi parce qu'elle produit de fortes concentrations de métabolites secondaires ayant des propriétés inhibitrices des autres organismes. Il s'agit de composés phénoliques (ou polyphénols) hydrolysables dont la forme majoritaire, pouvant représenter jusqu'à 1,5% de la biomasse sèche, est la tellimagrandine II (β-1,2,3-tri-*O*-galloyl-4,6(*S*)-hexahydroxydiphenoyl-D-Glc, **figure I.2**) (Gross et al., 1996). Plusieurs études se sont intéressées à ces molécules et à leurs effets sur les organismes interagissant avec le Myriophylle. Gross et al. (1996) ont ainsi montré que les composés phénoliques présents dans la plante (dont la tellimagrandine II) inhibent le développement des microalgues vertes et des cyanobactéries, qui sont des compétiteurs pour l'accès à la lumière et aux nutriments. Cet effet est principalement dû à l'inhibition de la photosynthèse (et plus particulièrement du photosystème II) chez ces organismes ; mais aussi à l'inactivation d'exoenzymes telles que la phosphatase alcaline.

De fait, les microorganismes photosynthétiques sont connus pour produire des enzymes extracellulaires leur permettant d'augmenter la disponibilité des nutriments ; la phosphatase alcaline par exemple, permet d'hydrolyser le phosphore organique en cas de situation de limitation du phosphore inorganique. Inhiber ces enzymes c'est condamner ces organismes si les nutriments viennent à manquer (Gross et al., 1996). Choi et al. (2002) quant à eux, se sont intéressés aux impacts de ces polyphénols sur l'un des principaux herbivores de *M. spicatum* : *Acentria ephemerella*, un Lépidoptère aquatique. Ils ont montré que les composés phénoliques de la plante réduisaient de façon significative la croissance des larves qui les ingéraient. Les composés phénoliques de *Myriophyllum spicatum* ont donc des effets cyanobactéricides, algicides et insecticides, qui permettent à la plante de dominer l'écosystème dans lequel elle se trouve.

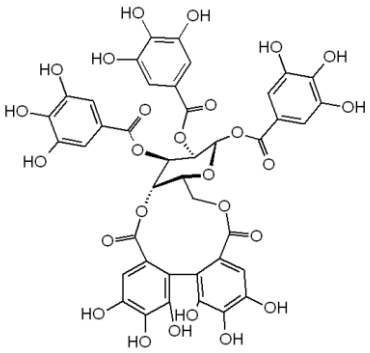


Figure I.2 Structure de la tellimagrandine II (β-1,2,3-tri-*O*-galloyl-4,6(*S*)-hexahydroxydiphenoyl-D-Glc), le composé phénolique majoritaire de *Myriophyllum spicatum* responsable de l'inhibition de ses compétiteurs et de ses herbivores (Choi et al., 2002; Gross et al., 1996; Leu et al., 2002) (https://en.wikipedia.org/wiki/Tellimagrandin_II).

Cette forte compétitivité du Myriophylle en fait une espèce proliférante (**figure I.3**) qui pose de nombreux problèmes pour les activités récréatives des plans d'eau (telles que la navigation, les baignades, la pêche), ou simplement par réduction de l'esthétique des lieux, notamment en Amérique du Nord (Grace and Wetzel, 1978; Smith and Barko, 1990). Ces proliférations peuvent également gêner les zones de rejet, causer l'asphyxie des milieux aquatiques en diminuant les concentrations en oxygène dissout, ou simplement soutenir une prolifération d'insectes nuisibles tels que les moustiques (Smith and Barko, 1990). Comprendre les interactions de cette espèce avec son environnement est donc un enjeu crucial pour pouvoir mieux la contrôler.



Figure I.3 Canopée dense de *Myriophyllum spicatum* à la surface d'un lac. Photo de Robert L. Johnson, Université de Cornell (http://www.galvbayinvasives.org).

I.4.2 Pourquoi s'intéresser à *Myriophyllum spicatum* en écotoxicologie?

Les macrophytes constituent un compartiment clé pour l'évaluation des risques dans les milieux aquatiques (**Chapitre I.3)**, pourtant, les études ont longtemps été réalisées sur les microalgues. Les microalgues étant des organismes unicellulaires, elles ne représentent pas de façon fiable toute la gamme des organismes photosynthétiques, qui comprend également des organismes pluricellulaires. Afin de mieux représenter les organismes photosynthétiques vascularisés (pluricellulaires) des tests ont été développés sur le genre Lemna (Boutin et al., 1995; Lewis, 1995; OECD, 2006b). Ces plantes présentent plusieurs avantages en tant qu'organisme test, notamment une culture aisée et rapide en laboratoire, en conditions axéniques ou non-axéniques (Arts et al., 2008). Mais elles ont la particularité d'être flottantes, ainsi elles ne sont en contact qu'avec les polluants dissouts dans la colonne d'eau, et ne permettent pas d'évaluer l'impact des polluants présents dans les sédiments (Turgut and Fomin, 2002). De plus, il s'agit de plantes monocotylédones. Or, il existe des herbicides sélectifs des dicotylédones (Gauvrit, 1996), tels que les sulfonylurés appliqués dans les champs de céréales pour éradiquer les adventices dicotylédones. Estimer leur toxicité par le biais d'une monocotylédone, c'est risquer de la sous-estimer (Arts et al., 2008; Belgers et al., 2007; Cedergreen et al., 2004).

C'est pourquoi depuis 2014 deux nouveaux tests normalisés ont vu le jour avec un nouveau modèle d'étude : *Myriophyllum spicatum* (OECD, 2014a, 2014b). En tant que dicotylédone immergée, enracinée au substrat, elle permet d'élargir la gamme des modèles d'études du

compartiment photosynthétique aquatique, mais également d'être plus fiable dans l'extrapolation des effets des herbicides sélectifs des dicotylédones. Par ailleurs, il s'agit d'une espèce largement répandue dans les lacs et les rivières à l'échelle du globe, elle présente ainsi un intérêt majeur pour l'évaluation des risques des milieux aquatiques. Sa croissance rapide ainsi que ses capacités très efficaces de reproduction asexuée par fragmentation permettent une mise en culture et une multiplication en laboratoire aisée et rapide, deux atouts pour la réalisation de tests. Enfin, ses teneurs importantes en composés phénoliques pourraient représenter un nouveau paramètre permettant de prédire les effets indirects de facteurs environnementaux sur d'autres organismes vivant en interaction avec le Myriophylle. En effet, les composés phénoliques interviennent dans les relations biotiques du Myriophylle (Choi et al., 2002; Fornoff and Gross, 2014; Leu et al., 2002) mais ils peuvent varier suivant différents facteurs environnementaux : les saisons (Bauer et al., 2009), les conditions environnementales de lumière et d'azote (Gross, 2003b), ou encore de phosphore (Gross, 2009). De plus ces molécules ont des propriétés anti- et prooxydantes, ce qui les rend susceptibles de varier en réponse à une contrainte environnementale induisant un stress oxydant, tels que les polluants.

II. L'écotoxicologie une discipline en pleine évolution

II.1 Généralités et historique

L'écotoxicologie est une discipline relativement jeune, développée dans les années 70. Le terme "écotoxicologie" a été défini pour la première fois par René Truhaut à la réunion de l'International Council for Science (ICSU) à Stockholm en 1969 (Molle, 1984) comme : "la branche de la toxicologie s'intéressant à l'étude des effets toxiques causés par les polluants naturels et synthétiques aux constituants des écosystèmes : animaux (incluant les humains), végétaux, et microorganismes, dans un contexte intégré" (Bard, 2008). Ce n'est que 8 ans plus tard qu'apparaît le premier manuel traitant d'écotoxicologie, écris par François Ramade (1977). Ce dernier redéfini l'écotoxicologie comme : "la science dont l'objet est l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine, ainsi que de leurs mécanismes d'action et leurs

effets sur l'ensemble des êtres vivants qui peuplent la biosphère". Il faudra ensuite attendre 10 ans avant de voir la première version traduite en anglais de l'ouvrage (Ramade, 1987).

Les principes de base de l'écotoxicologie sont ceux de la toxicologie : analyse de relations dose-réponse et estimation d'effets de concentration (EC50 par exemple) par l'intermédiaire de tests monospécifiques avec un nombre limité de paramètres étudiés, comme par exemple la croissance, la survie et la reproduction. Ces essais expérimentaux sont généralement réalisés sur des espèces modèles représentatives des différents niveaux d'un réseau trophique simplifié, par exemple pour les systèmes aquatiques : algues et plus récemment *Lemna* spp. en tant que producteurs primaires, daphnies en tant que consommateurs primaires et poissons comme représentants des consommateurs secondaires (Calow and Forbes, 2003). Ces approches ont été et sont encore largement utilisées. Elles ont entre autre permis d'acquérir de nombreuses bases dans l'estimation des concentrations chimiques acceptables dans l'environnement, notamment d'un point de vue réglementaire (Van Straalen, 2003).

II.2 Limites des approches écotoxicologiques "classiques"

Les tests standardisés en laboratoire ont des avantages indéniables en termes de rapidité, répétabilité, ou mise en place. De plus, les conditions contrôlées permettent de diminuer la variabilité, et facilitent ainsi l'extrapolation des liens de causes à effets entre les situations testées et les réponses des organismes (Knauer et al., 2008; Vignati et al., 2007). Cependant, les conditions expérimentales de ces tests standardisés sont, d'un point de vue environnemental, souvent peu réalistes (**Tableau I.1**), ce qui limite leur capacité à refléter les réponses des communautés végétales naturelles aux polluants (Mohan and Hosetti, 1999).

Certains aménagements peuvent être faits dans les protocoles des tests standardisés pour répondre à des questions spécifiques : modification des teneurs en nutriments, adaptation des conditions de culture (par exemple la température, la luminosité, ou le pH), changement d'organismes etc ..., c'est pourquoi ces tests demeurent utiles (Vignati et al., 2007). Néanmoins, face aux différences entre les conditions de laboratoire et les conditions environnementales, l'écotoxicologie a dû s'adapter et évoluer pour améliorer le réalisme écologique des stratégies d'évaluation de risques (Schmitt-Jansen et al., 2008; Van Straalen, 2003).

Tableau I.1 Principaux facteurs limitants des tests standardisés en laboratoire et questions posées pour l'extrapolation des résultats en conditions naturelles.

Facteurs limitants	Problèmes posés
Milieux de culture	Milieux très enrichis (développement et croissance rapide) → peu représentatifs des concentrations environnementales → limite la disponibilité des polluants (liaison, précipitation) (Vignati et al., 2007). Plusieurs milieux pour un même organisme → Différents nutriments (ratios et nature) (Roshon et al., 1996) → Modification de la sensibilité au polluant (Brooks et al., 2015; Fulton et al., 2009; Sulmon et al., 2004)
Conditions expérimentales	Contrôlées → absences de facteurs influençant les réponses biologiques → problème d'extrapolation laboratoire vs. terrain (Vignati et al., 2007)
Organismes testés	→ tests monospécifiques ou sur des chaines trophiques simplifiées → espèces modèles choisies pour leur facilité d'utilisation en laboratoire, mais souvent peu représentatives des milieux évalués (Artigas et al., 2012; Calow and Forbes, 2003). → ne permettent pas de montrer les interactions entre les organismes au sein des communautés et des populations (Calow and Forbes, 2003; Schmitt-Jansen et al., 2008) → ne prennent pas en compte les effets indirects des polluants par modifications des interactions entre les espèces (Clements and Rohr, 2009; Rohr et al., 2006).
Contaminations	→ aigües → court terme → molécules simples (pas de mélanges) → détermination de valeur seuils EC50 (Concentration Effet 50%), PNEC (Predicted No Effect Concentration), NOEC (No Observed Effect Concentration), etc. pour la détermination des limites environnementales acceptables et la réglementation des produits phytosanitaires.

II.3 Mettre plus d'écologie en écotoxicologie : Quelles solutions ?

L'écotoxicologie a longtemps relevé plus de la toxicologie que de l'"éco"-toxicologie à proprement parler (Van Straalen, 2003). C'est pourquoi, face aux limites des approches "classiques", plusieurs scientifiques se sont accordés pour reconnaître le besoin de rendre ses lettres de noblesse au "éco" de écotoxicologie (Chapman, 2002), c'est à dire avoir une meilleure intégration de l'écologie théorique pour améliorer l'évaluation de risque (Calow and Forbes, 2003; Clements and Rohr, 2009; Van Straalen, 2003).

Au sein des écosystèmes, les communautés sont définies par la force des interactions entre les espèces qui les composent. Il faut donc en tenir compte pour prédire les réponses de ces communautés aux contaminants. C'est pourquoi Rohr et al. (2006) proposent d'intégrer des théories d'écologie des communautés aux études d'écotoxicologie. En 2009, Clements and Rohr définissent "l'écotoxicologie des communautés" comme étant l'étude des effets des contaminants sur les modèles d'abondance des espèces, la diversité, la composition des communautés, et les interactions entre espèces. Ils expliquent notamment que la plupart des paradigmes importants en écologie ont été mis au point par les chercheurs qui étudient les communautés, et que ces hypothèses sont directement applicables à l'écotoxicologie des communautés (**Tableau I.2**). Leur idée est de coupler les informations de toxicité directe avec la richesse spécifique, les interactions spécifiques, les liens trophiques et leur dispersion spatio-temporelle, afin de pouvoir identifier la ou les "espèces clés" dont la perte causerait des dommages irréparables.

Artigas et al. (2012) corroborent cette idée mais proposent d'adapter les approches au niveau de complexité considéré : s'intéresser à des traits d'histoire de vie pertinents au niveau populationnel, étudier les modifications des relations trophiques et interspécifiques au niveau communautaire, et se focaliser sur les altérations structurales et fonctionnelles des écosystèmes. En écotoxicologie, selon la complexité des approches, on peut travailler avec des tests normalisés monospécifiques (c'est le niveau 1) ou bien en micro- ou mésocosmes avec des communautés (tests de niveau supérieur). Ainsi plusieurs des théories évoquées dans le **tableau I.2** peuvent permettre de mieux comprendre les effets directs et indirects des polluants. Les traits bio- ou écologiques des espèces sont, par exemple, déjà utilisés au niveau des macroinvertebrés (Archaimbault et al., 2009) ou des diatomées (Larras et al., 2014). Ils sont également de plus en plus utilisés chez les plantes, notamment pour les

comparaisons inter- mais aussi intraspécifiques (Pérez-Harguindeguy et al., 2013). Leur mesure permet d'évaluer les effets d'un polluant, ou plus généralement d'un stress, et d'extrapoler les conséquences sur la population ou la communauté (Violle et al., 2007).

Tableau I.2 Avancées théoriques importantes en écologie des communautés et applications potentielles en écotoxicologie (reproduit d'après Clements and Rohr, 2009).

Paradigmes en écologie	**Applications en écotoxicologie**
Théorie des réseaux trophiques	Modèles de transport des contaminants
Hypothèses des cascades trophiques	Biomagnification
Gradients écologiques	Biosurveillance
Modèle de matrice d'habitat	Traits des espèces
Théorie de la biogéographie insulaire	Résilience des communautés
Successions écologiques	Ecologie de la restauration
Principe d'exclusion compétitive	Effets indirects des polluants
Théorie proie - prédateur	PICT (Pollution-induced community tolerance)
Théorie de la perturbation	
Théorie de la hiérarchie	Sélection des paramètres en ERA[a]
Hypothèse de la perturbation intermédiaire	Gradients subvention-stress
Gradients de stress environnementaux	Hormèse en toxicologie
Seuils écologiques	Modification des états stables par les contaminants
Richesse spécifique et fonctions écologiques	Paramètres de mesures et évaluation en ERA
	Evaluation des services écosystémiques

[a] Evaluation du risque environnemental

Une évaluation de risque fiable passe donc nécessairement par une bonne compréhension du fonctionnement des écosystèmes. Or, pour cela, les principes d'écologie ne peuvent pas simplement être appliqués, il faut également faire intervenir des principes de chimie, de géologie, de physique etc ... au sein d'études pluridisciplinaires (Artigas et al., 2012; Schmitt-Jansen et al., 2008). Cela sous-entend de passer d'approches réductionnistes simples, à des approches holistiques considérant les écosystèmes dans toute leur complexité (Chapman, 2002). Cette problématique est à la base de l'étude du stress multiple.

III. L'étude du stress multiple

Quelles soient naturelles ou anthropiques, les perturbations subies par les milieux aquatiques n'ont cessé de se multiplier, menaçant les écosystèmes. Si bien qu'aujourd'hui les situations de multi-stress sont devenues courantes plutôt qu'exceptionnelles (Nõges et al., 2016). Bien que plusieurs auteurs aient montré depuis longtemps l'intérêt d'étudier l'effet combiné de ces stress (Breitburg et al., 1999; Folt et al., 1999), l'écotoxicologie n'a que récemment commencé à considérer les polluants au sein d'un réseau complexe de perturbations ou stresseurs (Ban et al., 2014; Segner et al., 2014).

III.1 Concepts de stress et stresseur

Le mot "stress" est dérivé du moyen anglais "stresse", et signifie : détresse, tension ou encore déformation causée par une force extérieure (Odum et al., 1979). Bien que Odum et al., (1979) aient proposé d'utiliser le terme "stress" dans les cas de réponses négatives, et "subvention" pour les réponses positives ; en écologie il est courant d'inclure dans le terme de stress toute variation aussi bien positive que négative par rapport à un état nominal. En effet, tout écart, même s'il est positif pour une espèce pourra conduire à un remaniement des communautés, impliquant l'élimination d'autres espèces incapables de s'adapter au changement (Folt et al., 1999; Odum et al., 1979; Segner et al., 2014). La levée d'un stress implique le retour à l'état homéostatique original ou bien à la création d'un nouvel état stable (Segner et al., 2014).

En français le mot stress est souvent utilisé aussi bien pour qualifier la réponse d'un système que pour qualifier le facteur ayant induit cette réponse. Néanmoins, afin de bien séparer la cause et l'effet, plusieurs auteurs parlent de stress pour l'effet, et de stresseur ou facteur de stress pour la cause. Un facteur de stress (**Figure I.4**) est défini comme toute variable sortant de sa gamme normale de variation et affectant positivement ou négativement les organismes individuels, la composition des communautés, ou le fonctionnement des écosystèmes par rapport à une condition de référence (Breitburg et al., 1999; Crain et al., 2008; Piggott et al., 2015). L'impact des facteurs de stress ou stresseurs dépend de leur intensité, du moment auquel ils surviennent, de leur durée, aussi bien que des propriétés physiologiques et écologiques des systèmes impactés (Segner et al., 2014).

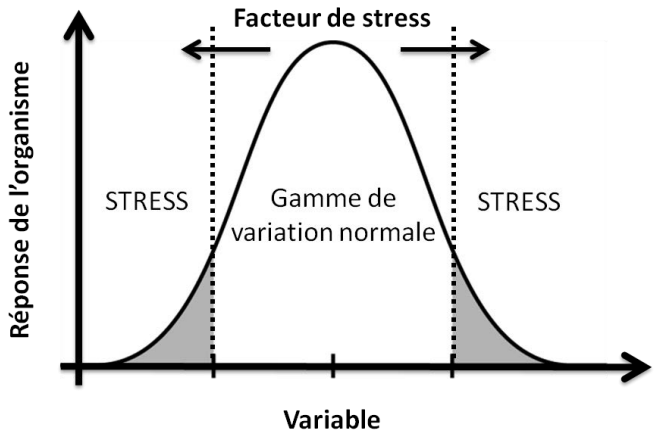


Figure I.4 Influence de l'intensité d'une variable sur la réponse d'un organisme, et mise en évidence du stress et des facteurs de stress (adapté selon Piggott et al., 2015).

III.2 Les stresseurs en milieux aquatiques

Les milieux aquatiques sont soumis à divers facteurs de stress, la plupart d'origine anthropique, pouvant impacter le fonctionnement des écosystèmes : rejets directs ou indirects de polluants, de nutriments, modifications d'habitats, pénurie d'eau, ou encore changement climatique global (**Figure I.5**, European Environment Agency, 2012). Seuls 19% des masses d'eaux ne seraient pas touchées par l'un ou l'autre facteur, seuls ou combinés (European Environment Agency, 2012).

Selon le type d'environnement aquatique ou la région considérée les facteurs de stress diffèrent, en effet selon que l'on se trouve en zone d'agriculture intensive ou dans une zone très urbanisée les pressions majoritaires ne sont pas les mêmes (Hering et al., 2015; Navarro-Ortega et al., 2015).

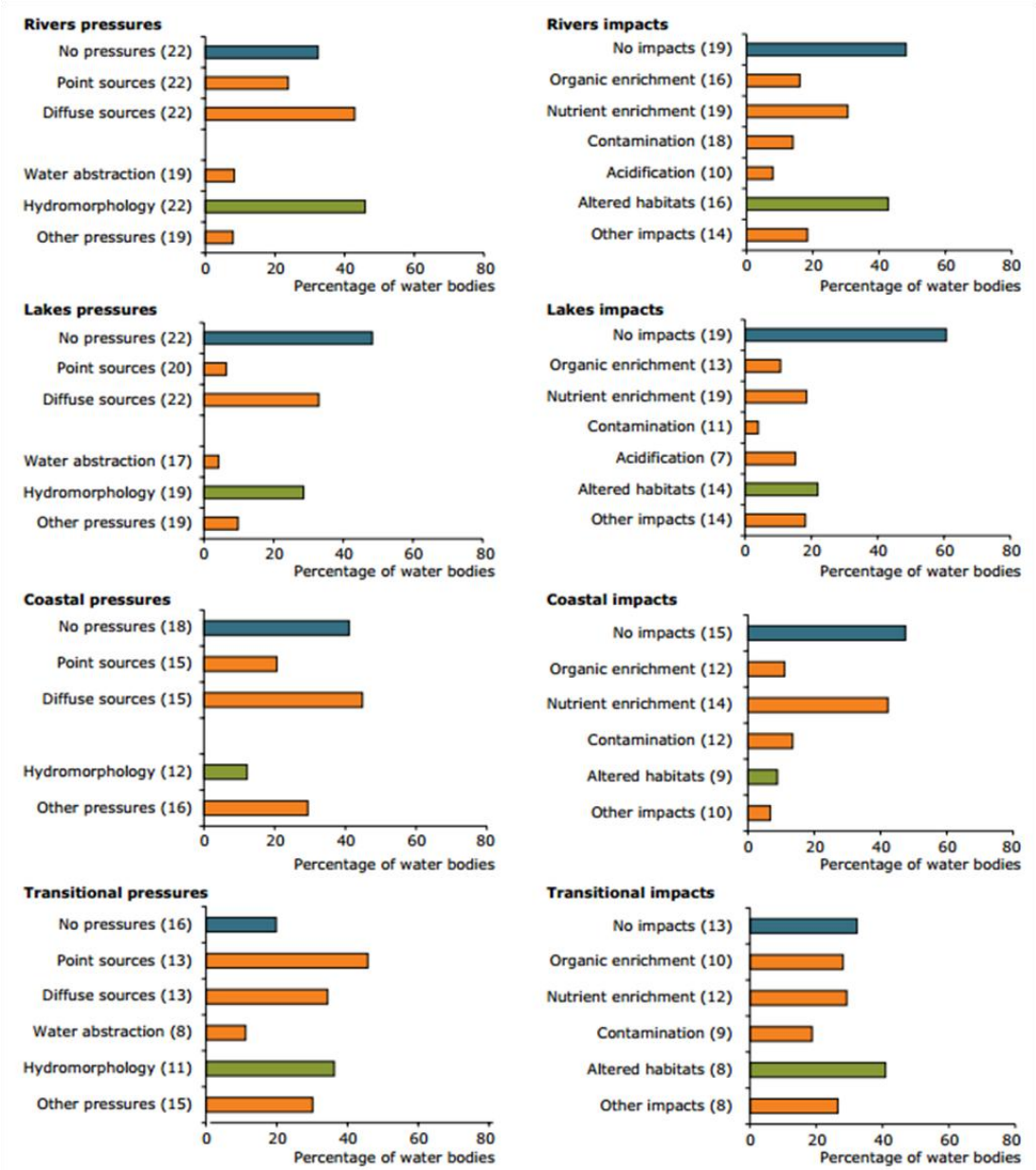


Figure I.5 Proportions du nombre total des masses d'eau classées (rivières, lacs, eaux côtières et eaux de transition) présentant des pressions significatives clairement identifiées (colonne de gauche) ainsi que leurs impacts (colonne de droite) (tiré de European Environment Agency, 2012).

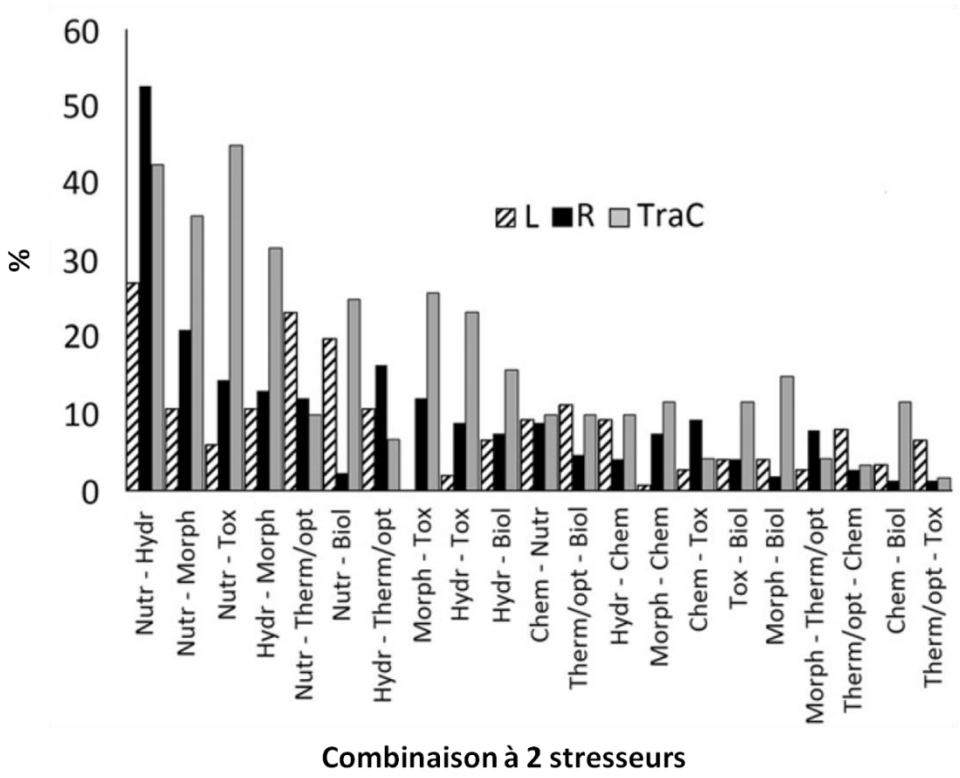


Figure I.6 Fréquences d'apparition de combinaisons à deux stresseurs dans les eaux de surface (% de données probantes dans les 219 articles analysés par Nõges et al, 2016).

Etant donné la multitude de facteurs de stress existants, et l'omniprésence des activités anthropiques de par le monde, il est courant de retrouver simultanément dans un même milieu plusieurs facteurs de stress (**Figure I.6** ; Hering et al., 2015; Nõges et al., 2016), c'est pourquoi on parle de "stress multiple" ou "multistress". Bien que le nombre de stresseurs simultanés puisse être relativement élevé, particulièrement dans le cas des eaux de transition (**Figure I.7**), pour les autres types d'environnements aquatiques se sont les combinaisons à deux facteurs de stress qui sont majoritairement retrouvées (**Figures I.6 et I.7**). Parmi ces combinaisons deux facteurs prédominent : (i) la pollution diffuse (regroupant aussi bien les rejets de nutriments que les rejets de contaminants divers), à hauteur de 45% pour les rivières et à plus de 30% pour les lacs ; et (ii) les dégradations hydromorphologiques (modifications du débit, prélèvement d'eau, enlèvement de la végétation, élévation de la température etc.) à plus de 30% et 40% pour les lacs et les rivières respectivement (European Environment Agency, 2012; Fehér et al., 2012; Hering et al., 2015).

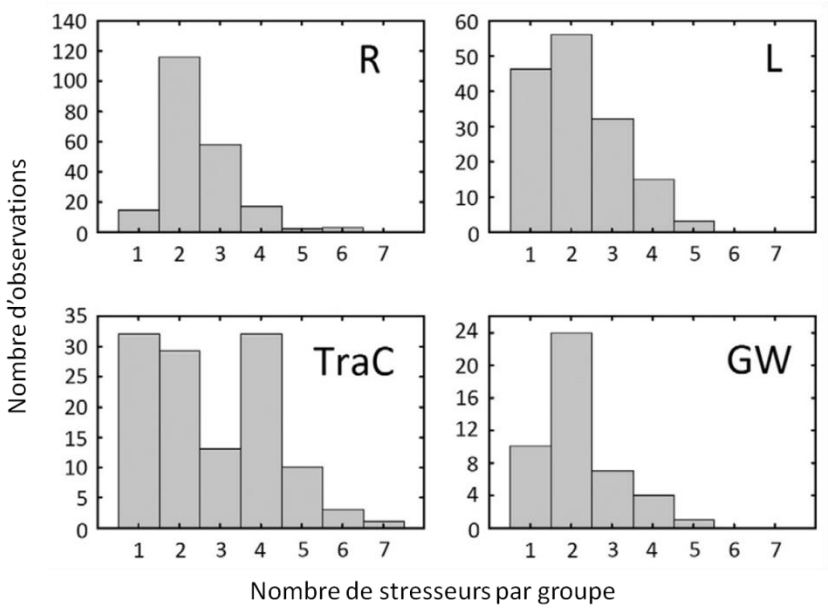


Figure I.7 Nombre de groupes de facteurs de stress simultanés retrouvés dans les milieux aquatiques des publications analysées par Nõges et al., 2016 : 219 articles évaluant les effets de stress-multiple sur des écosystèmes aquatiques. R - rivières ; L - lacs ; TraC - eaux de transition et côtières ; GW - eaux souterraines.

Etant donné l'ubiquité croissante des situations de multistress, les effets des facteurs de stress ne peuvent plus être étudiés indépendamment. Ils doivent être évalués de façon combinée. Cependant les connaissances actuelles ne permettent pas l'extrapolation des effets des associations de facteurs à partir des effets des facteurs seuls. En effet, un certain nombre de challenges compliquent l'évaluation des stress multiples.

III.3 Challenges posés par l'évaluation de risque des stress multiples

Challenge 1 : Une diversité de situations trop importante

Pour un même facteur de stress, comme par exemple les herbicides, il existe une grande variabilité de réponse, de comportement, et de sensibilité parmi les espèces (Segner et al., 2014). Cette diversité de sensibilité sert même de base aux approches SSD (species sensitivity distribution) utilisées en évaluation de risque. Le principe de la SSD est de construire des courbes avec les valeurs seuils de plusieurs espèces (EC50 : concentration effet à 50%, LOEC : concentration la plus basse induisant des effets, ou NOEC : concentration à laquelle on n'observe aucun effet) qui permettent ensuite de déterminer les concentrations dangereuses pour les écosystèmes (Posthuma et al., 2002 ; **figure I.8**). Mais

dans l'environnement, il est rare de n'être confronté qu'à un seul stress. En effet, comme il a été montré dans la partie précédente (**Chapitre I.III.2**), il existe toute une variété de facteurs de stress possibles, qui varient selon l'environnement aquatique concerné (rivières, lacs, eaux de transitions ou eaux souterraines), et les activités anthropiques limitrophes (agriculture, industries, ou urbanisation) (European Environment Agency, 2012; Fehér et al., 2012; Hering et al., 2015). Une telle diversité de réponses des systèmes biologiques et de facteurs de stress rendent impossible l'obtention des données sur toutes les combinaisons et les interactions possibles (Hooper et al., 2013; Segner et al., 2014). Pour pallier cette difficulté plusieurs solutions sont envisagées : Segner et al. (2014) par exemple, ont proposé de convertir les différentes réponses biologiques en une unité commune. D'autres proposent de privilégier l'utilisation de traits fonctionnels pour s'affranchir de la variabilité biologique (Van den Brink et al., 2006; Violle et al., 2007) ; alors que Hooper et al. (2013), quant à eux, préconisent d'avantage de développement de modèles prédictifs.

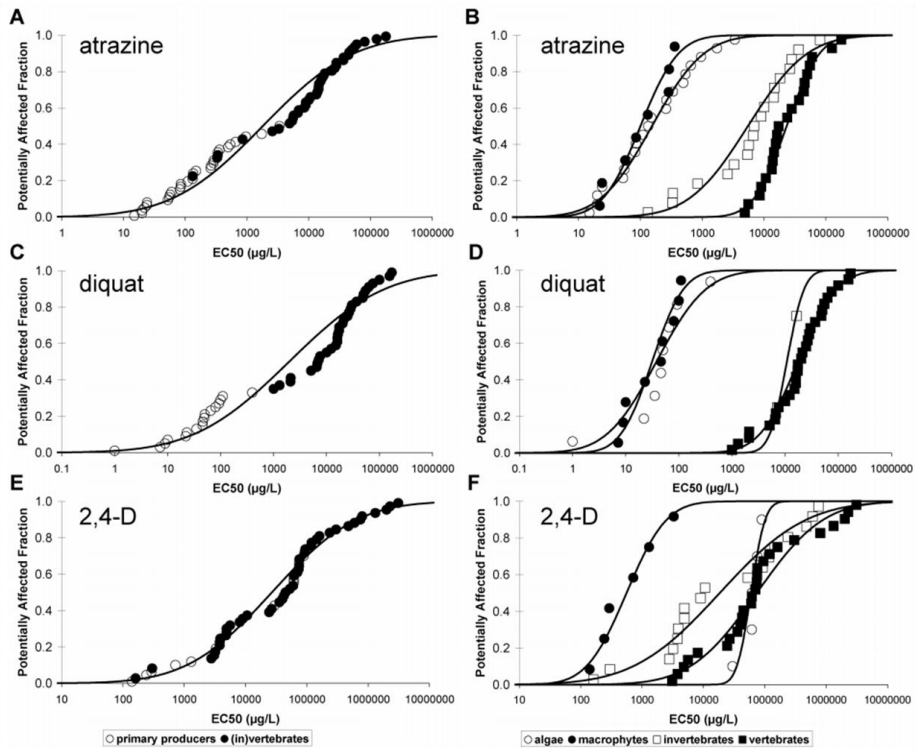


Figure I.8 SSD (Species Sensitivity Distribution) réalisée à partir de données de tests de toxicité à court-terme de plusieurs espèces aquatiques à l'atrazine (A), au diquat (C) et au 2,4-D (E). Les graphiques (B), (D), et (F) présentent les mêmes données mais cette fois séparées par groupe : algues, macrophytes, invertébrés et vertébrés (Van den Brink et al., 2006).

Challenge 2 : Relations stresseur - réponse non linéaires

Un deuxième point compliquant l'étude du stress multiple est la présence de relations stresseurs - réponses non-linéaires (**Figure I.9** ; Dodds et al., 2010; Nõges et al., 2016; Segner et al., 2014). Là encore les réponses aux polluants fournissent de bons exemples de non-linéarité : courbes dose-réponse sigmoïdes (Cedergreen et al., 2004) ou phénomènes d'hormèse (Calabrese et al., 2007; Cedergreen et al., 2009) par exemple. Cette non-linéarité entrave l'extrapolation et la prédiction des réponses à d'autres niveaux d'intensités, et ainsi force à la réalisation de tests pour observer la réaction du système étudié.

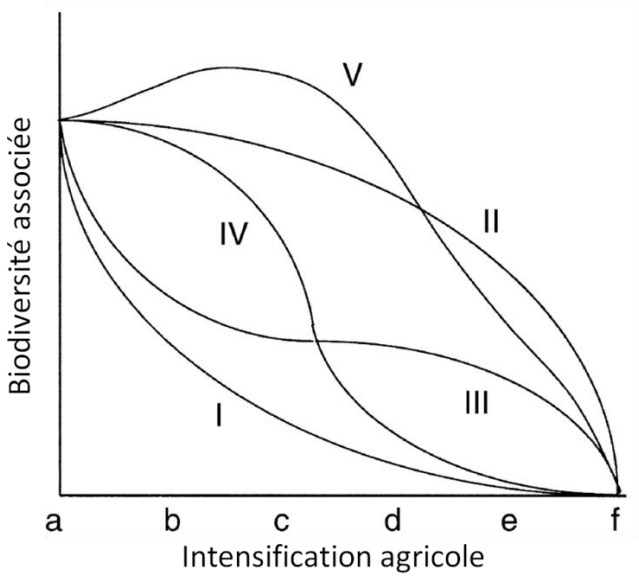


Figure I.9 Potentiels modèles d'effet de l'intensification des pratiques agricoles sur la diversité des espèces non-cibles. Les lettres a à f de l'axe des abscisses représentent l'état de gestion depuis "a" un écosystème sans gestion particulière, jusqu'à "f" une agriculture intensive et industrialisée. L'intensification a tendance à réduire la diversité, mais cette diminution peut prendre différentes trajectoires (Hooper et al., 2005).

Challenge 3 : Différents stress à différentes échelles

Les différents types de stresseurs, qu'ils soient chimiques, biologiques ou physiques, n'agissent pas aux mêmes échelles de temps et d'espace, de même qu'ils n'ont pas la même intensité, la même fréquence ou la même durée, ce qui a pour conséquence de faire varier les effets (**Figure I.10** ; Schmitt-Jansen et al., 2008; Segner et al., 2014). Des facteurs de stress à petite échelle, ou locaux, comme les rejets de nutriments ou de polluants, auront

tendance à se produire souvent, seront en général d'intensité faible à modérée, et auront tendance à être réversibles. Les facteurs de stress à plus large échelle, ou globaux, comme le changement d'usage des terres ou les modifications hydromorphologiques, surviennent plus ponctuellement mais ont une intensité telle que leurs effets sont très peu réversibles (Segner et al., 2014). Ainsi les deux stresseurs majeurs des environnements aquatiques (nutriments et polluants vs. modifications hydromorphologiques, voir **chapitre I.III.2**) agissent à des échelles différentes.

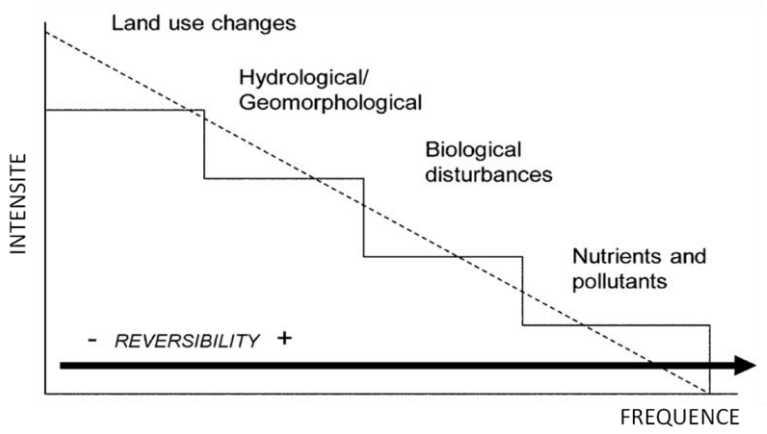


Figure I.10 L'intensité et la fréquence de chaque type de facteurs de stress (chimiques, biologiques et physiques) diffèrent et influencent la réversibilité de leurs effets (Segner et al., 2014).

Challenge 4 : Dépendance des effets à l'historique de perturbation du système

Chaque écosystème subit une succession de perturbations ; celles-ci peuvent être ponctuelles ou continues, de faible intensité, ou drastiques, se suivre ou être espacées dans le temps et l'espace. Les écosystèmes peuvent être détruits par ces perturbations si elles sont trop fortes, ou résister et récupérer. Dans ce dernier cas, les écosystèmes peuvent retourner à leur état d'équilibre initial, ou état nominal, on parlera alors de résilience ; ou bien ils peuvent atteindre un nouvel état d'équilibre, différent de l'état nominal, on parlera alors d'état stable alternatif (**Figure I.11** ; Folke et al., 2004; Gunderson, 2000; Scheffer et al., 2001). L'alternance des états stables à dominance de macrophytes immergées ou de phytoplancton dans les lacs peu profonds est un exemple bien étudié (Scheffer et al., 1993). Or, selon l'état de stabilité dans lequel il se trouve, un écosystème ne répondra pas de la même manière à un nouveau facteur de stress (ou nouvelle perturbation) (Hughes and

Connell, 1999). Ainsi un facteur de stress peut avoir ou ne pas avoir de conséquences selon l'historique de l'écosystème étudié (Nõges et al., 2016), ce qui complique l'évaluation de risque.

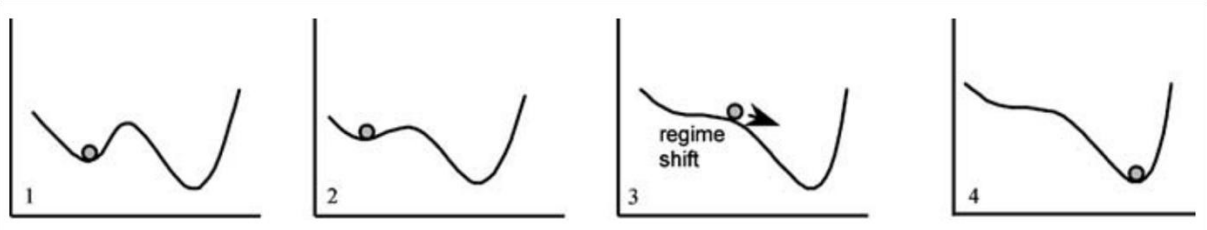


Figure I.11 Etats stables alternatifs. Les perturbations peuvent modifier l'écosystème (représenté par la balle ; du schéma 1 à 4) de telle sorte qu'il passe d'un état stable nominal à un nouvel état stable dit alternatif (les état stables sont représentés par les "vallées") (tiré de Folke et al., 2004).

Challenge 5 : Interactions entre les facteurs de stress

Si les effets d'une combinaison de stresseurs étaient simplement l'addition des effets des facteurs de stress seuls, leur extrapolation pourrait se faire sur la base de tests des stresseurs isolés. Or, la plupart des études de stress multiple ont montré des interactions entre les facteurs de stress aboutissant à des effets différents de la simple additivité : synergie et antagonisme (Crain et al., 2008; Folt et al., 1999; Nõges et al., 2016; Piggott et al., 2015). En effet, Nõges et al., (2016) ont montré que sur les 219 articles qu'ils ont examiné dans les situations de multistress avéré, les interactions (synergie et antagonisme) représentaient 62, 60, 40 et 80% des cas pour les rivières, les lacs, les eaux de transition et côtières et les eaux souterraines respectivement (**Figure I.12**).

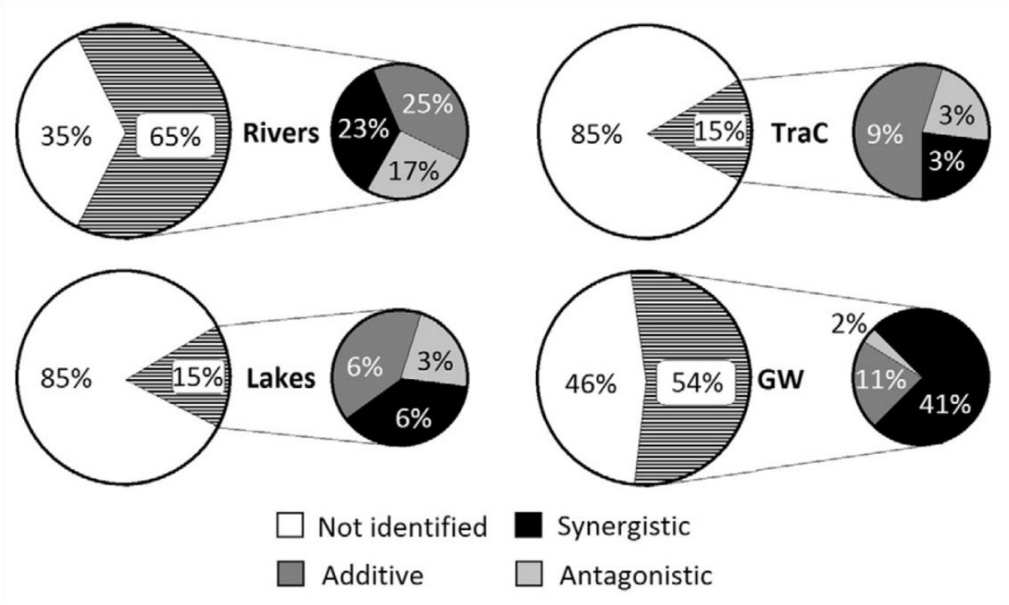


Figure I.12 Interactions entre les facteurs de stress au sein de situation de multistress pour différents environnements aquatiques. TraC - eaux de transition et côtières ; GW - eaux souterraines (tiré de Nõges et al., 2016).

Le synergisme a longtemps désigné les cas où l'effet de la combinaison était plus important que la simple additivité ; alors que l'antagonisme désignait les situations où l'effet de la combinaison est moins important que celui de l'additivité (Folt et al., 1999). Des classifications plus précises, permettant de décrire les interactions en prenant en compte les effets des stresseurs seuls, existent aujourd'hui (Crain et al., 2008; Piggott et al., 2015). Piggott et al, 2015 proposent par exemple de parler de synergisme et d'antagonisme positif ou négatif, selon que l'effet est plus ou moins négatif (ou positif) que par simple additivité (**Tableau I.3**).

Tableau I.3 Classification des effets des combinaisons de facteurs de stress proposée par Piggott et al, 2015 d'après Crain et al, 2008.

Effets		**Conséquences**
Additif (AD)		Somme des effets individuels sans interaction
Antagonisme (A)	Positif (A+)	Effets moins positifs que prédit par simple additivité
	Négatif (A-)	Effets moins négatifs que prédit par simple additivité
Synergisme (S)	Positif (S+)	Effets plus positifs que prédit par simple additivité
	Négatif (S-)	Effets plus négatifs que prédit par simple additivité

Ces interactions conduisent parfois même à des effets qui dévient si drastiquement des effets escomptés qu'on parle alors de "surprises écologiques" (Ban et al., 2014; Segner et al., 2014). C'est pourquoi l'étude des interactions entre les facteurs de stress, et particulièrement l'étude de leurs effets cumulés, est plébiscitée par plusieurs auteurs comme étant d'une nécessité de premier ordre (Ban et al., 2014; Folt et al., 1999).

Bien que ce sujet reçoive de plus en plus d'attention depuis une vingtaine d'année, les informations sur les interactions entre stresseurs sont encore minces. Une meilleure connaissance de ces interactions, et notamment l'élucidation des situations avec synergisme, permettrait de prioriser les situations selon leur risque pour l'environnement. En outre, cela permettrait de concentrer les efforts sur ces situations, d'adopter des mesures préventives, et ainsi de limiter leurs conséquences pour les écosystèmes aquatiques (Ban et al., 2014). Par conséquent, une meilleure évaluation du risque nécessite d'étudier et de comprendre comment les facteurs de stress peuvent interagir.

IV. Effets de deux facteurs de stress prédominants : les polluants et les nutriments sur les macrophytes

Les pollutions diffuses constituent, avec les modifications hydromorphologiques, les deux facteurs de stress majoritairement retrouvés en combinaison dans les différents milieux aquatiques (**Chapitre I.III.2** ; European Environment Agency, 2012; Fehér et al., 2012; Nõges et al., 2016). Mais, à l'inverse des modifications hydromorphologiques qui sont ponctuelles, ont une forte intensité, et une faible réversibilité ; les pollutions diffuses, en général moins fortes et plus réversibles, sont retrouvées très fréquemment (Segner et al., 2014). Les pollutions diffuses font référence aussi bien aux nutriments qu'aux polluants (European Environment Agency, 2012; Fehér et al., 2012) qui se retrouvent en mélanges complexes dans les écosystèmes aquatiques. Malgré la fréquence de ces contaminations simultanées (nutriments - polluants), l'évaluation du risque des polluants se fait dans la plupart des cas sans tenir compte du facteur "nutriment" dans les milieux. Or, comme les stresseurs interagissent dans la plupart des cas, et que la combinaison polluant - nutriment est très fréquente (Nõges et al., 2016), il est nécessaire de réaliser des études pour évaluer les

interactions possibles entre ces deux facteurs de stress. Cependant avant d'étudier ces deux facteurs en combinaison il est important de connaître leurs effets isolés.

IV.1 Effets isolés des herbicides et des ETM

Compte-tenu de la diversité des molécules existantes, il a été choisi de se focaliser sur les deux familles de polluants majeurs : les herbicides et les éléments traces métalliques (ou ETM).

IV.1.1 Les herbicides

Myriophyllum spicatum est une espèce aux capacités de croissance, de propagation et de défense importantes (**Chapitre I.I.4**), ce qui lui confère une très bonne compétitivité vis à vis des autres espèces aquatiques et la rend envahissante ou invasive, notamment en Amérique du nord où elle pose de nombreux problèmes. C'est pourquoi les premières publications existant sur le Myriophylle et les herbicides, et de façon générale une grande part de la bibliographie à ce sujet, portent sur le contrôle de cette espèce par les herbicides (voir notamment toute la bibliographie des chercheurs américains : Michael D. Netherland, et Kurt D. Getsinger). Ce type d'études a permis de mettre en évidence la sensibilité du Myriophylle vis à vis de certains herbicides, notamment les herbicides auxiniques (ou auxine like) comme le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), le triclopyr, ou encore un sulfonyluré : le bensulfuron-méthyl (Getsinger et al., 1982; Nelson et al., 1993; Netherland and Getsinger, 1992).

Cette sensibilité à certains herbicides, et sa large répartition à l'échelle du globe ont conduit les scientifiques à s'intéresser au genre *Myriophyllum* pour l'évaluation des risques environnementaux des herbicides. Ainsi plusieurs études existent aujourd'hui sur la sensibilité du Myriophylle vis à vis de différents herbicides, dans des systèmes de culture plus ou moins complexes (**Tableau I.4**).

Tableau I.4 Synthèse des effets connus des herbicides sur le genre *Myriophyllum.*

Mode d'action : AAA - acides aminés aromatiques, IAA - auxines, CK : cytokinines. **Espèces :** *M. aq - M. aquaticum* ; *M. het - M. heterophyllum* ; *M. spi - M. spicatum ; M. ver - M. verticillatum.* **Milieux :** A - Andrews ; ED - eau déchlorée ; EN - eau naturelle ; ER - eau du robinet (ERE = enrichie) ; H - Hoagland ; J - Jaworski ; MS - Murashige and Skoog ; SB - Smart and Barko ; S - Steinberg. **Paramètres :** Chl a - chlorophylle a ; L - longueur (totale, ou parties) ; MF/MS - masse fraîche ou sèche (totale, T = tige, R = racine) ; Nb - nombre (NbN : nœuds, NbR : ramifications, NbF : fleurs) ; Rdt - rendement ; RGR - taux de croissance relatif ; Y(II) - rendement quantique efficace du PSII. **Références :** [1] Belgers et al., 2011, [2] Bird, 1993, [3] Coutris et al., 2011, [4] Fairchild et al., 1998, [5] Heine et al., 2015, [6] Lambert et al., 2006, [7] McGregor et al., 2008, [8] Mohr et al., 2007, [9] Mohr et al., 2013, [10] Mohr et al., 2015, [11] Richardson et al., 2016, [12] Sánchez et al., 2007, [13] Schreiber et al., 2011, [14] Teodorović et al., 2012, [15] Tunić et al., 2015, [16] Vervliet-Scheebaum et al., 2010, [17] Wilson et al., 2001.

Famille et mode d'action	Espèce	Herbicide	Type	Milieu	Jours	Valeurs (µg/L)		Paramètres	Réf.
Régulateur de croissance (IAA et CK-like)	*M. spi*	Thidiazuron	Axénique	MS	5	EC50	9800	NbR	[2]
Acides aryloxyalkanoïques (IAA-like)	*M. aq*	2,4 D	OCDE 239	SB	7	EC50	30 - 1000	Rdt, RGRL, RGRMS	[15]
		SX-1552	Méso	ER	28	EC50	< 0.3- 0.68	L, MS	[11]
						LOEC	0.3		
		SX-1552A	Méso	ER	28	EC50	6.9 - 10.5	MS,L	[11]
						LOEC	9		
	M. het	SX-1552	Méso	ER	28	EC50	< 0.3	L, Mf, MS	[11]
						LOEC	0.3		
		SX-1552A	Méso	ERE	28	EC50	21.3 - 35.1	L, MS	[11]
						LOEC	27		
	M. spi	2,4 D	Axénique	MS	5	EC50	40	NbR	[2]
			OCDE 238	A	14	EC50	5 - 1000	L_R, L_T	[9]
			OCDE 239	SB	14	EC50	100 - 400	L_T	[9]
		Fluroxypyr	OCDE 238	A	14	EC50	420	L_T	[9]
			Micro	EN	30	EC50	70 - 130	MF, MS, MS_R, L_T	[9]
			Micro	EN	37	EC50	62	MF	[10]

Famille et mode d'action	Espèce	Herbicide	Type	Milieu	Jours	Valeurs (µg/L)		Paramètres	Réf
Urées (Inhibition photosystème II)	*M. spi*	Diuron	Eau	J	14	EC50	5	RGRMS	[6]
						NOEC	0.0005	RGRMS	
						EC50	> 5	Fv/Fm	
						NOEC	5	Fv/Fm	
		Isoproturon	OCDE 239	SB	7	EC50	260 - > 1000	Rdt, RGRL, RGRMS	[15]
			OCDE 238	A	14	EC50	260 - 530	L_R, MF,MS	[9]
			OCDE 239	SB	14	EC50	60 - 260	MS, L_T	[9]
			Micro	EN	30	EC50	50 - 110	MS, MS_R, MF, L_T	[9]
Sulfonylurées (Inhibition acétolactate syntase)	*M. spi*	Iofensulfuron	OCDE 239	SB	14	EC50	0.18	L_T	[5]
		Metsulfuron-methyl	Micro	SB	42 (1)	EC50	0.054 - 0.073	L_T, L_R	[1]
					42 (3)	EC50	0.075 - 0.081		
					42 (7)	EC50	0.071 - 0.093		
					42 (14)	EC50	0.078 - 0.085		
					42 (21)	EC50	0.054 - 0.055		
Triazines (Inhibition photosystème II)	*M. aq*	Atrazine	OCDE 239	SB	7	EC50	170 - 640	Rdt, RGRL, RGRMS	[15]
			Eau	S	10	EC50	76.42 - 93.51	Rdt, RGRMF	[14]
						LOEC	40 - 80		
			Sédiment	S	10	EC50	0.42 - 0.70 µg/g	MF_T, L_R, L_T, RGRMF	[14]
						LOEC	0.46 - 0.92 µg/g		
						EC50	1.99 - 3.13 µg/g	Chl a	
			Sédiment	S	13	EC50	2.9 µg/g	MF	[13]
						EC50	0.79 µg/g	Y(II)	
		Simazine	Hydrop	H	7	LOEC	300 - 1000	MF, NbR, L_T	[17]
						NOEC	100 - 300		
	M. het	Atrazine	Micro	ASTM	14	EC50	132	MF	[4]
		Metribuzine	Micro	ASTM	14	EC50	17	MF	[4]

Famille et mode d'action	Espèce	Herbicide	Type	Milieu	Jours	Valeurs (µg/L)		Paramètres	Réf
Triazines (Inhibition photosystème II)	*M. spi*	Atrazine	Axénique	MS	5	EC50	3700	NbR	[2]
			Micro	EN	14	EC50	69 - 178.6	MS_R, MS_T	[7]
						EC50	149.7	Chl a	
					28	EC50	25.2 - 42.5	MS_R, MS_T	
						EC50	104.9	Chl a	
					42	EC50	37.8 - 114.5	MS_T, MS_R	
						EC50	122.9	Chl a	
		Simazine	Micro	ED	28	NOEC	50	L_T, MS, MF	[16]
					56	NOEC	50	L_T, MS, MF	
						NOEC	50	NbFl	
					84	NOEC	500	L_T, MS, MF	
						NOEC	50	NbFl	
Chloroacétanilides (Inhibition synthèse protéines et lipides)	*M. het*	Alachlor	Micro	ASTM	14	EC50	> 3000	MF	[4]
		Metolachlor	Micro	ASTM	14	EC50	> 3000	MF	[4]
	M. ver	Metazaclor	Méso	EN	140	EC50	22	MF	[8]
		Metazaclor	Méso	EN	170	EC50	11	MF	[8]
Organophosphorés (Inhibition synthèse AAA)	*M. spi*	Glyphosate	Axénique	MS	5	EC50	1600	NbR	[2]
			Axénique	A	21	EC50	330 - 5010	L_R, MF, L, NbN	[12]
Acides benzoïques (IAA-like)	*M. aq*	Dicamba	OCDE 239	SB	7	EC50	520 - 3140	Rdt, RGRL, RGRMF, RGRMS	[15]
Dinitroanilines (Inhibition formation microtubules)	*M. aq*	Trifluraline	OCDE 239	SB	7	EC50	270 - >1000	Rdt, RGRL, RGRMS	[15]
Dinitrophénols (Inhibition respiration)	*M. aq*	DNOC (dinitro-o-cresol)	Sédiment	S	13	EC50	81.71 µg/g	MF	[13]
						NOEC	30.8 µg/g	Y(II)	
Mélange (cf ci-dessus)	*M. spi*	Atrazine (50%), isoproturon (35%) alachlor (15%)	Micro	ERE	21	EC50	59	MS	[3]

L'étude de la bibliographie a permis de montrer une grande variété d'espèces de Myriophylle, d'herbicides étudiés, de conditions de cultures et de paramètres mesurés. Cette diversité se retrouve dans les valeurs seuils présentées : EC50, LOEC et NOEC qui varient énormément.

Concernant les espèces étudiées, il est difficile de conclure à une plus ou moins grande sensibilité de *M. spicatum* par rapport aux autres espèces de Myriophylle vis à vis des herbicides. En effet, il existe trop de différences dans les protocoles pour attribuer une variation des valeurs seuils à l'espèce étudiée plutôt qu'aux conditions de cultures et aux paramètres étudiés. Par exemple, les effets de l'atrazine, qui ont été étudiés chez *M. aquaticum* (Schreiber et al., 2011; Teodorović et al., 2012; Tunić et al., 2015), *M. heterophyllum* (Fairchild et al., 1998) et *M. spicatum* (Bird, 1993; McGregor et al., 2008), sont variables. Mais comme dans certains cas les effets sont étudiés en conditions axéniques (Bird, 1993), dans d'autres en microcosmes ou système plante-eau-sédiment (Fairchild et al., 1998; McGregor et al., 2008; Tunić et al., 2015) ou encore en système plante-sédiment (Schreiber et al., 2011; Teodorović et al., 2012), les comparaisons sont très difficiles.

Parmi les différents herbicides étudiés on retrouve majoritairement des herbicides auxiniques dont l'efficacité sur *M. spicatum* avait été montrée précédemment (Getsinger et al., 1982; Netherland and Getsinger, 1992), mais également des urées et des triazines, très répandues dans les milieux aquatiques, ainsi que deux sulfonylurées, également connues pour leur contrôle efficace du Myriophylle (Nelson et al., 1993). La sensibilité connue du Myriophylle à certains herbicides n'a pas toujours été retrouvée. Par exemple, les EC50s déterminées pour *M. spicatum* et le 2,4-D varient d'un facteur de 200 (entre 5 et 1000 µg/L) selon que l'on considère la longueur des racines ou des tiges (Mohr et al., 2013). A contrario, des herbicides, dont les effets étaient supposés moins importants que ceux des herbicides auxiniques, ou des sulfonylurées, se sont parfois avérés autant voire plus toxiques que ces derniers. Par exemple les EC50 déterminées pour le diuron chez *M. spicatum* sont de 5 µg L^{-1} alors que celles du fluoxypyr sont au minimum de 67 µg L^{-1}.

Les études présentées ont utilisé différentes conditions de culture. Les systèmes les plus contrôlés sont les systèmes plante-eau, qui peuvent être axéniques ou non ; viennent ensuite les systèmes plante-eau-sédiment, les microcosmes et les mésocosmes. La majorité des résultats suggèrent une plus grande sensibilité des espèces de Myriophylles dans les

systèmes complexes (micro et mésocosmes). Bien que pour l'évaluation du risque ces derniers systèmes soient préférables, car au plus proches des conditions environnementales, ils augmentent aussi le nombre de facteurs confondants (Vignati et al., 2007), si bien que les effets apparemment plus marqués des herbicides dans les conditions des mésocosmes pourraient en réalité résulter d'autres facteurs de stress, par exemple une déplétion en nutriment ou une attaque d'herbivore. Le milieu de culture peut aussi modifier la réponse des plantes. Cependant les seuls exemples de situations similaires mais de milieux différents : le glyphosate (Bird, 1993; Sánchez et al., 2007) et le 2,4-D (Bird, 1993; Mohr et al., 2013) sur *M. spicatum*, comportent des différences de durée d'exposition et/ou de paramètres étudiés, biaisant d'éventuelles conclusions. Les exemples trouvés de situations similaires mais de durées d'exposition différentes, n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet de ce paramètre (Belgers et al., 2011; Vervliet-Scheebaum et al., 2010).

La majorité des études présentées s'intéressent exclusivement à des paramètres morphologiques. Ce type de paramètres : croissance, rendement, etc ... sont courants en évaluations de risques puisque préconisés par les normes (OECD, 2014a, 2014b, 2006b). Seules quatre des études trouvées ce sont intéressées à un autre type de paramètres liés à la photosynthèse : le contenu en chlorophylle a, le Y(II), et le Fv/Fm (Lambert et al., 2006; McGregor et al., 2008; Schreiber et al., 2011; Teodorović et al., 2012). Mais étant donné la grande variabilité entre les valeurs des paramètres morphologiques, il est difficile de comparer la sensibilité des deux types de paramètres.

L'ensemble des études rencontrées permet de dresser un tableau complexe des effets des herbicides sur le Myriophylle, effets dépendants de nombreuses conditions. Mais qu'en est-il des effets des ETM?

IV.1.2 Les ETM

Les métaux lourds et les métalloïdes sont aujourd'hui regroupés sous une même appellation, celle d'éléments traces métalliques (ou ETM). Les interactions entre les ETM et le genre *Myriophyllum* sont étudiées depuis de nombreuses années en raison des capacités épuratrices de ces derniers. En effet plusieurs études ont montré que les espèces de Myriophylle, à l'instar d'autres espèces de macrophytes, pouvaient accumuler les ETM : par bioaccumulation c'est-à-dire absorption et accumulation interne (Cardwell et al., 2002;

Harguinteguy et al., 2015; Sapci and Ustun, 2015), mais également par biosorption c'est-à-dire par adsorption à l'extérieur de la plante (Keskinkan et al., 2003; Lesage et al., 2007). Concernant ce dernier point, il a également été montré que cette biosorption pouvait se faire en utilisant un compost de plantes aquatiques (Milojković et al., 2014). Les capacités d'accumulation des Myriophylles, voire d'hyperaccumulation dans certains cas (Robinson et al., 2006), ont conduit à leur utilisation comme biomoniteur et bioindicateur de la qualité des milieux (Grudnik and Germ, 2010; Lewander et al., 1996), mais aussi en phytoremédiation (Harguinteguy et al., 2015). Certains auteurs les qualifient même de biomoniteur idéal, puisque que ce sont des organismes sessiles, visibles à l'œil nu, faciles à collecter, manipuler et identifier sur le terrain, et qui concentrent les métaux biodisponibles à la fois du sédiment par leurs racines, mais aussi de la colonne d'eau par les feuilles et les tiges (Nimptsch et al., 2005).

Néanmoins, cette bioaccumulation n'est pas sans conséquences pour les plantes. Les travaux de Yan and Xue, (2013) ont par exemple permis de montrer une réduction de la croissance de *M. spicatum* avec une accumulation croissante de Cu (**Figure I.13**). Les ETM peuvent également inhiber la biosynthèse des pigments chlorophylliens et des enzymes impliquées dans ce procédé en prenant la place de l'ion Mg^{2+} dans la molécule de chlorophylle, conduisant ainsi à l'incapacité de capter un photon et donc à une diminution de l'activité photosynthétique (Ferrat et al., 2003).

C'est pourquoi, la tolérance à des niveaux importants d'ETM ne peut se faire que par la mise en place de procédés de détoxification efficaces. Ces procédés de détoxification peuvent être divisés en 3 étapes : la phase I, qui inclut principalement les transformations par oxydation et hydrolyse des ETM (la plupart avec le système des monooxygénases à cytochrome P450) ; ces métabolites sont ensuite conjugués en phase II par des enzymes de types transférases (par exemple : la glutathion S-transférase) ; et en phase III, ils sont répartis et stockés dans les parois cellulaires ou les vacuoles (Ferrat et al., 2003; Nimptsch et al., 2005). Les plantes doivent également mettre en place un certain nombre de systèmes de défenses antioxydantes : cystéine, glutathion, tocophérols, acide ascorbique et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la guaiacol peroxydase, la glutathion réductase ou encore l'ascorbate peroxydase. Ces défenses vont permettre de piéger les espèces

réactives de l'oxygène (ROS) toxiques, et ainsi de protéger la plante d'un stress oxydant (Ngayila et al., 2009).

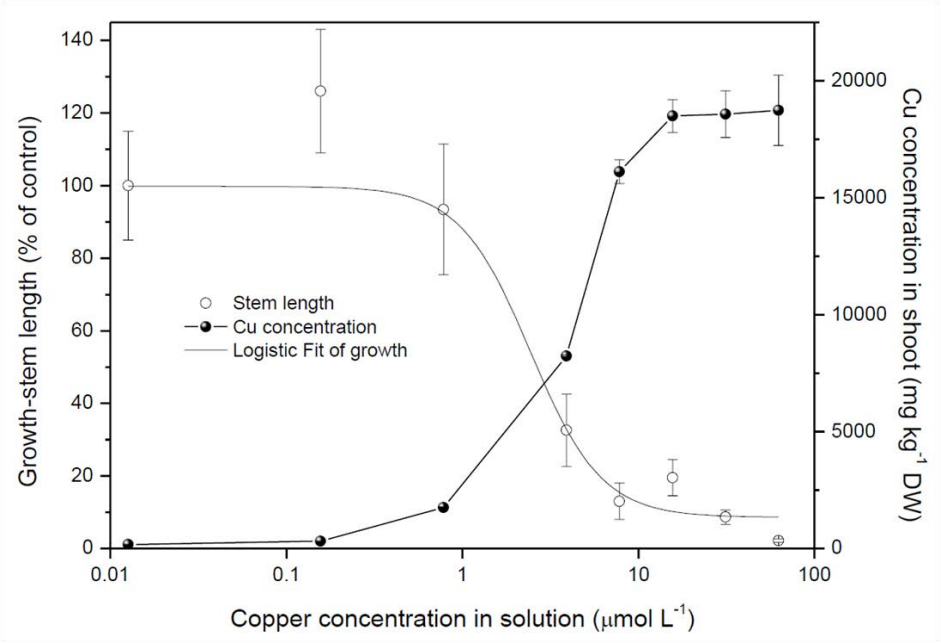


Figure I.13 Concentrations de cuivre mesurées dans des tiges de *M. spicatum* et effet sur la croissance (longueur de la tige) suite à leur l'exposition à différentes concentrations de Cu pendant 4 jours (10 µM Cu = 635,46 µg/L). Les données présentent les moyennes ± l'écartype (n = 3). Les lignes sont les courbes log-logistique intégrées (tiré de Yan and Xue, 2013).

Les mesures des systèmes de défenses antioxydantes, des teneurs en pigments chlorophylliens, de l'activité photosynthétique, et également de la croissance, qui sont soit activés soit inhibés par les ETM, peuvent être utilisées comme bioindicateurs de la qualité de milieux, mais aussi comme biomarqueurs de leur toxicité (Ferrat et al., 2003; Harguinteguy et al., 2015; Ngayila et al., 2009). C'est pourquoi de plus en plus d'études s'y intéressent (**Tableau I.5**).

Tableau I.5 Synthèse des effets connus des ETM sur le genre *Myriophyllum*

Espèces : *M. aq - M. aquaticum* ; *M. alt - M. alterniflorum ; M. het - M. heterophyllum ; M. pro - M. propinquum M. spi - M. spicatum ; M. tri - M. triphyllum.* **Test :** Ax - Axénique (t= tube ; b= boîte); NAx - non axénique. **Milieux :** A - Andrews ; ED - eau déionisée ; EN - eau naturelle ; H - Hoagland ; MN - milieu nutritif ; Vo - Vienne oligotrophe ; Ve - Vienne enrichi. **Bioacc :** bioaccumulation. **Paramètres :** AAO - activité antioxydante ; ABA - acide abscissique ; Aty - anthocyanes ; Car - caroténoïdes ; Chl - chlorophylle ; L - longueur (totale, T= tige, R = racine) ; NbN - nombre de nœuds ; NbRc - nombre de racines ; MDA - malondialdéhyde ; MF - masse fraîche (totale, T= tige, R = racine) ; MS - masse sèche (totale, T= tige, R = racine) ; TPC - composés phénoliques totaux Ψπ - potentiel osmotique. **Références :** [1] Delmail et al., 2011a, [2] Delmail et al., 2011b, [3] Harguinteguy et al., 2015, [4] Krayem et al., 2016, [5] Ngayila et al., 2007, [6] Ngayila et al., 2009, [7] Robinson et al., 2006, [8] Sajwan and Ornes, 1996, [9] Sánchez et al., 2007, [10] Sivaci et al., 2004, [11] Sivaci et al., 2007, [12] Sivaci et al., 2008.

Type	Esp.	ETM	Dose (µg/L)	Test	Milieu	Durée (j)	Concentration (µg/g MS)	Bioacc	Effet sur la plante		Remarques	Réf.
									Physiologie	Morphologie		
Essentiels	*M. alt*	$CuSO_4$	100	Ax	Vo	27	≈ 31		↘ Chl a, Chl b, ↗ Proline, ↗ Ψπ feuille	5% mort, ↘ Nb, ⌀ vaisseaux xylème, double endoderme	≠ selon âges des feuilles ; 77% en 24h	[2]
			0 - 2000	Nax	Vo	42	Pas de saturation		↗ Chl b	↘ MF, MS		[6]
			0 - 2500	NAx	Vo	42	1350 - 5850	89 - 93				[5]
	M. aq	Zn^{2+}	0 - 20000	NAx	MN	7	2348		↘ Chl a, ↗ MDA		Phytoremédiation efficace	[3]
	M. spi	$CuSO_4$	0 - 40000	Ax	A	21				EC50 : 2190 - 4490 µg/L (L_R, MS, L, NbN)		[9]

Type	Esp.	ETM	Dose (µg/L)	Test	Milieu	Durée (j)	Concentration (µg/g MS)	Bioacc	Effet sur la plante		Remarques	Réf.
									Physiologie	Morphologie		
Non-essentiels	*M. alt*	Na_2HAsO_4 (AsV)	100	Ax (t)	Vo	14			↘ photosynthèse, ↘ respiration			[4]
				Ax (b)		21	103.85 (T), 156.53 (R)		↘ de Chl a, Chl b, Car			[4]
				Ax (t)	Ve	14			↗ photosynthèse, ↘ respiration			[4]
						30				↘ L_{TP}		[4]
				Ax (b)	Ve	21	87.48 (T), 106.65 (R)		↘ de Car			[4]
		$CdCl_2$	10	Ax	Vo	27	≈ 320		↘ Chl a, Chl b, Car, ↗ MDA, ↗ Proline, ↗ Ψπ feuille	5% mort, ↘ Nb, ↘ vaisseaux xylème, double endoderme transitoire	≠ selon âges des feuilles ; 50% en 24h	[1]
		$CdSO_4$	0 - 25	NAx	Vo	42	Pas de saturation	76 - 83	↘ Chl a, Chl b, Car	↘ MF, MS		[6]
							1800 - 5100		↗ Chl a, Chl b, Car			[5]

Type	Esp.	ETM	Dose (µg/L)	Test	Milieu	Durée (j)	Concentration (µg/g MS)	Bioacc	Effet sur la plante		Remarques	Réf.
									Physiologie	Morphologie		
Non-essentiels	*M. aq*	Ni^{2+}	0 - 10000	NAx	MN	7	≈ 4625		↗ Chl a, ↗ MDA		Phytoremédiation efficace	[3]
		Pb^{2+}	0 - 15000	NAx	MN	7	3798 ± 1032		↗ Chl a, ↗ MDA		Phytoremédiation efficace	[3]
	M. het	$CdSO_4$	0 - 64000	NAx	ED	4		<100	↘ Chl a, Chl b, Car, ↗ ↘ Aty, ↗ TPC			[12]
	M. pro	Na_2HAsO_4 (AsV)	0 - 3000	NAx	EN	42	≈ 250			↘ MS		[7]
	M. spi	$CdSO_4$	0 - 7360	Ax	H	14	≈ 270		↘ P	↘ (L_T, MS_T, MS_R, NbRc)		[8]
			0 - 16000	NAx	ED	4			↗ ABA			[11]
							≈ 78		↘ Chl a, Chl b, Car		>70% accumulation en 24h	[10]
	M. tri	$CdSO_4$	0 - 16000	NAx	ED	4			↗ ABA, ↗ AAO, ↘ TPC			[11]
							≈ 150		↘ Chl a, Chl b, Car		>70% accumulation en 24h	[10]
Mélange	*M. alt*	$CuSO_4$ - $CdSO_4$	0 - 2000, 0 - 25	NAx	Vo	42	Pas de saturation		↘ Chl a, Chl b	↘ MF, MS	Pas d'influence dans la bioaccumulation	[6]

Beaucoup d'études portant sur les ETM et les Myriophylles, sont des études *in-situ*. Le **tableau I.5** présente des études conduites en laboratoire, en conditions contrôlées et ayant pour objectif d'évaluer leur toxicité pour différentes espèces de Myriophylle. Ces études sont souvent conduites par les mêmes équipes, de ce fait, ce sont principalement trois ETM qui sont retrouvés : un ETM essentiel, le cuivre (Cu) et deux ETM non-essentiels, le cadmium (Cd) et l'arsenic, sous forme d'arséniate (As(V)), forme majoritaire de l'arsenic dans la colonne d'eau, mais aussi la plus toxique (Rahman et al., 2012). Le fait que plusieurs études soient conduites par les mêmes équipes n'empêche cependant pas de retrouver une certaine diversité dans les doses et les conditions de cultures, ainsi que dans les paramètres.

Comme les espèces de Myriophylle sont tolérantes aux ETM, les doses testées sont assez élevées par rapport à celles testées pour les herbicides, et plutôt de l'ordre du milligramme (voir des dizaines de milligrammes ; Sivaci et al., 2008 ; 2007 ; 2004). Quelques études se sont néanmoins intéressées à des doses plus faibles (de quelques dizaines à quelques centaines de microgrammes) et ont pu montrer des effets significatifs. Par exemple, Delmail et al. (2011b) ont montré une réduction du contenu en chlorophylle a et b, une accumulation de proline, une augmentation du potentiel osmotique et des modifications du xylème chez *M. alterniflorum* en présence de 100 µg L^{-1} du $CuSO_4$; et Delmail et al. (2011a) ont montré des effets similaires du Cd chez cette même espèce à 10 µg L^{-1}. Pour autant, l'absence de tests des effets d'ETM différents aux mêmes doses et dans les mêmes conditions empêche la comparaison de la toxicité des ETM essentiels et des ETM non-essentiels. Ainsi il est difficile de voir s'il existe une différence entre les deux.

Concernant les conditions de culture, on peut noter que dans l'ensemble les études se font en condition assez contrôlées (aucune mention d'étude en micro- ou mésocosme), et essentiellement sur des systèmes plante-eau. Il existe une disparité importante de durée d'exposition et de milieux de culture utilisés par les différents auteurs. Certains utilisent des milieux nutritifs classiquement utilisés pour la culture axénique des macrophytes, comme le milieu Hoagland ou le milieu Andrews (Sajwan and Ornes, 1996; Sánchez et al., 2007), ou des milieux nutritifs non spécifiés (Harguinteguy et al., 2015). D'autres utilisent des milieux oligotrophes enrichis ou non, dont la composition est similaire à celle trouvée sur le terrain, comme le milieux Vienne (Delmail et al., 2011b; Krayem et al., 2016; Ngayila et al., 2007). Robinson et al. (2006) quant à eux ont réalisé leur étude avec de l'eau naturelle qu'ils ont

complémenté en As(V). Enfin, Sivaci et al. (2008 ; 2007 ; 2004) n'ont pas utilisé de milieux de culture. Ils ont réalisé leur test dans de l'eau déionisée. L'utilisation d'eau déionisée au lieu d'un milieu nutritif, ne serait-ce qu'oligotrophe est discutable, bien que les auteurs affirment que cela ne nuit pas à la plante. En effet, il est probable que ces plantes aient subi un choc osmotique pouvant biaiser les résultats obtenus.

Les dosages d'ETM ainsi que les calculs de facteurs de bioaccumulation, quand ils ont été faits, montrent bien que les espèces de Myriophylle sont capables d'accumuler les ETM en quantités importantes, et que plus de 50% de la dose retrouvée à la fin de l'expérimentation était absorbée durant les premières 24 h (Delmail et al., 2011a; Sivaci et al., 2004). Cependant, comme aucune étude n'a mesuré de saturation des quantités absorbées, même quand la contamination représentait plusieurs $mg.L^{-1}$ (Harguinteguy et al., 2015), le taux absorbé à 24 h est peut-être inférieur à 50%.

Parmi les paramètres mesurés on trouve peu de paramètres morphologiques comparativement aux études sur les herbicides. A la place ce sont surtout des paramètres physiologiques qui sont mesurés : les biomarqueurs évoqués au début du paragraphe. Dans la plupart des cas, les biomarqueurs de stress (contenu en MDA, ABA, proline, mesure de l'activité antioxydante) augmentent, alors que le contenu en pigments photosynthétiques, l'activité photosynthétique, la respiration et la croissance diminuent. Mais quelques études ont aussi observé une augmentation légère des pigments avec le Cu (Ngayila et al., 2009), le Cd (Ngayila et al., 2007), le Ni et le Pb (Harguinteguy et al., 2015). Le dosage des composés phénoliques totaux (TPC), utilisés comme marqueurs de stress oxydant (Blokhina et al., 2003) ont montré une augmentation chez *M. heterophyllum* (Sivaci et al., 2008) et une diminution chez *M. triphyllum* (Sivaci et al., 2007) en présence de Cd dans des conditions de cultures similaires, mais à des doses différentes (augmentation à 64 mg L^{-1} et réduction à 16 mg L^{-1}).

Les deux études réalisées avec le milieu Hoagland (Sajwan and Ornes, 1996) et le milieu Andrews (Sánchez et al., 2007) ressemblent, du fait du choix des paramètres mesurés, plus à celles conduites sur les herbicides. Elles se sont en effet intéressées à des paramètres morphologiques plutôt que physiologiques : longueur, masses sèches, nombre de racine ou de nœuds. Sánchez et al. (2007 ; étude conduite également sur le glyphosate) ont pu déterminer une EC50 pour le Cu comprise entre 2190 et 4490 µg L^{-1}. Donc contrairement aux

études sur les herbicides et les espèces de Myriophylle, une seule EC50 a été trouvée pour les ETM. Ainsi, il semblerait que dans les études portant sur les ETM et le genre *Myriophyllum*, la réalisation de courbes dose-réponse soit une pratique moins courante.

Comme pour les herbicides, il apparait donc que les effets des ETM sur le Myriophylle sont complexes. Là encore la présence de différences entre les espèces, les conditions de culture, les ETM, doses et paramètres utilisés entre les études empêche de généraliser les effets, ou de mettre en évidence des liens entre les conditions testées et les réponses des plantes. Seule l'étude de Krayem et al. (2016) montre une modification des effets de l'As(V) sur l'activité photosynthétique de *M. alterniflorum* dépendante de l'enrichissement en nutriments du milieu, et suggérant une interaction entre l'As(V) et les nutriments. Mais que sait-on de telles interactions ?

IV.2 Interactions entre les herbicides ou ETM et les nutriments

Pour se développer, les organismes photosynthétiques, autotrophes, ont besoin de prélever dans leur environnement des nutriments essentiels (Maathuis, 2009; Taiz et al., 2015). On définit la concentration critique en nutriments comme étant la concentration minimale de nutriments dans les tissus permettant une croissance ou un rendement maximal de la plante (Taiz et al., 2015). Gerloff (1975) a déterminé que chez *M. spicatum* cette concentration critique est égale à 0,75% pour l'azote (N), et 0,07% pour le phosphore (P). En deçà de ces concentrations, la croissance est réduite et la plante déficiente. Ainsi, les modifications des concentrations en nutriments dans les milieux sont susceptibles d'affecter les organismes photosynthétiques par limitation, ou excès.

Dans les écosystèmes aquatiques, l'azote et le phosphore constituent les deux principaux facteurs limitant la croissance des organismes photosynthétiques (Bornette and Puijalon, 2011; Duarte, 1992; Moss et al., 2013). L'azote entre en effet dans la composition des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques, des nucléotides, ou encore des amines (Maathuis, 2009; Taiz et al., 2015). Le phosphore quant à lui est plutôt impliqué dans les processus énergétiques et le maintien de l'intégrité cellulaire : c'est un composant de l'ATP, des phospholipides, des sucres phosphates, des acides nucléiques ou encore des nucléotides (Maathuis, 2009; Taiz et al., 2015).

Les activités anthropiques, responsables de rejets importants de ces deux éléments (azote et phosphore), en plus des molécules contaminantes de type herbicide ou ETM par exemple (**Chapitre I.III.2**), peuvent donc impacter doublement les organismes photosynthétiques de ces milieux : (i) par action toxique des contaminants, et (ii) en perturbant les concentrations et les équilibres des différents nutriments.

Les nutriments dans le milieu peuvent en effet être modifiés en terme de concentrations, mais également dans en terme de rapports molaires ou massiques selon les auteurs (rapport N:P par exemple). Ces rapports sont appelés ratios stœchiométriques, et leur effets sont étudiés en stœchiométrie écologique, terme désignant les équilibres des substances chimiques dans les interactions écologiques, les procédés, et leur étude (Sterner and Elser, 2002). La théorie de la stœchiométrie écologique considère que les déséquilibres élémentaires entre les "consommateurs" (ici des organismes photosynthétiques) et la "ressource" (azote ou phosphore) mènent à la limitation des organismes par les nutriments, affectant par la suite de nombreux processus écologiques, comme les caractéristiques de croissance des organismes, leur valeur nutritive pour les herbivores (qualité), et leur biomasse, la dynamique de population, la dynamique des chaînes trophiques, les interactions biotiques, ou le recyclage des nutriments, c'est-à-dire, au final, la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Danger et al., 2008).

Sterner et Elser (2002) ont fait la supposition que les teneurs en N et P et par conséquent le ratio N:P des organismes photosynthétiques était étroitement corrélés à ceux du milieu. Les travaux de Güsewell and Koerselman (2002) montrent au contraire une faible corrélation entre les concentrations en nutriments et le ratio N:P du sol, et ceux de plantes de zone humides. En revanche, ils démontrent que ces paramètres répondent à une fertilisation du milieu, que ce soit sur le terrain ou en laboratoire. Demars and Edwards (2007) démontrent quant à eux qu'il existe bien une relation entre les nutriments du milieu et ceux de la plante, mais que cette relation est faible ; et que les ratios stœchiométriques C:N:P sont relativement stricts ce qui empêche leur usage en bioindication de l'enrichissement des milieux. Pourtant, des ratios N:P différents ont été trouvés dans des macrophytes issues de sites oligo- et eutrophes (Frost and Hicks, 2012; Xia et al., 2015). De même, Sistla et al. (2015) montrent qu'un enrichissement en azote, en augmentant le ratio N:P, peut empêcher l'absorption du phosphore par l'organisme et ainsi aboutir à une limitation en phosphore.

Mais, bien que les points de vue aient évolués et/ou divergent, il semblerait que les nutriments du milieu puissent influencer les teneurs des plantes dans une certaine mesure. De par le rôle de ces nutriments dans le métabolisme de la plante (Maathuis, 2009), de telles modifications des ratios C:N:P sont susceptibles d'affecter le métabolisme. Mais est-ce que de telles modifications peuvent influencer la réponse des organismes à un stress additionnel, tels que les polluants? C'est ce que les études présentées dans le **tableau I.6** ont cherché à savoir.

Tableau I.6 Synthèse des effets connus des herbicides et ETM combinés aux nutriments sur les organismes photosynthétiques d'eau douce.

Sens de l'effet : ↗ (augmentation), ↘ (diminution). **Signes :** + ou - désignent des effets plus ou moins importants par rapport aux effets des facteurs seuls allant dans la même direction, ns - non significatif. **Test :** Ax - Axénique (t= tube ; b= boîte); NAx - non axénique ; Hydrop - hydroponie ; Micro - microscosme ; méso - mésocosme. **Modes d'action :** AAA - acides aminées aromatiques ; GA - gibbérellines ; PSI - photosystème I ; PSII - photosystème II. **Paramètres :** Car - caroténoïdes ; Chl a = chlorophylle a ; MF - masse fraîche, MS - masse sèche. **Références :** [1] Baker et al., 2016, [2] Bian et al., 2013, [3] Cedergreen et al., 2016, [4]Chia et al., 2015, [5] Dalton et al., 2015, [6] Detenbeck et al., 1996 [7] Interlandi, 2002, [8] Krayem et al., 2016, [9] Lizotte et al., 2013, [10] Lozano and Pratt, 1994, [11] Murdock et al., 2013, [12] Tubea et al., 1981.

Type	Organisme	Test	Polluants			Nutriments		Combinaison	Paramètres	Réf.
			Nature	Mode d'action	effet	Nature	effet			
Herbicides	*Chlorella pyrenoidosa*	Ax	Prométryne	Inhibition du PSII	↘	N +	↗	↘ +	Croissance	[12]
					↘	P +	ns	ns		
			Dinosèbe	Inhibition métabolisme	ns	N +	↗	ns	Croissance	
					ns	P +	ns	ns		
			Fluométuron	Inhibition du PSII	↘	N +	↗	↘ +	Croissance	
					↘	P +	ns	ns		
	Phytoplancton	*In-situ*	Glyphosate	Inhibition AAA	ns	N et P+	ns	↘	Qualité ressource phytoplancton	[1]
		Méso	atrazine, S-métolachlore, perméthrine	Inhibition PSII, des GA, Insecticide	↘	N et P +	↗	ns	Chl a	[9]
	Périphyton	Micro	Diquat	Inhibition PSI	ns	N et P +	↗	↘	Chl a	[10]
					ns	N et P +	↗	↗ +	Protéines	
		Micro	Atrazine	Inhibition du PSII	↘	N et P +	↗	ns	Chl a (établie)	[11]
					↘	N et P +	↗	↗ +	Chl a (colonisation)	
					↘	N et P +	ns	ns	PPB	
					↘	N et P +	↘	ns	Absorption NH_4^+	

Type	Organisme	Test	Polluants			Nutriments		Combinaison	Paramètres	Réf.
			Nature	Mode d'action	effet	Nature	effet			
Herbicides	Périphyton	Méso	Atrazine	Inhibition du PSII	ns	N +	↘	↗	Car/Chl a	[6]
					ns	P +	↗	↘		
					ns	N et P +	ns	ns		
	Lemna minor	Hydrop	Glyphosate	Inhibition AAA	↗	N -	↘	↗ +	RGR surface des frondes	[3]
					↗	P -	↘	↗ +		
					↘	N -	↘	↘ -		
					↘	P -	↘	↘ -		
	Communauté de macrophytes	*In-situ*	Atrazine	Inhibition PSII	ns	N et P +	ns	ns	Richesse spécifique	[5]
					ns	N et P +	↘	ns	Macrophytes submergées	
					ns	N et P +	↗	ns	% d'espèces non natives	
					ns	N et P +	↘	ns	Qualité floristique	

Type	Organisme	Test	Polluants			Nutriments		Combinaison	Paramètres	Réf.
			Nature	Mode d'action	effet	Nature	effet			
ETM	*Ankistrodesmus falcatus*	NAx	$CuCl_2$		ns	N -	ns	ns	Croissance	[7]
	Asterionella formosa	NAx	$CuCl_2$		↘	N -	↘	↘ +	Croissance	
	Fragilaria crotonensis	NAx	$CuCl_2$		↘	N -	↘	↘ +	Croissance	
	Chlorella vulgaris	Ax	$Cd(NO_3)_2$		↘	N -	↘	↘ +	Croissance	[4]
					↘	N -	↘	↘ -	Densité de cellules	
					↗	N -		↗ +	MS	
					↗	N -	↘	↗ +	Chl a	
	Lemna gibba	Ax	$AgNO_3$		↘	Nut -	↘	↘ -	Nombre de frondes	[2]
					↘	N:P+ (↘P)	↘	ns		
					↘	Nut -	↘	↘ -	MF	
					↘	N:P+ (↘P)	↘	ns		
					↘	Nut -	↘	ns	Croissance	
					↘	N:P+ (↘P)	↘	ns		
	M. alterniflorum	Ax	Na_2HAsO_4		↘	N et P +	↘	↗	Photosynthèse	[8]
					ns	N et P +	↘	↘ +	Respiration	

Le **tableau I.6** présente les résultats d'études combinant les deux facteurs de stress évoqués précédemment : polluant et nutriments. Comme pour les **tableaux I.4** et **I.5,** il existe une variété importante de conditions et de milieux de culture utilisés entre les différentes études, ce qui peut en partie expliquer les différences de résultats. Afin d'éviter les redondances avec le **chapitre I.IV.1**, ils n'ont pas été détaillés ici.

A l'instar des études sur les effets des polluants seuls, il existe une disparité importante entre les approches des études sur les herbicides et celles sur les ETM. En effet, les travaux sur les herbicides portent principalement sur des communautés : phytoplancton (Baker et al., 2016; Lizotte et al., 2013), périphyton (Detenbeck et al., 1996; Lozano and Pratt, 1994; Murdock et al., 2013), macrophytes (Dalton et al., 2015), en systèmes complexes : microcosme (Lozano and Pratt, 1994; Murdock et al., 2013), mésocosme (Detenbeck et al., 1996; Lizotte et al., 2013), ou encore *in-situ* (Baker et al., 2016; Dalton et al., 2015) ; alors que les études trouvées pour les ETM portent sur une seule espèce en conditions contrôlées.

Parmi les herbicides étudiés, ont retrouve une certaine diversité de formes et de modes d'action, avec quand même une dominante d'herbicides inhibiteurs de la photosynthèse, que ce soit au niveau du photosystème I (Lozano and Pratt, 1994) ou majoritairement du photosystème II (Dalton et al., 2015; Detenbeck et al., 1996; Lizotte et al., 2013; Murdock et al., 2013; Tubea et al., 1981). A l'exception des travaux de Dalton et al. (2015), l'ensemble des études portent sur des microorganismes, seuls ou en communautés, et non sur des plantes supérieures dicotylédones, comme le Myriophylle, ainsi il n'est pas étonnant de ne pas retrouver d'herbicides auxiniques au sein des différents herbicides testés.

Plusieurs études n’ont pas montré d'effets significatifs des herbicides sur les paramètres étudiés. A l'exception de celle sur le dinosèbe conduite en conditions axéniques (Tubea et al., 1981), toutes les autres ont été réalisées sur des systèmes complexes : microcosme (Lozano and Pratt, 1994), mésocosme (Detenbeck et al., 1996), ou *in-situ* (Baker et al., 2016; Dalton et al., 2015). Ces études montrent pourtant des effets significatifs des nutriments. Certains auteurs expliquent ces résultats par une trop grande variabilité dans les réponses aux polluants dans ce type de système de test, et la présence de facteurs confondants. Ces points sont vrais, mais ils sont vrais aussi pour les nutriments, et n'empêchent cependant pas de montrer des effets significatifs. C'est pourquoi certains auteurs n'hésitent pas à dire que les effets des nutriments dépassent les effets des polluants en conditions naturelles

(Dalton et al., 2015), et en ce sens constituent un facteur qu'il est important d'étudier et de réguler.

Les autres études montrent en général des effets négatifs des herbicides sur les paramètres étudiés, mais celle de Cedergreen et al. (2016) semblent d'abord montrer un effet positif puis un effet négatif sur le même paramètre (le taux de croissance de surface des frondes). Cette étude est un peu particulière par rapport aux autres, car elle présente les effets d'une limitation en azote ou en phosphore sur les hormèses (stimulation de la croissance par de faibles doses de contaminants) induite par le glyphosate. Les résultats présentés dans le tableau montrent dans un premier temps les effets de doses induisant des hormèses dans des milieux plus ou moins limités en nutriments, c'est pourquoi l'effet de l'herbicide est positif. Les résultats présentés ensuite ont été obtenus avec une expérimentation testant un gradient de concentration de glyphosate jusqu'à des doses induisant une réduction de la croissance, c'est pourquoi les effets sont négatifs. Les auteurs expliquent ces relations complexes entre limitation en phosphore et effet du glyphosate par l'utilisation par *Lemna minor* du glyphosate comme source de phosphore. L'interaction avec l'azote serait quant à elle due à une atténuation des inhibitions rétroactives de la photosynthèse par la limitation en azote. Cette étude permet ainsi de montrer la complexité entre le mode d'action et la disponibilité des polluants et des nutriments.

Les effets des nutriments dans les études du tableau I.6. ont été évalués sous différents aspects. Certains travaux ont découplé l'N et le P afin de mesurer leurs effets respectifs (Cedergreen et al., 2016; Tubea et al., 1981). Certains auteur ont choisi de tester les deux : séparément et conjointement (Detenbeck et al., 1996). Les autres ne se sont intéressés qu'au couplage des deux paramètres. En revanche, il est intéressant de noter qu'aucune des études sur les herbicides ne s'est intéressée au ratio N:P. Les résultats montrent qu'une augmentation des nutriments, mais majoritairement de l'N serait bénéfique pour la croissance, les teneurs en chlorophylle a et en protéines, mais affecterait l'absorption de l'ammonium (Lizotte et al., 2013; Lozano and Pratt, 1994; Murdock et al., 2013; Tubea et al., 1981). Une limitation en N et P en revanche réduit la croissance (Cedergreen et al., 2016). Les travaux de Dalton et al. (2015), conduits sur une communauté de macrophyte *in-situ* ont montré qu'un enrichissement du milieu en nutriments provoquait une diminution du ou des macrophytes immergées, et plus généralement, un remaniement de la communauté, en

faveur d'espèces non-natives, mieux à même de tolérer et d'exploiter des teneurs élevées en nutriments.

Des interactions entre les effets des herbicides et les effets des nutriments ont pu être mises en évidence. Dans certaines études, la combinaison conduit à un effet, alors que séparément les deux facteurs n'en ont pas (Baker et al., 2016). Dans d'autres études, l'effet du seul facteur ayant un effet est amplifié ou au contraire la combinaison conduit à un effet opposé (Lozano and Pratt, 1994). Le plus souvent l'effet d'un des deux facteurs est amplifié. En effet, plusieurs études ont montré qu'un enrichissement en nutriment, en améliorant la croissance des organismes, augmentait aussi l'effet inhibiteur des herbicides (Murdock et al., 2013; Tubea et al., 1981). La trop grande diversité de tests et d'effets empêche de tirer des conclusions quant à un éventuel effet commun de l'interaction herbicide/nutriment, néanmoins il apparait que l'état nutritionnel de l'organisme (est-il limité en nutriment ou non) soit un paramètre important à prendre en compte.

Contrairement aux études sur les herbicides, toutes les études sur les ETM, à l'exception du test sur *Ankistrodesmus falcatus* (Interlandi, 2002), ont permis de montrer des effets des ETM et des nutriments sur au moins un des paramètres mesurés. Les études sur les ETM étant réalisées en conditions contrôlées axéniques ou non, alors que les études sur les herbicides étaient majoritairement réalisées en systèmes complexe, on pourrait penser qu'on observe des effets plus prononcés en conditions contrôlées. Ainsi une évaluation du risque basée sur ces systèmes permettrait une estimation de la toxicité conservatrice, et conduirait à la détermination de valeurs seuils protectrices. C'est également ce que montrent Brooks et al. (2015) qui expliquent que les milieux et les conditions de culture utilisés pour l'évaluation de risque ne sont pas représentatifs de l'environnement et devraient être (i) plus réalistes, et (ii) homogénéisés ; mais, que les valeurs déterminées dans ces systèmes permettraient *a priori* une évaluation du risque plus protectrice. Cependant, il faudrait plus d'études comparant les différents types de tests, sur différentes molécules pour pouvoir vérifier cette hypothèse.

Les ETM étudiés ont induit une réduction de la croissance, de la biomasse (sauf pour *Chlorella vulgaris*, Chia et al., 2015), du nombre de cellules ou de frondes, et/ou de la photosynthèse chez les différentes espèces étudiées. Toutes les modifications des nutriments : limitation en azote (Chia et al., 2015; Interlandi, 2002), réduction de l'ensemble

des nutriments ou modification du rapport N:P (Bian et al., 2013), enrichissement en azote et phosphore (Krayem et al., 2016), ont également réduit ces paramètres en l'absence d'ETM.

Les interactions mises en évidences sont, comme pour les herbicides, variables. Il est donc difficile de dégager un modèle de réponses communes aux ETM, et *a fortiori* aux polluants. L'unique étude s'intéressant aux effets du ratio N:P n'a pas montré d'interaction entre les deux facteurs étudiés, alors qu'une interaction très forte avec la concentration en nutriment du milieu a été mise en évidence. Il faudrait d'autres études s'intéressant aux effets du ratio N:P afin de savoir si cette absence d'interaction est un cas isolé, ou au contraire est représentatif des organismes photosynthétiques.

Ainsi, l'état des lieux des effets connus des polluants (herbicides et ETM) seuls ou combinés à des modifications des nutriments du milieu montre que, si les effets des herbicides et des ETM seuls sur le Myriophylle sont de plus en plus étudiés (notamment depuis la normalisation de deux tests sur *M. spicatum* par l'OCDE en 2014), les effets de ces polluants, combinés aux modifications des nutriments, restent encore à explorer. En effet, une seule étude combinant ces deux facteurs de stress a été trouvée (Krayem et al., 2016). Or, étant donné la complexité et la variabilité des effets combinés observées pour d'autres organismes photosynthétiques aquatiques, il apparait crucial de remédier à ce manque de connaissance.

OBJECTIFS DE LA THESE

Plusieurs études réalisées sur des organismes photosynthétiques aquatiques ont permis de montrer que les polluants et les ressources affectant les écosystèmes aquatiques pouvaient interagir et modifier les réponses des organismes, biaisant ainsi l'évaluation du risque (**Chapitre I.IV**). Bien que ce soient des organismes clés du fonctionnement des écosystèmes, la prise en compte des macrophytes dans ce genre d'étude est très récente (Bian et al., 2013; Cedergreen et al., 2016; Krayem et al., 2016). Les résultats obtenus suggèrent une influence importante des ressources, notamment des macronutriments, sur leur réponse aux polluants. C'est pourquoi il convient aujourd'hui de réaliser des études permettant d'évaluer cette influence, et ses conséquences pour la réponse aux polluants.

L'objectif principal de ce travail de thèse est donc d'évaluer les effets conjoints de deux types de polluants : les herbicides et les ETM sur une macrophyte d'intérêt : *Myriophyllum spicatum* ou Myriophylle à épi, dans des milieux ayant des ressources variables.

Cet objectif est découpé en trois sous-objectifs :

1) Montrer que chaque polluant induit des effets spécifiques sur la physiologie, le métabolisme et la composition chimique du Myriophylle (on parlera d'empreinte chimique spécifique),

2) Montrer qu'un enrichissement ou une modification des ressources du milieu peut modifier ces effets,

3) Montrer que cette combinaison de facteur de stress induit des effets complexes et imprévisibles sur différents paramètres du Myriophylle à épis.

Ce travail permettra d'apporter des éléments de réponses quant au risque réel que représente l'enrichissement des milieux aquatiques en nutriments, ou plus généralement les modifications des ressources, sur les communautés de macrophytes. De plus, l'utilisation de différents paramètres, certains classiquement mesurés en écotoxicologie (comme la croissance et aussi dans une moindre mesure les pigments photosynthétiques), et d'autres tirés de l'écologie chimique (mesure de la stœchiométrie de la plante et de ces métabolites secondaires à activité inhibitrice des autres organismes photosynthétiques et des herbivores) permettra : (i) d'avoir une vue plus globale des effets des deux facteurs de stress sur le métabolisme de la plante, et (ii) en renseignant à la fois sur la croissance (quantité de la plante), et les teneurs en nutriments et métabolites secondaires (qualité de la plante),

donnera aussi une estimation des effets indirects des deux facteurs de stress sur les organismes vivant en interactions avec le Myriophylle. Enfin, le gain d'information apporté par les paramètres mesurés, devrait offrir des pistes de réflexions quant aux tests normalisés et aux paramètres utilisés dans l'évaluation du risque actuelle : sont-ils adaptés aux enjeux des situations environnementales complexes (multistress)? Permettent-ils d'obtenir plus d'informations sur les effets directs et indirects au niveau des différentes échelles biologiques (organisme/population, communauté, écosystème) nécessaires? Existe-t-il des alternatives réalistes qui pourraient être mise en place?

Les résultats obtenus pendant cette thèse seront présentés et discutés dans les **chapitres III** et **IV**, qui tenteront de répondre successivement aux différents objectifs présentés ci-dessus. Au préalable, le **chapitre II** présentera les démarches scientifiques appliquées.

Le **chapitre III** traitera de la réponse du Myriophylle à épis à deux herbicides aux modes d'actions différents : l'isoproturon (IPU) et le mésosulfuron-méthyl (MSM), seuls ou en mélange dans un milieu normal et un milieu enrichi en nitrate. Ce chapitre permettra d'évaluer si des interactions entre le milieu et les herbicides dépendent du mode d'action des herbicides (**Chapitre III.I**, article publié dans Aquatic Toxicology), et si les interactions au sein d'un mélange peuvent modifier les interactions avec le milieu (**Chapitre III.II**, projet de manuscrit).

Dans le **chapitre IV**, la réponse du Myriophylle à épis à différents ETM sera évaluée dans des conditions de culture contrastées. Il s'agira dans un premier temps d'évaluer les effets d'un ETM essentiel largement utilisé (notamment comme fongicide) et retrouvé dans les milieux aquatiques : le cuivre. Les effets du cuivre seront évalués dans un milieu normal et un milieu enrichi en nitrate (le même que celui étudié sur les herbicides) afin de voir si, en contexte agricole, la présence simultanée de cuivre et de fertilisants comme les nitrates augmente les risques de ce dernier pour les macrophytes, par rapport à une situation avec uniquement le cuivre (**Chapitre IV.I**, projet de manuscrit). Dans un second temps, les effets de deux ETM non-essentiels seront évalués sur le Myriophylle : l'arséniate et le cadmium. L'arséniate étant absorbé par les mêmes transporteurs que le phosphate, ses effets seront évalués en faisant varier aussi bien l'azote que le phosphore du milieu, afin de voir si le phosphore seul influence les effets de l'arséniate ou bien si les deux nutriments interviennent conjointement (**Chapitre IV.II**, projet de manuscrit). Enfin, les effets d'une dose de cadmium ont été évalués

dans des milieux dont on a fait varier la source de carbone (sous forme de saccharose), afin de voir si la ressource organique du milieu pouvait influencer les réponses du Myriophylle à épis aux ETM (**Chapitre IV.III**, article publié dans Environmental Toxicology and Chemistry).

CHAPITRE II

Démarche scientifique

I. Choix d'un système plante-eau en conditions axéniques

L'analyse de la bibliographie (**chapitre I.IV**) a permis de montrer qu'il existe une grande variabilité de systèmes de test pour *M. spicatum* selon les conditions de cultures (*i.e.* systèmes plante - eau axénique, plante - eau - sédiment, microcosme, ou mésocosme). Ces différents tests prennent en compte une complexité variable selon le système. Les micro- et mésocosmes sont plus réalistes d'un point de vue environnemental, mais limite le contrôle des facteurs appliqués ainsi que des conditions de culture, ce qui introduit un biais dans les résultats obtenus.

Les systèmes plus réduits permettent quant à eux de beaucoup mieux contrôler à la fois les facteurs de stress et les conditions de culture, c'est pourquoi nous nous sommes orientés vers eux. Ces systèmes peuvent être de deux sortes : avec (non-axénique) ou sans sédiments (axénique). Après une analyse des avantages et inconvénients de ces deux systèmes de tests nous avons choisi d'utiliser le système plante - eau en conditions axéniques. En effet, ce système, en empêchant le développement de microalgues, de bactéries et/ou de champignons, permet de s'affranchir (i) de la modification des teneurs en nutriments du milieu ; (ii) de la modification de la forme et/ou de la disponibilité du polluant ; et enfin (iii) des interactions que le Myriophylle aurait eu avec ces organismes et qui auraient pu modifier ses réponses aux polluants ; tout en maintenant des conditions de croissance optimales pour la plante.

II. Choix du milieu de culture

Il existe différents milieux pour la culture *in vitro* du Myriophylle ayant des sources et des teneurs variables en nutriments. Comme ce travail de thèse a débuté en Octobre 2012 et que la norme OCDE pour les tests en systèmes plante - eau avec *Myriophyllum spicatum* n'a été homologuée qu'en Septembre 2014, le milieu choisi pour cette étude n'est pas le milieu Andrews (le milieu de la norme), mais le milieu qui était utilisé au laboratoire depuis de nombreuses années appelé 1/2 Min A (**tableau II.I**). Ce milieu est une adaptation du milieu Murashige et Skoog (Murashige and Skoog, 1962) que Kane and Gilman (1991) ont utilisés pour réaliser avec succès les premières cultures *in vitro* de Myriophylle. Les milieux pour les cultures axéniques des végétaux, tel que le Murashige et Skoog, sont des milieux qui, à

l'origine, ont été développés pour la culture des tissus végétaux notamment pour la formation de calles et la régénération végétative. Ils sont donc particulièrement riches en nutriments, contiennent parfois des vitamines et hormones, mais permettent avant tout une croissance rapide et optimale des plantes, ce qui était recherché ici.

Tableau II.I Composition élémentaire du milieu 1/2 Min A

Macronutriments	**Masse molaire** $g\ mol^{-1}$	**Concentration finale** $mg\ L^{-1}$	**mM**
KNO_3	101,10	950,34	9,40
NH_4NO_3	80,04	824,41	10,30
KH_2PO_4	136,09	85,05	0,63
$MgSO_4$ - 7 x H_2O	246,46	184,85	0,75
$CaCl_2$ - 2 x H_2O	147,02	220,53	1,50
Na-Fe-EDTA	367,05	3,67	0,01
Sucrose	342,30	3000,00	8,76
Micronutriments	**Masse molaire** $g\ mol^{-1}$	**Concentration** $\mu g\ L^{-1}$	**µM**
$MnCl_2$ - 4 x H_2O	169,00	8450,00	50,00
$ZnSO_4$ - 7 x H_2O	287,54	4313,10	15,00
H_3BO_3	61,83	3091,50	50,00
$CuSO_4$ - 5x H_2O	249,69	12,48	0,05
$CoCl_2$ - 6 x H_2O	237,90	11,90	0,05
Na_2MoO_4 - 2 x H_2O	241,95	120,98	0,50
KI	166,00	415,00	2,50
Autres	**Masse molaire** $g\ mol^{-1}$	**Concentration** $\mu g\ L^{-1}$	**µM**
Myo-inositol	180,16	100,89*	560,00
Hydrochlorure de Thiamine	150,20	180,24	1,20
2iP	203,24	6097,20	30,00

III. Choix des paramètres étudiés

Comme nous l'avons montré dans le **chapitre I.II**, l'intégration de notions d'écologie en écotoxicologie permet de gagner en représentativité environnementale mais également en informations fournies par les tests. C'est pourquoi nous avons choisi une approche couplant des paramètres classiquement utilisés en écotoxicologie et des paramètres empruntés à l'écologie chimique, jusqu'à présent encore rarement utilisés en écotoxicologie (la

stœchiométrie de la plante, et ses teneurs en métabolites à activité allélochimique : les polyphénols) (**chapitre I.I**). La prise en compte de la stœchiométrie est tout à fait justifiée dans le cadre d'une étude s'intéressant aux effets combinés des polluants et des nutriments, car elle peut être influencée par ces deux facteurs. En effet les polluants induisent des mécanismes de défense de la plante, au détriment de sa croissance et modifient ainsi le ratio protéine/ARN, et donc le ratio N:P de la plante (Matzek and Vitousek, 2009). La composition du milieu semble également influencer la stœchiométrie de la plante (**chapitre I.IV**). Les polyphénols sont susceptibles également d'être influencés par les deux facteurs de stress étudiés. D'une part, leurs propriétés pro- et antioxydantes en font des composés pouvant être induits par les polluants (Blokhina et al., 2003; Salminen and Karonen, 2011), et d'autre part, un enrichissement du milieu modifiant les teneurs en azote de la plante, pourrait modifier également les polyphénols car les métabolismes carbonés et azotés sont liés entre eux : c'est la théorie de la balance carbone-azote (Bryant et al., 1983; Koricheva, 2002; Lerdau, 2002). L'intérêt de ces deux paramètres réside également dans le fait qu'ils renseignent sur la qualité de la plante : la stœchiométrie sur sa valeur nutritive pour les herbivores, et les polyphénols sur ses capacités inhibitrices des autres organismes. Ils permettent ainsi d'estimer une partie des effets indirects des polluants sur les organismes vivant en interactions avec le Myriophylle dans les écosystèmes aquatiques.

CHAPITRE III

Effets des nutriments sur la toxicité de deux herbicides

I. La présence de nitrate affecte-t-elle les réponses biologiques d'une plante aquatique à deux herbicides communs ?

Les effets des herbicides sur *Myriophyllum spicatum* sont étudiés depuis de nombreuses années (voir **Chapitre I.IV**), mais aucune étude, jusqu'à présent, ne s'est intéressée aux effets sur le Myriophylle de contaminations simultanées du milieu par des herbicides et des nitrates. Or, en contexte agricole, cette co-contamination des milieux aquatiques par des herbicides et des nitrates issus des fertilisants est fréquente. C'est pourquoi il convient aujourd'hui d'évaluer leurs effets combinés afin de définir si les nitrates doivent être pris en compte dans les futures évaluations du risque.

Does nitrate co-pollution affect biological responses of an aquatic plant to two common herbicides?

Nuttens et al., 2016 - DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.06.006 - Manuscrit publié dans Aquatic Toxicology.

I.1 Abstract

Aquatic systems in agricultural landscapes are subjected to multiple stressors, among them pesticide and nitrate run-off, but effects of both together have rarely been studied. We investigated possible stress-specific and interaction effects using the new OECD test organism, *Myriophyllum spicatum*, a widespread aquatic plant. In a fully factorial design, we used two widely applied herbicides, isoproturon and mesosulfuron-methyl, in concentration-response curves at two nitrate levels (219.63 and 878.52 mg N-NO_3). We applied different endpoints reflecting plant performance such as growth, pigment content, content in phenolic compounds, and plant stoichiometry. Relative growth rates based on length (RGR-L) were affected strongly by both herbicides, while effects on relative growth rate based on dry weight (RGR-DW) were apparent for isoproturon but hardly visible for mesosulfuron-methyl due to an increase in dry matter content. The higher nitrate level further reduced growth rates, specifically with mesosulfuron-methyl. Effects were visible between 50 and 500 µg L^{-1} for isoproturon and 0.5 - 5 µg L^{-1} for mesosulfuron-methyl, with some differences between endpoints. The two herbicides had opposite effects on chlorophyll, carotenoid and nitrogen contents in plants, with values increasing with increasing concentrations of isoproturon and decreasing for mesosulfuron-methyl. Herbicides and nitrate level exhibited distinct effects on the content in phenolic compounds, with higher nitrate levels reducing total phenolic compounds in controls and with isoproturon, but not with mesosulfuron-methyl. Increasing concentrations of mesosulfuron-methyl lead to a decline of total phenolic compounds, while isoproturon had little effect. Contents of carbon, nitrogen and phosphorus changed depending on the stressor combination. We observed higher phosphorus levels in plants exposed to certain concentrations of herbicides, potentially indicating a metabolic response. The C:N molar ratio decreased strongly with isoproturon and increased with mesosulfuron-methyl. The C:P and N:P ratios did not vary for most herbicide concentrations, indicating homeostasis. Nitrate level had no effect on the C:N

ratio, but the N:P ratio increased in high nitrate level treatments, indicating that the former is more strictly regulated by the plant than the latter. We conclude that the multi-stress impacts caused to aquatic primary producers by herbicides and nitrate enrichment, as often observed in agricultural run-off, not only affected growth and pigment content, but also structural traits (dry matter content) and other physiological traits (elemental stoichiometry, phenolic compounds). Changes in those might have indirect effects on biotic interactions and elemental cycles. We suggest considering some of these endpoints in future studies in environmental risk assessment for agricultural run-off.

Keywords: Chemical ecology; ecological stoichiometry; nitrogen enrichment; herbicide; multi-stress; plant traits; submerged macrophytes

I.2 Introduction

The increase in pesticide use to meet the needs of an ever growing human population has resulted in non-negligible contamination of aquatic ecosystems through spray drift, infiltration, run-off, and/or drainage (Arias-Estévez et al., 2008). In addition, increased levels of nitrate, turbidity, and conductivity in wetlands have been found at sites near pesticide outlets (Schock et al., 2014). Thus, nutrient and pesticide pollution often occur together, forming complex cocktails acting on biota and biogeochemical cycles in the aquatic environment. However, not much is known about the possible interactions of both stressors, which is surprising, as e.g., nutrients and herbicides may specifically affect the lowest trophic level, the primary producers.

Nutrient enrichment effects on aquatic systems can globally be classified as causing three major problems (i) eutrophication, provoking hypoxia or anoxia in lakes and slow flowing streams, (ii) toxic algal or cyanobacterial blooms and resulting damage to aquatic invertebrate and fish communities, (iii) acidification, and associated metal release, not only in marine but increasingly also in freshwater systems (Camargo and Alonso, 2006; Davidson et al., 2012). Often, eutrophication leads to the loss of aquatic higher plants and macroalgae (both also called “macrophytes”), and their replacement by phytoplankton or periphyton (Scheffer et al., 1993). In recent years, nitrogen enrichment due to atmospheric deposition or run-off from fields has been focused on both in Europe and North America, as it causes

deleterious effects to terrestrial and aquatic ecosystems (Camargo and Alonso, 2006; Davidson et al., 2012; Hessen, 2013; Sardans et al., 2012).

If and how nitrogen or phosphorus enrichment affects the content and ratio of N and P in aquatic plants is a controversial issue (Demars and Edwards, 2007; Güsewell and Koerselman, 2002). Increased nitrogen availability was positively related to macrophyte C:P and N:P ratios, but not related to plant C:N ratio in a Canadian study (Frost and Hicks, 2012). Given the critical roles of N and P in cell metabolism, modifications in environmental nitrogen availability may affect tissue nutrient content and/or resulting stoichiometric ratios (Sterner and Elser, 2002), and thus directly metabolism and performance of the plant. We assumed that plant responses to changing nitrogen availability can modify the plant response to additional stressors like herbicides, specifically if their mode of action interferes with the carbon or nitrogen metabolism of the plant.

Only a few studies have attempted to test whether nutrient levels interact with other anthropogenic pollutants. The N or P availability and the resulting N:P ratios in the media affected the toxicity of triclosan to *Lemna gibba* (Fulton et al., 2010, 2009), the toxicity of cadmium to *Chlorella vulgaris* (Chia et al., 2015), and the toxicity of ionic silver to *Lemna gibba* (Bian et al., 2013). Nitrogen enrichment resulting in molar TN:TP ratios of more than 150 had severe negative effects on submerged vegetation and overrode atrazine effects (Dalton et al., 2015). Similarly, Halstead et al. (2014), working at N:P molar ratios between 11 (controls) and 23 (fertilizer treatments), found that fertilizer and herbicide interactions changed the structure of primary producers and favored periphyton.

Agricultural run-off often contains a cocktail of different pesticides. Among them are frequently the herbicides isoproturon (IPU) and mesosulfuron-methyl (MSM), such as in ponds in NorthEastern France (Lazartigues et al., 2013). Peak concentrations of about 4 µg L^{-1} for IPU (Brock et al., 2009) and up to 90 ng L^{-1} of MSM have been reported (Lazartigues et al., 2013). IPU [3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea] is a systemic phenylurea herbicide used to control pre- and post-emergence weeds in winter cereals (Lu et al., 2015). IPU blocks electron transport in photosystem II (Pérès et al., 1996), and leads to oxidative stress (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001). IPU negatively affects many aquatic primary producers, with EC50 values of 43.25 µg L^{-1} for *Chlamydomonas reinhardtii*, of 60 µg L^{-1} for *Lemna minor*, and between 22 and 53 µg L^{-1}, depending on the endpoint considered, for

Myriophyllum spicatum (Bi et al., 2012; Mohr et al., 2013; Nitschke et al., 1999). MSM [methyl 2-[3-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)ure-iodosulfonyl]-4-methanesulfonamido-methyl benzoate] is a new systemic sulfonylurea herbicide for the control of grass and some broad-leaved weeds in cereals (Vazan et al., 2011). Sulfonylurea herbicides inhibit acetolactate synthase (ALS), the first enzyme in the biosynthesis of branched amino acids, and hence inhibit cell division (Blair and Martin, 1988). The structurally related metsulfuron-methyl affected the submerged macrophytes *Elodea canadensis* and *Myriophyllum spicatum* at concentrations as low as 100 ng L^{-1} (Cedergreen et al., 2004; Wendt-Rasch et al., 2003). However, although results formetsulfuron-methyl provide a good base for those of MSM, extrapolations are difficult as sulfonylurea herbicides with only few structural changes exerted strongly different effects on *M. aquaticum* (Turgut and Fomin, 2002).

Rooted, submerged macrophytes play an important role in aquatic ecosystems. They not only produce organic matter and oxygen, but also provide food, shelter, or substrate for a variety of aquatic organisms, and can modify flow, stabilize sediments or promote retention of organic matter and nutrients in lakes and rivers (Carpenter and Lodge, 1986; Lewis, 1995). It is thus good that since September 2014, *Myriophyllum spicatum* is the new dicotyledonous and sediment rooted OECD test species (OECD, 2014a, 2014b). Its widespread occurrence in lakes and rivers in temperate to subtropical parts of the world, and its strong competitive growth make it a good test organism. In addition, *M. spicatum* affects other organisms by strong allelochemical interactions due to the production of defensive secondary metabolites, specifically high amounts of polyphenols (Gross et al., 1996). Polyphenols affect competitors like microalgae and cyanobacteria by inhibition of photosynthesis (PSII) and exoenzymes like alkaline phosphatase (Gross et al., 1996; Leu et al., 2002). These allelochemicals have also been shown to significantly reduce the growth of herbivorous Lepidopteran larvae of *Acentria ephemerella* (Choi et al., 2002).

Although some studies have already tested the combined effect of nutrient levels and pesticides on aquatic primary producers, including submerged macrophytes (Dalton et al., 2015; Halstead et al., 2014), no study has so far investigated such a scenario with *Myriophyllum spicatum*. To investigate the combined impact of multiple stressors found in agricultural run-off, here herbicides and nitrate enrichment, we set up a concentration-response experiment in axenic conditions with IPU and MSM on *M. spicatum*, in media with

two different nitrate levels based on different N:P stoichiometries: normal (N:P molar ratio = 25:1; hereafter called NP-25) and enriched (N:P molar ratio = 100:1; hereafter called NP-100), equivalent to N concentrations of 16.5 and 66 mM. While submerged rooted plants take up nutrients mostly via sediment, they are also thought to be able to absorb nutrients via their leaves (Madsen and Cedergreen 2002). Axenic culture media have to provide sufficiently high nutrient levels in the medium for predominant shoot uptake (Kane and Gilman 1991). To investigate these effects, we combined standard endpoints like growth or pigment contents, reflecting direct effects on the organism, and additional endpoints like dry matter and water content (DMC, WC), contents of phenolic compounds, elemental composition and stoichiometry, that might also be used to explain the performance of this organism in ecological interactions. We are testing two hypotheses (1) that nitrate enrichment reflected by a high N:P ratio will negatively affect *M. spicatum*, and (2) that nitrate enrichment can modify the plant response to herbicides, depending on their mode of action.

I.3 Materials and methods

I.3.1 Plant material and culture conditions

Axenic *Myriophyllum spicatum* cultures from stock cultures originating from a mesotrophic lake that has little to no exposure to pesticides, and kept in the laboratory (see Gross, 2003), were pre-adapted to a modified half-strength Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962). Pre-cultures were grown in 100 mL Erlenmeyer flasks with modified nitrogen source (1.58 g L^{-1} KNO_3, 0.51 mg L^{-1} $NaNO_3$; equivalent to a total of 219.63 mg N-NO_3; and a N:P molar ratio of 25:1) and 3 g L^{-1} of sucrose, but otherwise unchanged medium (Kane and Gilman, 1991). Plants were cultivated in a Sanyo MLR 352 climate chamber (Panasonic France) at a day/night temperature regime of 22°C/20°C, a photoperiod of 16 h light, 8 h dark, and daytime light of 140 µmol photons PAR m^{-2} s^{-1}.

I.3.2 Experiment

We set up a 2 × 7 factorial design experiment with *M. spicatum*, using controls and six concentrations of either IPU or MSM (0 - 1000 g L^{-1}) crossed with two levels of nitrate, 219.63 and 878.52 mg N-NO3, resulting in N:P ratios of 25:1 and 100:1. In the following, we name these two media with different nitrate levels NP-25 and NP-100, respectively, and NP-

100 is considered the “nitrate enrichment”. The N:P molar ratios were selected based on environmental ratios of dissolved inorganic nitrogen and phosphorus (TDN:TDP) found in undisturbed or nitrogen-enriched areas (Demars and Edwards, 2007; Hessen, 2013; Ventura et al., 2008).

From the pre-cultures, we cut 2 cm long apices and placed equal numbers in each medium for 5 days to allow wound healing and acclimation to test conditions. 12 apices from each medium served as starting control samples. We took their length and fresh weight after carefully blotting the shoots with paper tissue. Then shoots were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry weight determination and chemical analyses (see below).

The experiment was performed in 250 mL cell culture flasks (BD FalconTM) containing 150 mL medium. For each treatment combination (nitrate level × herbicide concentration), we used three flasks as individual replicates. Herbicide concentration-response curves were performed with concentrations of 0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500, 1000 µg L^{-1} IPU or MSM, as these concentrations include published EC50 values based on growth for IPU and metsulfuron-methyl, another sulfonylurea herbicide (Cedergreen et al., 2004; Mohr et al., 2013). Each flask contained four apices. Stock solutions of each herbicide (Dr. Ehrenstorfer GmbH; purity 99.0%) had been prepared in methanol. We used six replicates for the controls, to which we added an equal amount of solvent (150 µL per 150 mL) to that used in the herbicide treatments.

The experimental conditions were the same as described above for the pre-cultures except that flasks were repositioned in a random way each day to account for the slight light and temperature differences within the growth chamber. The test ran for 14 days, and we renewed the medium including herbicides at day 7 to account for possible herbicide degradation.

I.3.3 Herbicide analyses

High concentrations of IPU and MSM (50, 500 and 1000 µg L^{-1}) were analyzed at day zero and day seven for pooled samples (3 replicates per concentration and herbicide medium type) using on-line solid phase extraction (SPE, Oasis HLB 2.1 mm × 20 mm, 25 m, Waters) as pre-column followed by liquid chromatography (LC, Ultimate 3000 RSLC system and Diode Array Detector, Synergi Hydro-RP C18 HPLC column 50 mm × 2.1 mm, 2.5 m, Phenomenex).

Additional details are given in Vallée et al. (2014). Low concentrations (0.05, 0.5 and 5 µg L^{-1}) were analyzed at day seven using SPE (Autotrace Workstation, Caliper Life Science, Oasis HLB 200 mg/6 mL cartridges, Waters) followed by reverse-phase liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS, Ultimate 3000 Intelligent LC system, Dionex, Acclaim 120 C18 column, 100 × 2.1 mm ID, 3 m, Thermo). The mobile phases A and B were LC-MS grade water and acetonitrile respectively, both buffered with 0.1% formic acid. The gradient started from 20% B for 3 min, increasing to 40% within 9 min, to 100% within 3 min, was kept at 100% for 3 min and returned to initial composition after a further 2 min, with a flow rate of 0.25 mL/min and the column oven set at 40°C. The MS system was an API 3200 triple quadrupole mass spectrometer (AB/Sciex) equipped with a Turbo Ion Spray interface used in positive ionization mode. The acquisition was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode, using two transitions for quantification and confirmation of each molecule (*m/z* 207.2 > 72.0 and 207.2 > 165.1 for IPU; *m/z* 504.1 > 182.0 and 504.1 > 83.2 for MSM).

I.3.4 Plant responses

Growth parameters and plant characteristics

At the end of the experiment, plants were harvested and the three shoots per flask were placed for 5 min in a washing solution of $CaCl_2$ (5 mM) followed by a short rinse in distilled water. Thereafter, every plantlet was measured individually (L: length),photographed and weighed (FW: fresh weight, sum of four shoots per flask). The tube was immediately shock-frozen in liquid nitrogen, then freezedried, and each sample was weighed again to establish the DW: dry weight.

Chemical Analyses

Dried plants were mechanically ground into a fine powder using a ball mill (Fritsch pulverisette 23 GmbH, M301) for 2 min at 30 Hz. Total chlorophyll (chl, sum of chl a and b) and total carotenoids (car) and anthocyanins (aty) were extracted with acetone and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 at 8/2 [v/v] for chlorophyll and carotenoids; and methanol, ultrapure water, and 37% HCl at 80/20/1 [v/v/v] for anthocyanins. Absorptions were measured using a Varian Cary 50 Bio UV/Visible Spectrophotometer. Multiple wavelength readings at 470, 664 and 647 nm were used for chlorophyll and carotenoids; and at 532 plus 653 nm for anthocyanins.

Concentrations of chlorophyll, carotenoids and anthocyanins were obtained using established equations in the literature (Lichtenthaler and Wellburn, 1983; Murray and Hackett, 1991). All pigment concentrations were converted to the exact mass weighed per sample. Total phenolic compounds (TPC) were quantified according to the Folin-Ciocalteau method used by Gross et al. (1996).

Carbon and nitrogen contents were obtained from 1.5 to 2 mg plant powder, and samples were then incinerated in an elemental analyzer Carlo-ERBA Na 2100 CE Instrument using a calibration with EDTA. Phosphorus was determined after alkaline digestion (1 M NaOH and 0.5 M $Na_2S_2O_8$) of approx. 1 mg powder for 2 h at 120°C and 1 bar followed by spectrophotometric quantification (AFNOR 1990) using an automated analyser (Konelab 420-XTi, Thermo Fisher Analytics).

I.4.5 Data analyses

Growth and trait calculations

The Relative Growth Rates for length (RGR-L) and dry mass (RGR-DW) were calculated according to:

$$\text{RGR-L} = \frac{\ln(L-T_{14})-\ln(L-T_0)}{14} \quad \text{and} \quad \text{RGR-DW} = \frac{\ln(DW-T_{14})-\ln(DW-T_0)}{14}$$

Dry matter content (DMC) and water content (WC) were calculated based on fresh and dry mass according to the following calculations:

$$\text{DMC} = \frac{DW}{FW} \qquad \text{and} \qquad \text{WC} = \frac{(FW-DW)}{DW}$$

Dose-response modelling

From each condition (IPU and MSM in NP-25 and NP-100), dose-response curves for growth rate by length (RGR-L) were fitted with R software and the ‘‘drc’’ package (Ritz et al., 2007). A log-logistic model (see below) was applied where d was the upper limit of the curve, c was the lower limit, and b was the relative slope around the EC50 known as e (Ritz et al., 2007).

$$f\big(x,(b,c,d,e)\big) = c + \frac{d-c}{1+\exp\big(b(\log(x)-\log(e))\big)}$$

The Effective Concentration (EC) affecting by 50% (EC_{50}) the growth of *M. spicatum* was numerically determined from each dose-response curve.

Statistical analyses

The statistical analyses were conducted using R software. Homoscedasticity and normality were verified respectively by the Levene and Shapiro-Wilk tests, and if needed a log-transformation of the data was performed. Because of some negative null values for growth rate (resulting from approximation of length and weight at T = 0), which impede Levene test outcomes, we decided to replace these values by 1.10^{-5} in order to allow statistical analysis. When the conditions were met, two-way ANOVAs with nitrate levels and herbicide concentrations as categorical factors were performed using a probability threshold of $p \leq 0.05$. Post hoc Tukey HSD tests were done to separate differences between pairs of treatments. ANOVAs were performed for the full range of herbicide concentrations and again for up to 500 µg L^{-1} of each herbicide, as plants were mostly dead at the highest concentrations. Nonparametric data were analyzed using Kruskal–Wallis tests followed by Kruskal-Wallis post hoc tests. Principal component analysis (PCA) was performed on the set of endpoints to visualize differences in endpoint responses according to the experimental conditions. The contribution of each variable on the different axes (i.e. the quality of representation of variables upon axes) were computed and called column inertia.

I.4 Results

I.4.1 Herbicide analysis

High concentrations of IPU and MSM (50, 500 and 1000 µg L^{-1}) at the start and at day seven were above 87% of the nominal concentrations (except for IPU in NP-25 at 50 µg L^{-1} for day zero and 50 and 1000 µg L^{-1} for day seven, which were reduced by up to 25% compared to the nominal concentration). Low concentrations of 0.05 and 0.5 µg L^{-1} of IPU at day seven were on average 24% lower than the nominal concentration, and for 5 µg L^{-1}, recovery was slightly higher by around 13% above nominal concentrations. Measured low concentrations of MSM were more variable, but except for 5 µg L^{-1} in NP-25, where we measured 38% less than the nominal value, all other samples had measured concentrations of 17 - 130% above the nominal ones, with the highest deviations found for the two lowest nominal concentrations. A memory effect due to the medium change at day seven cannot be excluded for these low MSM concentrations.

I.4.2 Plant responses

Myriophyllum spicatum showed diverse and variable responses towards both herbicides and the nitrate treatment. We often observed interactive effects for both factors (**Table III.1**), but those disappeared mainly for the IPU treatment, and not for the MSM treatments (**Table III.3**) when the highest herbicide concentration was omitted.

Growth responses

Both herbicides and nitrate level affected the growth of *M. spicatum* in a differential and sometimes interactive pattern. The relative growth rate by length (RGR-L; **Figure III.1**, **Table III.1**) and by dry biomass (RGR-DW; **Table III.1**) declined with increasing concentrations of IPU and MSM in both media, and NP-100 often enhanced the effect. At low MSM concentrations (0.05 and 0.5 µg L^{-1}), RGR-L in NP-100 was significantly lower than that in NP-25. For MSM, no EC50 could be determined for RGR-DW because of the small differences compared to controls, while the EC50 for RGR-L in NP-25 was 4.41 µg L^{-1} and for NP-100 21.96 µg L^{-1} (**Figure III.1f**). We calculated EC50 values for IPU and RGR-DW of 169 and 111 µg L^{-1} for NP-25 and NP- 100, respectively. The EC50 values for RGR-L were 479.22 and 58.47 µg L^{-1} for NP-25 and NP-100, respectively (**Figure III.1a**). Nitrate level and herbicide concentration caused significant interactive effects on the dry matter content (DMC) and water content (WC), which developed inversely as expected (**Table III.1**, **Table III.2**). While increasing concentrations of IPU reduced the DMC (**Figure III.1b**), MSM caused an increase at higher concentrations (**Figure III.1g**).

Pigment content

There were significant treatment effects for total chlorophyll and carotenoids for both herbicides in combination with different nitrate levels (**Table III.1**). Total chlorophyll content was generally lower in NP-100 (**Figure III.1c,h**; **Table III.2**). Up to 5 µg L^{-1} for both herbicides values were stable, but above that the curves evolved in different directions, almost doubling for IPU and with a 50% reduction for MSM. Data for carotenoids evolved in almost exactly the same way as chlorophylls (**Table III.2**).

Table III.1 Isoproturon and mesosulfuron-methyl results of the statistical analysis (2 way-ANOVAs or Kruskal-Wallis for non-parametric data) to assess respective effects of nitrate level and herbicide concentration and their interactive effects on measured parameters after 14 days of exposure.

	Isoproturon (IPU) (*Res.*[c] *df = 34*)						Mesosulfuron-methyl (MSM) (*Res.*[c] *df = 34*)					
	NO_3 [a] *(df = 1)*		Conc.[b] *(df = 6)*		NO_3 x Conc. *(df = 6)*		NO_3 *(df = 1)*		Conc. *(df = 6)*		NO_3 x Conc. (*df = 6)*	
	F	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)
RGR-L	0.053	0.819	38.706	**< 0.001**	6.494	**< 0.001**	8.833	**0.005**	232.87	**< 0.001**	10.118	**< 0.001**
RGR-DW	26.643	**< 0.001**	54.071	**< 0.001**	0.453	0.838	23.208	**< 0.001**	4.256	**0.003**	1.669	0.159
DMC	114.27	**< 0.001**	43.07	**< 0.001**	4.002	**0.004**	54.66	**< 0.001**	85.58	**< 0.001**	17.26	**< 0.001**
WC	88.075	**< 0.001**	41.159	**< 0.001**	3.266	**0.012**	81.11	**< 0.001**	74.69	**< 0.001**	21.06	**< 0.001**
Chl	Kruskal-Wallis χ^2 = 39.333, df = 13, *p*-value **< 0.001**						166.23	**< 0.001**	149.94	**< 0.001**	2.816	**0.025**
Chl a/b	Kruskal-Wallis χ^2 = 39.862, df = 13, *p*-value **< 0.001**						106.85	**< 0.001**	158.07	**< 0.001**	20.97	**< 0.001**
Car	Kruskal-Wallis χ^2 = 31.735, df = 13, *p*-value = **0.003**						68.651	**< 0.001**	66.122	**< 0.001**	3.589	**0.007**
Aty	60.741	**< 0.001**	10.978	**< 0.001**	5.412	**< 0.001**	38.787	**< 0.001**	113.54	**< 0.001**	3.261	**0.012**
TPC	Kruskal-Wallis χ^2 = 27.758, df = 13, *p*-value = **0.0098**						22.706	**< 0.001**	39.7	**< 0.001**	8.478	**< 0.001**
C:N	21.182	**< 0.001**	48.59	**< 0.001**	2.823	**0.024**	2.114	0.155	133.79	**< 0.001**	4.19	**0.003**
C:P	Kruskal-Wallis χ^2 = 33.036, df = 13. *p*-value = **0.002**						Kruskal-Wallis χ2 = 43.513, df = 13. *p*-value **< 0.001**					
N:P	Kruskal-Wallis χ^2 = 44.343, df = 13. *p*-value **< 0.001**						Kruskal-Wallis χ2 = 40.056, df = 13. *p*-value **< 0.001**					
C	Kruskal-Wallis χ^2 = 38.386, df = 13. *p*-value **< 0.001**						6.376	**0.016**	12.479	**< 0.001**	19.117	**< 0.001**
N	6.116	**0.019**	134.34	**< 0.001**	2.376	**0.05**	5.569	**0.024**	107.55	**< 0.001**	2.34	0.053
P	Kruskal-Wallis χ^2 = 36.118, df = 13. *p*-value **< 0.001**						233.71	**< 0.001**	238.83	**< 0.001**	28.41	**< 0.001**

([a] = Nitrate/ NO_3; [b] = Concentration; [c] = Residuals)

Phenolic compounds

Anthocyanins (**Figure III.1d,i**) and TPC (**Table III.2**) can possibly be involved in oxidative stress resulting from herbicide and/or nitrate enrichment but there were only minor effects here. We observed a weak anthocyanin increase for IPU in NP-25 at 50 µg L^{-1}. TPC was not much affected by increasing concentrations of IPU and was mostly lower in the NP-100 compared to the NP-25 medium for this herbicide. MSM generally reduced both anthocyanin and TPC contents while NP-100 only further reduced anthocyanins at low MSM concentrations.

Plant stoichiometry

The elemental composition in carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P) developed in a specific manner depending on herbicide type and/or nitrate level, resulting in distinct effects on the stoichiometry (**Figure III.1e,j**; **Table III.1**, **Table III.2**). The strongest effects were on N, which increased by more than 50% at high IPU concentrations and declined by about 50% at high MSM concentrations. For high concentrations of IPU, the C content increased in both media, but it was only higher for the highest concentrations of MSM in NP-100. The P content increased at high IPU concentrations in NP-25, but remained constant in NP-100 except for the highest concentration, leading to significant differences between both media above 0.5 µg L^{-1}. At low concentrations of MSM, the P content was increased in NP-25, but otherwise it declined with increasing concentrations in both media. In general, plants maintained a good homeostasis in molar C:P and N:P ratios for both herbicides irrespective of nitrate level, except for the highest herbicide concentrations (**Table III.2**). The molar C:N ratio developed inversely to the N content. As the C content increased with higher concentrations of both herbicides, the only marginally significant interaction term for N became strongly significant for the C:N ratio (**Table III.1**).

Principal Component Analysis

The PCA was performed on the whole set of endpoints for all treatment combinations. A total of 81% of the total inertia was explained by the first two axes, which contributed 55.9 and 25.3%, respectively. The correlation circle (**Figure III.2a**) shows that pigments including anthocyanins, and in the opposite direction the DMC and C:N ratio were the most strongly-structuring variables for axis 1, while RGR-DM, and in the opposite direction, the N:P ratio related to axis 2. All other endpoints ranged more or less between both principal axes.

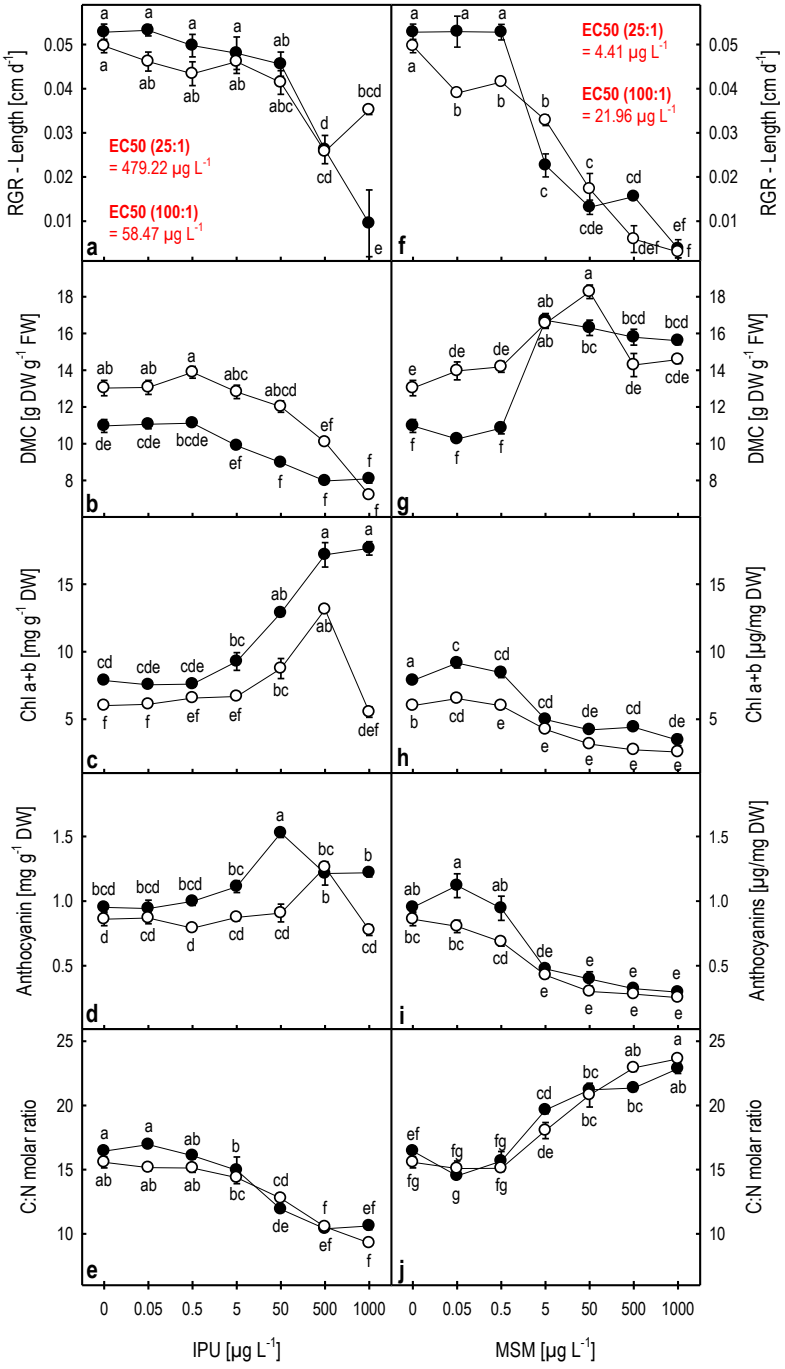


Figure III.1 Relative growth rate by length, (RGR-Length; **a** & **f**, including EC50 values), dry matter content (DMC; **b** & **g**), total chlorophyll content, (Chla+b; **c** & **h**), anthocyanin content (**d** & **i**) and C:N molar ratio (**e** & **j**) in *Myriophyllum spicatum* in response to isoproturon (IPU; **a** - **e**) and mesosulfuron-methyl (MSM; **f** - **j**) concentrations, in media NP-25 (dark circles) and NP-100 (white circles), after 14 days of exposure. Data are expressed as means ± 1 SEM with n = 3; values that do not share a common letter are significantly different ($p > 0.05$).

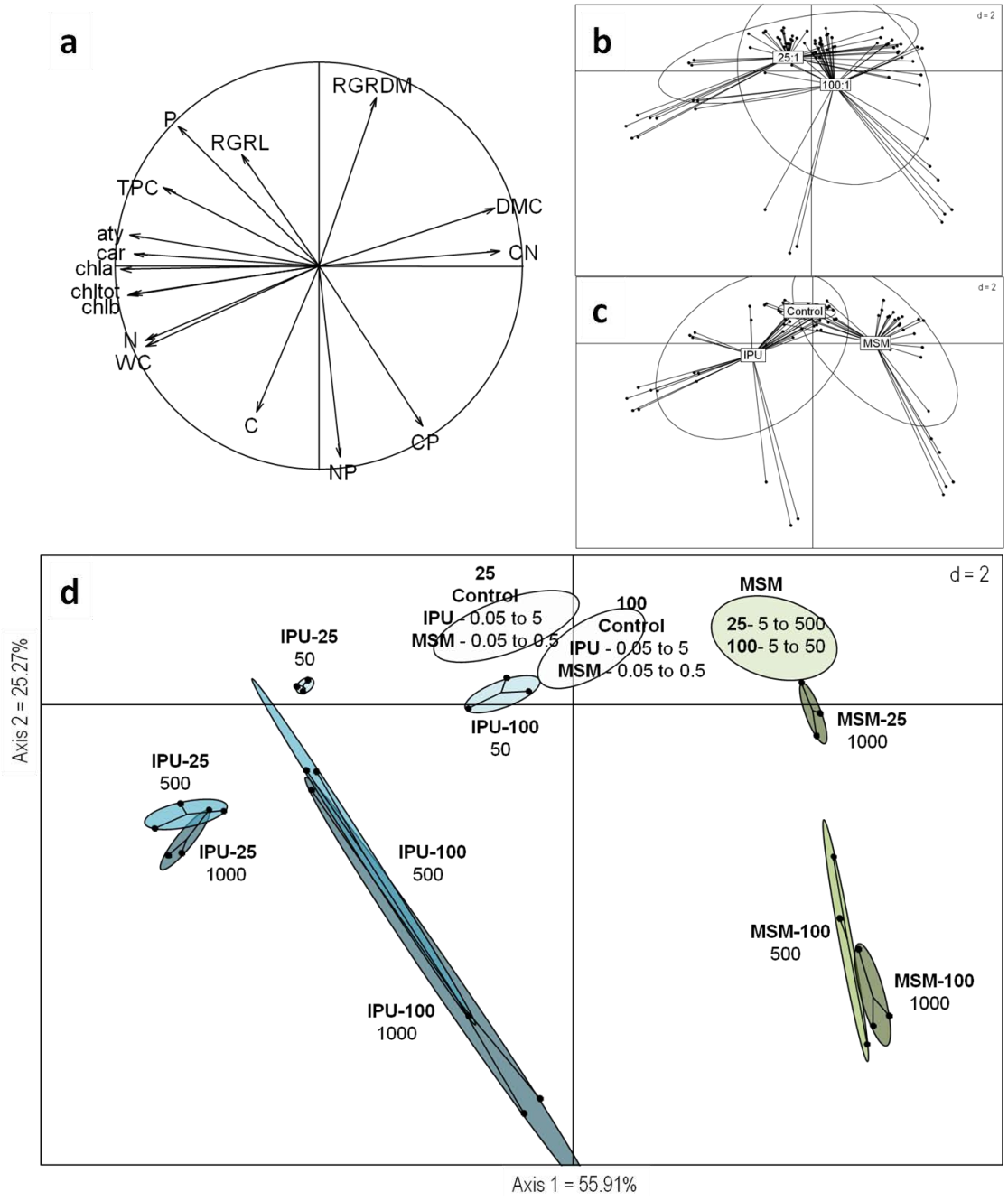


Figure III.2 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum*. **a** - Correlation circle, **b** - effect of nitrate level of the medium, **c** - effect of herbicide: isoproturon (IPU) and mesosulfuron-methyl (MSM), **d** - all treatment combinations; after 14 days of exposure to herbicide concentrations from 0 (control) to 1000 µg L^{-1}. A percentage of 55.91 and 25.27 of the total inertia were explained by the first two axes, respectively. Investigations showed that more than 60% of the column inertia were explained by pigment contents, dry matter content (DMC) and C:N on the first axis, whereas N:P ratio and growth rate by biomass (RGR-DM) were the most structuring variables of the second axis.

Different nitrate levels (**Figure III.2b**) and, to a more pronounced degree, herbicide type (**Figure III.2c**) resulted in shifts along the first and second axis. Combined treatment effects related to distinct herbicide-nitrate level were better visible in **figure III.2d**, supporting the interactions terms observed in the statistical analysis (**Table III.1**). In general, IPU sorted to the left and MSM to the right of the PCA plot. For controls, IPU and low concentrations of MSM, nitrate enrichment moved the treatments to the right, linked with DMC and C:N ratios. At higher MSM concentrations, NP-100 moved the treatments down axis 2, linked with the N:P ratio in plants.

I.5 Discussion

In view of M. spicatum being the new OECD test organism for rooted, submerged aquatic plants, and its wide presence in temperate and sub-tropical running and standing waters, we were interested to see how nitrate level reflected by two different N:P ratios would affect M. spicatum exposed to two commonly used herbicides with different modes of action. We hypothesized that nitrate enrichment expressed as a high N:P supply ratio would negatively affect M. spicatum, and thus change its response to herbicides. We further predicted that the effects might depend on the mode of action of the herbicide. Our results show specific and distinct effects of both herbicides and nitrate level on the different studied endpoints, and we will first discuss the effects on groups of endpoints before synthesizing the overall effects.

Growth responses

Growth rate (RGR-L and RGR-DW) reductions in *M. spicatum* with increasing concentrations of IPU are not surprising given that this herbicide inhibits the electron transport chain in photosystem II (Bi et al., 2012). Our EC50 values are within the range of those found by Mohr et al. (2013) in a similar sediment-free test system after 14 d of exposure. However, contrary to this publication, we observed that shoot length decreased. An explanation could be the use of different culture media, as we used a modified medium based on the original publication by Kane and Gilman (1991) for axenic *M. spicatum*. We used only 0.3% of sucrose, as this was sufficient to allow good plant growth (AN & EMG, unpublished results). In contrast, Mohr et al. (2013) used Andrews medium with 3% sucrose. Sucrose enhanced the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to atrazine and other photosystem-targeted herbicides

like simazine, diuron and isoproturon (Sulmon et al., 2007, 2004). Thus, the ten-fold higher sucrose concentration used by Mohr et al. (2013) might have mitigated IPU effects on their plants, and impeded shoot growth reduction.

Our findings that MSM induced only growth rate reductions based on length but not on dry weight are consistent with other results for metsulfuron-methyl effects on *M. spicatum* (Belgers et al., 2011; Wendt-Rasch et al., 2003). This lack of effect on RGR-DW is generally explained by an accumulation of carbohydrates resulting from a disturbance of source-sink relationships between storage and metabolism of fixed carbon (Royuela et al., 2000; Zabalza et al., 2004). Flurprimidol increased starch content in *M. spicatum* from about 3% to a maximum of 13% based on dry mass (Nelson, 1996). We also assume that starch accumulation might at least partly explain the higher dry mass found in *M. spicatum* at higher MSM concentrations. This would be supported by another explanation for the absence of effects on dry weight in that ALS inhibitors induce physiological changes in macrophytes increasing their tissue density (Wendt-Rasch et al., 2003). Our findings are in agreement with this explanation, as we noted an increase in DMC with increasing concentrations of MSM (see also below). Higher nitrate levels apparently additionally stressed plants, as the controls and treatments with low concentrations of either herbicide cultured in NP-100 exhibited lower RGR-DW than those in NP-25.

Dry matter content (DMC) and water content (WC)

A higher DMC might result in inferior palatability of plants to herbivores (Elger and Willby, 2003). Plants in NP-100 medium had generally higher DMC in the IPU treatments and in MSM treatments until 5 µg L^{-1}. As the WC is basically the inverse of DMC, NP-100 apparently reduced the internal water content of the cells. This is in contrast to what is found in terrestrial plants, where high nitrate availability increases plant water content (Cárdenas-Navarro et al., 1999). We assume that the high nitrate level in the surrounding medium might have exerted an osmotic stress on *M. spicatum* and reduced its water content. It is also interesting to note that the water content remained more or less constant for all MSM concentrations and NP-100, but was higher for the low MSM concentrations in NP-25. Apparently, high MSM concentrations also affected the water balance of the plant.

Pigment content analysis

The increase in total chlorophyll and carotenoid contents with increasing concentrations of IPU, regardless of nitrate level was in contrast to the findings of most other relevant studies, which show a decrease of photosynthetic pigments with IPU (Bi et al., 2012; Debenest et al., 2009; Nemat Alla et al., 2008). Possibly shadetype chloroplasts were induced by this herbicide (Lichtenthaler, 1984; Lichtenthaler et al., 1982; Teisseire et al., 1999). Another PSII inhibitor, diuron, showed two levels of toxicity on chloroplasts from pea and maize. At low concentrations non-cyclic electron flow was inhibited, and induced the formation of "shade-type chloroplasts", and higher concentrations inhibited photosystem I with the resulting photo-destruction of pigments (Ridley and Horton, 1984). The significant decrease of the chlorophyll a–b ratio (chl a/b) (**Table III.2**) supports this hypothesis. Slight reductions in chlorophyll and carotenoid are consistent with previous studies for MSM (Royuela et al., 2000; Turgut and Fomin, 2002) and can be explained by the accumulation of carbohydrates in leaves, with a negative feedback on RubisCO activity and CO2 fixation, leading to reduced photosynthesis and pigment content (Scarponi et al., 1996; Zabalza et al., 2004). The reduced total chlorophyll content under high nitrate level irrespective of the concentration of either herbicide might represent a stress reaction to the very high nitrate levels, possibly related to the generally lower growth rates observed under NP-100.

Phenolic Compounds (TPC)

Anthocyanins, as well as other phenolic compounds, have so far received only attention in ecotoxicology related to trace metal element contamination because of their capacity to complex metals (Sivaci et al., 2008, 2007) and/or their antioxidant properties (Landi et al., 2015; Michalak, 2006). Since herbicides can also induce oxidative stress, we wondered if *M. spicatum*, with its high levels of phenolic compounds (Gross et al., 1996), would show herbicide induced changes in TPC. Yet, IPU, known to produce oxidative stress, did not have strong effects on anthocyanins or TPC. Maybe other antioxidant systems had been activated. Interestingly, we found a reduction of anthocyanins and TPC in plants exposed to MSM, possibly related to overall changes in carbon metabolism caused by this herbicide. Controls and most concentrations of IPU showed a significant reduction of TPC in NP-100, which is consistent with the prediction of the carbon nutrient balance hypothesis (CNBH), stating that plants with enhanced nitrogen availability can reduce carbon-based defensive compounds

(Bryant et al., 1983). However, this effect was not observed for MSM treatments, maybe related to the disturbance of the amino acid biosynthesis.

Plant stoichiometry

We were interested in plant stoichiometry because carbon, nitrogen and phosphorus are major elements present not only in plant metabolites, but are also linked to crucial ecological processes (Sardans et al., 2012). At environmentally-relevant concentrations of herbicides (< 5µg L^{-1}) there were only a few changes in plant stoichiometry, observed only in medium NP-25. This lack of strong effects might be explained by the fact that we used a very nutrient rich culture medium. Changes in N:P ratios in response to nitrogen enrichment have been mainly observed when plants were limited in nitrogen (Sistla et al., 2015). This suggests that the use of nutrient-rich culture media for laboratory tests, which are necessary to obtain optimal growth of controls, might introduce a bias in the results by impeding variations of stoichiometry, and the carbon-nitrogen-phosphorus metabolism of the plant. Recently, Brooks et al. (2015) has argued the case to include environmentally relevant conditions into ecotoxicological tests.

The change in plant nitrogen content with high concentrations of IPU or MSM is consistent with the observed changes in chlorophyll. We interpret the increased phosphorus content at IPU concentrations of 5 µg L^{-1} and higher as a metabolic response of *M. spicatum*, possibly to enhance detoxification mechanisms. Metabolically active plants have higher %P levels, which are related to higher rRNA levels (Matzek and Vitousek, 2009).

Surprisingly, we observed no or only small differences between media for the C:N ratio, which was the only ratio that changed with increasing concentrations of IPU and MSM. The N:P ratio was more influenced by nitrate level than by the herbicides. This is not surprising, because the N:P ratio is considered to better reflect nutrient availability than C:N and C:P ratios (Demars and Edwards, 2007; Güsewell and Koerselman, 2002), and will increase with N enrichment (Sistla et al., 2015), as we also show here. Frost and Hicks (2012) predicted N effects also on the C:P ratio, and this is what we also saw. Overall, *M. spicatum* apparently maintained a certain homeostasis in its elemental stoichiometry, specifically that of C:N at low herbicide concentrations and for both nitrate levels, possibly related to the maintenance of cell functioning (Sterner and Elser, 2002).

From an ecological point of view, the observed changes in plant stoichiometry and phenolics with herbicide and/or with high nitrate levels will change the "quality" of *M. spicatum*. The contrasting effects of both herbicides on the C:N ratio, the reduction of phenolic compounds under high N:P ratio and with MSM; and the higher N:P ratio under NP-100 show that the combination of different stressors can result in very different "qualities" of this plant. We consider these effects ecologically relevant, e.g. in the interactions with herbivores, as we have previously shown (Fornoff and Gross, 2014). Adding endpoints that characterize the "quality" of a resource could thus be of possible value for environmental risk assessment.

The overall assessment of all combined treatment effects shows some interesting patterns, as seen in the PCA analysis (**Figure III.2**). In the presence of high nitrate level (NP-100), *M. spicatum* seemed to respond less to IPU pressure, which supports our hypothesis that nitrate level can modify the plant response to herbicides. The distinct effects of herbicide concentrations or nitrate levels were often difficult to explain because of the many significant interaction terms. Since plants were mostly dead in the 1000 µg L^{-1} in NP-100 with both herbicides, we had performed the statistical analyses again without this concentration (**Table III.3**, Supplementary material). Interestingly, many interaction terms disappeared for IPU, but not those for MSM. Thus, plants exposed to MSM, which affects amino acid biosynthesis, reacted more specifically to a certain combination of MSM concentration and nitrate level. The contrasting findings for IPU and MSM support our hypothesis that effects of nitrate enrichment might depend on the mode of action of an herbicide. Our different endpoints enabled us to explain certain patterns, such as effects on dry weight based growth influenced by the DMC, and links between nitrogen and chlorophyll content. It will be interesting to test in future experiments the possible indirect effects of such plant quality changes, as palatability and food quality towards herbivores might have been modified (*sensu* Fornoff and Gross, 2014).

I.6 Conclusions

Understanding the ecological effects of multiple anthropogenic stressors on aquatic ecosystems requires new approaches. We decided to investigate combined effects of herbicide and nitrate pollution in a cross-factorial experiment using the new OECD test organism: *Myriophyllum spicatum*, and to expand this to include plant responses that can be

meaningful in understanding ecological effects. We found complex and often interacting effects for both herbicides, IPU and MSM, and high nitrate level. Yet, the overall nitrate level effects were lower than expected, probably because we were using already a high nutrient medium under normal conditions in the NP-25 medium. Further studies should investigate multiple nitrate and pesticide pollution on oligotrophic or mesotrophic aquatic systems, as in such systems changes in the N:P environmental ratio should have stronger effects. Nitrate enrichment in agricultural landscapes needs to be considered as an additional stress for organisms. How plants would respond to a combination of herbicides is difficult to predict, as we observed, for example, opposite effects on chlorophyll, nitrogen and anthocyanin content for IPU and MSM. Our study offers first insights into how "plant quality" in terms of structural and physiological traits (DMC, elemental stoichiometry, phenolic compounds) might change in response to herbicides, and such changes in nutritional value can affect, for example, herbivores utilizing macrophyte species for food. While the inclusion of additional endpoints is certainly time consuming, we believe that our study shows how a combination of endpoints can help explain distinct effects based on a certain combination of stressors. We consider them useful to identify effects at the plant level, and they can possibly be interpreted in an ecological and environmental context. In response to our initial question we can state that nitrate enrichment can indeed affect the response of *M. spicatum* to two common herbicides. Further, this response can be specific for a certain type of herbicide, possibly linked to its mode of action.

I.7 Supplementary data

Table III.2 Results for all measured endpoints based on different herbicide concentrations and nitrate level. Data are presented as means ± 1 SEM with n = 3. Results of Tukey post-hoc tests after 2-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA (see Table 1) are indicated by letter code. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

Endpoints	Isoproturon (IPU)		Mesosulfuron-methyl (MSM)	
[µg L^{-1}]	NP-25 (N:P = 25:1)	NP-100 (N:P = 100:1)	NP-25 (N:P = 25:1)	NP-100 (N:P = 100:1)
RGR-L [mm day^{-1}]				
0	0.05 ± 0.002 a	0.05 ± 0.002 a	0.05 ± 0.002 a	0.05 ± 0.002 a
0.05	0.05 ± 0.001 a	0.05 ± 0.002 ab	0.05 ± 0.004 a	0.04 ± 0.001 b
0.5	0.05 ± 0.003 a	0.04 ± 0.003 ab	0.05 ± 0.002 a	0.04 ± 0.000 b
5	0.05 ± 0.004 a	0.05 ± 0.003 ab	0.02 ± 0.003 c	0.03 ± 0.001 b
50	0.05 ± 0.003 ab	0.04 ± 0.003 abc	0.01 ± 0.002 cde	0.02 ± 0.004 c
500	0.03 ± 0.003 d	0.03 ± 0.001 cd	0.02 ± 0.000 cd	0.01 ± 0.003 def
1000	0.01 ± 0.008 e	0.04 ± 0.001 bcd	0.00 ± 0.002 ef	0.00 ± 0.001 f
RGR-DW [mg DW day^{-1}]				
0	0.07 ± 0.003 a	0.06 ± 0.004 ab	0.07 ± 0.003 a	0.06 ± 0.004 ab
0.05	0.07 ± 0.004 a	0.05 ± 0.003 ab	0.06 ± 0.007 a	0.04 ± 0.006 abc
0.5	0.06 ± 0.004 ab	0.05 ± 0.005 ab	0.07 ± 0.004 a	0.05 ± 0.001 abc
5	0.06 ± 0.009 ab	0.05 ± 0.005 ab	0.06 ± 0.011 a	0.05 ± 0.004 abc
50	0.05 ± 0.002 ab	0.04 ± 0.004 bc	0.05 ± 0.005 abc	0.05 ± 0.007 abc
500	0.02 ± 0.005 cd	0.00 ± 0.002 d	0.06 ± 0.008 a	0.03 ± 0.005 bc
1000	0.01 ± 0.004 d	-0.02 ± 0.003 d	0.05 ± 0.006 abc	0.03 ± 0.009 c
Dry matter content				
0	11.0 ± 0.347 de	13.0 ± 0.418 ab	11.0 ± 0.347 f	13.0 ± 0.418 e
0.05	11.1 ± 0.252 cde	13.1 ± 0.384 ab	10.3 ± 0.095 f	14.0 ± 0.487 de
0.5	11.1 ± 0.045 bcde	13.9 ± 0.319 ab	10.8 ± 0.307 f	14.2 ± 0.298 de
5	9.9 ± 0.126 ef	12.8 ± 0.366 abc	16.7 ± 0.366 ab	16.5 ± 0.269 ab
50	9.0 ± 0.050 f	12.0 ± 0.306 abcd	16.3 ± 0.416 bc	18.3 ± 0.369 a
500	8.0 ± 0.108 f	10.1 ± 0.106 ef	15.8 ± 0.433 bcd	14.3 ± 0.629 de
1000	8.1 ± 0.229 f	7.2 ± 0.096 f	15.6 ± 0.221 bcd	14.6 ± 0.208 cde
Water content				
0	8.1 ± 0.299 bcd	6.7 ± 0.254 e	8.1 ± 0.299 a	6.7 ± 0.254 b
0.05	8.0 ± 0.210 bcde	6.7 ± 0.232 e	8.8 ± 0.090 a	6.2 ± 0.260 bc
0.5	8.0 ± 0.036 bcde	6.2 ± 0.167 e	8.2 ± 0.254 a	6.1 ± 0.150 bcd
5	9.1 ± 0.128 bc	6.8 ± 0.223 de	5.0 ± 0.129 ef	5.0 ± 0.097 def
50	10.1 ± 0.062 ab	7.3 ± 0.215 cde	5.1 ± 0.161 cdef	4.5 ± 0.113 f
500	11.5 ± 0.168 a	8.9 ± 0.104 ab	5.3 ± 0.172 cdef	6.0 ± 0.315 bcde

1000	11.4	±	0.351	a	12.9	±	0.184	a	5.4	±	0.091	cdef	5.9	±	0.097	bcde
Chlorophyll (a+b) [mg g^{-1} DW]																
0	7.9	±	0.134	cd	6.0	±	0.053	f	7.9	±	0.134	a	6.0	±	0.053	b
0.05	7.6	±	0.174	cde	6.1	±	0.188	f	9.2	±	0.367	c	6.5	±	0.077	cd
0.5	7.6	±	0.206	cde	6.6	±	0.081	ef	8.4	±	0.365	cd	6.0	±	0.215	e
5	9.3	±	0.652	bc	6.7	±	0.104	ef	5.0	±	0.145	cd	4.2	±	0.200	e
50	12.9	±	0.253	ab	8.8	±	0.742	bc	4.2	±	0.137	de	3.2	±	0.117	e
500	17.2	±	0.902	a	13.1	±	0.118	ab	4.4	±	0.019	cd	2.7	±	0.089	e
1000	17.7	±	0.496	a	5.5	±	0.387	def	3.4	±	0.408	de	2.6	±	0.114	e
Chlorophyll a/b																
0	2.4	±	0.021	ab	2.4	±	0.024	c	2.4	±	0.021	a	2.4	±	0.024	ab
0.05	2.4	±	0.063	abc	2.3	±	0.017	cd	2.5	±	0.001	a	2.2	±	0.026	bc
0.5	2.3	±	0.021	bc	2.3	±	0.024	cd	2.4	±	0.001	a	2.2	±	0.025	bc
5	2.4	±	0.017	a	2.3	±	0.024	c	2.1	±	0.012	cde	2.2	±	0.026	cd
50	2.2	±	0.000	de	2.0	±	0.145	ef	1.9	±	0.025	ef	1.9	±	0.025	ef
500	2.0	±	0.055	ef	2.1	±	0.022	ef	2.0	±	0.032	def	1.5	±	0.090	g
1000	2.1	±	0.000	ef	1.9	±	0.020	f	1.9	±	0.037	f	1.5	±	0.059	g
Carotenoid [mg g^{-1} DW]																
0	1.13	±	0.016	cde	0.96	±	0.022	f	1.13	±	0.016	abc	0.96	±	0.022	cde
0.05	1.10	±	0.018	bcd	0.97	±	0.022	ef	1.23	±	0.053	a	1.07	±	0.013	abc
0.5	1.08	±	0.029	bcde	1.04	±	0.010	cdef	1.16	±	0.045	ab	1.01	±	0.040	bcd
5	1.29	±	0.090	abc	1.06	±	0.015	cdef	0.80	±	0.024	f	0.79	±	0.041	f
50	1.67	±	0.035	abc	1.16	±	0.063	bcd	0.81	±	0.032	ef	0.66	±	0.041	fg
500	2.25	±	0.090	a	1.83	±	0.044	bcd	0.86	±	0.024	def	0.53	±	0.059	g
1000	2.39	±	0.077	a	0.43	±	0.022	def	0.73	±	0.049	f	0.48	±	0.042	g
Anthocyanin [mg g^{-1} DW]																
0	0.95	±	0.033	bcd	0.86	±	0.050	d	0.95	±	0.033	ab	0.86	±	0.050	bcd
0.05	0.94	±	0.065	bcd	0.87	±	0.044	cd	1.12	±	0.092	a	0.80	±	0.048	bcd
0.5	1.00	±	0.031	bcd	0.79	±	0.022	d	0.94	±	0.094	ab	0.69	±	0.033	cd
5	1.11	±	0.046	bc	0.87	±	0.026	cd	0.48	±	0.036	de	0.43	±	0.024	e
50	1.53	±	0.035	a	0.91	±	0.069	cd	0.40	±	0.056	e	0.30	±	0.023	e
500	1.21	±	0.090	b	1.26	±	0.043	bc	0.32	±	0.021	e	0.28	±	0.005	e
1000	1.22	±	0.032	b	0.78	±	0.042	cd	0.30	±	0.009	e	0.25	±	0.015	e
Total polyphenol content [mg g^{-1} DW]																
0	77.4	±	5.977	a	56.2	±	1.777	e	77.4	±	5.977	a	56.2	±	1.777	cd
0.05	75.0	±	2.843	abcd	61.0	±	3.604	de	66.5	±	1.374	bc	67.5	±	1.972	bc
0.5	75.6	±	3.110	abcd	62.3	±	1.804	de	68.8	±	3.960	abc	72.7	±	2.103	ab
5	64.9	±	3.622	cde	65.6	±	1.809	bcde	45.0	±	1.658	def	47.4	±	1.504	def
50	78.2	±	4.282	abc	62.4	±	1.736	de	53.4	±	4.056	cde	54.2	±	1.212	cd

500	80.8 ± 2.072 ab	87.7 ± 3.537 abcd	45.8 ± 1.733 def	38.0 ± 4.183 ef
1000	80.2 ± 1.374 abc	35.0 ± 0.179 de	45.9 ± 4.164 def	36.3 ± 4.564 f
Carbon %				
0	39.6 ± 0.070 cde	39.1 ± 0.133 g	39.6 ± 0.070 b	39.1 ± 0.133 c
0.05	40.1 ± 0.052 ab	39.2 ± 0.138 fg	39.6 ± 0.146 bc	39.1 ± 0.194 bc
0.5	40.2 ± 0.130 ab	39.4 ± 0.081 ef	39.6 ± 0.113 bc	39.4 ± 0.120 bc
5	39.5 ± 0.240 def	39.4 ± 0.071 ef	39.1 ± 0.022 bc	38.9 ± 0.345 c
50	40.0 ± 0.044 ac	39.4 ± 0.056 ef	38.7 ± 0.180 c	39.1 ± 0.205 bc
500	41.3 ± 0.164 a	39.7 ± 0.100 bcde	39.5 ± 0.520 bc	41.1 ± 0.308 a
1000	41.3 ± 0.083 a	40.8 ± 0.170 bcd	38.9 ± 0.159 c	41.4 ± 0.124 a
Nitrogen %				
0	2.81 ± 0.015 d	2.93 ± 0.072 d	2.81 ± 0.015 bc	2.93 ± 0.072 ab
0.05	2.76 ± 0.031 d	3.02 ± 0.044 d	3.18 ± 0.040 a	3.03 ± 0.128 ab
0.5	2.91 ± 0.050 d	3.04 ± 0.062 d	2.96 ± 0.137 ab	3.05 ± 0.041 ab
5	3.11 ± 0.187 cd	3.20 ± 0.027 cd	2.32 ± 0.034 de	2.52 ± 0.071 cd
50	3.92 ± 0.076 b	3.61 ± 0.059 bc	2.13 ± 0.017 ef	2.20 ± 0.093 def
500	4.64 ± 0.034 a	4.40 ± 0.035 a	2.16 ± 0.044 ef	2.09 ± 0.015 ef
1000	4.54 ± 0.121 a	5.12 ± 0.100 a	1.98 ± 0.034 f	2.05 ± 0.027 ef
Phosphorus %				
0	1.26 ± 0.007 cd	1.20 ± 0.015 ef	1.26 ± 0.007 b	1.20 ± 0.015 bc
0.05	1.25 ± 0.017 cd	1.24 ± 0.025 cde	1.44 ± 0.044 a	1.19 ± 0.021 bc
0.5	1.26 ± 0.013 bc	1.21 ± 0.007 cde	1.38 ± 0.023 a	1.17 ± 0.028 bc
5	1.43 ± 0.048 ab	1.21 ± 0.025 def	1.22 ± 0.031 bc	1.08 ± 0.036 cd
50	1.50 ± 0.021 a	1.22 ± 0.020 cde	1.01 ± 0.033 de	0.94 ± 0.035 d
500	1.44 ± 0.016 a	1.25 ± 0.039 cde	0.96 ± 0.022 de	0.36 ± 0.054 f
1000	1.42 ± 0.035 a	0.46 ± 0.008 f	0.75 ± 0.041 e	0.28 ± 0.020 f
C:N molar ratio				
0	16.4 ± 0.105 a	15.6 ± 0.436 ab	16.4 ± 0.105 ef	15.6 ± 0.436 fg
0.05	16.9 ± 0.181 a	15.2 ± 0.240 ab	14.5 ± 0.152 g	15.1 ± 0.594 fg
0.5	16.1 ± 0.248 ab	15.1 ± 0.334 ab	15.7 ± 0.749 fg	15.1 ± 0.241 fg
5	14.9 ± 1.040 b	14.4 ± 0.113 bc	19.6 ± 0.280 cd	18.0 ± 0.628 def
50	11.9 ± 0.235 de	12.8 ± 0.230 cd	21.2 ± 0.257 bc	20.8 ± 0.928 bc
500	10.4 ± 0.053 ef	10.5 ± 0.057 f	21.4 ± 0.256 bc	22.9 ± 0.274 ab
1000	10.6 ± 0.290 ef	9.3 ± 0.143 f	22.9 ± 0.382 ab	23.6 ± 0.297 a
C:P molar ratio				
0	81.1 ± 0.446 b	83.7 ± 1.328 b	81.1 ± 0.446 f	83.7 ± 1.328 ef
0.05	82.6 ± 1.009 b	81.7 ± 1.725 bc	71.2 ± 2.164 g	84.4 ± 1.858 ef
0.5	82.4 ± 1.108 b	83.8 ± 0.317 b	74.1 ± 1.325 g	87.0 ± 2.117 def
5	71.3 ± 2.816 d	84.0 ± 1.542 ab	82.9 ± 2.120 f	92.7 ± 2.649 cd

50	68.9 ± 0.993 d	83.1 ± 1.433 b	99.1 ± 2.894 c	107 ± 4.381 bc
500	73.8 ± 1.128 d	81.8 ± 2.352 b	106 ± 3.547 bc	312 ± 50.60 a
1000	74.9 ± 1.714 cd	227 ± 3.190 a	135 ± 7.645 ab	380 ± 27.78 a
N:P molar ratio				
0	4.93 ± 0.055 g	5.38 ± 0.065 e	4.93 ± 0.055 ef	5.38 ± 0.065 bc
0.05	4.87 ± 0.043 g	5.40 ± 0.181 ef	4.91 ± 0.101 ef	5.62 ± 0.298 bc
0.5	5.13 ± 0.134 f	5.55 ± 0.137 e	4.75 ± 0.162 fg	5.76 ± 0.128 ab
5	4.79 ± 0.149 g	5.85 ± 0.114 d	4.22 ± 0.093 g	5.15 ± 0.176 cde
50	5.78 ± 0.035 d	6.51 ± 0.065 cd	4.68 ± 0.190 fg	5.17 ± 0.033 cd
500	7.11 ± 0.121 bc	7.76 ± 0.181 ab	4.96 ± 0.170 def	13.6 ± 2.057 a
1000	7.07 ± 0.235 bc	24.4 ± 0.032 a	5.89 ± 0.393 ab	16.1 ± 1.131 a

Table III.3 Modified table III.1 to represent only herbicide concentration ranging from 0 to 500 µg L^{-1}. Isoproturon and mesosulfuron-methyl results of the statistical analysis (2 way-ANOVAs or Kruskal-Wallis for non-parametric data) to assess respective effects of nitrate level and herbicide concentration ranging from 0 to 500 µg L^{-1} and their interactive effects on measured parameters after 14 days of exposure. Residual df = 34.

	Isoproturon (IPU) (*Res.*[c] *df = 34*)						Mesosulfuron-methyl (MSM) (*Res.*[c] *df = 34*)					
	NO_3 [a] *(df = 1)*		Conc.[b] *(df = 6)*		NO_3 x Conc. *(df = 6)*		NO_3 *(df = 1)*		Conc. *(df = 6)*		NO_3 x Conc. (*df = 6)*	
	F	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)
RGR-L	4.653	**0.039**	28.892	**< 0.001**	1.174	0.345	9.027	**0.005**	179.31	**< 0.001**	11.56	**< 0.001**
RGR-DW	24.347	**< 0.001**	32.113	**< 0.001**	0.388	0.853	18.822	**< 0.001**	2.443	0.057	1.968	0.112
DMC	164.72	**< 0.001**	34.848	**< 0.001**	1.756	0.152	68.89	**< 0.001**	91.11	**< 0.001**	14.59	**< 0.001**
WC	121.71	**< 0.001**	37.345	**< 0.001**	1.457	0.233	94.35	**< 0.001**	76.24	**< 0.001**	18.22	**< 0.001**
Chl	89.977	**< 0.001**	60.423	**< 0.001**	1.947	0.116	190.39	**< 0.001**	189.56	**< 0.001**	3.496	**0.013**
Chl a/b	Kruskal-Wallis χ^2 = 32.710, df = 11, *p*-value **< 0.001**						69.19	**< 0.001**	137.06	**< 0.001**	22.15	**< 0.001**
Car	Kruskal-Wallis χ^2 = 28.464, df = 11, *p*-value = **0.003**						52.854	**< 0.001**	57.464	**< 0.001**	3.786	**0.009**
Aty	50.67	**< 0.001**	14.26	**< 0.001**	6.7	**< 0.001**	36.47	**< 0.001**	95.448	**< 0.001**	3.015	**0.025**
TPC	Kruskal-Wallis χ^2 = 28.030, df = 11, *p*-value = **0.003**						20.89	**< 0.001**	40.67	**< 0.001**	11.6	**< 0.001**
C:N	15.439	**< 0.001**	82.094	**< 0.001**	3.062	**0.024**	3.847	0.059	100.6	**< 0.001**	4.13	**0.006**
C:P	Kruskal-Wallis χ^2 = 23.292, df = 11. *p*-value = **0.02**						Kruskal-Wallis χ2 = 36.547, df = 11. *p*-value **< 0.001**					
N:P	Kruskal-Wallis χ^2 = 37.748, df = 11. *p*-value **< 0.001**						Kruskal-Wallis χ2 = 33.459, df = 11. *p*-value **< 0.001**					
C	138.07	**< 0.001**	27.389	**< 0.001**	6.768	**< 0.001**	0.279	0.602	9.676	**< 0.001**	8.767	**< 0.001**
N	5.152	**0.031**	112.25	**< 0.001**	2.773	**0.036**	4.631	**0.04**	86.221	**< 0.001**	2.539	**0.05**
P	Kruskal-Wallis χ^2 = 27.453, df = 11. *p*-value **0.004**						151.43	**< 0.001**	147.12	**< 0.001**	27.39	**< 0.001**

([a] = Nitrate/ NO_3; [b] = Concentration; [c] = Residual)

II. Mise en évidence des effets de l'exposition à des herbicides en mélange, combinés avec un enrichissement en nitrate, après seulement une semaine d'exposition

Cette première étude a permis de montrer que l'isoproturon (IPU) et le mésosulfuron-méthyl (MSM) en contamination simple affectent tous les deux *M. spicatum*, mais différemment. En effet l'IPU a tendance à augmenter le contenu en pigments et diminuer le DMC et le ratio C:N, alors que le MSM présente un effet inverse. Nous avons également montré l'influence du ratio N:P du milieu sur ces effets, qui, pour les plus hautes concentrations sont amplifiés en présence d'un ratio N:P plus grand.

Dans les milieux aquatiques, les herbicides ne sont jamais seuls, au contraire ils forment des mélanges complexes de molécules de types et d'effets variés pouvant interagir. Ainsi l'IPU et le MSM sont susceptibles d'être retrouvés en mélange dans un même environnement. Compte-tenu de leurs effets opposés en contamination simple, on peut se demander quel serait l'effet d'un tel mélange ? Les effets vont-ils s'annuler, s'amplifier l'un l'autre, se cumuler, ou bien l'un des deux va-t-il prendre le pas sur l'autre? D'autre part, comme la différenciation des effets de l'IPU et du MSM était essentiellement visible aux plus hautes concentrations, concentrations non réalistes d'un point de vue environnemental, on peut se demander si pour des doses plus réalistes, cette distinction serait toujours possible.

Afin de répondre à ces différentes questions nous avons réalisé une expérimentation comparant les effets de l'IPU, du MSM et d'un mélange des deux, à des doses plus proches des concentrations retrouvées dans l'environnement, et dans des milieux ayant des ratios N:P différents.

Effects of mixed herbicide exposure combined with high nitrate enrichment are visible after one week of exposure

Draft manuscript

II.1 Abstract

Aquatic plants are often exposed to multiple stressors at the same time, such as mixed herbicide exposure coupled with nitrate run-off in agricultural areas. To test the combined effect of herbicide mixtures and nitrate levels on an aquatic plant, *Myriophyllum spicatum*, we performed a fully factorial experiment using medium type (two levels of nitrate), herbicide type (isoproturon, mesosulfuron-methyl and the mixture of both) and herbicide level (low and high) as factors. We additionally had run the experiment for 7 and 14 days to account for temporal dynamics. Based on a range of morphological and physiological endpoints we saw that nitrate level had a distinct effect on plant responses, and that this effect was more pronounced at day 7 and fading at day 14. The most distinct effects were the increase in nitrogen and chlorophyll content, specifically chlorophyll b with isoproturon, and an increase in dry matter content accompanied by a reduction in chlorophyll and nitrogen content with mesosulfuron-methyl. In contrast to our expectation that these two herbicides would neutralize each other due to their divergent effects on the plant, the mixture of both herbicides was more closely related to the responses observed for mesosulfuron-methyl than intermediary between both individual herbicides, suggesting a stronger toxicity of mesosulfuron-methyl in our setting. Nitrate itself strongly affected *M. spicatum* and strongly interacted both with herbicide type and level. We conclude that distinct stressor combinations will result in specific changes in physiology and growth parameters of plants, which cannot be easily deduced based on the effects of individual stressors. Such complex effects may influence, at least temporarily, the ecological performance of species such as *M. spicatum*.

Keywords: mixture toxicity; multistress; ecological stoichiometry; aquatic ecosystems

II.2 Introduction

Ecosystems and the organisms living in them are more and more exposed to multiple stressors acting at different spatial and temporal scales. One combination of environmental stressors for aquatic ecosystems acting at comparable spatial and temporal scales is the exposure of aquatic organisms to pesticides and nutrient eutrophication (Altenburger et al., 2015; Nõges et al., 2016; Segner et al., 2014). However, there are almost no studies that have explored the combined action of such a multistress scenario already. A few studies investigated the combined effect of pesticides, in particular herbicides, and nutrients, specifically nitrate, on aquatic primary producers (Dalton et al. 2015; Halstead et al. 2014; Nuttens et al., accepted ms). So far, these studies have been mainly focusing on one pesticide combined with nutrient enrichment. However, mixtures of different herbicides with diverse modes of action can result in complex responses and "ecological surprises" (Segner et al., 2014). In principle, no interaction, additive, synergistic or antagonistic effects would be expected for a given combination of toxicants (Cedergreen, 2014; Damalas, 2004; Sørensen et al., 2007).

The concentrations of pesticide mixtures affecting aquatic ecosystems seem generally still below the concentrations identified to have no or low effects (NOEC, LOEC) on different organisms, but we might be missing peak exposures due to local run-off at high concentrations. Two herbicides that are frequently found together in run-off from agricultural fields in Lorraine are isoproturon (IPU) and mesosulfuron-methyl (MSM) (Lazartiques et al. 2013; S. Dousset and A. de Junet, pers. communication). Details on these two herbicides have been described previously (**Chapter III.I**, Nuttens et al., 2016 - in press). In short, IPU [3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea] is a phenylurea systemic herbicide that blocks electron transport in photosystem II (Lu et al. 2015; Pérès et al., 1996), causing oxidative stress (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001). The EC_{50} values for IPU identified for different aquatic primary producers are in the range of 20 to 60 µg L^{-1} (Bi et al., 2012; Mohr et al., 2013; Nitschke et al., 1999). MSM [methyl 2-[3-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)ure-iodosulfonyl]-4-methanesulfonamido-methyl benzoate] is a new sulfonylurea systemic herbicide widely used in agriculture and affecting branched amino acid biosynthesis (Blair and Martin, 1988; Vazan et al., 2011). Several structurally related sulfonyl-urea herbicides have been tested against submerged macrophytes, and most of them are toxic already at

the low micromolar range (Cedergreen et al., 2004; Turgut and Fomin, 2002; Wendt-Rasch et al., 2003).

An additional complication in environmental risk assessment is that effects of herbicide mixtures are very difficult to predict due to different modes of action. Even if some studies have evaluated effects of herbicide mixtures on aquatic plants, also called macrophytes (Coutris et al., 2011; Knauert et al., 2010; Teisseire et al., 1999), the majority of studies have focused only on one herbicide, although in different experimental settings, from axenic cultures up to large mesocosms (Fairchild et al., 1998; Frankart et al., 2003; McGregor et al., 2008; Mohr et al., 2013; Rosenkrantz et al., 2013). However, mixtures of pesticides including different herbicides are reality for aquatic ecosystems, even though peak run-off for one or another compound might occur.

Effects on aquatic primary producers in normalized test systems for risk assessment are mainly based on growth-rate or biomass related endpoints (**Chapter I.IV.1** and citations therein). Very few studies focused on other endpoints, e.g. some regarded pigment content or photosynthetic performance (Lambert et al., 2006; McGregor et al., 2008; Schreiber et al., 2011; Teodorović et al., 2012). However, also other sub-lethal or transitory effects might occur, such as changes in plant physiology or morphology. Among these effects can be increases in starch accumulation such as observed for some herbicides (Nelson 1996, Scarponi et al. 1996). This is also an effect we assume for the action of MSM, and it could explain the increase in DMC observed in *M. spicatum* in our and other studies (Cedergreen et al. 2004; Nuttens et al., accepted ms). Starch accumulates when plants are incapable of using fixed carbon for further metabolisation, such as amino acid biosynthesis, as can be expected for sulfonylurea herbicides. On the other hand, several herbicides affecting photosynthesis have been shown to increase the chlorophyll content and the ratio of chlorophyll a and b at low exposure concentrations (Lichtenthaler, 1984; Lichtenthaler et al., 1982; Teisseire et al., 1999). Little attention so far received changes in plant dry matter content (DMC) caused by e.g. increases in starch accumulation, or changes in the elemental composition and stoichiometry, i.e. the content in carbon, nitrogen and phosphorus and resulting molar ratios of these elements (Elger and Willby, 2003; Hussner and Jahns, 2015). Yet, effects on photosynthesis, and thus carbon assimilation, or on amino acid biosynthesis, thus nitrogen assimilation, should modify these parameters in plants. Such endpoints might

have a strong ecological relevance, as changes in DMC and plant stoichiometry are known to affect e.g. the palatability of plants to herbivores (Fornoff & Gross 2014).

We recently found that isoproturon (IPU) and mesosulfuron-methyl (MSM) have distinct effects on chlorophyll and nitrogen content, as well as dry matter content in the submerged macrophytes *Myriophyllum spicatum*, (**Chapter III.I**, Nuttens et al., 2016 *in press*). Based on these findings we predicted that the mixture of these two herbicides with such contrasting modes of action would result in neutral effects on these endpoints. We specifically expected that the increase in chlorophyll observed with IPU and the reduction in chlorophyll with MSM would disappear when both herbicides are acting in mixture. We tested these predictions under different nitrate enrichment conditions in media with a normal (molar N:P ratio of 25:1) and a high nitrate level (N:P ratio of 100:1) to see if nitrogen would interfere with the effects specifically caused by herbicide mixture. We also used two different exposure durations to see if physiological effects were stable or rather transitory. Precisely, our hypotheses were: 1) Nitrate enrichment will modify plant response to herbicides alone or in mixture; 2) The mixture of IPU and MSM will result in neutral effects, or will mask effects observed for the individual herbicides, and 3) Seven days of exposure are sufficient to discriminate herbicide and nitrate effects.

II.3 Materials and methods

II.3.1 Plant material and culture conditions

We used axenic cultures of *Myriophyllum spicatum* originating from own stock cultures (see Gross, 2003). Pre-cultures were performed in 100 ml Erlenmeyer flasks with modified nitrogen source (KNO_3 15.62 mM, $NaNO_3$ 6 µM; with a N:P molar ratio of 25:1) and 3 g L^{-1} of sucrose, but otherwise unchanged medium (Kane and Gilman, 1991). Plants were cultivated in a Sanyo MLR 352 climate chamber (Panasonic France) at a day/night temperature regime of 22°C/20°C, a photoperiod of 16 h, and daytime light of 140 µmol photons PAR m^{-2} s^{-1}.

We set up a 2 x 3 factorial design experiment with *M. spicatum*, using controls and two levels of either IPU, MSM or mixture of both (5 and 50 µg L^{-1} for IPU; 0.5 and 5 µg L^{-1} for MSM alone or in mixture, as levels 1 and 2, respectively, considered to reflect equal toxic units of each herbicide based on literature extrapolations and our prior experiments (Cedergreen et al., 2004; Mohr et al., 2013; Nuttens et al., 2016) crossed with two levels of

nitrate (NP-25 and NP-100, the latter with 62.5 mM NO_3 with KNO_3 at 62.4 mM and $NaNO_3$ at 60 µM). The N:P molar ratios were selected based on environmental ratios of dissolved inorganic nitrogen and phosphorus (TDN:TDP) found in undisturbed or nitrogen-enriched areas (Demars and Edwards, 2007; Hessen, 2013; Ventura et al., 2008).

From the pre-cultures, we cut 2 cm long apices and placed equal numbers in each medium for 5 days to allow wound healing of the cut and acclimation to test conditions. 12 apices from each medium served as starting control samples. We took their length and fresh weight after carefully blotting the shoots with paper tissue. Then shoots were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry weight determination and chemical analyses (see below).

The experiment was performed in 250 mL cell culture flasks (BD Falcon^{TM}) containing 150 mL medium. For each condition, we used three flasks as individual replicates, each at concentrations of 5 and 50 µg L^{-1} for IPU; 0.5 and 5 µg L^{-1} for MSM alone or in mixture. The experiment was run in duplicate: one series ran for 7 days, the other for 14 days. The first series contained 4 apices per flasks in order to allow sufficient biomass for chemical analyses, whereas second series running for 14 days contained 3 apices per flask. Stock solutions of each herbicide (Dr. Ehrenstorfer GmbH; purity 99.0%) had been prepared in methanol. We used six replicates for the controls, to which we added an equal amount of solvent (150 µL per 150 mL) to that used in the herbicide treatments.

Flasks were daily randomly repositioned to account for slight light and temperature differences within the growth chamber. At the end of the experiment (day 7 and 14), plants were harvested and the four or three shoots per flask were washed for 5 min in a 5 mM $CaCl_2$ solution to detach external phosphate or other elements, followed by a short rinse in distilled water.

II.3.2 Growth analyses

We measured individual shoot length including eventual side shoots of all apices used in the experiment, including those used as start values. We also took a photo of all four apices per flask. Fresh mass was determined from shoots carefully blotted dry with tissue paper. Then shoots were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry mass determination and chemical analyses. The relative growth rates for length (RGR-L) and dry mass (RGR-DM) were calculated as: $RGR\text{-}L = (\ln_{L\ at\ T7} - \ln_{L\ at\ T0}) / 7$ and $RGR\text{-}DM = (\ln_{DM\ at\ T7} - \ln_{DM\ at\ T0}) / 7$ for plant

running for 7 days, and as : RGR-L = ($\ln_{L\ at\ T14}$ - $\ln_{L\ at\ T0}$) / 14 and RGR-DM = ($\ln_{DM\ at\ T14}$ - $\ln_{DM\ at\ T0}$) / 14 for plant running for 14 days. Dry matter content (DMC) is defined as the ratio of DM / FM.

II.3.3 Chemical analyses

Dried plants were mechanically ground into a fine powder using a ball mill (Fritsch GmbH, pulversisette 23) for 2 min at 30 Hz. We performed micro-analyses using 0.5 to 2 mg plant material depending on the method. Chlorophyll was extracted with acetone and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 at 8/2 [v/v], and anthocyanins with methanol, ultrapure water, and 37% HCl at 80/20/1 [v/v/v]. Multiple wavelength readings at 470, 664 and 647 nm for carotenoids, chlorophyll a and b; and 532 and 653 nm for anthocyanins were used to calculate final concentrations using established equations (Lichtenthaler and Wellburn, 1983; Murray and Hackett, 1991). Total phenolic compounds (TPC) were quantified according to the Folin-Ciocalteu method using tannic acid as standard (Fornoff and Gross, 2014).

Carbon (C) and nitrogen (N) contents were determined in an elemental analyzer *Carlo-ERBA Na 2100 CE Instrument* with EDTA as standard. Phosphorus (P) in plant samples was determined based on the AFNOR protocol (1990) using alkaline digestion (1 N NaOH and 0.5 M $Na_2S_2O_8$) of approx. 1 mg powder for 2 h at 120°C and 1 bar followed by spectrophotometric quantification in an automated analyzer (Konelab 420-XTi, Thermofischer).

II.3.4 Herbicide analyses

Herbicide concentrations (0.05, 0.5 and 5 µg L^{-1}) were analyzed at day 7 and day 14 using SPE (Autotrace Workstation, Caliper Life Science, Oasis HLB 200 mg/6 mL cartridges, Waters) and reverse-phase liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, Ultimate 3000 Intelligent LC system, Dionex, Acclaim 120 C18 column, 100 x 2.1 mm ID, 3 µm, Thermo). The mobile phases A and B were LC-MS grade water and acetonitrile respectively, both buffered with 0.1% formic acid. The gradient started from 20% B for 3 min, increasing to 40% within 9 min, to 100% within 3 min, kept at 100% for 3 min and returning to initial composition after a further 2 min, with a flow rate of 0.25 mL/min and the column oven set at 40°C. The MS system was an API 3200 triple quadrupole mass spectrometer (AB/Sciex) equipped with a Turbo Ion Spray interface used in positive

ionization mode. The acquisition was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode, using two transitions for quantification and confirmation of each molecule (m/z 207.2>72.0 and 207.2>165.1 for IPU; m/z 504.1>182.0 and 504.1>83.2 for MSM).

II.3.5 Statistical analyses

The statistical analyses were conducted using R software. Multivariate analysis of variance (MANOVA) analyses with medium composition, type and concentration of herbicide as fixed factors have been performed using a probability threshold of $p \leq 0.05$. Principal component analyses (PCA) were performed on the set of endpoints at day 7 and day 14 to visualize differences in endpoint responses according to the experimental conditions. Co-inertia analysis has been carried out to compare PCA at day 7 and at day 14. Significant differences between PCA groups defined by the combination medium x herbicide x concentration have been assessed with Hotelling test.

Table III.4 Results of a three-way MANOVA analysis based on three factors and all endpoints measured in *Myriophyllum spicatum*. Results are given for effects of medium type (NP-25 and NP-100 based on respective N:P molar ratios), herbicide type (isoproturon = IPU, mesosulfuron = MSM, or mixture of both = Mix) and herbicide level (5 and 50 µg L^{-1} for IPU and 0.5 and 5 µg L^{-1} for MSM for levels 1 and 2, respectively), and all interaction terms after 7 or 14 days of exposure. Significant *p*-values are in bold.

	T7 *(df res.[a] = 34)*			**T14** *(df res.[a] = 34)*		
Factors	df	*approx F*	Pr (*F*)	df	*approx F*	Pr (*F*)
Medium	1	475.04	**<0.001**	1	160.871	**<0.001**
Herbicide type	2	12.19	**<0.001**	2	9.868	**<0.001**
Herbicide level	2	5.96	**<0.001**	2	28.83	**<0.001**
Medium x Herbicide level	2	5.06	**<0.001**	2	5.828	**<0.001**
Medium x Herbicide type	2	2.32	**0.043**	2	7.849	**<0.001**
Herbicide type x level	2	8.91	**<0.001**	2	7.858	**<0.001**
Medium x Herbicide type x level	2	3.62	**0.004**	2	2.557	**0.027**

[a] Residuals

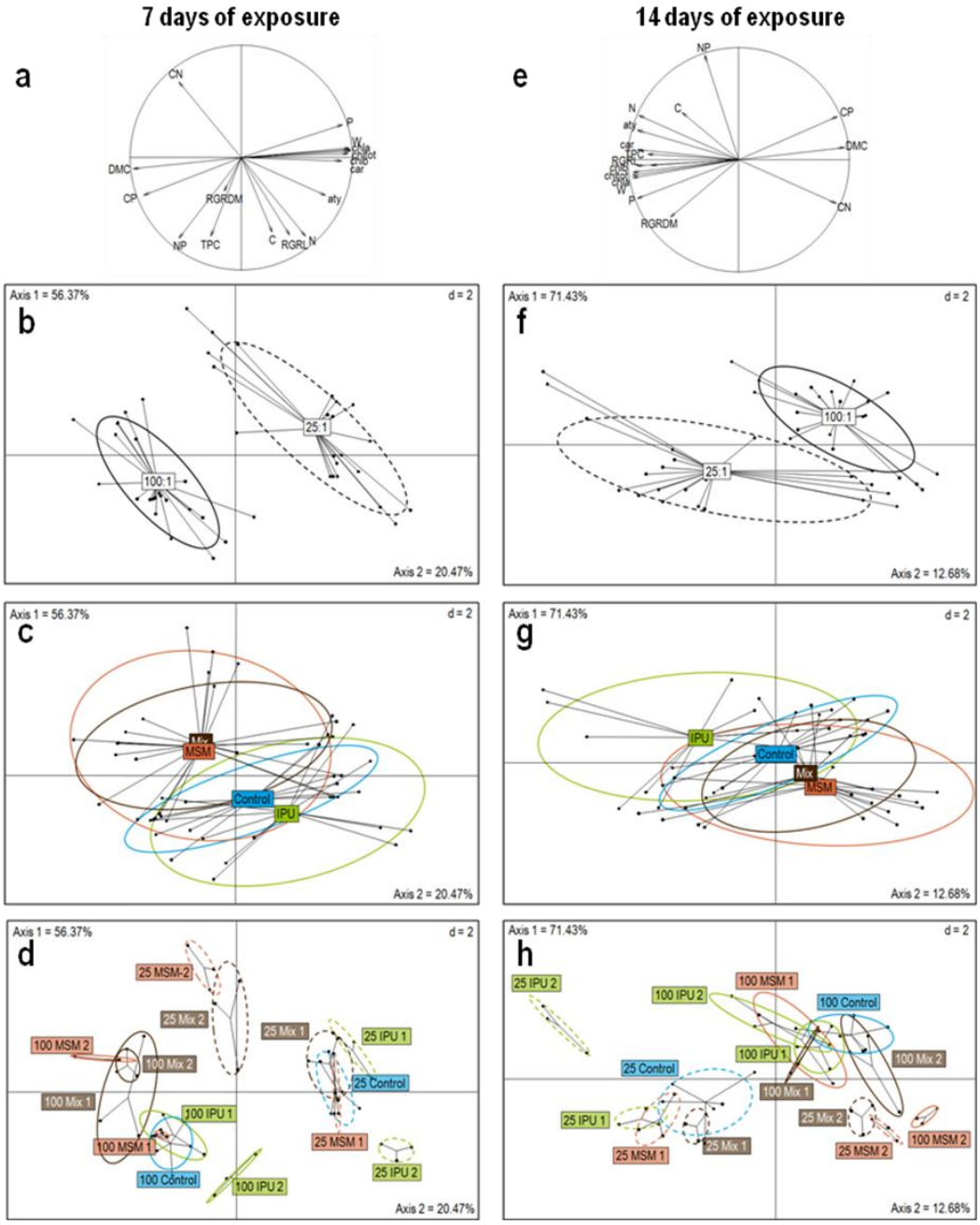


Figure III.3 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum* after 7 days of exposure (**T7**; **a** to **d**) or after 14 days of exposure (**T14**; **e** to **h**). **a & e -** Correlation circles, **b & f** - effects of nitrate level of the medium (N:P = **25:1** or **100:1**), **c & g** - effect of herbicide: isoproturon (**IPU**), mesosulfuron-methyl (**MSM**) or mixture of both (**Mix**), **d & h** - all treatment combination: medium, herbicide and concentration (**1** = 0.5 or 5 µg L^{-1} of MSM or IPU respectively; and **2** = 5 or 50 µg L^{-1} of MSM or IPU respectively, alone or in mixture). Percentages of 56.37% and 20.47% of the total inertia were explained respectively by the first two axes at T7; and percentages of 71.43% and 12.68% of the total inertia were explained respectively by the first two axes at T14.

II.4 Results

All factors, herbicide type, herbicide level and nitrate level, affected the response of *Myriophyllum spicatum* at both exposure times, and highly significant interaction effects were observed for all factor combinations (**Table III.4**). These complex results are detailed in the following.

PCA analyses were performed using all endpoints measured, and the relationship of these endpoints with the first two axes is shown in the respective correlation circles (**Figure III.3 a, e**). After seven days of exposure, pigments (chlorophyll a and b, carotenoids), water content and phosphorus content to one site and dry matter content (DMC) or the C:P molar ratio to the other site described differences along the first axis, and these endpoints together explain 79% of the total inertia. Relative growth rate by length (RGR-L), carbon and nitrogen content, C:N and N:P ratios and total phenolic compounds (TPC) were more related to the second axis, and explained 87% of the total inertia. It is noteworthy that the vector for growth rate based on dry mass (RGR-DM) is not strongly affecting the variance along axis 2. After 14 days of exposure, RGR-L is in line with pigments and water content, explaining differences along the first axis, including again the opposite direction for DMC. The only endpoint pointing clearly towards the second axis is the molar N:P ratio. For 14 days of exposure, DMC, water content (W), chlorophylls a and b, total chlorophyll, carotenoids, anthocyanins, nitrogen and phosphorus content explain 69% of the total inertia of the first axis, while RGRDM, carbon content and the N:P molar ratio explain 64% of the total inertia of the second axis.

The PCA analyses also specified the distinct effects of medium (**Figures III.3 b, f**), herbicide type (**Figures III.3 c, g**) and the resulting individual treatment combinations (**Figures III.3 d, h**). The first two axes explain almost 77% of all variance at day 7, and more than 84% of all variance at day 14.

Medium strongly affected the overall response of *M. spicatum*, with a stronger separation of groups in the PCA analysis for day 7 (**Figure III.3 b**) than for day 14 (**Figure III.3 f)**. The groups are mainly separated along axis 1, which reflects, as stated above, mainly differences in pigments and water content, and in opposite direction the dry matter content (DMC) (**Figures III.3 a, e**). When regarding the effects of herbicide type, irrespective of herbicide

level, IPU is close to the control after seven days of exposure, but groups are further separated after 14 days of exposure (**Figures III.3 c, g**). MSM overlaps with MIX, the mixture of IPU and MSM at day 7, and this does not change much after 14 days of exposure. Nevertheless, there are distinct differences also based on herbicide level, as seen in the PCAs based on all treatment combinations (**Figures III.3 d, h**). After 7 days, we can identify one cluster showing treatment combinations based on medium NP-25 and controls or level 1 of the herbicide types. For medium NP-25, the level 2 effects are organised along a diagonal with 25-IPU-2 to the lower right (corresponding to a profile with higher pigment content, increased length growth, higher carbon and nitrogen content but lower DMC profile), 25-MSM-2 to the upper left (inverse profile) and 25-Mix-2 attached to 25-MSM-2. All treatments in medium NP-100 are to the lower left, corresponding to reduction in pigments and higher DMC, and again with a gradient from 100-IPU-2 in the lower middle to 100-MSM-2 at the mid-left of the graph, and other treatments in between.

After 14 days of exposure, some patterns of the PCA show the same tendency, e.g. the almost distinct placement of 25-IPU-2, and the cluster of all other control and herbicide level 1 treatments in NP-25. Interestingly, 25-MSM-2 and 25-Mix-2 are more close to 100-MSM-2 and below all other treatment combinations in medium NP-100.

The observations we had made for the graphical representation of the treatment combinations have been verified using Hotelling tests (**Table III.5**). The differences for a given herbicide type and level combination observed after seven days of exposure largely disappear after 14 days of exposure, except for controls and IPU-1, although some contrasts remain marginally significant. If differences are observed between treatment combinations within a given medium, these differences remain in many cases for both media, but disappear in some cases (e.g. contrast between IPU-1 and Mix-1 is significant in NP-25 for both dates, but no longer significant in NP-100). If focussing on MSM and Mix treatments, only the contrast between MSM-1 and MSM-2 is always significant, while none of the other contrasts showed an effect, underlining that the Mix effects are mainly caused by MSM.

Table III.5 Hotelling test results (significant differences at $p < 0.05$) for pair-wise comparisons of PCA groups defined by the combination of the three studied factors on *Myriophyllum spicatum*: medium (NP-25 and NP-100 based on respective N:P molar ratios), herbicide type (isoproturon = IPU, mesosulfuron = MSM, or mixture of both = Mix) and herbicide level (5 and 50 µg L^{-1} for IPU and 0.5 and 5 µg L^{-1} for MSM for levels 1 and 2, respectively) after 7 or 14 days of exposure. Significant p-values are in bold, marginally significant values in italics.

T7			**T14**		
Within medium	**25:1**	**100:1**	**Within medium**	**25:1**	**100:1**
Control x IPU 1	**0.024**	0.453	Control x IPU 1	0.216	0.483
Control x IPU 2	**0.002**	**0.022**	Control x IPU 2	**0.015**	0.137
Control x MSM 1	0.466	0.741	Control x MSM 1	0.148	0.403
Control x MSM 2	**<0.001**	**0.017**	Control x MSM 2	**0.002**	**0.008**
Control x Mix 1	0.757	*0.096*	Control x Mix 1	0.691	*0.066*
Control x Mix 2	**0.004**	**0.021**	Control x Mix 2	**0.009**	*0.066*
IPU 1 x IPU 2	**0.014**	**0.044**	IPU 1 x IPU 2	**0.015**	*0.061*
IPU 1 x MSM 1	0.296	0.598	IPU 1 x MSM 1	0.273	0.552
IPU 1 x Mix 1	**0.038**	0.310	IPU 1 x Mix 1	**0.043**	0.310
IPU 2 x MSM 2	**0.014**	**0.021**	IPU 2 x MSM 2	**0.015**	**0.023**
IPU 2 x Mix 2	**0.034**	**0.013**	IPU 2 x Mix 2	**0.039**	**0.009**
MSM 1 x MSM 2	**0.006**	**0.013**	MSM 1 x MSM 2	**0.009**	**0.009**
MSM 1 x Mix 1	0.756	0.461	MSM 1 x Mix 1	0.756	0.461
MSM 2 x Mix 2	0.222	0.748	MSM 2 x Mix 2	0.216	0.748
Mix 1 x Mix 2	0.148	0.846	Mix 1 x Mix 2	0.148	0.846
Between media			**Between media**		
Control	**<0.001**		Control	**<0.001**	
IPU 1	**0.030**		IPU 1	**0.026**	
IPU 2	**0.038**		IPU 2	*0.058*	
MSM 1	**0.007**		MSM 1	*0.095*	
MSM 2	**0.043**		MSM 2	0.107	
Mix 1	**0.038**		Mix 1	*0.062*	
Mix 2	**0.044**		Mix 2	0.181	

II.5 Discussion

Our results show the complex effects observed when crossing two stressors, nitrate level and herbicide exposure, measured for two different herbicides and the mixture of both at two different levels (low and high concentrations) and at different length of exposure. We focused on three major factors in this experiment, and these were medium type (nitrate

level), herbicide type and herbicide level, and compared the results for different times of exposure. Based on MANOVA analyses, all factors and all factor combinations had highly significant effects, underlining that it is very difficult to impossible to identify the isolated effect of a single factor.

Based on our initial first hypothesis, where we postulated that nitrate enrichment will modify the response of *M. spicatum* to herbicides alone or in mixture, we can state that there are indeed strong media effects after seven days of exposure for all different herbicide treatments (lower part of **table II.5**), but that these differences are fading or completely disappearing after 14 days of exposure. As we used a series of endpoints based on growth and physiological parameters, and given that physiological parameters such as pigments and elemental stoichiometry were explaining much of the inertia of our PCA axes, we conclude that some of the effects caused by nitrate enrichment, i.e. differences in medium, were transient. However, if there was a difference between herbicide treatment combinations (herbicide type x herbicide level), this difference remained in most cases in both media (upper part of **table II.5**).

Our second hypothesis was based on the contrasting effects of the two herbicides used, IPU and MSM, as described in **chapter III.I**, and predicted that the mixture of both herbicides at equal toxic units (based on presumed EC50 values) would result in neutral effects, i.e. a masking of the distinct effects caused by each herbicide. In short, the main effects observed for IPU as described in **chapter III.I** were that it increased the total chlorophyll content, the ratio of chlorophyll b and the nitrogen content, whereas MSM reduced chlorophyll and nitrogen content, and further caused an increase in the dry matter content (DMC), possibly caused by starch accumulation (Cedergreen et al., 2004; Royuela et al., 2000; Zabalza et al., 2004). We had chosen the two levels for the individual herbicides and the mixture based on the concentrations used in the former experiment, and chosen concentrations just below and above the point where we had observed effects for most parameters. It should be noted that the calculation of EC50, which would have enabled us to calculate more precisely the toxic units used, was not possible for all endpoints due to non-sigmoid dose-response curves.

Our PCA analyses confirmed the contrasting effect of IPU and MSM on *M. spicatum*, as the clusters for the respective herbicide are located on different sites along the first axis

compared to the control, thus underlining the differential effect on pigments and DMC. However, the mixture of both herbicides ranged more closely to the MSM treatment, indicating that the MSM effects were overriding those of IPU in the Mix treatments. The lack of difference between MSM and Mix treatments was confirmed by detailed Hotelling tests. We thus have to state that our second hypothesis was not confirmed as we did not see a masking effect when both herbicides were applied in mixture. This is probably due to the higher toxicity of MSM compared to IPU for a given level of exposure, even if MSM levels applied was ten times lower than those of IPU.

Our third hypothesis stated that seven days of exposure are sufficient to discriminate herbicide and nitrate effects. Based on our results, we assume that this hypothesis can be accepted. In no case we observed an effect that was not visible after seven days only after 14 days. All effects that were negative (i.e. a factor had no effect) on day 7, remained negative at day 14. This was not always the case the other way round, as some effects observed at day 7 faded or disappeared after 14 days.

There are several options on how to interpret these temporal dynamics. From one perspective, it seems that the plants response is somewhat getting weaker after 14 days of exposure, suggesting maybe some kind of acclimation, or compensatory mechanisms. It would be interesting to see if the distinct effects on physiology and DMC observed for both herbicides can be reverted when the herbicides are removed from the system. Such recovery tests are now more and more requested for ecotoxicological tests with plants, including *M. spicatum* (SETAC Plant Advisory Group discussions, E.M. Gross, pers. communication). Yet, even temporal changes may affect a plants performance in the ecosystem. A slightly slower growth can affect competitive interactions, changes in pigment concentrations can affect photosynthetic performance and ultimately also growth, and changes in elemental stoichiometry or DMC content can affect herbivore palatability, as has been shown previously (Fornoff and Gross, 2014).

The temporal dynamics observed in our study are interesting in view of the recently accepted normalized tests with *M. spicatum*. The OECD guidelines on *M. spicatum* in a sediment-free system (OECD, 2014a) and in a water-sediment system (OECD, 2014b) recommend 14 days of exposure. However, our results show that at already after 7 days of exposure we observed significant effects, and even some effects were no longer found after

14 days of exposure. We are well aware that it is difficult to draw too general conclusions from our study, yet we would like to underline that more studies should look into the complex interactions, or "ecological surprises", that might arrive if multiple stressors interact.

II.6 Supplementary data

Table III.6 Results for all measured endpoints based on different nitrate levels and treatments: isoproturon at 5 (IPU I) or 50 µg L^{-1} (IPU II); mesosulfuron-methyl at 0.5 (MSM I) or 5 µg L^{-1} (MSM II), or mixture of both at 5 and 0.5 µg L^{-1} of IPU and MSM respectively (Mix I) or at 50 and 5 µg L^{-1} of IPU and MSM (Mix II). Data are presented as means ± 1 SEM with n = 6 for controls and n = 3 for treatments.

Endpoints	**7 days of exposure**		**14 days of exposure**	
	N:P = 25:1	**N:P = 100:1**	**N:P = 25:1**	**N:P = 100:1**
RGR-L [mm day^{-1}]				
Control	0.030 ± 0.001	0.029 ± 0.002	0.061 ± 0.001	0.043 ± 0.001
IPU I	0.029 ± 0.002	0.033 ± 0.002	0.058 ± 0.002	0.044 ± 0.002
IPU II	0.030 ± 0.001	0.028 ± 0.002	0.056 ± 0.002	0.040 ± 0.004
MSM I	0.030 ± 0.001	0.029 ± 0.001	0.056 ± 0.001	0.045 ± 0.002
MSM II	0.015 ± 0.003	0.018 ± 0.001	0.016 ± 0.000	0.030 ± 0.001
Mix I	0.027 ± 0.001	0.022 ± 0.002	0.060 ± 0.003	0.045 ± 0.004
Mix II	0.015 ± 0.002	0.021 ± 0.001	0.036 ± 0.004	0.031 ± 0.000
RGR-DM [mg DW day^{-1}]				
Control	0.029 ± 0.005	0.033 ± 0.006	0.062 ± 0.002	0.037 ± 0.005
IPU I	0.031 ± 0.005	0.052 ± 0.001	0.059 ± 0.004	0.042 ± 0.006
IPU II	0.025 ± 0.002	0.029 ± 0.005	0.049 ± 0.002	0.034 ± 0.004
MSM I	0.025 ± 0.005	0.038 ± 0.005	0.053 ± 0.003	0.038 ± 0.004
MSM II	0.030 ± 0.008	0.022 ± 0.007	0.044 ± 0.004	0.031 ± 0.002
Mix I	0.025 ± 0.004	0.029 ± 0.003	0.064 ± 0.005	0.039 ± 0.005
Mix II	0.029 ± 0.001	0.031 ± 0.002	0.049 ± 0.002	0.030 ± 0.002
Dry matter content (DMC)				
Control	10.394 ± 0.087	14.503 ± 0.202	11.448 ± 0.168	15.395 ± 0.225
IPU I	10.233 ± 0.209	14.431 ± 0.169	10.219 ± 0.096	15.441 ± 0.208
IPU II	9.837 ± 0.167	13.740 ± 0.339	9.592 ± 0.036	14.546 ± 0.082
MSM I	10.720 ± 0.201	14.804 ± 0.161	9.868 ± 0.198	15.096 ± 0.408
MSM II	13.366 ± 0.016	15.973 ± 0.270	17.190 ± 0.290	19.160 ± 0.060
Mix I	10.441 ± 0.210	14.821 ± 0.308	11.218 ± 0.249	14.781 ± 0.205
Mix II	12.565 ± 0.108	15.092 ± 0.450	15.533 ± 0.722	17.233 ± 0.063

Water content (WC)				
Control	8.624 ± 0.084	5.902 ± 0.096	7.744 ± 0.130	5.503 ± 0.095
IPU I	8.780 ± 0.200	5.931 ± 0.081	8.788 ± 0.092	5.479 ± 0.088
IPU II	9.171 ± 0.172	6.287 ± 0.183	9.425 ± 0.039	5.875 ± 0.038
MSM I	8.335 ± 0.173	5.757 ± 0.073	9.142 ± 0.200	5.634 ± 0.183
MSM II	6.482 ± 0.009	5.264 ± 0.104	4.821 ± 0.099	4.219 ± 0.016
Mix I	8.586 ± 0.196	5.753 ± 0.143	7.923 ± 0.195	5.768 ± 0.094
Mix II	6.960 ± 0.068	5.638 ± 0.201	5.467 ± 0.315	4.803 ± 0.021
Chlorophyll (a+b) [mg g^{-1} DW]				
Control	10.616 ± 0.270	6.918 ± 0.097	7.449 ± 0.408	4.593 ± 0.195
IPU I	10.732 ± 0.335	7.123 ± 0.258	9.920 ± 0.333	5.214 ± 0.151
IPU II	12.111 ± 0.078	8.204 ± 0.326	12.004 ± 0.329	6.546 ± 0.782
MSM I	10.579 ± 0.232	6.732 ± 0.163	9.142 ± 0.255	5.692 ± 0.580
MSM II	8.396 ± 0.405	5.700 ± 0.369	5.244 ± 0.130	4.372 ± 0.033
Mix I	10.202 ± 0.332	6.300 ± 0.165	8.180 ± 0.215	5.327 ± 0.223
Mix II	9.211 ± 0.183	5.915 ± 0.151	5.587 ± 0.100	5.250 ± 0.179
Carotenoid [mg g^{-1} DW]				
Control	1.110 ± 0.049	0.854 ± 0.014	0.726 ± 0.028	0.626 ± 0.021
IPU I	1.116 ± 0.074	0.856 ± 0.032	0.868 ± 0.028	0.672 ± 0.018
IPU II	1.162 ± 0.038	0.927 ± 0.059	1.005 ± 0.027	0.792 ± 0.064
MSM I	1.105 ± 0.060	0.844 ± 0.026	0.795 ± 0.027	0.701 ± 0.048
MSM II	0.947 ± 0.029	0.707 ± 0.020	0.630 ± 0.013	0.573 ± 0.012
Mix I	0.977 ± 0.055	0.759 ± 0.012	0.796 ± 0.018	0.698 ± 0.033
Mix II	0.919 ± 0.062	0.692 ± 0.022	0.622 ± 0.023	0.637 ± 0.012
Anthocyanin [mg g^{-1} DW]				
Control	0.959 ± 0.041	0.795 ± 0.014	0.929 ± 0.032	0.811 ± 0.013
IPU I	0.900 ± 0.086	0.734 ± 0.029	1.012 ± 0.035	0.831 ± 0.030
IPU II	1.077 ± 0.024	0.853 ± 0.013	1.394 ± 0.069	0.819 ± 0.045
MSM I	0.941 ± 0.091	0.704 ± 0.023	1.081 ± 0.028	0.828 ± 0.035
MSM II	0.655 ± 0.026	0.595 ± 0.031	0.503 ± 0.045	0.476 ± 0.009
Mix I	1.032 ± 0.042	0.781 ± 0.018	0.962 ± 0.010	0.806 ± 0.046
Mix II	0.602 ± 0.077	0.708 ± 0.014	0.629 ± 0.033	0.592 ± 0.028
Total phenolic compounds [mg g-1 DW]				
Control	127.17 ± 2.182	147.08 ± 7.942	135.00 ± 6.325	82.17 ± 4.578
IPU I	89.33 ± 6.333	124.00 ± 5.774	134.67 ± 3.480	97.33 ± 3.383
IPU II	90.00 ± 1.528	139.17 ± 6.797	164.50 ± 4.500	114.33 ± 10.477
MSM I	97.50 ± 6.557	139.67 ± 2.242	151.00 ± 3.215	103.67 ± 7.172
MSM II	77.00 ± 3.215	100.83 ± 5.947	104.00 ± 6.110	83.00 ± 3.786
Mix I	101.67 ± 5.044	112.17 ± 1.481	101.67 ± 2.333	132.50 ± 5.635
Mix II	76.00 ± 8.083	110.50 ± 3.606	74.33 ± 0.882	102.33 ± 5.548
Carbon %				
Control	39.508 ± 0.069	39.455 ± 0.046	39.745 ± 0.135	39.462 ± 0.069
IPU I	39.260 ± 0.100	39.533 ± 0.056	39.410 ± 0.044	39.587 ± 0.042
IPU II	40.080 ± 0.140	39.723 ± 0.123	40.070 ± 0.165	39.550 ± 0.207
MSM I	39.687 ± 0.147	39.540 ± 0.046	39.063 ± 0.043	39.550 ± 0.128
MSM II	39.157 ± 0.066	39.253 ± 0.143	38.850 ± 0.012	39.173 ± 0.077

Mix I	39.317 ± 0.295	39.447 ± 0.147	39.633 ± 0.119	39.217 ± 0.084
Mix II	39.130 ± 0.245	39.483 ± 0.097	39.487 ± 0.087	39.233 ± 0.043
Nitrogen %				
Control	2.988 ± 0.035	2.992 ± 0.031	2.667 ± 0.067	2.435 ± 0.063
IPU I	3.010 ± 0.045	2.907 ± 0.082	2.847 ± 0.049	2.507 ± 0.075
IPU II	3.373 ± 0.055	3.293 ± 0.038	3.273 ± 0.099	2.773 ± 0.135
MSM I	3.070 ± 0.023	2.943 ± 0.018	2.790 ± 0.060	2.610 ± 0.159
MSM II	2.560 ± 0.031	2.787 ± 0.058	2.130 ± 0.051	1.990 ± 0.021
Mix I	3.003 ± 0.057	2.787 ± 0.088	2.623 ± 0.078	2.557 ± 0.003
Mix II	2.873 ± 0.049	2.727 ± 0.047	2.107 ± 0.013	2.287 ± 0.149
Phosphorus %				
Control	1.214 ± 0.016	0.987 ± 0.022	1.219 ± 0.027	1.003 ± 0.016
IPU I	1.286 ± 0.016	0.992 ± 0.027	1.306 ± 0.007	1.062 ± 0.015
IPU II	1.193 ± 0.019	1.051 ± 0.026	1.269 ± 0.016	1.101 ± 0.038
MSM I	1.193 ± 0.009	0.995 ± 0.013	1.281 ± 0.025	1.083 ± 0.021
MSM II	1.111 ± 0.010	0.950 ± 0.040	1.065 ± 0.005	1.031 ± 0.026
Mix I	1.226 ± 0.015	0.918 ± 0.063	1.258 ± 0.016	1.085 ± 0.019
Mix II	1.083 ± 0.013	0.991 ± 0.035	1.049 ± 0.016	1.022 ± 0.018
C:N molar ratio				
Control	15.428 ± 0.169	15.388 ± 0.162	17.435 ± 0.433	18.960 ± 0.470
IPU I	15.218 ± 0.244	15.887 ± 0.452	16.155 ± 0.284	18.452 ± 0.579
IPU II	13.865 ± 0.271	14.070 ± 0.156	14.299 ± 0.386	16.705 ± 0.758
MSM I	15.077 ± 0.082	15.667 ± 0.110	16.343 ± 0.343	17.798 ± 1.038
MSM II	17.843 ± 0.241	16.443 ± 0.387	21.295 ± 0.505	22.961 ± 0.233
Mix I	15.280 ± 0.364	16.542 ± 0.544	17.650 ± 0.540	17.888 ± 0.061
Mix II	15.888 ± 0.190	16.898 ± 0.325	21.860 ± 0.129	20.189 ± 1.385
C:P molar ratio				
Control	84.02 ± 1.236	103.37 ± 2.319	84.30 ± 2.118	101.57 ± 1.607
IPU I	78.73 ± 1.122	102.89 ± 2.912	77.83 ± 0.336	96.12 ± 1.348
IPU II	86.69 ± 1.647	97.57 ± 2.682	81.46 ± 0.879	92.82 ± 2.859
MSM I	85.78 ± 0.932	102.50 ± 1.309	78.69 ± 1.581	94.27 ± 1.898
MSM II	90.88 ± 0.893	106.89 ± 4.419	94.03 ± 0.467	98.06 ± 2.277
Mix I	82.71 ± 1.599	111.79 ± 7.468	81.27 ± 1.000	93.30 ± 1.589
Mix II	93.20 ± 1.545	102.99 ± 3.421	97.10 ± 1.398	99.09 ± 1.701
N:P molar ratio				
Control	5.449 ± 0.098	6.721 ± 0.164	4.840 ± 0.091	5.364 ± 0.067
IPU I	5.174 ± 0.043	6.478 ± 0.109	4.820 ± 0.074	5.217 ± 0.128
IPU II	6.253 ± 0.054	6.934 ± 0.151	5.705 ± 0.163	5.565 ± 0.103
MSM I	5.690 ± 0.077	6.544 ± 0.124	4.819 ± 0.139	5.331 ± 0.311
MSM II	5.095 ± 0.090	6.507 ± 0.300	4.420 ± 0.099	4.271 ± 0.085
Mix I	5.415 ± 0.064	6.799 ± 0.647	4.609 ± 0.084	5.216 ± 0.095
Mix II	5.870 ± 0.166	6.103 ± 0.274	4.443 ± 0.090	4.947 ± 0.289

CHAPITRE IV

Effets des nutriments sur la toxicité de différents ETM

I. Effets des nitrates sur la toxicité du cuivre, un élément essentiel largement utilisé comme fongicide

Nous venons de montrer comment un enrichissement en nitrate pouvait influencer la toxicité de deux herbicides ayant des modes d'action différents : l'isoproturon et le mésosulfuron-méthyl, qu'ils soient seuls ou en mélange (**chapitres III.I et III.II**). Les situations de présence simultanée de ces herbicides et d'un enrichissement en nitrate sont courantes en contexte agricole. Mais, bien que les herbicides constituent une des pollutions majeures des milieux agricoles, ils n'en sont pas pour autant le seul type de polluant. En effet, on retrouve également quantité d'autres molécules organiques utilisées comme pesticides, mais, on retrouve aussi des ETM, comme par exemple le cuivre, largement utilisé comme fongicide (Donnachie et al., 2014). C'est pourquoi, des situations de pollution au cuivre et d'enrichissement en nitrate simultanés sont fréquentes également. Cette fréquence, ainsi que la démonstration dans plusieurs études d'interactions entre les ETM et la ressource du milieu (**tableau I.6**) justifie l'intérêt d'étudier les effets de cette combinaison de facteurs de stress sur les espèces de ces milieux, comme les macrophytes.

Nitrate excess effects prevail over and impede copper effects on Myriophyllum spicatum

Manuscript draft

I.1 Abstract

Copper is used widely as fungicide in organic agriculture and viticulture, and becoming more and more an issue for aquatic ecosystems. Here we investigated if a common aquatic macrophyte, *Myriophyllum spicatum*, is affected by the combined action of copper and nitrate. We performed a 2 x 7 factorial design experiment using axenic cultures grown in media with 2 different nitrate levels based on molar nitrogen-to-phosphorus ratios of 25:1 and 100:1, and copper concentrations from 0 to 1000 µg L^{-1}. Different endpoints were determined based on growth, dry matter content (DMC), pigments, phenolic compounds and elemental stoichiometry. Overall, nitrate effects were much stronger and visible for all measured endpoints, while copper significantly affected only growth rate by length the total phenolic compounds, the carbon content and the C:N ratio. However, several interactive effects were observed for the combined effect of nitrate and copper, which impeded a clear interpretation of individual factor effects. Higher nitrate levels reduced the growth rate based on dry mass, but also increased the DMC. Although high nitrate level increased the nitrogen content, the chlorophyll content was reduced. The principle component analysis showed a clear medium effect, and only a slight copper effect between low and high copper levels in the lower nitrate medium. Exposure to copper at up to 1000 µg L^{-1} did not seem to affect *M. spicatum* strongly, possibly because this species can well accumulate trace metal elements. Responses to copper were less pronounced at the higher nitrate level, possibly because high nitrate availability masked some effects.

Keywords: Chemical ecology; ecological stoichiometry; nitrogen enrichment; multi-stress; plant traits; submerged macrophytes; trace metal element

I.2 Introduction

Human activity has led to diffuse pollution of aquatic ecosystems by agricultural, industrial, and urban activities, among them trace metal elements and nutrient eutrophication. Understanding the combined action of multiple pressures on aquatic biota is thus a

primordial goal in environmental research. Copper is an EU priority pollutant and arriving in aquatic systems via multiple sources, one of them agricultural practices (Donnachie et al., 2014). An increasing demand for organically grown food and wine has led to high copper use as fungicide, resulting in increasing soil pollution. Copper containing run-off from fields and vine yards will merge with other agricultural pollutants, such as nitrate, and then affect aquatic biota in rivers and lakes. On the other hand, copper is an essential metal, which plays important roles in plant metabolism as enzyme co-factor because of its two oxidation states (Hänsch and Mendel, 2009; Taiz et al., 2015). However, this feature makes copper also potentially toxic as it might create free radicals (Hänsch and Mendel, 2009), specifically if high concentrations occur in the environment.

Aquatic plants are at the interface between terrestrial and aquatic systems, and well known to be able to accumulate various trace metals via roots (emergent and free floating macrophytes) or via roots and shoots (submerged growing macrophytes. These primary producers play a key role in providing food, habitat and shelter for a wide range of organisms, and are known for their structuring role in ecosystem functioning in lakes and rivers (Grace and Wetzel, 1978). They are considered also very useful in phytotoxicity testing specifically because of their key role in aquatic ecosystems (Lewis, 1995).

Evidence for trace metal effects on macrophytes range from studies focussing on bioaccumulation and potential use for phytoremediation to their use as bioindicators, based on either accumulation and/or effects observed on growth, morphology or physiology. Species of the genus *Myriophyllum* L. (Haloragaceae; dicotyledonous plants) are frequently used for these purposes.

Myriophyllum aquaticum (Vell.) Verdc. has been shown to accumulate various ETM, among them copper (Harguinteguy et al., 2013, 2016; Yan and Xue, 2013). Whole plants or leaves from different sites exhibited a highly significant correlation between the Cu content in plant tissue and that found in the water, while the correlation was less strong or nonexistent when comparing with the Cu content in sediment (Harguinteguy et al., 2013, 2016). Another species typical for oligotrophic, non calcareous aquatic systems, *M. alterniflorum*, exhibited temporal dynamics in different morphological and physiological biomarkers in response to copper in the medium (Delmail et al., 2011a). It is however striking that their control medium did not contain copper. Plants accumulated only little copper (less than 32 ng mg^{-1}

dry weight) when subjected to 100 µg L^{-1} $CuSO_4$ (Delmail et al., 2011), much less than *M. aquaticum* from field samples (up to 15 µg mg^{-1} dry weight) growing in water containing up to 40 µg L^{-1} Cu (Harguinteguy et al., 2013). However, a prior study had found a significant Cu bioaccumulation in *M. alterniflorum*, up to 93% of the externally applied amount (Ngayila et al.2009), but at the cost of biomass reduction. The same research group had calculated that Cu concentrations of about 5 mg L^{-1} would result in plant Cu contents of about 10 µg mg^{-1} (Ngayila et al. 2007), a value comparable to that found in *M. aquaticum* (Harguinteguy et al. 2013). The same species accumulated up to 163 µg g^{-1} Cu when exposed to sediment porewater Cu concentrations of up to 1510 µg L^{-1} (Caillat et al., 2014). Copper affected *M. spicatum* only when exposed to relatively high concentrations: When grown in a range from 0 to 40000 µg L^{-1} $CuSO_4$, this species exhibited EC50 values between 2190 - 4490 µg L^{-1}, depending on the endpoint chosen (root length, DW, total length, number of nodes) (Sánchez et al., 2007).

It is likely that environmental factors such as conductivity and the presence of other elements and ions will influence the bioavailability and potential deleterious effects of metals on aquatic plants. Such an interaction has been shown between phosphorus and copper acting on periphyton (Serra et al., 2010). In agricultural areas, not only phosphorus, but also nitrogen, specifically in the form of nitrate, is a problem (Schock et al., 2014). However, no study so far has investigated the combined action of nitrate and copper exposure on aquatic plants.

We thus ask if *M. spicatum,* a widespread submerged macrophyte in temperate lakes and rivers, would respond differentially to increasing copper additions in medium containing lower or higher levels of nitrate. We also used *M. spicatum* because it is now the new OECD test organism (OECD TG238 and TG239; OECD 2014a; 2014b). To avoid any modifying effect of bacteria, we used axenic culture conditions (see Nuttens et al., 2016), and a modified culture medium based on the medium described for the first axenic cultures of this species (Kane et al. 1991). Based on the different publications on *M. spicatum* and other *Myriophyllum* species, we expected some negative effects of copper at the highest concentrations used. We also expected that nitrate stress would affect the plants negatively, and that the overall stress for the plants would be enhanced in the combined stressor treatments. In detail, our hypotheses are (1) Cu, as an essential micro-nutrient, will affect *M.*

spicatum only at high concentrations; (2) high nitrate levels will lead to reduced growth and negative effects on plant physiology and (3) high nitrate levels will increase the negative effects caused by high copper concentration exposure.

I.3 Materials and methods

I.3.1 Plant material and culture conditions

Axenic M*yriophyllum spicatum* from stock cultures originating from a mesotrophic lake that has little to no exposure to pesticides, and have been kept in the laboratory (see Gross, 2003), were pre-adapted to a modified half-strength Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962). Pre-cultures were performed in 100 ml Erlenmeyer flasks with modified nitrogen source (KNO_3 15.62 mM, $NaNO_3$ 6 µM; with a N:P molar ratio of 25:1) and 3 g L^{-1} of sucrose, but otherwise unchanged medium (Kane and Gilman, 1991). This medium contains 0.05 µM (3.177 µg L^{-1}) copper, added from a stock solution containing all microelements except iron, which was added separately. Plants were cultivated in a Sanyo MLR 352 climate chamber (Panasonic France) at a day/night temperature regime of 22°C/20°C, a photoperiod of 16 h, and daytime light of 140 µmol photons PAR m^{-2} s^{-1}.

I.3.2 Experiment

We set up a 2 x 7 factorial design experiment with *M. spicatum*, using controls and six concentrations of Cu (0 to 1000 µg L^{-1}) crossed with two level of nitrate (15.625 and 62.5 mM NO_3), resulting in N:P ratios of 25:1 and 100:1. In the following, we name these two media with different nitrate levels NP-25 and NP-100, respectively, and NP-100 is considered the “nitrate enrichment”. The N:P molar ratios were selected based on environmental ratios of dissolved inorganic nitrogen and phosphorus (TDN:TDP) found in undisturbed or nitrogen-enriched areas (Demars and Edwards, 2007; Hessen, 2013; Ventura et al., 2008). The standard medium contains 0.05 µM Cu, equivalent to approx. 3.18 µg L^{-1}, applied from a stock solution containing all microelements of the modified Murashige & Skoog medium (Nuttens et al., 2016).

From the pre-cultures, we cut 2 cm long apices and placed equal numbers in each medium for 5 days to allow for wound healing and acclimation to test conditions. Three replicates with each 4 apices from each medium served as starting control samples. We took their

length and fresh weight after carefully blotting the shoots with paper tissue. Then shoots were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry weight determination and chemical analyses (see below).

The experiment was performed in 250 mL cell culture flasks (BD Falcon^{TM}) containing 150 mL medium. For each treatment combination (nitrate level x herbicide concentration), we used three flasks as individual replicates. Herbicide dose-response curves were performed by adding the following concentrations to the normal media: 0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500, 1000 µg L^{-1} Cu. Each flask contained four apices. Stock solution of Cu (as $CuSO_4$ x 5 H_2O; Riedel-deHaën®, 99%) had been prepared in ultrapure water (sterile filter Millipak 40 Durapore 0.22 µm). We used three replicates for the controls, to which we added an equal amount of ultrapure water (150 µL per 150 mL) as used in the Cu treatments.

The experimental conditions were the same as described above for the pre-cultures except that flasks were repositioned in a random way each day to account for the slight light and temperature differences within the growth chamber. The test ran for 14 days, and we renewed the medium at day 7.

I.3.3 Growth responses

The relative growth rates for length (RGR-L) and dry mass (RGR-DW) were calculated as: RGR-L = ($\ln_{L\ at\ T14}$ - $\ln_{L\ at\ T0}$) / 14 and RGR-DW = ($\ln_{DW\ at\ T14}$ - $\ln_{DW\ at\ T0}$) / 14 for plant running for 14 days. Dry matter content (DMC) is defined as the ratio of DW / FW.

I.3.4 Chemical Analyses

Dried plants were mechanically ground into a fine powder using a ball mill *(*Fritsch pulverisette 23 GmbH, M301*)* for 2 min at 30 Hz. Total chlorophyll (chl, sum of chl a and b) and total carotenoids (car); were extracted with acetone and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 at 8/2 [v/v]; and anthocyanins (aty) with methanol, ultrapure water, and 37% HCl at 80/20/1 [v/v/v]. Absorptions were measured using a Varian Cary 50 Bio UV/Visible Spectrophotometer. Multiple wavelength readings at 470, 664 and 647 nm were used for chlorophyll and carotenoids; at 532 and 653 nm for anthocyanins. Concentrations of chlorophyll, carotenoids and anthocyanins were obtained using equations by Lichtenthaler and Wellburn (1983) and Murray and Hackett (1991). All pigment concentrations were converted to the exact mass weighed per sample. Total phenolic compounds (TPC) were

quantified with the Folin-Ciocalteu method modified to 2.4 ml sample volume after Gross et al. (1996).

Carbon and nitrogen contents were obtained with 1.5 to 2 mg plant powder, and samples were then incinerated in an elemental analyzer *Carlo-ERBA Na 2100 CE Instrument* using a calibration with EDTA. Phosphorus was determined after alkaline digestion (1 M NaOH and 0.5 M $Na_2S_2O_8$) of approx. 1 mg powder for 2 h at 120°C and 1 bar followed by spectrophotometric quantification (AFNOR 1990) using an automated analyzer (Konelab 420-XTi, Thermofischer).

I.3.5 Statistical analyses

The statistical analyses were conducted using R software. Homoscedasticity and normality were verified respectively by the Levene and Shapiro–Wilk tests, and if needed a log-transformation of the data was performed. When the conditions were met, two-way ANOVAs with nitrate levels and continuous herbicide concentrations as factors were performed using a probability threshold of $p \leq 0.05$. Post hoc Tukey HSD tests were done to separate differences between pairs of treatments. Non-parametric data were analysed using Kruskal–Wallis tests followed by Kruskal–Wallis post hoc tests. Principal component analysis (PCA) was performed on the set of endpoints to visualize differences in endpoint responses according to the experimental conditions. The contribution of each variable on the different axes (i.e. the quality of representation of variables upon axes) were computed and called column inertia.

I.4 Results

Copper affected only few endpoints in *Myriophyllum spicatum* significantly (although several p-values are marginally significant), while the high nitrate treatment (NP-100) affect all measured parameters, and often interaction effects were observed for both factors (Table 1). Concentrations mentioned below for copper are those added to the normal medium concentration of 0.05 µM / 3.177 µg L^{-1}, as stated in the methods section. Results are summarized in **tables IV.1** and **IV.2**, and selected results are visualized in **figure IV.1**.

Table IV.1 Results for nitrate and copper effects and the interaction of both factors on *Myriophyllum spicatum* endpoints based on 2 way-ANOVAs or Kruskal-Wallis ANOVAs (for non-parametric data) after 14 days of exposure (Residual df = 34).

	NO_3 [a] *(df = 1)*		Conc.[b] *(df = 6)*		NO_3 x Conc. *(df = 6)*	
	F	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)
RGR-L	18.273	**< 0.001**	4.256	**0.004**	2.949	**0.023**
RGR-DM	48.348	**< 0.001**	1.383	0.256	3.495	**0.011**
DMC	170.410	**< 0.001**	0.525	0.784	0.525	0.784
WC	195.646	**< 0.001**	0.657	0.684	0.652	0.689
Chl a+b	151.526	**< 0.001**	1.696	0.159	3.851	**0.006**
Chl a/b	502.526	**< 0.001**	2.387	*0.055*	10.293	**< 0.001**
Car	22.792	**< 0.001**	2.002	*0.099*	2.089	*0.087*
Aty	95.203	**< 0.001**	0.785	0.589	0.390	0.879
TPC	18.827	**< 0.001**	13.740	**< 0.001**	7.346	**< 0.001**
C:N	72.795	**< 0.001**	3.176	**0.017**	1.745	0.147
C:P	Kruskal-Wallis χ^2 = 35.171, df = 13, *p*-value **< 0.001**					
N:P	140.467	**< 0.001**	1.988	0.101	2.093	*0.086*
C	5.280	0.029	2.664	**0.036**	7.503	**< 0.001**
N	58.681	**< 0.001**	2.421	*0.052*	1.644	0.172
P	51.361	**< 0.001**	2.130	*0.081*	2.556	**0.042**

([a] = Nitrate/ NO_3; [b] = Concentration)

Growth and morphological endpoints

The growth rate based on dry mass (RGR-DM) was with about 0.07 / day higher than that measured for length (RGR-L) with about 0.055 /day in NP-25. Both growth rates were strongly reduced in the NP-100 medium (**Figure IV.1 a, Tables IV.1 and IV.2**). Copper affected RGR-L, but the only difference remaining after post-hoc tests was that between 0.5 and 1000 µg L^{-1} copper addition in NP-25 (**Table IV.2**). Weak interaction effects for both growth rates underline the complex interactions. The dry matter content was increased in the NP-100 medium compared to NP-25, with no differences based on copper addition (**Figure IV.1 b**), and inverse effects due to nitrate level were observed for water content which was reduced in NP-100 compared to NP-25.

Pigments and phenolic compounds

Nitrate level strongly affected the total chlorophyll content (chl a+b; **Figure IV.1 c**), but not copper. In NP-100, total chlorophyll content and the chl a/b ratio (**Table IV.2**) were strongly reduced compared to NP-25. In NP-25 medium, copper addition tended to increase

chlorophyll content with the exception of 5 µg L^{-1}, and it significantly increased the chl a/b ratio for all copper additions compared to the control. No such effects were observed in NP-100 medium. Overall, this resulted in significant interaction effects for both chl a+b and chl a/b. The carotenoid content was reduced at the higher N:P ratio, but only marginally affected by copper.

A similar effect than for chlorophyll was observed for anthocyanins, with higher levels under NP-25 compared to NP-100, but no copper effects (**Figure IV.1 d**). Complex interaction effects for total phenolic compounds (TPC, **table IV.2**) were observed, with a peak in TPC in NP-25 at 500 µg L^{-1}, and generally weaker differences between both media than observed for anthocyanins. In NP-100, all copper additions lead to an increase in TPC compared to the control.

Plant stoichiometry

Complex patterns are observed for carbon, nitrogen and phosphorus (C, N, P). While the effects of nitrate and copper on the C content were weak, differences at high and low copper additions lead to a strong interaction effect. As expected, nitrogen content increased strongly when more nitrogen was available in NP-100 (**Figure IV.1 e**). In NP-100, plants exhibited generally lower P-contents, but at relatively high absolute P-contents (**Figure IV.1 g**). This is clearly reflected also in the higher N:P, higher C:P and lower C:N molar ratio in NP-100 medium compared to NP-25 (**Figure IV.1 f & h, table IV.2**). In many cases, the addition of 5 µg L^{-1} copper to the NP-25 media resulted in different responses than those observed for lower and higher concentrations, resulting in “butterfly”-like graphs (e.g. chl a+b and %P, **Figure IV.1 c & g**).

Principal component analysis (PCA)

The PCA confirms the general impression that copper has very little effects on all measured endpoints compared to nitrate level (**Figure IV.2**). Only for NP-25, the lower copper additions (0 – 5 µg L^{-1}) shifted the spheres a bit to the upper left. Axes 1 and 2 explain together more than 72% of the variation. Differences along axis 1 are caused by growth rates, pigments and P-content and in opposite direction by DMC, as well as the C:P and N:P ratio. No factor is directly linked to axis 2, but N-content, the C:N molar ratio and carotenoids explain most of the variation along axis 2.

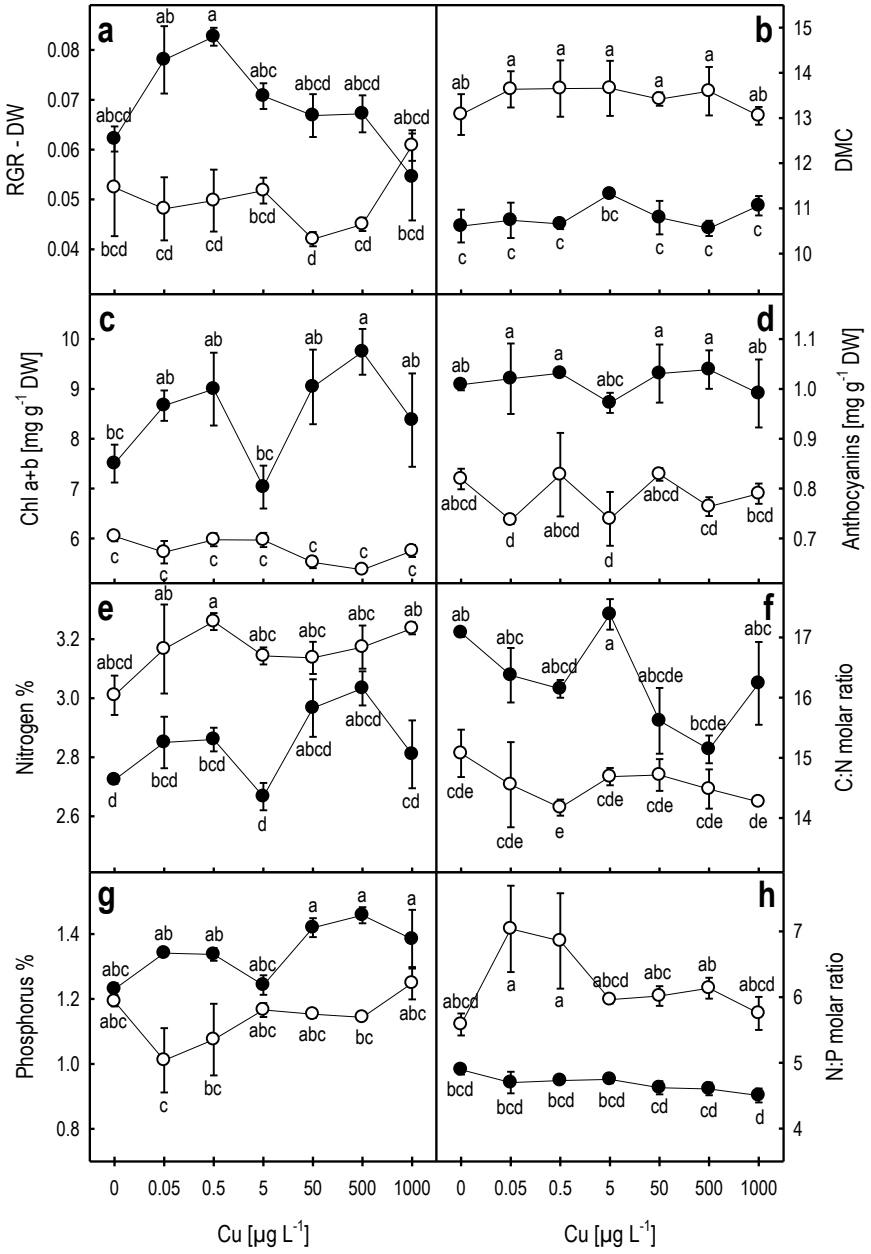


Figure IV.1. Response of *Myriophyllum spicatum* to increasing copper concentrations (additional copper added to normal media concentrations), in media with standard medium nitrate levels (NP-25; dark circles) and high nitrate levels (NP-100; white circles), after 14 days of exposure. Relative growth rate by dry weight, (RGR-DW; **a**), dry matter content (DMC; **b**), total chlorophyll content, (Chl a+b; **c**), anthocyanin content (**d**), nitrogen and phosphorus content in [%] (**e** & **g**), and C:N and C:P molar ratios (**f** & **h**). Data are expressed as means ± 1 SEM with n = 3; values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

Table IV.2. Results for all measured endpoints in *Myriophyllum spicatum* based on different copper additions (indicated in µg L^{-1} in the left-hand column) and nitrate level (N:P = 25:1 and 100:1). Data are presented as means ± 1 SEM with n = 3. Results of Tukey post-hoc tests after 2-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA (see **Table IV.1**) are indicated by letter code. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

Endpoints	**Copper (Cu)**					
	N:P = 25:1			**N:P = 100:1**		
	Means	± SEM		Means	± SEM	
RGR-L [mm day^{-1}]						
0	0.050	± 0.001	abcd	0.051	± 0.001	abcd
0.05	0.058	± 0.003	ab	0.047	± 0.004	abcd
0.5	0.061	± 0.000	a	0.050	± 0.002	abcd
5	0.054	± 0.001	abc	0.048	± 0.002	abcd
50	0.051	± 0.002	abcd	0.042	± 0.002	cd
500	0.050	± 0.002	abcd	0.038	± 0.004	d
1000	0.044	± 0.006	bcd	0.049	± 0.003	abcd
RGR-DM [mg DW day^{-1}]						
0	0.062	± 0.003	abcd	0.052	± 0.010	bcd
0.05	0.078	± 0.007	ab	0.048	± 0.006	cd
0.5	0.083	± 0.002	a	0.050	± 0.006	cd
5	0.071	± 0.003	abc	0.052	± 0.003	bcd
50	0.067	± 0.004	abcd	0.042	± 0.001	d
500	0.067	± 0.004	abcd	0.045	± 0.001	cd
1000	0.055	± 0.009	abcd	0.061	± 0.003	bcd
Dry matter content (DMC)						
0	10.61	± 0.36	c	13.08	± 0.45	ab
0.05	10.74	± 0.39	c	13.63	± 0.40	a
0.5	10.65	± 0.11	c	13.65	± 0.63	a
5	11.32	± 0.06	bc	13.66	± 0.61	a
50	10.80	± 0.37	c	13.42	± 0.15	a
500	10.56	± 0.17	c	13.59	± 0.54	a
1000	11.06	± 0.22	c	13.05	± 0.20	ab
Water content (WC)						
0	8.45	± 0.32	a	6.67	± 0.27	bc
0.05	8.34	± 0.34	a	6.35	± 0.21	c
0.5	8.39	± 0.10	a	6.36	± 0.33	c
5	7.84	± 0.04	ab	6.35	± 0.33	c
50	8.28	± 0.31	a	6.45	± 0.08	c
500	8.48	± 0.15	a	6.38	± 0.29	c
1000	8.05	± 0.18	a	6.67	± 0.12	bc

Chlorophyll (a+b) [mg g^{-1} DW]						
0	7.50	±	0.38	bc	6.05 ± 0.10	c
0.05	8.67	±	0.31	ab	5.72 ± 0.23	c
0.5	9.00	±	0.73	ab	5.97 ± 0.13	c
5	7.03	±	0.43	bc	5.97 ± 0.14	c
50	9.04	±	0.75	ab	5.52 ± 0.12	c
500	9.74	±	0.46	a	5.37 ± 0.05	c
1000	8.37	±	0.94	ab	5.75 ± 0.12	c
Chlorophyll a /b						
0	2.39	±	0.01	bc	2.30 ± 0.01	cd
0.05	2.53	±	0.01	a	2.15 ± 0.01	e
0.5	2.55	±	0.01	a	2.14 ± 0.03	e
5	2.52	±	0.02	a	2.23 ± 0.03	de
50	2.45	±	0.07	ab	2.15 ± 0.03	e
500	2.47	±	0.02	ab	2.149 ± 0.01	e
1000	2.43	±	0.01	ab	2.222 ± 0.02	de
Carotenoids [mg g^{-1} DW]						
0	1.04	±	0.04	ab	0.98 ± 0.03	b
0.05	1.10	±	0.03	ab	1.04 ± 0.03	ab
0.5	1.21	±	0.05	ab	1.08 ± 0.02	ab
5	1.02	±	0.03	ab	1.02 ± 0.02	ab
50	1.24	±	0.10	ab	0.99 ± 0.02	b
500	1.28	±	0.08	a	0.99 ± 0.02	b
1000	1.17	±	0.120	ab	1.038 ± 0.019	ab
Anthocyanins [mg g^{-1} DW]						
0	1.01	±	0.01	ab	0.82 ± 0.02	abcd
0.05	1.02	±	0.07	a	0.74 ± 0.01	d
0.5	1.03	±	0.01	a	0.83 ± 0.08	abcd
5	0.97	±	0.02	abc	0.74 ± 0.05	d
50	1.03	±	0.06	a	0.83 ± 0.01	abcd
500	1.04	±	0.04	a	0.77 ± 0.02	cd
1000	0.99	±	0.07	ab	0.79 ± 0.02	cd
Total polyphenol content (TPC; mg g^{-1} DW)						
0	84.64	±	1.43	abc	55.80 ± 2.06	d
0.05	79.44	±	6.04	bc	80.92 ± 2.68	bc
0.5	78.07	±	3.50	bc	74.63 ± 2.14	c
5	86.65	±	5.11	abc	85.41 ± 1.16	abc
50	91.91	±	3.56	ab	85.48 ± 1.21	abc
500	99.30	±	1.86	a	86.31 ± 0.53	abc
1000	81.39	±	3.75	bc	85.41 ± 1.24	abc
Carbon %						
0	39.88	±	0.06	a	38.86 ± 0.16	c
0.05	39.94	±	0.16	a	39.34 ± 0.11	abc
0.5	39.59	±	0.19	ab	39.61 ± 0.07	ab
5	39.73	±	0.12	a	39.58 ± 0.05	ab
50	39.63	±	0.17	ab	39.56 ± 0.02	abc
500	39.36	±	0.27	abc	39.37 ± 0.08	abc

1000	39.00	±	0.13	bc	39.60	±	0.22	ab
Nitrogen %								
0	2.72	±	0.01	d	3.01	±	0.07	abcd
0.05	2.85	±	0.09	bcd	3.17	±	0.15	ab
0.5	2.86	±	0.04	bcd	3.26	±	0.03	a
5	2.67	±	0.05	d	3.14	±	0.03	abc
50	2.97	±	0.10	abcd	3.14	±	0.06	abc
500	3.03	±	0.06	abcd	3.17	±	0.07	abc
1000	2.81	±	0.12	cd	3.24	±	0.02	ab
Phosphorus %								
0	1.23	±	0.02	abc	1.19	±	0.02	abc
0.05	1.34	±	0.01	ab	1.01	±	0.10	c
0.5	1.34	±	0.02	ab	1.08	±	0.11	bc
5	1.24	±	0.03	abc	1.16	±	0.02	abc
50	1.42	±	0.03	a	1.15	±	0.01	abc
500	1.46	±	0.03	a	1.14	±	0.004	bc
1000	1.38	±	0.09	a	1.25	±	0.05	abc
C:N molar ratio								
0	17.08	±	0.07	ab	15.07	±	0.40	cde
0.05	16.37	±	0.45	abc	14.55	±	0.71	cde
0.5	16.15	±	0.15	abcd	14.17	±	0.13	e
5	17.38	±	0.25	a	14.69	±	0.15	cde
50	15.61	±	0.55	abcde	14.72	±	0.26	cde
500	15.14	±	0.23	bcde	14.48	±	0.33	cde
1000	16.24	±	0.69	abc	14.27	±	0.04	de
C:P molar ratio								
0	83.61	±	1.15	c	84.06	±	1.01	bc
0.05	76.79	±	0.64	def	102.46	±	10.98	a
0.5	76.36	±	0.76	ef	97.33	±	11.23	a
5	82.52	±	1.807	cd	87.59	±	1.67	ab
50	72.07	±	1.794	f	88.48	±	0.90	a
500	69.67	±	1.436	f	88.76	±	0.35	a
1000	73.25	±	4.716	f	82.08	±	3.43	cde
N:P molar ratio								
0	4.90	±	0.08	bcd	5.59	±	0.17	abcd
0.05	4.70	±	0.16	bcd	7.04	±	0.66	a
0.5	4.73	±	0.004	bcd	6.86	±	0.73	a
5	4.75	±	0.06	bcd	5.96	±	0.06	abcd
50	4.62	±	0.10	cd	6.02	±	0.15	abc
500	4.60	±	0.10	cd	6.14	±	0.16	ab
1000	4.50	±	0.11	d	5.75	±	0.25	abcd

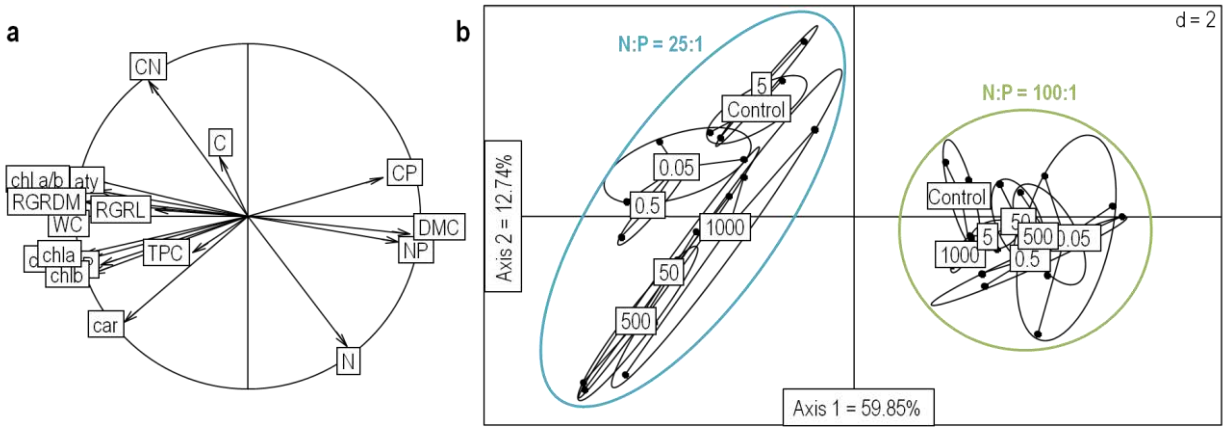


Figure IV.2. Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum*. **a -** Correlation circle, **b** - all treatment combinations; after 14 days of exposure to copper additions from 0 (control) to 1000 µg L^{-1}. A percentage of 59.85 and 12.74 of the total inertia were explained by the first two axes, respectively. Investigations showed that more than 70% of the column inertia were explained by dry matter content (DMC), water content (WC), chlorophyll (chl a, chl b, chl tot, and chl a/b), anthocyanins (aty) phosphorus content (P) and N:P ratio; whereas nitrogen content (N), C:N ratio and carotenoids (car) were the most structuring variables of the second axis.

I.5 Discussion

The aim of this study was to evaluate combined nutrient and trace metal pollution effects, in the form of high nitrate enrichment and copper, on *Myriophyllum spicatum*. Overall, the main effects were caused by high nitrate levels in the medium. Although we had used a range of copper concentrations that span across environmentally relevant concentrations up to concentrations that have, at least in some studies, been shown to have negative effects on the growth or physiology of this or other *Myriophyllum* species, we found only very little effects. Most effects were observed in the lower nitrate medium, and it might have been that nitrate stress was masking effects in the high nitrate medium. In the following we will detail our findings based on the three initial hypotheses.

I.5.1 Copper will affect *M. spicatum* only at high concentrations

The existing studies for copper effects on *M. spicatum* or other *Myriophyllum* species are showing no clear picture, as sometimes effects were observed already at rather low concentrations of 100 µg $CuSO_4$ L^{-1} (equivalent to about 39.8 µg [Cu] L^{-1}; Delmail et al.,

2011), while others report EC50 values of up to several milligrams (Sánchez et al., 2007). Our study showed only weak effects on length growth but not biomass increase, and this only for the higher copper concentrations used (500 and 1000 µg L^{-1}). The sensitive effects on the softwater *M. alterniflorum* observed by Delmail et al. (2011) at low concentrations have been obtained using a low ion strength medium based on the ionic composition of water from a stream in South-western France. This might explain the higher sensitivity, as Sánchez et al. (2007) worked with a modified Andrews medium, the medium now used for the axenic plant-water OECD test system (OECD, 2014a), which has much higher concentrations of macronutrients, but contains also sucrose at 3%. Our test system also used axenic conditions as applied in both studies cited before, but based on a modified Murashige & Skoog medium (Kane and Gilman, 1991; Murashige and Skoog, 1962; Nuttens et al., *in press*). Our data are rather in agreement with those found by Sanchez et al. 2007, as their EC50 values for $CuSO_4$ have also to be multiplied by 0.4 to yield the pure [Cu] exposure of the plants.

In contrast to our experiments with the two organic herbicides isoproturon and mesosulfuron-methyl (Nuttens et al., 2016), copper did neither affect the DMC nor pigment content in *M. spicatum*. Rather low $CuSO_4$ concentrations caused a decline in chlorophylls in *M. alterniflorum* under axenic conditions (Delmail et al., 2011a), but the same species responded with an increase in chlorophyll b under higher copper concentrations (Ngayila et al., 2009). It is possible that *Myriophyllum* species control the uptake of elements, including copper, buy endodermis-like structures also developed in leaves, as proposed by (Delmail et al., 2011a). If and how such structures affect the uptake of possible toxic elements needs to be further studied. A strong protection from uptake would be in contrast to other findings suggesting that *Myriophyllum* species are rather strong accumulators of trace metal elements (Harguinteguy et al., 2016, 2013).

Although we observed a few further significant effects of copper on the different endpoints chosen, there was no significant trend with increasing copper concentrations. Instead, all significant Cu effects were accompanied by significant interaction effects, showing that no easy explanation is possible, but that nitrate level also affected the response. Slight effects were often observed for the two lowest Cu concentrations (0.05 and 0.5 µg L^{-1}) added. If the nominal concentration of our microelement stock solution was assumed at 3.177 µg L^{-1}, such a slight addition should have had no effect. Yet, it might be that the absolute concentration

of Cu had decreased with time in the stock solution, and then plants responded to the slight increase in Cu availability. The analysis of the culture media and plant tissue for Cu should bring more clarity on the actual exposure concentration and possible plant uptake. It should be noted that the analysis in plant material is impeded by the low biomass yields per test tube. Future experiments should take into account possible interactions between media components and the trace metal pollutant used, as this might also affect the bioavailability for the plants.

Overall, it can be concluded that copper was only slightly affecting *M. spicatum* at the higher concentrations added, thus the first hypothesis could be confirmed.

I.5.2 High nitrate levels will lead to reduced growth and negative effects on plant physiology

The growth of plants is considered to be affected by the most limiting nutrient ("Liebig's Law"), but there is more and more evidence that also the ratio of certain elements is crucial for the good development of different plants (Demars and Edwards, 2007; Güsewell and Koerselman, 2002; Sterner and Elser, 2002). In short, plants might also show a certain homeostasis, specifically with the N:P ratio realised in plant tissue (Demars and Edwards, 2007; Güsewell and Koerselman, 2002; Sistla et al., 2015). Thus, a strong imbalance in the medium N:P ratio, such as applied in our study, should lead to strong effects in the plant.

All measured endpoints were affected by the N:P ratio of the medium. The lower growth rates and the higher DMC under high nitrate conditions suggest negative effects on plant performance. This is underlined by the lower chlorophyll content in the NP-100 medium. We cannot fully exclude indirect effects by the higher ionic strength (conductivity) of the NP-100 medium. However, *M. spicatum* is a species also found in brackish water (Grillas, 1990; van Wijck et al., 1994), and seems to be tolerant to higher conductivity waters.

Plant elemental composition and stoichiometry were strongly affected by the medium nitrate content. The higher nitrogen content in NP-100 medium is not surprising, but the lower phosphorus content in this medium shows that plants were unable to maintain the same P content despite sufficiently high concentrations in the medium (as verified by measurements of the final medium; data not shown). In consequence, all molar ratios (C:N, C:P and N:P) differed between both media. The increased C:P ratio in NP-100 medium can be

explained by the lower P content, and the even stronger effect on the N:P ratio in this medium by a concomitant decline in P content together with an increase in N content. Due to the high overall macronutrient concentrations in both media used, the measured C:N, C:P and N:P ratios are largely different from those found in situ under oligo- or eutrophic conditions (Frost and Hicks, 2012; Xia et al., 2014). Xia et al. (2014) found a mass-based C:P ratio of about 123:1 for eutrophic systems; this would need to be multiplied by 2.21 to yield the molar C:P ratio. Our molar C:P ratios were about 90:1 in the NP-100 medium compared to 70-80:1 in the NP-25 medium. Also the molar C:N ratios were with about 14:1 in the NP-100 and 16:1 in the NP-25 rather low.

In conclusion, we can mostly confirm our hypothesis that high nitrate levels impeded growth and physiology of *M. spicatum*. Still, plants were rich in macronutrients due to the high availability in both media, and the differences caused in the stoichiometry by the increase in nitrates were relatively low compared to differences found between plants originating from nutrient-poor vs. nutrient-rich habitats. It would be interesting to see how nitrate pulses act on nutrient limited plants, and if the here observed effects would then be enhanced in *M. spicatum*.

I.5.3 High nitrate levels will increase the negative effects caused by high copper concentration exposure

The combined effects of both nitrate enrichment and copper pollution caused some significant interaction effects, specifically for carbon (C) content, content in total phenolic compounds (TPC), but also total chlorophyll content and the chlorophyll a/b ratio. However, neither C nor TPC explained much of the variance observed based on the correlation circle for the PCA. Chlorophyll content and a high chl a/ b ratio were more strongly related to growth rate, which can be expected as the content and ratio of these pigments determines the photosynthetic capacity of plants. Despite the few interaction effects observed, it is difficult to decide if and how high nitrate levels increased the negative effects caused by copper. This is mainly due to the fact that we observed very little copper effects. Thus at present, we would not support the third hypothesis.

II. Effets des variations en azote et phosphore sur les effets de l'arséniate

Nous n'avons pas montré de réelle toxicité du cuivre pour *M. spicatum* dans notre expérimentation (**chapitre IV.I**), en revanche nous avons montré des effets importants de l'enrichissement du milieu en nitrate sur la physiologie et la stœchiométrie de la plante. Cette absence d'effet du cuivre peut s'expliquer par le fait que *M. spicatum* est une espèce reconnue comme accumulatrice d'ETM (Yan and Xue, 2013). De plus, le cuivre étant un ETM essentiel à la croissance des plantes (Hänsch and Mendel, 2009; Taiz et al., 2015), même une plante non-accumulatrice peut en tolérer des doses relativement importantes. On peut donc se demander si d'autres ETM, non-essentiels, comme l'arséniate ou le cadmium, pourraient induire des effets plus marqués que le cuivre sur la plante.

L'arséniate est un analogue chimique du phosphate et donc il peut entrer en compétition avec ce dernier au niveau des transporteurs du phosphate (Rahman and Hasegawa, 2011). C'est pourquoi nous nous sommes interrogées sur les conséquences d'augmentation des teneurs du milieu en phosphate sur les effets de cet ETM. En outre, comme l'enrichissement des milieux en nitrate est fréquente, et a montré des effets importants dans nos expérimentations nous avons jugés pertinent de nous y intéresser.

Are potential sublethal effects of arsenate for the aquatic macrophyte Myriophyllum spicatum modified by changes in the nitrogen-to-phosphorus ratio of the culture medium?

Draft manuscript

II.1 Abstract

Arsenic is a trace metal pollutant of worldwide concern and found in many aquatic systems, where it can be absorbed by aquatic plants. The submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* is known to accumulate significant concentrations of arsenic, but at some costs in terms of reduced growth at higher exposure concentrations. Arsenate, the most abundant form in oxic waters, is competing with phosphate uptake. This is why we tested whether changes in absolute and relative phosphorus availability would affect the impact of arsenate on *M. spicatum*. In a 3 x 5 factorial design experiment, we exposed axenic plants to 3 concentrations of arsenate (0, 0.625 and 6.25 µM As(V) in five different media based on molar ratios for N:P of 10:1, 25:1 and 40:1, and by modifying either the absolute concentration of nitrogen or phosphorus in the medium. Exposure time was either 7 or 14 days. We used a range of different endpoints based on growth, pigments, elemental stoichiometry and total phenolic compounds to see effects at different levels. However, we found only very little effects of arsenate exposure. Only one medium, called N10 thus with modification of the absolute nitrogen content and an N:P ratio of 10:1, was different compared to all other media. Multivariate analyses based on a Partial Least Squares (PLS) analysis revealed the most important endpoints for both exposure times as chlorophyll a, total chlorophyll, carbon and nitrogen content, the C:N molar ratio of the plants, and additionally the N:P ratio for 7 days exposure. The negligible effects of arsenate might be explained by a high tolerance of *M. spicatum* towards this trace metal, and the medium rich in nutriments. The distinct differences for the N10 medium might be explained by its medium composition. Future experiments should use lower absolute nutrient concentrations to match better environmental conditions.

II.2 Introduction

Trace metal elements (ETM) are naturally occurring in aquatic ecosystems in varying quantity and composition due to the bedrock and catchment geological characteristics. However, because of anthropogenic activities ETM levels have extremely increased and thus have become a huge threat for the environment and the organisms living in it (Rai, 2009). Arsenic (As), a metalloid because of its metallic and non metallic properties, is ubiquitous in aquatic environments and represents one of the most toxic and carcinogenic elements (Hughes, 2002; Tripathi et al., 2014). As occurrence in water mainly results from natural sources like mineral and geothermal inputs, but human mining activities, burning of fossil fuels and uses in medicine and agriculture (livestock treatments and pesticides) also contributes to As release in aquatic systems (Rahman and Hasegawa, 2011; Smedley and Kinniburgh, 2002). In the environment As exist in four oxidation states: arsenate - As(V), arsenite - As(III), arsenic - As(0), and arsine - As(-III) (Sharma and Sohn, 2009), but As(V) and As(III) represent the predominant forms of As in terrestrial as well as in aquatic environments (Rahman and Hasegawa, 2011; Robinson et al., 2006). The accumulation of arsenic compounds in water and its entry in the food chain affect ecosystem functioning and are one of the most important public health concerns (Leão et al., 2014), because it has been shown that As consumption, even at low doses, was responsible for an increased incidence in human cancer (Mandal and Suzuki, 2002).

In aquatic ecosystems, the entry of As in the food chain can be facilitated by the accumulation in macrophytes (Robinson et al., 2006). In fact, some macrophytes are known to accumulate As, and more generally ETM (Grudnik and Germ, 2010; Rahman et al., 2008, 2007; Tripathi et al., 2014). Such accumulation (or even hyperaccumulation) capacities are used for phytoremediation of contaminated water and sediment (Rahman and Hasegawa, 2011; Tripathi et al., 2014). But they also allow the use of certain aquatic plants as bioindicators in biomonitoring of ETM pollution (Guittonny-Philippe et al., 2014; Rahman and Hasegawa, 2011; Yabanli et al., 2014; Zhou et al., 2008).

As(V), the major As compound in oxic waters (Rahman and Hasegawa, 2011), is a chemical analog of phosphate and is absorbed by the same transporter ; whereas As(III) is transported through aquaporin channels (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002; Meharg and Macnair, 1991). As(V) can exert toxicity in plants directly by replacing phosphate in phosphorylation

reactions or indirectly after reduction to As(III) by the plant (Rahman and Hasegawa, 2011). As(III) is more toxic than As(V) because of its high affinity for protein thiol groups (Tripathi et al., 2012). Globally, As induce the production of reactive oxygen species and so create oxidative stress causing DNA, protein and lipid damages, and leading to plant growth inhibition (Tripathi et al., 2014, 2012). Accumulator macrophytes can mitigate these effects by establishing detoxification strategies that comprise various antioxydant molecules and enzymes, glutathione, phytochelatins, or amino acids like proline and compatible solutes (Leão et al., 2014; Srivastava et al., 2005; Tripathi et al., 2007).

The genus *Myriophyllum* includes accumulator macrophyte species of which some, like *M. alterniflorum*, are already used as bioindicator (Guittonny-Philippe et al., 2014). A recent study has shown that trophic water state can modify the *M. alterniflorum* response to As(V): eutrophic conditions were leading to stronger toxicity for the plant (Krayem et al., 2016). They explain this effect by ammonium toxicity in the eutrophic condition (Krayem et al., 2016). Also some other studies have been dealing with nutrient concentrations in aquatic systems and effects of ETM (Bian et al., 2013; Chia et al., 2015), thus it seems timely to investigate in more detail the interaction of nutrient availability and ETM effects on aquatic plants. In view of these studies, and considering the fact that As(V) is a competitor to phosphate for phosphate transporters, we conclude that the interactive effect between nutrients and ETM such as As are more complicated than just caused by ammonium toxicity, as suggested by Krayem et al. (2016).

That is why we decided to investigate the combined effect of As(V) and macronutrient availability and molar ratio on another *Myriophyllum* species, *M. spicatum* L., the new OECD test organism (OECD, 2014a; 2014b), but also known as ETM accumulator (Lesage et al., 2007).

Considering the interactive effects of phosphate availability and As uptake in *Lemna* (Mkandawire and Gert Dudel, 2012), we wanted to know if absolute phosphorus availability, or the molar N:P ratio of the medium would modify effects of As on *M. spicatum.* We thus modified the medium used to cultivate our axenic *M. spicatum*, the so called ½ Min A to reflect 3 different molar ratios of N:P, 10:1, considered the P-enrichment conditions, N:P = 25:1, considered normal conditions based on published studies (Demars and Edwards, 2007; Ventura et al., 2008) and N:P = 40:1, considered the N-enrichment conditions. While the NP-

25 (short form for N:P = 25:1) medium was considered the control, we modified either the absolute N or P content for the 10:1 and 40:1 molar ratios, yielding the conditions N-10 and P10 as well as N40 and P40, with N and P reflecting the element modified.

Specifically, we predicted that conditions with a high N:P ratio, indicative of P restrictions, would enhance negative effects of As, and that these effects would be even more pronounced if the high N:P ratio was caused by a lower absolute concentration of P.

II.3 Materials and methods

II.3.1 Plant material and culture conditions

We used axenic cultures of M*yriophyllum spicatum* originating from own stock cultures (see Gross, 2003). Pre-cultures were performed in 100 ml Erlenmeyer flasks with modified nitrogen source (KNO_3 9.4 mM, NH_4NO_3 3.113 µM; with a N:P molar ratio of 25:1) and 3 g L^{-1} of sucrose, but otherwise unchanged medium (Kane and Gilman, 1991). Plants were cultivated in a Sanyo MLR 352 climate chamber (Panasonic France) at a day/night temperature regime of 22°C/20°C, a photoperiod of 16 h, and daytime light of 140 µmol photons PAR m^{-2} s^{-1}.

We set up a 3 x 5 factorial design experiment with *M. spicatum*, using controls and two concentrations of As(V), crossed with five different media (**Table IV.3**). The N:P molar ratio of the standard medium was modified to represent situations of "phosphorus excess" (N:P = 10:1) or "nitrogen excess" (N:P = 40:1) compared to the normal ratio of N:P = 25:1. We used two different ways to adjust the lower or higher N:P molar ratios, either by adjusting the nitrogen concentration of the medium (N10 and N40) or by adjusting the phosphorus concentration (P10 and P40). The ratio of N:P = 25:1 was based on mean values often found in submerged macrophytes (Demars and Edwards, 2007; Ventura et al., 2008), and is called NP25 in the following. We explicitly changed both absolute concentrations of N and P and their ratio to be able to distinguish between both factors.

From the pre-cultures, we cut 2 cm long apices and placed equal numbers in each medium for 5 days to allow healing of the cut and acclimation to test conditions. Three replicates with each 4 apices from each medium served as starting control samples. We took their length and fresh weight after carefully blotting the shoots with paper tissue. Then shoots

were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry weight determination and chemical analyses (see below).

Table IV.3 Nitrogen and phosphorus sources and concentrations of the five different media in which *Myriophyllum spicatum* was cultivated.

	Medium				
Molar ratio	**N:P = 10:1**		**N:P = 25:1**	**N:P = 40:1**	
Nutrients [mM]	**N10**	**P10**	**NP25**	**N40**	**P40**
KH_2PO_4	0.625	1.563	0.625	0.625	0.391
KNO_3	6.250	9.400	9.400	9.400	9.400
NH_4NO_3	0.000	3.113	3.113	7.800	3.113
Total N	6.250	15.625	15.625	25.000	15.625

The experiment was performed in 250 mL cell culture flasks (BD Falcon™) containing each 150 mL medium. For each condition, we used three flasks as individual replicates, each containing 4 apices, at concentrations of 0.625 or 6.250 µM of As(V) (47 or 468 µg L^{-1} As in the form of Na_2HAsO_4, respectively). The experiment was run in duplicate: one set ran for 7 days, and the other one ran for 14 days. Stock solutions of As(V) had been prepared in ultrapure water (sterile filter Millipak 40 Durapore, 0.22 µm). We used three replicates for the controls, to which we added an equal amount of distilled water (150 µL per 150 mL) as used in the As(V) treatments.

Flasks were daily randomly repositioned to account for slight light and temperature differences within the growth chamber. At the end of the experiment (day 7 and 14), plants were harvested and the four shoots per flask were washed for 5 min in a 5 mM $CaCl_2$ solution to detach external phosphate, followed by a short rinse in distilled water.

II.3.2 Growth analyses

We measured individual shoot length including eventual side shoots of all apices used in the experiment, including those used as start values. We also took a photo of all four apices per flask. Fresh mass was determined from shoots carefully blotted dry with tissue paper. Then shoots were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry mass determination and chemical analyses. The relative growth rates for length (RGR-L) and dry mass (RGR-DM) were calculated as: RGR-L = ($\ln_{L\ at\ T7}$ - $\ln_{L\ at\ T0}$) / 7 and RGR-DM = ($\ln_{DM\ at\ T7}$ - $\ln_{DM\ at\ T0}$) / 7 for plant running for 7 days, and as : RGR-L = ($\ln_{L\ at\ T14}$ - $\ln_{L\ at\ T0}$) / 14 and RGR-DM = ($\ln_{DM\ at\ T14}$ - $\ln_{DM\ at}$

$_{T0}$) / 14 for plant running for 14 days. Dry matter content (DMC) is defined as the ratio of DM / FM.

II.3.3 Chemical analyses

Dried plants were mechanically ground into a fine powder using a ball mill *(*Fritsch puliverisette 23; Idar-Oberstein, Germany*)* for 2 min at 30 Hz. We performed micro-analyses using 0.5 to 2 mg plant material depending on the method. Chlorophyll was extracted with acetone and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 at 8/2 [v/v], and anthocyanins with methanol, ultrapure water, and 37% HCl at 80/20/1 [v/v/v]. Multiple wavelength readings at 470, 664 and 647 nm for carotenoids, chlorophyll a and b; and 532 and 653 nm for anthocyanins were used to calculate final concentrations using established equations (Lichtenthaler and Wellburn, 1983; Murray and Hackett, 1991). Total phenolic compounds (TPC) were quantified according to the Folin-Ciocalteu method using tannic acid as standard (Fornoff and Gross, 2014).

Carbon (C) and nitrogen (N) contents were determined in an elemental analyzer *Carlo-ERBA Na 2100 CE Instrument* with EDTA as standard. Phosphorus (P) in plant samples was determined based on the AFNOR protocol (1990) using alkaline digestion (1 N NaOH and 0.5 M $Na_2S_2O_8$) of approx. 1 mg powder for 2 h at 120°C and 1 bar followed by spectrophotometric quantification in an automated analyzer (Konelab 420-XTi, Thermofischer).

II.3.4 Statistical analyses

The statistical analyses were conducted using Tanagra 1.4.5 and R software. Since only some endpoints showed differences between the different conditions, and principal component analyses (PCA) based on all measured endpoints turned out to obscure the results (data not shown), we decided to analyse the data in a more global way. Partial least-squares (PLS) regression analysis allowing draw relationships between a set of endpoint and exposure conditions was carried out on the whole set of endpoints (using Tanagra 1.4.5 software). The analysis was performed independently for data obtained after 7 and 14 days of exposure (respectively T7 and T14). The generated variable important in the projection (VIP, **table IV.4**) values reflected the importance of each variable in the model, with VIP > 1 (or around 1) indicating important predictors. Cumulated correlations (R^2, allowing the global view of

the quality of representation of each variable of each endpoints with the two axes of the PLS) and weight of each set of variables on each component (how each variable contributes to the definition of the component, and what the sign of the correlation is) are also presented in **Table IV.4**.

Table IV.4 Results of Partial Least-Squares (PLS) conducted with experimental groups after 7 days of exposure (T7) or 14 days of exposure (T14). Variable Important in the Projection (VIP) in bold reflecting the most important predictor biomarkers, R^2 assessing the quality of representation of each variable and Weight axis used to define the contribution of each variable and the correlation sign.

	T7				T14			
Endpoints	**VIP**	**R^2**	**Weight axis 1**	**Weight axis 2**	**VIP**	**R^2**	**Weight axis 1**	**Weight axis 2**
RGR-L	0.822	0.081	-0.205	-0.345	1.397	0.500	-0.349	-0.181
RGR-DM	0.577	0.014	-0.144	-0.410	0.115	0.004	0.029	0.176
DMC	0.215	0.077	-0.054	0.323	0.181	0.015	-0.045	0.020
WC	0.181	0.069	0.045	-0.329	0.167	0.018	0.042	-0.047
Chl a	**1.417**	**0.762**	**0.354**	**-0.183**	**1.058**	**0.626**	**0.265**	**-0.209**
Chl b	0.654	0.238	0.164	-0.256	0.457	0.373	0.114	-0.455
Chl tot	**1.354**	**0.730**	**0.339**	**-0.216**	**0.942**	**0.624**	**0.235**	**-0.303**
car	1.144	0.470	0.286	-0.109	0.641	0.092	0.160	0.113
aty	0.525	0.020	0.131	0.305	0.791	0.381	-0.198	0.191
TPC	0.473	0.160	0.118	-0.283	0.108	0.006	0.027	0.193
C	**1.502**	**0.638**	**0.376**	**0.063**	**1.786**	**0.791**	**0.446**	**0.251**
N	**1.511**	**0.680**	**0.378**	**0.021**	**1.567**	**0.902**	**0.392**	**-0.009**
P	0.037	0.025	0.009	-0.282	0.712	0.488	0.178	-0.366
C:N	**1.488**	**0.660**	**-0.372**	**-0.019**	**1.583**	**0.888**	**-0.396**	**-0.014**
C:P	0.120	0.002	0.030	0.234	0.674	0.438	-0.169	0.347
N:P	**1.438**	**0.501**	**0.360**	**0.176**	1.265	0.195	0.316	0.434

The selected endpoints are shown in bold: chlorophyll a and total, C and N content, as well as C:N and N:P ratios for T7 and same endpoints minus N:P ratios for T14 (N:P ratio has not been retained because of its low R^2). Then, a two-way multivariate analysis of variance (MANOVA) analysis with medium composition and concentration of As(V) as fixed factors using a probability threshold of $p \leq 0.05$. Principal component analyses (PCA) were performed on the selected set of endpoints at day 7 and at day 14 to visualize differences in

endpoint responses according to the experimental conditions. Significant differences between PCA groups defined by the combination medium x herbicide x concentration have been assessed with Hotelling test (MANOVA, PCA and Hotelling tests have been performed with R software).

II.3 Results

Myriophyllum spicatum exposed to three levels of arsenate (0, 0.625 and 6.25 µM) in five different media reflecting different nitrogen and phosphorus concentrations and resulting molar N:P ratios at 10:1, 25:1 and 40:1 exhibited remarkably few differences for all measured endpoints. Since only some endpoints showed differences between the five conditions, we decided to analyse the data in a more global way using multivariate analyses of variance (MANOVA) on the most important predictor endpoints. Results were separately analysed for the two sampling dates to see the development over time.

The global MANOVA shows highly significant medium and arsenate as well as strong interaction effects at day 7, while at day 14 only medium remained a significant explanatory factor for the variance observed (**Table IV.5**).

Table IV.5 Respective effects of each factor (medium and arsenate) and their interactive effects on *Myriophyllum spicatum* (two-way multivariate analysis of variance - MANOVA, significant differences at $p < 0.05$), after 7 (T7) and 14 (T14) days of exposure (residuals df = 30).

Factors	**T7**			**T14**		
	df	*approx F*	Pr (*F*)	df	*approx F*	Pr (*F*)
Medium	4	10.030	**<0.001**	4	7.866	**<0.001**
Arsenate	2	4.603	**<0.001**	2	1.204	0.317
Medium x Arsenate	8	3.230	**<0.001**	8	1.184	0.278

In most cases, effects were very different for medium N10 compared to all other media. For example, the nitrogen content was lower resulting in a higher C:N ratio at both sampling dates (**Figure IV.3 e, h**). A lower chlorophyll content was not only observed in N10 but also P10 at day 7 (**Figure IV.3 a**), but the effect for P10 faded at day 14 (**Figure IV.3 b**).

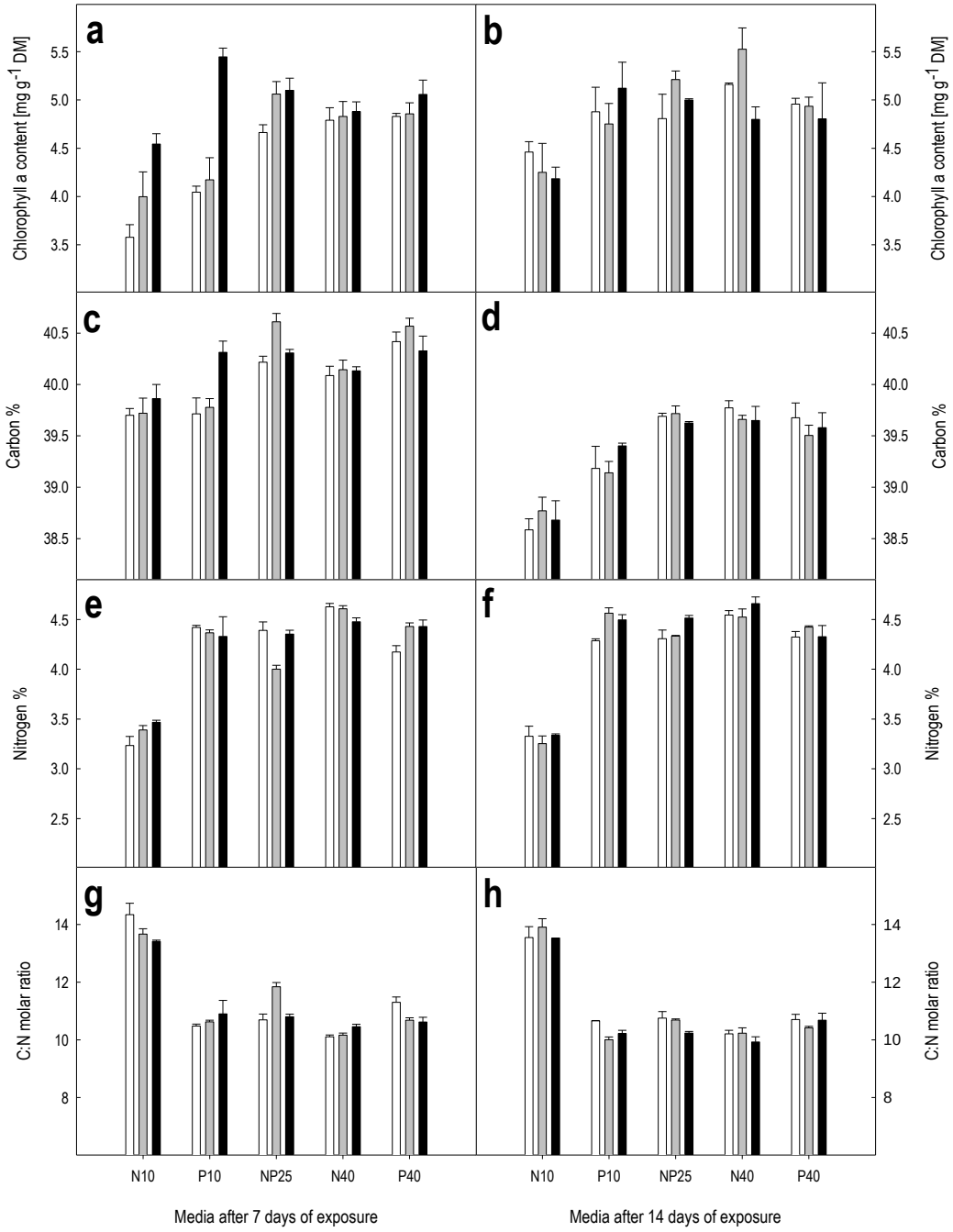


Figure IV.3 Effects of As(V) at two concentrations (47 and 468 µg L-1; grey and black bars, respectively) compared to controls (white bars) for four endpoints and two sampling dates. The selection of endpoints has been based on the results of the Partial Least-Squares (PLS) analysis shown in **Table IV.4**. Data are shown as means ± 1 SEM. No letter code for differences between conditions are given for this type of statistical analysis.

Based on the endpoints identified by the PLS analysis, we run new PCAs for day 7 and day 14 (**Figure IV.4**). For day 7, the first axis explained 67.48% and the second axis 22.13% of the variability. Thus in total almost 90% of the variability could be explained by focussing on the six major endpoints. A similar result was observed for day 14, with more than 93% of the variability explained by the five remaining endpoints; here the first axis explained 78.74% and the second axis 15.32% of the variability.

The correlation circles show almost the same pattern between both dates (**Figure IV.4 a, c**). The inverse relationship between N and C:N molar ratio is not surprising. Carbon was parallel to the vectors for chlorophyll a and total chlorophyll at day 7, but at day 14, it was found closer to nitrogen. The N:P ratio appears only at day 7.

In the PCAs, we basically see two groups (**Figure IV.4 b, d**): One to the right encompassing the N10 medium for all As levels, and one to the left containing all other media at the different As levels. The treatments P10-As-0 and P10-As-I at day 7 are slightly outside the main group, and distinct from the P10-As-II treatment; and this difference disappears for day 14.

The results from the Hotelling test (**Table IV.6**) show only one effect for comparisons between As levels within a given medium. We found a marginal difference between P10-As-0 and P10-As-II for day 7.

Differences for media were also tested with the Hotelling test, but not all possible medium combinations were included to increase the power of the test. We focussed on two aspects, growing N:P ratios and comparison within one level of N:P ratio but with different absolute nutrient concentrations. The distinct grouping of the N10 medium is confirmed by this analysis (**Table IV.6**), which shows significant differences for all As levels with N40, with P10 (for T14 and As-0 only marginal effect), and with NP25 (for T7 and As-0 only marginal effect). Other differences based on Hotelling tests were observed for the comparison of NP25 with N40 at day 7 for As-I and As-II, and between NP25 and P40 for day 14 at As-I and As-II. When comparing within the same N:P ratio but with different absolute nutrient concentrations, then we observed mostly (5 out of 6) significant differences between N10 and P10, but no significant differences between N40 and P40.

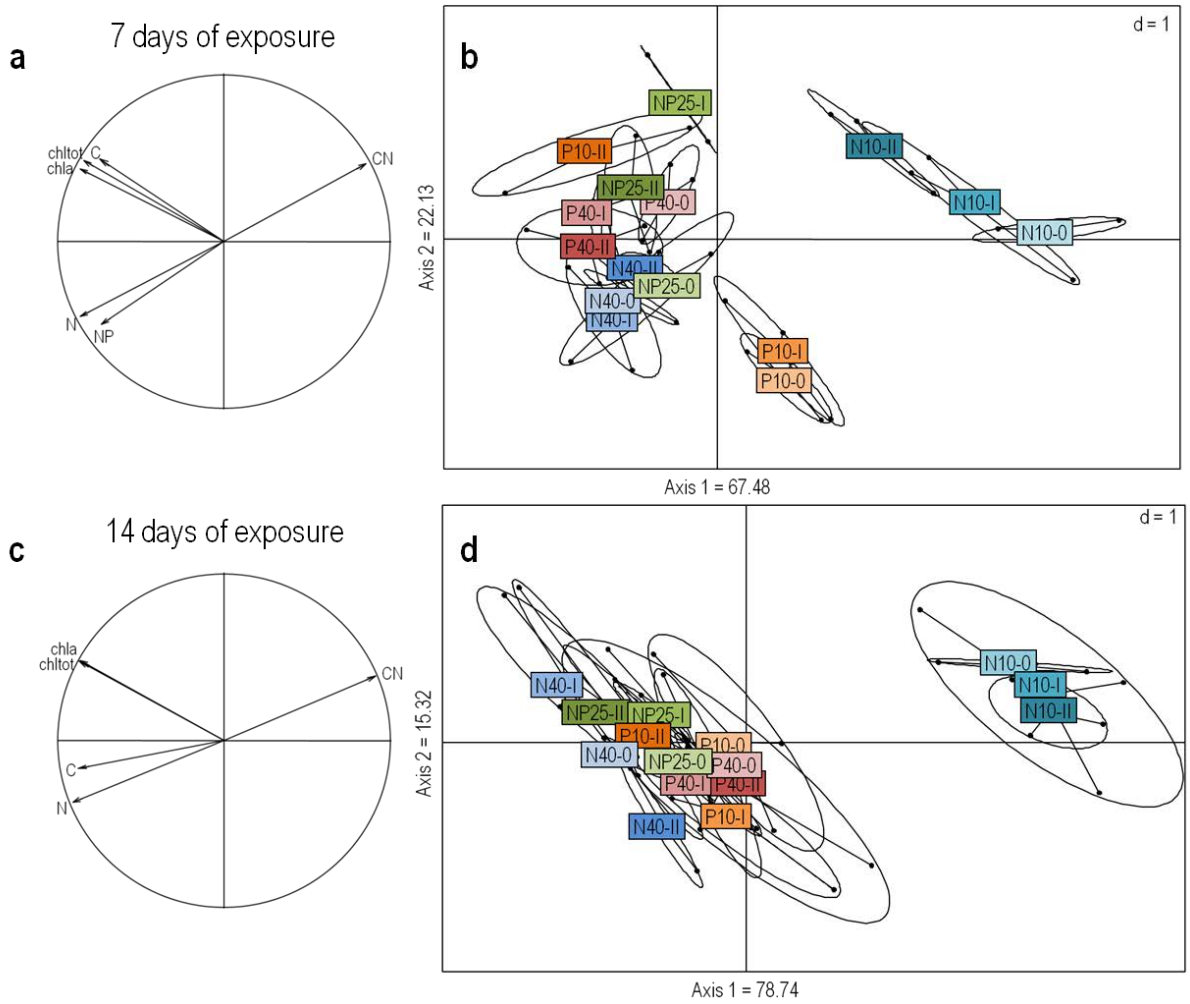


Figure IV.4 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum* exposed to different arsenate levels (control = 0; low level = I, high level = II) in five different media (N10, N40, NP25, P10 and P40 based on modifications of either the nitrogen or phosphorus content and the respective N:P molar ratios). **a, c -** Correlation circles for day 7 and day 14, **b, d** - all treatment combinations; after 7 or 14 days of exposure.

Table IV.6 Hotelling test results (significant differences at $p < 0.05$) for pair-wise comparisons of PCA groups defined by the combination of the two studied factors on *M. spicatum*: (i) in five different media (N10, N40, NP25, P10 and P40 based on modifications of either the nitrogen or phosphorus content and the respective N:P molar ratios; and (ii) arsenate: 0, 0.625 (I) or 6.250 µM (II); after 7 (T7) or 14 (T14) days of exposure.

Comparisons		**T7**	**T14**	**Comparisons**		**T7**	**T14**
Within each medium				**Between increasing N:P ratios**			
N10	0 x I	0.623	0.617	N10 x N40	0 x 0	**0.035**	**0.015**
	0 x II	0.202	0.617		I x I	**0.026**	**0.041**
	I x II	0.623	0.617		II x II	**0.016**	**0.015**
P10	0 x I	0.730	0.372	N10 x NP25	0 x 0	0.060	**0.049**
	0 x II	**0.053**	0.372		I x I	**0.018**	**0.047**
	I x II	0.182	0.372		II x II	**0.018**	**0.006**
NP25	0 x I	0.239	0.660	NP25 x N40	0 x 0	0.343	0.402
	0 x II	0.239	0.464		I x I	**0.046**	0.454
	I x II	0.197	0.265		II x II	**0.046**	0.454
N40	0 x I	0.516	0.711	N10 x P40	0 x 0	**0.048**	0.129
	0 x II	0.496	0.571		I x I	**0.048**	0.124
	I x II	0.496	0.571		II x II	**0.048**	0.124
P40	0 x I	0.565	0.979	P10 x P40	0 x 0	0.126	0.595
	0 x II	0.776	0.979		I x I	0.127	0.325
	I x II	0.830	0.979		II x II	0.126	0.325
				P10 x NP25	0 x 0	0.275	0.583
					I x I	0.104	0.091
Between same ratio					II x II	0.276	0.091
N10 x P10	0 x 0	**0.046**	0.065	NP25 x P40	0 x 0	0.422	0.993
	I x I	**0.046**	**0.014**		I x I	0.026	**0.002**
	II x II	**0.046**	**0.014**		II x II	0.708	**0.021**
N40 x P40	0 x 0	0.277	0.091	P10 x N40	0 x 0	**0.028**	0.153
	I x I	0.277	0.388		I x I	**0.028**	0.211
	II x II	0.641	0.500		II x II	0.059	0.130

Table IV.7 Results for all measured endpoints based on different media: N:P = 10: 1 with modifications of N (N10) or P (P10), N:P = 25 (25), or N:P = 40 with modifications of N (N40) or P (P40); and arsenate concentrations of zero (0), 0.625 (I) or 6.250 µM (II). Data are presented as means ± 1 SEM with n = 3.

Endpoints		**T7**	**T14**	**T7**	**T14**
		RGRL [mm day^{-1}]		**RGRDM [mg DW day^{-1}]**	
N10	As 0	0.054 ± 0.003	0.070 ± 0.003	0.051 ± 0.004	0.068 ± 0.001
	As I	0.068 ± 0.004	0.063 ± 0.002	0.080 ± 0.005	0.067 ± 0.002
	As II	0.073 ± 0.001	0.065 ± 0.002	0.085 ± 0.001	0.068 ± 0.001
P10	As 0	0.049 ± 0.001	0.057 ± 0.004	0.059 ± 0.002	0.058 ± 0.007
	As I	0.045 ± 0.002	0.058 ± 0.002	0.049 ± 0.003	0.062 ± 0.001
	As II	0.059 ± 0.003	0.054 ± 0.002	0.077 ± 0.006	0.056 ± 0.007
NP25	As 0	0.051 ± 0.006	0.055 ± 0.001	0.059 ± 0.006	0.049 ± 0.016
	As I	0.057 ± 0.004	0.055 ± 0.001	0.058 ± 0.001	0.061 ± 0.002
	As II	0.068 ± 0.003	0.053 ± 0.003	0.057 ± 0.009	0.058 ± 0.006
N40	As 0	0.039 ± 0.001	0.056 ± 0.004	0.063 ± 0.004	0.065 ± 0.002
	As I	0.063 ± 0.005	0.061 ± 0.001	0.061 ± 0.000	0.069 ± 0.001
	As II	0.060 ± 0.002	0.053 ± 0.002	0.065 ± 0.001	0.053 ± 0.009
P40	As 0	0.040 ± 0.002	0.054 ± 0.001	0.059 ± 0.005	0.106 ± 0.046
	As I	0.050 ± 0.001	0.055 ± 0.001	0.064 ± 0.012	0.060 ± 0.003
	As II	0.045 ± 0.003	0.054 ± 0.002	0.045 ± 0.016	0.053 ± 0.010
		DMC		**WC**	
N10	As 0	9.705 ± 0.056	7.740 ± 0.072	9.305 ± 0.060	11.921 ± 0.119
	As I	9.287 ± 0.211	8.025 ± 0.105	9.779 ± 0.241	11.466 ± 0.163
	As II	8.958 ± 0.207	7.781 ± 0.275	10.175 ± 0.264	11.885 ± 0.472
P10	As 0	9.017 ± 0.068	7.917 ± 0.271	10.091 ± 0.084	11.660 ± 0.419
	As I	8.968 ± 0.119	8.215 ± 0.035	10.155 ± 0.150	11.173 ± 0.052
	As II	9.220 ± 0.118	7.567 ± 0.152	9.850 ± 0.137	12.226 ± 0.264
NP25	As 0	8.894 ± 0.252	7.771 ± 0.878	10.261 ± 0.314	12.201 ± 1.479
	As I	9.445 ± 0.079	8.058 ± 0.107	9.590 ± 0.089	11.414 ± 0.164
	As II	9.136 ± 0.193	7.219 ± 0.059	9.956 ± 0.228	12.856 ± 0.113
N40	As 0	8.631 ± 0.086	8.001 ± 0.065	10.588 ± 0.116	11.500 ± 0.102
	As I	9.245 ± 0.026	7.818 ± 0.168	9.817 ± 0.031	11.803 ± 0.280
	As II	9.258 ± 0.046	7.794 ± 0.079	9.802 ± 0.054	11.834 ± 0.131
P40	As 0	9.164 ± 0.097	7.967 ± 0.083	9.915 ± 0.116	11.557 ± 0.130
	As I	9.139 ± 0.078	8.019 ± 0.071	9.944 ± 0.093	11.472 ± 0.110
	As II	9.290 ± 0.135	7.489 ± 0.298	9.769 ± 0.157	12.394 ± 0.522
		Chl a [mg g^{-1} DW]		**Chl b [mg g^{-1} DW]**	
N10	As 0	3.578 ± 0.131	4.461 ± 0.107	2.851 ± 0.023	2.994 ± 0.064
	As I	3.999 ± 0.257	4.251 ± 0.299	2.936 ± 0.165	2.984 ± 0.122
	As II	4.542 ± 0.108	4.185 ± 0.118	3.144 ± 0.092	3.031 ± 0.071
P10	As 0	4.045 ± 0.062	4.878 ± 0.254	2.952 ± 0.035	3.317 ± 0.099
	As I	4.173 ± 0.228	4.752 ± 0.211	2.849 ± 0.049	3.080 ± 0.149
	As II	5.446 ± 0.091	5.122 ± 0.269	3.150 ± 0.012	3.241 ± 0.087

NP25	As 0	4.662	±	0.081	4.807	±	0.252	3.137	±	0.033	3.288	± 0.093
	As I	5.061	±	0.130	5.211	±	0.089	3.063	±	0.014	3.224	± 0.034
	As II	5.100	±	0.126	4.998	±	0.014	2.999	±	0.052	3.285	± 0.006
N40	As 0	4.790	±	0.129	5.160	±	0.015	3.049	±	0.111	3.289	± 0.072
	As I	4.829	±	0.155	5.526	±	0.219	2.952	±	0.045	3.311	± 0.192
	As II	4.880	±	0.101	4.798	±	0.130	2.854	±	0.048	3.255	± 0.048
P40	As 0	4.829	±	0.031	4.956	±	0.061	3.075	±	0.071	3.146	± 0.039
	As I	4.855	±	0.114	4.935	±	0.094	3.226	±	0.020	3.026	± 0.032
	As II	5.057	±	0.149	4.804	±	0.374	3.120	±	0.050	3.130	± 0.199
		Chl tot [mg g^{-1} DW]						**Car [mg g^{-1} DW]**				
N10	As 0	6.429	±	0.138	7.455	±	0.171	0.051	±	0.007	0.268	± 0.007
	As I	6.935	±	0.422	7.235	±	0.416	0.126	±	0.023	0.213	± 0.049
	As II	7.686	±	0.200	7.217	±	0.110	0.168	±	0.006	0.142	± 0.060
P10	As 0	6.997	±	0.096	8.194	±	0.352	0.058	±	0.007	0.168	± 0.016
	As I	7.022	±	0.269	7.832	±	0.351	0.164	±	0.059	0.228	± 0.043
	As II	8.596	±	0.080	8.363	±	0.344	0.485	±	0.038	0.284	± 0.088
NP25	As 0	7.799	±	0.112	8.095	±	0.239	0.148	±	0.023	0.217	± 0.088
	As I	8.124	±	0.144	8.435	±	0.105	0.364	±	0.055	0.333	± 0.034
	As II	8.099	±	0.175	8.283	±	0.007	0.380	±	0.044	0.193	± 0.005
N40	As 0	7.840	±	0.239	8.449	±	0.078	0.229	±	0.016	0.271	± 0.039
	As I	7.780	±	0.167	8.837	±	0.408	0.308	±	0.058	0.387	± 0.029
	As II	7.734	±	0.118	8.053	±	0.178	0.381	±	0.038	0.119	± 0.023
P40	As 0	7.904	±	0.043	8.103	±	0.069	0.295	±	0.030	0.291	± 0.041
	As I	8.082	±	0.099	7.961	±	0.124	0.210	±	0.057	0.363	± 0.021
	As II	8.177	±	0.127	7.934	±	0.536	0.338	±	0.090	0.254	± 0.085
		Aty [mg g^{-1} DW]						**TPC [mg g^{-1} DW]**				
N10	As 0	1.214	±	0.065	1.774	±	0.125	60.180	±	4.452	65.118	± 2.438
	As I	1.354	±	0.051	1.512	±	0.030	75.893	±	5.170	77.963	± 2.922
	As II	1.332	±	0.029	1.445	±	0.037	86.620	±	12.881	72.240	± 2.839
P10	As 0	1.063	±	0.008	1.469	±	0.077	64.285	±	3.377	69.617	± 2.860
	As I	1.128	±	0.028	1.113	±	0.110	66.308	±	3.607	61.346	± 4.913
	As II	1.103	±	0.052	1.249	±	0.027	90.272	±	3.561	70.588	± 2.891
NP25	As 0	1.236	±	0.129	1.314	±	0.064	77.594	±	5.967	74.375	± 5.049
	As I	1.543	±	0.008	1.284	±	0.104	87.856	±	2.820	63.335	± 1.015
	As II	1.386	±	0.043	1.141	±	0.025	84.507	±	2.353	62.562	± 2.204
N40	As 0	1.340	±	0.033	1.331	±	0.052	78.268	±	5.697	73.686	± 1.730
	As I	1.289	±	0.062	1.181	±	0.071	65.213	±	2.324	67.234	± 2.406
	As II	1.475	±	0.085	1.304	±	0.034	80.309	±	5.311	74.490	± 2.309
P40	As 0	1.484	±	0.071	1.401	±	0.044	87.067	±	2.774	73.956	± 4.709
	As I	1.473	±	0.037	1.189	±	0.013	84.888	±	0.362	63.411	± 5.650
	As II	1.008	±	0.115	1.547	±	0.085	69.632	±	7.462	74.896	± 5.385
		C						**N**				
N10	As 0	39.700	±	0.067	38.587	±	0.107	3.233	±	0.092	3.327	± 0.101
	As I	39.720	±	0.147	38.770	±	0.133	3.390	±	0.045	3.253	± 0.078
	As II	39.863	±	0.137	38.680	±	0.189	3.467	±	0.022	3.337	± 0.015

P10	As 0	39.713	±	0.155	39.183	±	0.215	4.420	±	0.021	4.287	±	0.019
	As I	39.777	±	0.087	39.140	±	0.111	4.367	±	0.028	4.563	±	0.054
	As II	40.313	±	0.108	39.403	±	0.027	4.330	±	0.197	4.497	±	0.052
NP25	As 0	40.217	±	0.058	39.690	±	0.031	4.390	±	0.085	4.307	±	0.087
	As I	40.610	±	0.081	39.717	±	0.075	4.000	±	0.040	4.333	±	0.007
	As II	40.307	±	0.035	39.625	±	0.014	4.353	±	0.038	4.515	±	0.026
N40	As 0	40.087	±	0.090	39.773	±	0.069	4.627	±	0.035	4.543	±	0.047
	As I	40.143	±	0.094	39.660	±	0.040	4.607	±	0.032	4.523	±	0.082
	As II	40.133	±	0.038	39.650	±	0.137	4.477	±	0.039	4.660	±	0.067
P40	As 0	40.417	±	0.094	39.677	±	0.143	4.173	±	0.064	4.323	±	0.055
	As I	40.567	±	0.078	39.503	±	0.100	4.430	±	0.036	4.423	±	0.012
	As II	40.327	±	0.144	39.580	±	0.145	4.430	±	0.064	4.327	±	0.113
		P						**C:N molar ratio**					
N10	As 0	1.318	±	0.014	1.453	±	0.010	14.341	±	0.395	13.550	±	0.377
	As I	1.393	±	0.027	1.412	±	0.032	13.669	±	0.182	13.911	±	0.290
	As II	1.377	±	0.007	1.526	±	0.014	13.411	±	0.050	13.519	±	0.015
P10	As 0	1.530	±	0.006	1.871	±	0.016	10.479	±	0.065	10.660	±	0.012
	As I	1.525	±	0.012	1.845	±	0.021	10.624	±	0.059	10.005	±	0.100
	As II	1.500	±	0.010	1.909	±	0.051	10.900	±	0.471	10.222	±	0.112
NP25	As 0	1.352	±	0.114	1.761	±	0.017	10.691	±	0.204	10.756	±	0.224
	As I	1.535	±	0.039	1.752	±	0.024	11.844	±	0.143	10.689	±	0.036
	As II	1.535	±	0.146	1.805	±	0.236	10.799	±	0.093	10.236	±	0.055
N40	As 0	1.508	±	0.025	1.791	±	0.127	10.105	±	0.064	10.211	±	0.119
	As I	1.401	±	0.024	1.724	±	0.157	10.163	±	0.074	10.232	±	0.188
	As II	1.463	±	0.012	1.818	±	0.042	10.456	±	0.082	9.928	±	0.178
P40	As 0	1.417	±	0.027	1.723	±	0.009	11.300	±	0.187	10.707	±	0.177
	As I	1.423	±	0.033	1.688	±	0.031	10.680	±	0.084	10.415	±	0.055
	As II	1.342	±	0.031	1.694	±	0.023	10.620	±	0.162	10.681	±	0.246
		C:P molar ratio						**N:P molar ratio**					
N10	As 0	77.721	±	0.828	68.478	±	0.374	5.429	±	0.178	5.061	±	0.124
	As I	73.569	±	1.592	70.851	±	1.397	5.382	±	0.064	5.094	±	0.063
	As II	74.662	±	0.444	65.368	±	0.552	5.568	±	0.054	4.835	±	0.036
P10	As 0	66.940	±	0.266	54.017	±	0.504	6.389	±	0.055	5.067	±	0.045
	As I	67.283	±	0.470	54.736	±	0.623	6.334	±	0.075	5.471	±	0.035
	As II	69.301	±	0.571	53.316	±	1.466	6.386	±	0.323	5.220	±	0.194
NP25	As 0	77.908	±	7.203	58.139	±	0.590	7.308	±	0.776	5.410	±	0.130
	As I	68.382	±	1.894	58.492	±	0.904	5.770	±	0.090	5.472	±	0.066
	As II	68.877	±	6.083	59.644	±	7.766	6.371	±	0.519	5.815	±	0.727
N40	As 0	68.564	±	0.994	57.859	±	4.262	6.785	±	0.100	5.676	±	0.482
	As I	73.927	±	1.275	60.305	±	5.349	7.276	±	0.173	5.886	±	0.462
	As II	70.731	±	0.606	56.315	±	1.294	6.765	±	0.081	5.676	±	0.159
P40	As 0	73.602	±	1.355	59.395	±	0.331	6.521	±	0.231	5.550	±	0.082
	As I	73.604	±	1.789	60.384	±	1.035	6.893	±	0.185	5.799	±	0.118
	As II	77.562	±	1.757	60.285	±	0.613	7.311	±	0.271	5.648	±	0.102

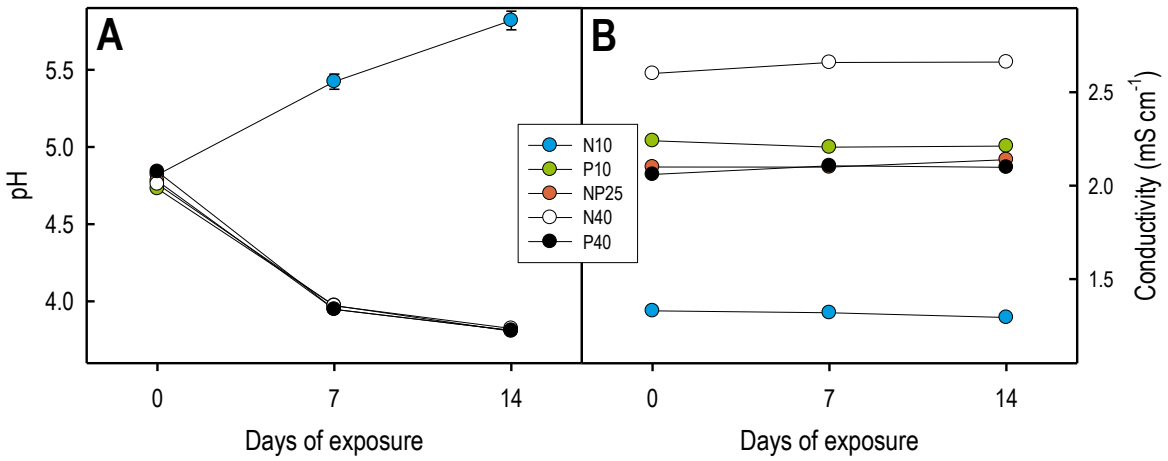


Figure IV.5 Evolution of pH (**A**) and conductivity (**B**) in the five different media after 0, 7 or 14 days of exposure: N:P = 10:1 with modifications of N (N10) or P (P10), N:P = 25:1 (25), or N:P = 40:1 with modifications of N (N40) or P (P40); regardless of arsenate level applied. Data are expressed as single value for T0, and as means ± 1 SEM with n = 3 for T7 and T14.

Comment: This figure and associated text were included in the PhD thesis manuscript upon discussion during the PhD defence.

II.4 Discussion

Our intention has been to see effects of environmentally realistic shifts in N:P ratios on the toxicity of arsenate on *Myriophyllum spicatum*. We had selected the N:P ratios of 10, 25 and 40 based on the publications of Demars and Edwards (2007), Hessen (2013) and Ventura et al. (2008), and had applied those to the culture medium used for axenic *M. spicatum*, half-strength Murashige & Skoog medium (Kane and Gilman, 1991; Murashige and Skoog, 1962). We expected effects based on absolute and relative phosphorus availability because arsenate is a competitor for phosphate uptake. However, we observed very little effects.

We had selected an axenic culture system to avoid any interference from bacteria or algae with nutrient availability. Axenic culture media are *per se* much more enriched in nutrients than normally found in the water column even of eutrophic lakes. The high nutrient content of this medium might have masked stronger effects.

It is remarkable that we did not observe arsenate effects on growth rate even if we used similar range of doses that induced *M. propinquum* growth impairment in Robinson et al.

(2006) study. It is remarkable too, that we did not measure effects on DMC, contrary to our previous studies (Nuttens et al., 2016; Nuttens and Gross, 2016) where DMC was, with pigments, one of the most structuring variable for condition discrimination.

According to the correlation circle, chlorophyll and nitrogen content were directed more or less related to the first axis, but with different direction along the second axis. Since chlorophyll is a nitrogen-rich molecule, this is not surprising. However, the lack of complete overlap might possibly be explained by other nitrogen-demanding compounds and processes, such as those found in antioxidant systems, the antioxidant enzymes (SOD, CAT, peroxidases) or the glutathione-mediated detoxification systems (Dixon et al., 1998).

The distinct different pattern for all N10 treatments suggests that nitrogen availability affected the plant response strongly. The N10 treatment was the only one in which the nitrogen content of the medium was reduced, and this was then visible also in the related endpoints such as chlorophyll and nitrogen content as well as the C:N ratio of the plant. The same molar N:P ratio of 10 but with modification of the absolute quantity of phosphorus in the medium had not such an effect. Phosphorus did not emerge as explanatory variable in the correlation circles, which is surprising given that arsenate competes with phosphate uptake (Rahman and Hasegawa, 2011).

However, the strong distinct pattern of N10 condition could also, and more probably, results from differences in pH. In fact, although pH-values were comparable between all media at the beginning of the experiment (**Figure IV.5A**), the pH-values of medium N10 are increasing with time, and thus strongly diverge from other conditions, where the pH-values strongly decrease until day 7 and further to day 14. Such pH differences can be explained by media composition, and more specifically by the absence (N10) or presence (others conditions) of ammonium (**Table IV.3**). Based on this principle, we can postulate that modifications of nitrogen content, C:N or chlorophyll content measured between N10 and other conditions were due to metabolism adjustments to this medium and its pH. This hypothesis is reinforced by the fact that the transition from pre-culture medium to N10 medium represents a sudden change from a medium containing ammonium and nitrate to a medium containing only nitrate.

Differences in media composition also modify media conductivity (**Figure IV.5B**). These differences were visible from the beginning, and remained stable during the experiment.

However, given that each medium present a specific conductivity that did not change during the experiment. As after 7 or 14 days of exposure, we only found two patterns of response: N10 versus all others medium conditions, it is likely that measured effects on the plants were not due to conductivity differences. At day 7, the gradient observed for the different As(V) concentrations in the two media N10 and P10 with a relative higher phosphorus content suggests that chlorophyll and carbon content was increased in response to the high arsenate level. This is surprising, as in both cases phosphorus should not be limiting, and was even increased at absolute concentrations in the P10 medium. It is also counterintuitive to the well known fact that phosphorus-deficient plants exhibit a dark green colour related to higher contents of chlorophyll (Taiz et al., 2015). Given that arsenate competes with phosphate uptake (Rahman and Hasegawa, 2011), this might indicate that at least in part the phosphorus metabolism was perturbed. However, we only observed somewhat apparently lower phosphorus contents and N:P ratio in plants cultivated in medium N10, not in P10 at both dates (**Table IV.7**).

A transient effect of phosphorus availability might eventually be deduced from the fact that the N:P ratio appeared only at day 7 in the correlation circle, and was no longer a predictor at day 14. Maybe this is related to the observations for As(V) effects, which are only visible on day 7 but no longer at day 14.

The overall weak effects of changes in phosphate content in the medium or changes in the resulting N:P molar ratios of the media on arsenate toxicity might be due to the fact that we are already in a very nutrient rich medium with the Murashige & Skoog (1962) medium, or by media composition effects on pH, e.g. due to ammonium as N source. Although these high concentrations are needed for a sufficient plant growth in axenic conditions, future studies should focus on adapting axenic culture media for *M. spicatum*. For example, the Andrews medium (OECD, 2014a; Roshon et al., 1996) works with much lower total nitrogen and phosphorus concentration in the medium (2.4 mM N and 0.2 mM P, N:P ratio 12:1). However, the medium volume needed per plant biomass is relatively high and needs a much more frequent exchange of medium than when plants are cultured in Murashige & Skoog medium (E. Gross, personal observation).

III. Conséquences de doses variables de saccharose dans les milieux de culture sur les effets du cadmium

A l'instar du cuivre, nous n'avons pas montré de réelle toxicité de l'arséniate sur *M. spicatum*, alors que ce dernier est un ETM non-essentiel. Contrairement à ce que nous attendions nous n'avons pas noté d'effet de modifications du milieu en phosphates ; par contre, nous avons ici encore démontré des effets importants de la ressource en azote.

Les sources et quantités de macronutriments azote et phosphore sont très variables d'un milieu de culture axénique à l'autre (Roshon et al., 1996). Nos résultats suggèrent donc que le choix du milieu utilisé peut avoir un impact sur la plante testée ou sa réponse au stress. Mais les macronutriments ne sont pas les seuls à varier d'un milieu à l'autre : les ressources en carbone sont elles aussi assez variables aussi bien en terme de sources que de concentrations (Roshon et al., 1996). Bien qu'il existe différentes sources de carbone utilisées pour les milieux axéniques on retrouve souvent le saccharose, mais à différentes doses. Or des études ont montré un impact de ce sucre sur les effets des herbicides chez *Arabidopsis thaliana* (Ramel et al., 2007; Sulmon et al., 2004). Aucune information n'ayant été trouvée quant aux possibles effets du saccharose sur la toxicité des ETM, nous avons décidé de nous y intéresser.

Sucrose modifies growth and physiology in axenically grown Myriophyllum spicatum with potential effects on the response to pollutants

Nuttens and Gross, 2016 - DOI: 10.1002/etc.3610 - Le manuscrit a été resoumis directement après la soutenance et est maintenant publié dans Environmental Toxicology and Chemistry.

III.1 Abstract

Sucrose as carbon source in axenic tests affects plant growth and physiology. The high sucrose concentration in the OECD TG238 for the submerged growing aquatic plant *Myriophyllum spicatum* might modify pollutant effects, thus impairing environmental risk assessment. In a factorial design experiment with axenic *M. spicatum* exposed to three sucrose concentrations (no, low and high) with or without cadmium, growth, dry matter content (DMC), content in pigments or phenolic compounds, and elemental stoichiometry of carbon, nitrogen and phosphorus were measured. The results show that sucrose is crucial for growth, but can be used at lower concentrations than currently considered. Sucrose-treated plants had higher DMC and carbon content, but lower contents in chlorophyll and nitrogen. Cadmium affected the content in chlorophyll, phenolic compounds, and elemental stoichiometry. Interactive effects were observed on length growth, the carbon and nitrogen content and the C:N and N:P molar ratios. Remarkably, cadmium led to increased shoot length at low but not at high sucrose concentration. This contrasting effect might result from differences in osmotic potential caused by sucrose. Overall, our results suggest a strong effect of sucrose concentration on the growth and physiology of *M. spicatum*, and modifications of the response to cadmium. Further studies should establish the lowest sucrose level needed to account for realistic environmental risk assessment based on the axenic OECD TG238.

Keywords: Macrophyte; metabolism; metal pollution; plant elemental composition; plant traits.

III.2 Introduction

In a world where environmental contamination is common place, environmental risk assessment (ERA) is a necessity in order to adequately protect and manage ecosystems (Junghans et al., 2006). ERA relies principally on extrapolations based on ecotoxicological tests (Van Leeuwen et al., 1996). These tests should represent as much as possible natural conditions, but at the same time must be reproducible, interpretable, and sensitive (Junghans et al., 2008). The harmonization and standardization of test protocols is a predominant task of national and international environmental agencies such as American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), US Environmental Protection Agency (USEPA), French Association for Standardization (AFNOR), German Environmental Agency (UBA) and others, to create efficiency across geographic regions, and reduce uncertainty in environmental hazard and risk assessments (Brooks et al., 2015).

Despite these efforts, different ecotoxicological test protocols are still used for the same organism, e.g. *Lemna* spp. (Brooks et al., 2015). *Myriophyllum spicatum*, the new OECD test organism for rooted aquatic plants, is the object of two guidelines: one based on cultivation in a water-sediment set-up (TG 239), and one sediment-free and under axenic conditions (TG 238) (OECD, 2014a, 2014b). TG 238 is the first standardized axenic protocol for an aquatic higher plant. Because of its key importance for the function of aquatic ecosystems (Carpenter and Lodge, 1986; Lewis, 1995), the genus *Myriophyllum* has been used in ecotoxicological and plant propagation studies for many years. Several of these studies used protocols for axenic *(in vitro)* cultivation different from the TG 238, which is based on a modified Andrews medium (OECD, 2014a). Other test protocols use Murashige & Skoog medium (Kane and Gilman, 1991), Hoagland medium (Lesage et al., 2007) or new media adapted to conditions found in the environment (Delmail et al., 2011b; Gross, 2003). These media all have a different elemental breakdown (Delmail et al., 2011b; Gross, 2003; Roshon et al., 1996). Nitrogen (N) and phosphorus (P) are key drivers of plant growth and development (Sterner and Elser, 2002). Modifications of element concentrations or ratios, particularly those of N and P, have been shown to modify plant responses to pollutants (Bian et al., 2013; Chia et al., 2015; Fulton et al., 2009; Millington et al., 1988). Nonetheless, plants also need a suitable carbon source to grow (Hussner and Jahns, 2015; Roshon et al., 1996).

In test media for *in vitro* cultures, carbon is often provided as sucrose at concentrations of up to 30 g L^{-1} (Roshon et al., 1996).

Sucrose is a critical component for plant metabolism. Indeed, in addition to being the major photosynthetic product and transport sugar in plants, sucrose is also known as a signaling molecule. It can regulate directly or indirectly, through its hydrolytic hexose products glucose and fructose, plant processes like growth, development, storage, or floral transition. Sucrose is also involved in abiotic and biotic stress responses, such as towards drought, salinity, wounding, and infection by pathogens (Couée et al., 2006; Rolland et al., 2006; Wind et al., 2010).

More importantly, some studies have pointed out the implication of sucrose in xenobiotic stress responses. The addition of sucrose in culture media induced tolerance of the terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana* to atrazine, a photosynthesis inhibitor herbicide (Sulmon et al., 2004). Sucrose concentrations ranging from 0 to 80 mM (around 30 g L^{-1}) have been tested, and significant effects were observed at 5 mM (1.7 g L^{-1}). Beyond this level, tolerance increased with increasing concentrations of sucrose. This tolerance has been partly explained by the activation of specific ROS scavenging systems with the subsequent reduction of oxidative damage caused by this herbicide (Ramel et al., 2009; 2007). Yet, induction of ROS is a common effect of many pollutants, including trace metal elements (TME). We assumed that the sucrose used in ecotoxicological test media for *M. spicatum* would modify the plants' response to others pollutants, such as cadmium.

We thus conducted an experiment where we investigated the impact of 5.5 µM Cd, a concentration known to induce sublethal effects on *M. spicatum* in Hoagland medium (Sajwan and Ornes, 1996), and we here used media with different concentrations of sucrose, namely 0 g L^{-1}, 3 g L^{-1} (hereafter called "low sucrose") or 30 g L^{-1} (hereafter called "high sucrose"). We measured the Cd and sucrose effects on a set of endpoints based on growth responses, pigments, elemental (C, N, P) composition and content in phenolic compounds to assess various metabolic responses of the plant. We hypothesized (1) that a concentration below 30 g L^{-1} will already assure a good growth of *M. spicatum*, (2) that the addition of sucrose in culture medium will change the metabolism of *M. spicatum* and thus responses to Cd, and (3) that these changes depend on the sucrose concentration.

III.3 Materials and methods

III.3.1 Plant material and culture conditions

We used axenic cultures of M*yriophyllum spicatum* originating from own stock cultures (see Gross, 2003). Stock cultures have been cultured in 50 mL of modified half-strength Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) with only 3 g L^{-1} of sucrose in 100 ml Erlenmeyer flasks. The Murashige and Skoog medium had been originally used when first axenic cultures of *M. spicatum* were established (Kane and Gilman, 1991). Plants both for pre-cultures and during the experiment were cultivated in a Sanyo MLR 352 climate chamber (Panasonic France) at a day/night temperature of 22°C/20°C, a photoperiod of 16 h, and 140 ± 20 µmol photons PAR m^{-2} s^{-1}.

We performed a 2 x 3 factorial design experiment, using no (control) or a presumed sub-lethal concentration of cadmium (5.5 µM Cd as 1 mg L^{-1} $CdCl_2$) crossed with three levels of sucrose at 0 g L^{-1} (hereafter called "no sucrose") , 3 g L^{-1} (hereafter called "low sucrose") or 30 g L^{-1} (hereafter called "high sucrose"). A total of about 150 2-cm long apices were pre-cultured in our modified Murashige & Skoog culture medium with 3 g L^{-1} of sucrose for five days before experimentation to allow for wound healing. Of those, 5 x 4 apices served as starting controls. The others were distributed among the treatments, each 4 apices per flask to allow for sufficient biomass for all analyses, and 5 replicate flasks per condition. We used 50-mL plastic cell culture flasks (BD Falcon™) filled each with 50 mL of medium in order to avoid metal adsorption on glass walls. Flasks were daily randomly repositioned to account for slight light and temperature differences within the growth chamber. As we focused primarily on physiological responses, the test duration was set at seven days. At the end of the experiment, plants were harvested and the four shoots per flask were washed for 5 min in a 5 mM $CaCl_2$ solution to detach external Cd, followed by a short rinse in distilled water.

We measured individual shoot length including eventual side shoots of all apices used in the experiment, including those used as start values. We also took a photo of all four apices per flask. Fresh weight was determined from shoots carefully blotted dry with tissue paper. Then shoots were shock-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for dry weight determination and chemical analyses. The relative growth rates for length (RGR-L) and dry mass (RGR-DW)

were calculated as: RGR-L = ($\ln_{L\ at\ T7}$ - $\ln_{L\ at\ T0}$) / 7 and RGR-DW = ($\ln_{DW\ at\ T7}$ - $\ln_{DW\ at\ T0}$) / 7. Dry matter content (DMC) is defined as the ratio of DW / FW.

III.3.2 Chemical Analyses

Final cadmium concentrations in the culture media for all treatments were determined by atomic absorption spectroscopy (AAS; Perkin-Elmer, AAnalyst 100). The remaining sucrose concentration in the media was determined using a modified phenol-sulfuric acid method, with 10x the volumes described in (Ramalakshmi et al., 2014). The osmolality of the medium was determined in 30 nL sample aliquots using an Otago nanolitre osmometer (Otago Osmometers Ltd, Dunedin, New Zealand) and a 300 mOsm kg^{-1} NaCl standard. Further details, and details of a supplementary experiment identifying the dynamics and partitioning of cadmium are described in the supplementary material.

Dried plants were mechanically ground into a fine powder using a ball mill *(Retsch GmbH, M301)* for 2 min at 30 Hz. We performed micro-analyses using 0.5 to 2 mg plant material depending on the method; further details for the used methods can be found in (Nuttens et al., 2016; Fornoff and Gross, 2014). Chlorophyll was extracted with acetone and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 at 8/2 [v/v], and anthocyanins with methanol, ultrapure water, and 37% HCl at 80/20/1 [v/v/v]. Multiple wavelength readings at 664 and 647 nm for chlorophyll a and b; and 532 and 653 nm for anthocyanins were used to calculate final concentrations (Fornoff and Gross, 2014). Total phenolic compounds (TPC) were quantified according to the Folin-Ciocalteu method using tannic acid as standard (Fornoff and Gross, 2014).

Carbon (C) and nitrogen (N) contents were determined in an elemental analyzer *Carlo-ERBA Na 2100 CE Instrument* with EDTA as standard. Phosphorus (P) in plant samples was determined using alkaline digestion (1 N NaOH and 0.5 M $Na_2S_2O_8$) of approx. 1 mg powder for 2 h at 120°C and 1 bar followed by spectrophotometric quantification in an automated analyzer (Konelab 420-XTi, Thermofischer).

Table IV.8 Results of the statistical analyses (2-way ANOVA) assessing the effects of cadmium or sucrose and their interactive effects on different growth and physiological endpoints in *Myriophyllum spicatum* after 7 days of exposure. Molar ratios for C, N and P are shown here.

	Cd (df = 1)		Suc[a] (df = 2)		Cd x Suc (df = 2)		df
	F	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	*F*	Pr (*F*)	
RGR-L[b]	0.377	0.545	26.641	**< 0.001**	9.809	**< 0.001**	24
RGR-DW[c]	0.149	0.703	9.821	**< 0.001**	1.428	0.259	24
DMC[d]	0.034	0.855	38.799	**< 0.001**	2.701	0.088	24
Chlorophyll	14.34	**< 0.001**	90.757	**< 0.001**	2.733	0.085	24
Anthocyanins	1.407	0.247	1.855	0.178	3.487	0.05	24
TPC[e]	5.875	**0.023**	5.123	**0.014**	0.214	0.809	24
C:N	26.58	**< 0.001**	290.06	**< 0.001**	11.23.	**< 0.001**	24
C:P	17.733	**< 0.001**	86.741	**< 0.001**	0.621	0.546	24
N:P	2.903	0.101	17.678	**< 0.001**	4.301	**0.025**	24
C	0.009	0.924	319.38	**< 0.001**	4.203	**0.027**	24
N	13.960	**0.001**	152.120	**< 0.001**	6.100	**0.007**	24
P	10.345	**0.004**	38.348	**< 0.001**	1.497	0.244	24

([a] Sucrose - [b] Relative Growth Weight by Length - [c] Relative Growth Weight by Dry Weight - [d] Dry Mater Content - [e] Total Phenolic Compound)

Table IV.9 Results for all measured endpoints not shown in Figure IV.5. Data are presented as means ± 1 SEM. Results of Tukey post-hoc tests after 2-way ANOVA (see Table IV.8) are indicated by letter code. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

Sucrose [g L^{-1}]	Control		$CdCl_2$ [1 mg L^{-1}]	
RGR-DW [mg DW day^{-1}]				
0	0.02 ± 0.005	B	-0.00 ± 0.025	B
3	0.03 ± 0.009	AB	0.05 ± 0.013	AB
30	0.07 ± 0.009	A	0.05 ± 0.022	AB
Anthocyanin [mg g^{-1} DW]				
0	0.99 ± 0.080	AB	1.12 ± 0.056	AB
3	1.22 ± 0.076	A	1.06 ± 0.070	AB
30	1.10 ± 0.032	AB	0.93 ± 0.044	B
Total phenolic compounds (TPC) [mg g^{-1} DW]				
0	43.1 ± 1.84	B	50.0 ± 2.97	AB
3	46.2 ± 2.00	AB	49.8 ± 1.50	AB
30	51.8 ± 4.33	AB	58.6 ± 3.61	A
N:P molar ratio				
0	4.03 ± 0.10	AB	4.47 ± 0.25	A
3	3.52 ± 0.10	C	3.72 ± 0.15	BC
30	4.16 ± 0.10	AB	3.97 ± 0.10	BC

III.3.3 Statistical analyses

The statistical analyses were conducted using R Studio software. Homoscedasticity and normality were verified by the Levene and Shapiro–Wilk tests. The factorial-design experiment was analyzed using 2-way ANOVA. The few negative or zero values for growth rate were replaced by 10^{-5}, in order to perform the Levene test. When conditions were met, 2-way ANOVAs with cadmium and sucrose concentration as fixed factors were performed using a probability threshold of $P \leq 0.05$. Post hoc Tukey HSD tests verified differences between pairs of treatments. Principal component analyses (PCA) were performed on the set of endpoints to visualize differences in endpoint responses according to the experimental conditions.

III.4 Results

Chemical analyses of culture media

At the end of the experiment, after 7 days, we only found 10.1 ± 5.6, 4.3 ± 1.9 and 14.9 ± 8.1 % of the initially applied cadmium in the media with no, low or high sucrose, respectively (**Part III.7.1**, **table IV.10**; 1-way ANOVA, $F_{2,12} = 4.19$, $P = 0.042$; Tukey post-hoc test: Cd in medium with low sucrose significantly lower than in high sucrose; $p = 0.034$). Data for Cd in plants are not available for this experiment because of the need to use the material for chemical analyses (see below). A detailed repartition of cadmium in medium, washing solutions and plants has been determined in a supplementary experiment (**Part III.7.2**).

Final sucrose levels at the end of the experiment for the low sucrose treatment were comparable and in the range of the initially applied concentration, but for the high sucrose treatment, we found significantly less sucrose in the controls (58 % of the initially applied concentration) than in the Cd treatment (87 %; see **table IV.10**; 2-way ANOVA, cadmium: $F = 13.58$; $p = 0.002$; sucrose: $F = 270.04$; $P = 1.93 \times 10^{-11}$; Cd x sucrose: $F = 15.51$; $p = 0.0012$).

The high sucrose medium had significantly higher osmotic strength compared to the no or low sucrose media (**Table IV.10**; Kruskal-Wallis ANOVA: $df = 5$, $\chi^2 = 26.75$, $P = 6.37 \times 10^{-5}$). The low sucrose medium exhibited a 1.25-fold higher osmolality compared to the medium without sucrose, and the high sucrose medium even a 3-fold higher osmolality.

Growth responses

Sucrose but not Cd affected biomass and length growth of *M. spicatum*. The relative growth rate by dry weight (RGR-DW, **Tables IV.8 & IV.9**) and by length (RGR-L, **Figure IV.6A**, **Table IV.8**) increased with increasing sucrose concentration in controls. Without any sucrose in medium there was only length growth but no dry weight growth. Cd did not affect RGR-DW, but modified the RGR-L. At low sucrose, Cd significantly increased RGR-L compared to the respective control, while no or only marginal differences occurred for other sucrose concentrations. The Dry Matter Content (DMC; **Figure IV.6E**, **Table IV.8**) increased strongly with increasing concentrations of sucrose in medium by up to 52% with Cd and by 88% without. We also observed a marginal interaction effect, as Cd caused an 8% increase in DMC in the no sucrose treatment, but a 13% decrease in DMC in high sucrose treatment.

Chemical analyses

Chlorophyll content (**Figure IV.6B**) was reduced both by sucrose and Cd and a marginal interaction effect was observed (**Table IV.8**). Sucrose reduced total chlorophyll by up to 28% in controls and by 36% with Cd. While there was no difference between control and Cd without sucrose, chlorophyll declined by about 12-13% with Cd addition at high sucrose. The anthocyanin content (**Tables IV.8 & IV.9**) was neither affected by Cd nor sucrose. Cd increased the total phenolic content (TPC) irrespective of the sucrose concentration by approximately 8-16%. Sucrose itself increased the TPC by up to 20% (**Tables IV.8 & IV.9**). Strongest effects were observed on the elemental composition. Carbon content (**Figure IV.6C**) increased by about 6% between zero and high sucrose, while Cd had no effect, but a slight interaction effect was observed (**Table IV.8**). Nitrogen content (**Figure IV.6F**) between no sucrose and high sucrose treatments decreased by 16% in controls and by 23% with Cd, and we observed a significant interaction between both factors. The C:N molar ratio (**Figure IV.6G**) was affected by both factors, and also exhibited a highly significant interaction (**Table IV.8**), resulting from the distinct effects of both sucrose and Cd on the C and N contents. The C:N ratio between no sucrose and high sucrose treatments increased by 26% in controls and by 37% with Cd. The higher effect with Cd is due to the strong effect of Cd at high sucrose level. The phosphorus content was significantly reduced by high sucrose compared to no sucrose (**Figure IV.6D**); the reduction was 19% in the controls, and 12% in the presence of Cd. Cd itself induced an 11% reduction in phosphorus in the no sucrose treatment, while the

effect was much weaker in the high sucrose treatment, where only a reduction of 3% was observed. Consequently, the C:P molar ratio (**Figure IV.6H**) was about 22% (with Cd addition) to 30% (control) higher in the high sucrose treatments, influenced both by distinct differences in the C and P contents for the different treatments. No or only marginal differences in P content and the C:P molar ratio were observed between no sucrose and low sucrose treatments (**Figure IV.6H**), in contrast to effects observed for C, N and the C:N molar ratio. The N:P ratio (**Tables IV.8 & IV.9**) was not affected by Cd, but by the sucrose concentration. Here the effects for the different treatments were complex, resulting in a significant interaction effect.

Principal component analysis

PCA was performed on the whole set of endpoints for both factors (**Figure IV.7**). A dose-dependent effect for sucrose can be seen as the three different media tested show distinctly separated spheres (**Figure IV.7B**). For each sucrose level, the Cd sphere was slightly moved to the left or lower left, with the strongest effect visible at low sucrose. The investigation of column inertia showed that stoichiometric endpoints (%C, %N, C:N), total chlorophyll content, and DMC, were the most structuring variables of the first axis of the PCA (more than 60% of explained inertia for each endpoint), whereas N:P ratio (with 91% of explained inertia), P content and C:P ratio (with more than 60% of explained inertia) were the most structuring variables of the second axis. Other variables (anthocyanins, TPC and growth parameters) poorly contributed to the inertia of the first 2 axes (**Figure IV.7A**).

III.5 Discussion

We decided to investigate the potential impact of using sucrose in culture medium on the outcome of ecotoxicological test results with axenic *Myriophyllum spicatum* because of two reasons. First, there is a rising interest to understand effects of differences in medium composition used in ecotoxicological tests (Brooks et al., 2015), and secondly, an alleviating impact of sucrose on the toxicity of a pollutant had already been shown for *Arabidopsis thaliana* (Sulmon et al., 2004; Ramel et al., 2007, 2009). Our choice for cadmium was based on the fact that this is a priority pollutant, and more and more found associated with phosphate fertilizers used in agriculture, leading to possible leachate effects into aquatic systems, where *M. spicatum* is a commonly occurring species.

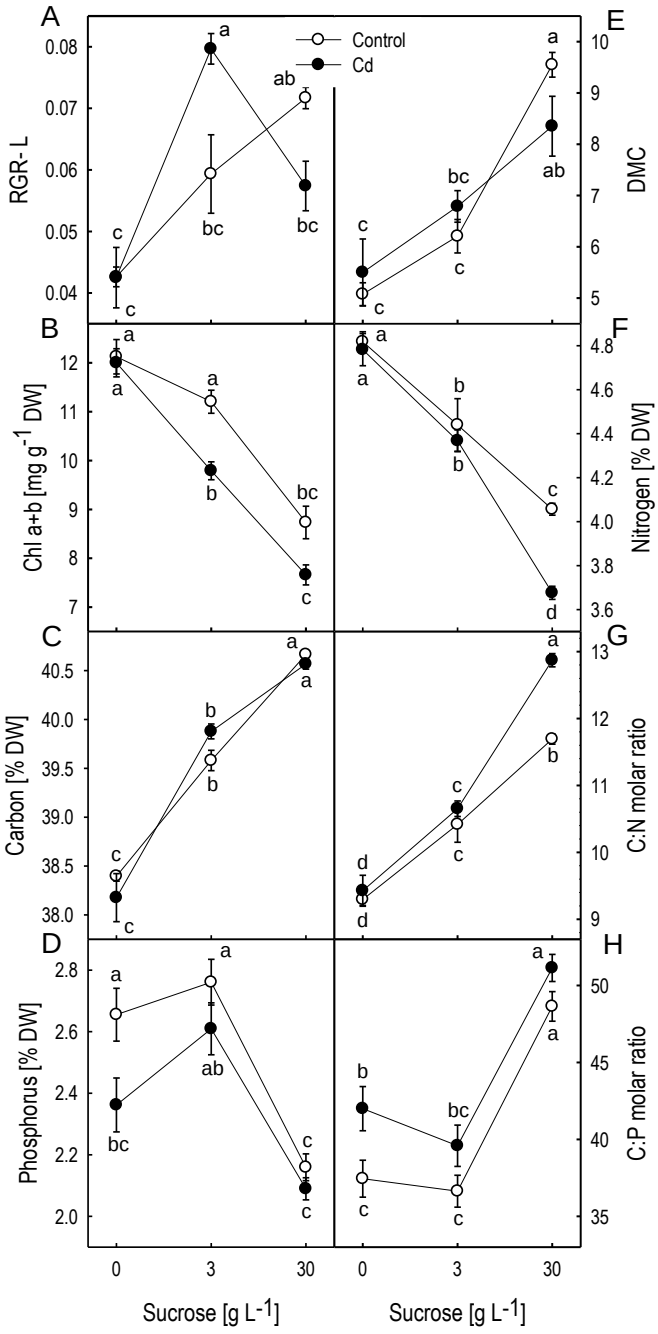


Figure IV.6 Responses of axenic *Myriophyllum spicatum* to sucrose and cadmium addition after seven days of exposure. (**A**) Relative growth rate by length (RGR-L), (**B**) total chlorophyll content (Chl a+b), (**C**) carbon content, (**D**) phosphorus content, (**E**) dry matter content (DMC), (**F**) nitrogen content, (**G**) carbon to nitrogen molar ratio (C:N ratio), and (**H**) carbon to phosphorus molar ratio of plant (C:P ratio). Controls – white circles, Cd - black circles. Data represent means ± 1 SEM with n = 5. Values sharing a common letter are not significantly different at $P < 0.05$. Please note different y-axis scaling depending on the endpoint in question.

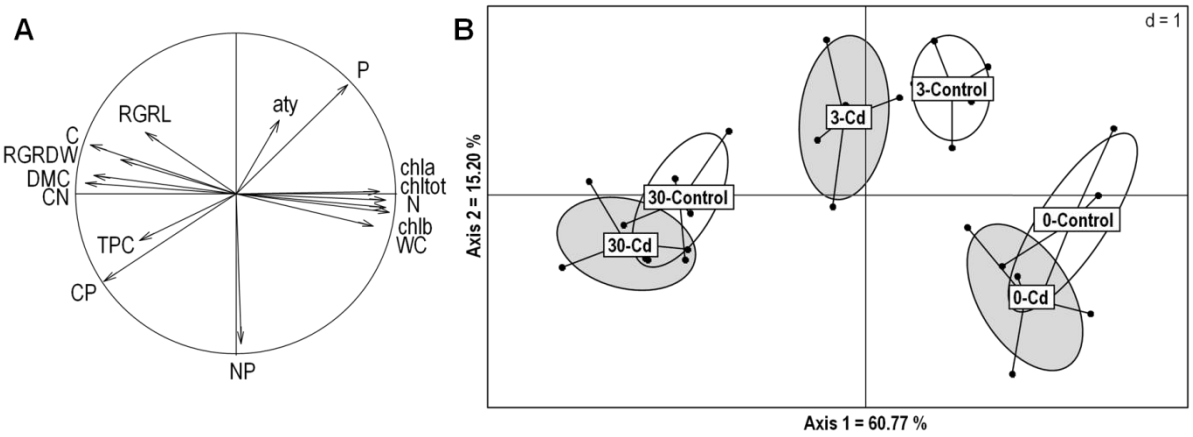


Figure IV.7 Principal component analysis of the endpoint responses of *Myriophyllum spicatum* to increasing concentrations of sucrose in medium (**0**, **3**, and **30** g L^{-1}), in presence (**Cd**) or absence (**Control**) of 5.5 µM Cd after 7 days of exposure. (**A**) Correlation circle. (**B**) PCA results for all treatment combinations.

Sucrose is crucial to obtain an optimal plant growth and development in static axenic *Myriophyllum* culture without any CO_2 ventilation, as expected from literature data (Kane and Gilman, 1991; Roshon et al., 1996; Mohr et al., 2013) and our own experience (Gross, 2003; Nuttens et al., 2016). However, in a medium containing sucrose plants are no longer photoautotrophic but become photomixotrophic (Badr et al., 2011). Under such conditions, plants use sucrose directly as carbon source, but may also satisfy some of their carbon requirements through the photosynthetic fixation of CO_2 (Badr et al., 2011).

When omitting sucrose from the medium, we observed a reduced growth rate based on length (RGR-L), and no growth at all based on plant dry biomass. When using low or high sucrose concentrations, we observed relative growth rates for length (RGR-L) of 0.06 to 0.07 d^{-1}, with no significant difference between both sucrose concentrations in the no Cd treatments. Thus the conditions of the new OECD guideline (OECD, 2014a) were met, as they state that "for the test to be valid, the doubling time of main shoot length in the control must be less than 14 days", which is the case for a RGR-L of at least 0.05 d^{-1}. Interestingly, the PCA (**Figure IV.7**) that integrates all endpoints responses, showed distinct patterns depending on the sucrose concentration in medium, but growth parameters were not among the most structuring variables of the first two axes based on the factors explaining the column inertia. By contrast, plant stoichiometry (element content and ratios),

chlorophyll content or DMC were the most structuring variables. Studies realized with potatoes (Badr et al, 2011, 2015), were helpful in the comprehension and interpretation of our results. Their metabolomic approach on plantlets grown *in vitro* with (30 g L^{-1}) or without sucrose provided an overview of changes in plant metabolism related to sucrose addition. They noticed an accumulation of numerous metabolites in the presence of sucrose, among them sugars and sugar alcohols (Badr et al, 2011, 2015). Similar effects might have occurred in *M. spicatum*, and could explain the observed increase in DMC and carbon content with high sucrose. Sucrose addition to culture medium has been shown also to cause an accumulation of nitrogen compounds, specifically amino acids (proline) and ureides (ornithine, allantoin) (Badr et al., 2015). This effect was explained by the activation of enhanced nitrogen assimilation (NO_3^- and NH_4^+) and storage of nitrogen-containing metabolites (Badr et al., 2015). Yet, it is unclear if the overall nitrogen content also had changed as this was not reported in this publication (Badr et al., 2015). We might have had similar accumulations of nitrogen compounds (free amino acids, ureides), but observed a global reduction of the nitrogen pool. Indeed, sugars in general are known to repress photosynthetic gene expression and chlorophyll accumulation (Rolland et al., 2006; Gaspar et al., 2002), and sucrose can have negative feedback effects on photosynthesis by reducing the quantity and activity of RuBisCO (Badr et al, 2011, 2015). We dosed total chlorophyll and total nitrogen, and observed a strong decrease of both endpoints in plants grown with high sucrose. These results confirm our hypothesis that sucrose can change the metabolism of *M. spicatum*, by acting most probably both on carbon and nitrogen metabolic pathways.

Effects of cadmium on *M. spicatum* were less evident. Indeed, as shown in the PCA (**Figure IV.7**), the dispersion areas were less separated between controls and Cd conditions than among different sucrose concentrations. Interestingly however, differences between controls and the related Cd conditions were variable depending on the sucrose concentration. The most pronounced effects were observed with low sucrose. The spheres were visibly separated along the first axis, and can principally be explained by differences in stoichiometry, chlorophyll content and DMC. On the contrary, with no and high sucrose, the small differences seem to be more related to factors contributing to the second axis, and were mainly resulting from differences in phosphorus content and C:P and N:P molar ratios. A reduction in growth with 5.5 µM Cd would not have been surprising as Cd is known to

impair plant development, and reduce *Myriophyllum* growth at this concentration (Sajwan and Ornes, 1996). However, in our experiment the effects of Cd were rather weak. This might be linked to about 10% lower true initial exposure conditions (**Part III.7.2**), and further precipitation of Cd during the experiment caused by medium components. However, the supplementary experiment (**Part III.7.2**) also showed that *M. spicatum* is able to ad- and absorb about 40% of the applied cadmium. At high sucrose, we observed a slight but only marginally significant reduction of RGR-L by Cd compare to control (**Figure IV.6A**). However, at low sucrose, we obtained a significant RGR-L increase with Cd, which was not observed with no sucrose or with high sucrose. These surprising results may be explained by differences in the osmotic potential of the medium and the plant cells. Indeed, we found significant differences in the osmolality of all media, and a very high osmolality in the high sucrose medium. The osmotic potential in the plant leaves could not yet be determined with sufficient precision. Yet, Cd in the medium likely destabilized cell wall integrity through the replacement of calcium ions in pectin bonds, or the disarrangement of actin filaments (Douchiche et al., 2007; Wan and Zhang, 2012). The increase in cell wall flexibility combined with a strong turgor pressure might have resulted in cell elongation in low sucrose, whereas the osmotic stress caused by high sucrose prevented cell elongation and thus changes in length.

Another explanation for the small cadmium effects observed in our study compared to those reported before (Sajwan and Ornes, 1996) are differences in the test media used, specifically the concentration of calcium and the source of carbon. Sajwan and Ornes (1996) used Hoagland medium with 0.5 mM calcium and 5.60 mM carbon as $NaHCO_3$. The difference in carbon source should have modified the plant metabolism and in consequence the plant stress response. Our medium contained a threefold higher calcium concentration (1.5 mM). Since calcium is well known to alleviate cadmium effects on plants by competition for metal ion influx (Suzuki, 2005), our medium with higher Ca could have reduced Cd absorption by *M. spicatum*, and as a consequence reduced its toxicity.

An interesting finding is that in the presence of Cd, the plant phosphorus (P) content was decreased, and the related C:P ratio was increased independently of the sucrose concentration in the medium. Sajwan and Ornes (1996) had also found a reduction of the P content with Cd, but at higher Cd concentration of 7.63 mg L^{-1}. The reduced P content could

possibly be explained by interactions between Cd and P uptake. In fact, a reduced P uptake in the presence of Cd has been found for the cyanobacterium *Nostoc linkia* (Sajwan et al., 2002). Others showed the alleviation of Cd toxicity by enhanced phosphorus supply (Sajwan et al., 2002; Arshad et al., 2016).

Our results are in favor of a reconsideration of the sucrose concentration added in axenic ecotoxicological test media. We found that low sucrose (3 g L^{-1}) already assured a sufficient growth rate while it lowered potentially confounding effects on plant metabolism. The chlorophyll content and elemental stoichiometry were closer to the no sucrose addition compared with the high sucrose treatments. Further experiments should investigate more levels with lower sucrose, and also apply longer test duration of up to 14 days in order to define an optimal sucrose level for TG238. Alternatives to sucrose could be the use of CO_2 (aeration) or bicarbonate. Even if *M. spicatum* exhibits slightly lower growth with bicarbonate under non-axenic conditions (Hussner and Jahns, 2015; Gross et al, 2016), sterile-filtered bicarbonate might be a solution.

III.6 Conclusion

Improving environmental risk assessment (ERA) by ecotoxicological tests needs to consider the way tests are conducted. From our experiment shown here we conclude that sucrose is a crucial component of culture media for axenically cultivated *M. spicatum*, but can be used at lower concentration than the one in force. The strong modifications of plant carbon and nitrogen metabolism found with higher sucrose concentrations ask for a reconsideration of the test protocols used. An increasing number of evidences highlight the impact of sucrose on plant metabolism in ecotoxicological studies (Ramel et al., 2007) and other contexts (Badr et al., 2011, 2015); this should encourage further research on this subject in ecotoxicology. We join Brooks et al. (2015) in their request to account for differences in the composition of test media. Differences in the composition of test media can introduce uncertainty in ERA of photosynthetic organisms. We consider that not only macroelements such as nitrogen or phosphorus, but also the carbon source for aquatic plants needs to be taken into account, as our findings underline. We are not sure if excess levels of nutrients in test media provide a conservative or protective estimation of toxicity for plants (Brooks et al., 2015). In fact, it

seems that depending on the resource considered, the used concentration in combination with a specific pollutant, toxicity thresholds might vary, and underestimations are possible.

III.7 Supplementary material

III.7.1 Additional results for main experiment

Table IV.10 Results of the statistical analyses (1- or 2-way ANOVA) for medium conditions after 7 days of exposure. Data are shown as means ± 1 SD. Results of Tukey post-hoc tests are indicated by letter code. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

Sucrose [g L^{-1}]	**Control**		**Cd [613 µg L^{-1}]**	
Final sucrose [g L^{-1}]				
0	ND		ND	
3	3.14 ± 0.68	A	2.85 ± 0.51	A
30	17.37 ± 2.30	B	26.06 ± 4.46	C
Final cadmium [µg L^{-1}]				
0	ND		61.80 ± 34.43	AB
3	ND		26.40 ± 11.55	A
30	ND		91.60 ± 49.95	B
Osmolality [mosmol kg^{-1}]				
0	67.35 ± 3.33	A	67.50 ± 0	A
3	84.75 ± 3.35	B	83.54 ± 0	B
30	202.72 ± 6.15	C	199.69 ± 1.70	C

III.7.2 Supplementary experiment

Context

Here we present supplementary information on the exposure concentrations for cadmium. As only the final media for all treatments were available, and not the initial starting media, we performed the same experiment again, by using only one replicate per treatment.

Material and methods

From this small experiment, we analysed cadmium in the initial starting media and at the end of the experiment after 7 days. We quantified the partitioning of cadmium between medium and plants. In detail, we analysed cadmium in the $CaCl_2$ washing solution and the deionized water washing solution used to desorb externally bound cadmium on the plants (see main manuscript for details of the washing steps). Finally, we analysed the cadmium

content in the plants by digesting 30 to 70 mg dried plant powder for 24 h in 25 mL 65 % ultrapure HNO3. Cadmium was quantified by atomic absorption spectroscopy (AAS; Perkin-Elmer, AAnalyst 100) in all samples.

Based on the applied medium and washing solution volumes and the total plant biomass present per flask, we calculated the partitioning of cadmium between medium, adsorbed on the plants (i.e. in the washing solutions) and in the plants (extracted from plant material).

Results

The cadmium medium had a nominal concentration of 613 µg L^{-1} [Cd] as $CdCl_2$. We measured on average 89.5 % of the nominal Cd concentration in the medium at day 0. After 7 days, at the end of this supplementary experiment, recovery of cadmium in the final medium was greatly reduced (Table B1), and lowest in the 3 g L^{-1} sucrose treatment.

The final biomass of plants in the treatments was 37.5, 63.5 and 70.6 mg per flask in the 0, 3 and 30 g L^{-1} sucrose treatments, respectively. About 40 % of all cadmium from the initial medium was recovered in or on the plants (both washing solutions combined), leading to total recoveries between 53 and 70.5 % for the different sucrose concentrations.

Discussion

Our supplementary small experiment shows that *M. spicatum* is able to accumulate large parts of the available cadmium in the medium, and another non-negligible fraction is adsorbed externally on the plants. The difference between the nominal concentration and that measured at the start of the experiment in the flasks might be explained by the filtration of the solution, although filters had been well rinsed with the cadmium solution before using them. Another possibility is that part of the cadmium was bound to the polystyrene flasks. Yet, we consider this not very likely, as another experiment had shown that only about 2% of the applied cadmium bound to this type of flasks. It is possible that part of the cadmium precipitated with medium components, as the medium is rich in sulphate and phosphate. Recovery of cadmium in the final medium was higher in this supplementary material compared to the main experiment. It is possible that the freezing and thawing of the stored samples caused this difference.

Table IV.11 Cadmium concentrations in different compartments measured in the supplementary experiment. Only one replicate per cadmium condition was used. The nominal initial Cd concentration was 30.65 µg per flask of 50 mL (613 µg L^{-1}). Data below are related to the measured initial Cd concentrations in the media.

Recovery	**Sucrose level [g L^{-1}]**		
as [µg] per flask	**0**	**3**	**30**
initial medium [µg]	27.25	28.10	26.90
final medium [µg]	7.40	2.55	7.15
washing solutions [µg]	2.60	1.65	1.35
in plants [µg]	9.21	10.64	9.40
sum [µg]	19.21	14.84	17.90
or as [%] of initial medium			
% in final medium	27.16	9.07	26.58
% in plants	33.78	37.87	34.96
% adsorbed on plants	9.54	5.87	5.02
% on and in plants (sum)	43.33	43.75	39.98
% total recovery (on + in plants + final medium)	70.48	52.82	66.56

CHAPITRE V

Discussion générale

La fréquence de situations où les pollutions des milieux aquatiques sont associées à des modifications des ressources augmente, et plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'interactions entre ces deux facteurs de stress (**Chapitre I.IV.2**). L'étude des effets de cette combinaison sur des compartiments clés des écosystèmes aquatiques comme les macrophytes est donc nécessaire. Ce travail de thèse, intitulé : "Etude des effets de l'interaction entre polluants et ressources sur *Myriophyllum spicatum* grâce à une approche couplant écotoxicologie et écologie chimique" avait pour objectif principal d'évaluer les effets conjoints de deux types de polluants : les herbicides et les ETM sur une macrophyte d'intérêt : *Myriophyllum spicatum* ou Myriophylle à épi, dans des milieux ayant des ressources variables. L'originalité de ce projet était d'atteindre cet objectif avec une approche pluridisciplinaire, encore peu utilisée jusqu'à aujourd'hui, combinant les principes de l'écotoxicologie à des paramètres tirés de l'écologie chimique. Ce travail devait donc également permettre d'ouvrir de nouvelles pistes pour l'évaluation du risque.

L'objectif principal de cette thèse était subdivisé en trois sous-objectifs : (1) montrer que le polluant induisait une empreinte chimique spécifique dans la plante, (2) montrer qu'une modification des ressources pouvait altérer ces effets, et (3) montrer que cette combinaison de facteurs de stress induisait des effets complexes et imprévisibles sur différents paramètres du Myriophylle à épis.

Les différents résultats obtenus (présentés dans les **chapitres III et IV**) permettent-ils de vérifier ou au contraire d'infirmer ces différentes hypothèses? C'est ce que nous verrons dans un premier temps dans les **parties I à III** de la discussion générale. Dans un second temps les apports de ce travail de recherche seront examinés au regard de deux questions plus larges : (i) quelles sont les conséquences pour les écosystèmes aquatiques (**Partie IV**) et (ii) faut-il revoir certaines approches en écotoxicologie pour l'évaluation du risque ? (**Partie V**)

I. Chaque polluant a-t-il une empreinte spécifique?

Les expérimentations menées durant cette thèse avaient comme objectif principal d'évaluer les effets de différents types de polluants en combinaison avec des ressources variables sur

le Myriophylle, en faisant l'hypothèse a priori que chaque polluant allait induire des effets spécifiques sur cette plante, effets que l'on pourrait qualifier d'empreinte spécifique.

L'impossibilité de comparer l'ensemble des polluants, car ils n'ont pas tous été étudiés faces aux mêmes conditions, ainsi que parfois l'absence d'effet des polluants étudiés, notamment pour les ETM, ne permet pas d'affirmer que chaque polluant induit des effets spécifiques. Cependant, au regard des résultats obtenus, il semble que les polluants de type et d'effet différents induisent des effets qui leur sont propres sur le Myriophylle. Cette spécificité est notamment visible dans la **figure V.I**, où l'ensemble des effets des deux herbicides (isoproturon et mésosulfuron-méthyl) et du cuivre sur le Myriophylle ont été comparés dans une analyse en composante principale (ACP). Une telle comparaison a été possible car les tests avec ces 2 herbicides organiques et ce fongicide métallique ont été réalisés au même moment, dans les mêmes conditions et avec des gammes de concentrations ajoutées comparables. Bien que le cuivre n'ait pas induit de toxicité sur le Myriophylle (**Chapitre IV.1**), l'ensemble des conditions contenant du cuivre se distingue clairement des autres conditions : contrôle ou herbicides.

Cette spécificité d'effets remarquée pour les herbicides est probablement la résultante des différences de modes d'actions plutôt que des molécules. En effet, des augmentations de chlorophylles similaires à celles induites par l'isoproturon ont été provoquées par le diuron (anciennement DCMU), une autre urée, sur *Lemna minor* (Teisseire et al., 1999), sur le maïs et sur l'orge (Lichtenthaler, 1984), et par la bentazone, une diazine inhibant également la photosynthèse aux niveau du photosystème II sur la moutarde (Lichtenthaler et al., 1982). En outre, des effets similaires à ceux du mésosulfuron-méthyl sur la croissance en biomasse, ont été trouvés dans d'autres études conduites sur d'autres sulfonylurées et/ou d'autres espèces (Cedergreen et al., 2004; Turgut and Fomin, 2002; Wendt-Rasch et al., 2003) ainsi qu'avec un herbicide d'une autre famille mais ayant le même mode d'action (l'imazethapyre) chez le pois (Royuela et al., 2000; Zabalza et al., 2004).

Ces résultats sous-entendent que des herbicides différents, de familles différentes mais ayant le même mode d'action pourraient induire une réponse spécifique.

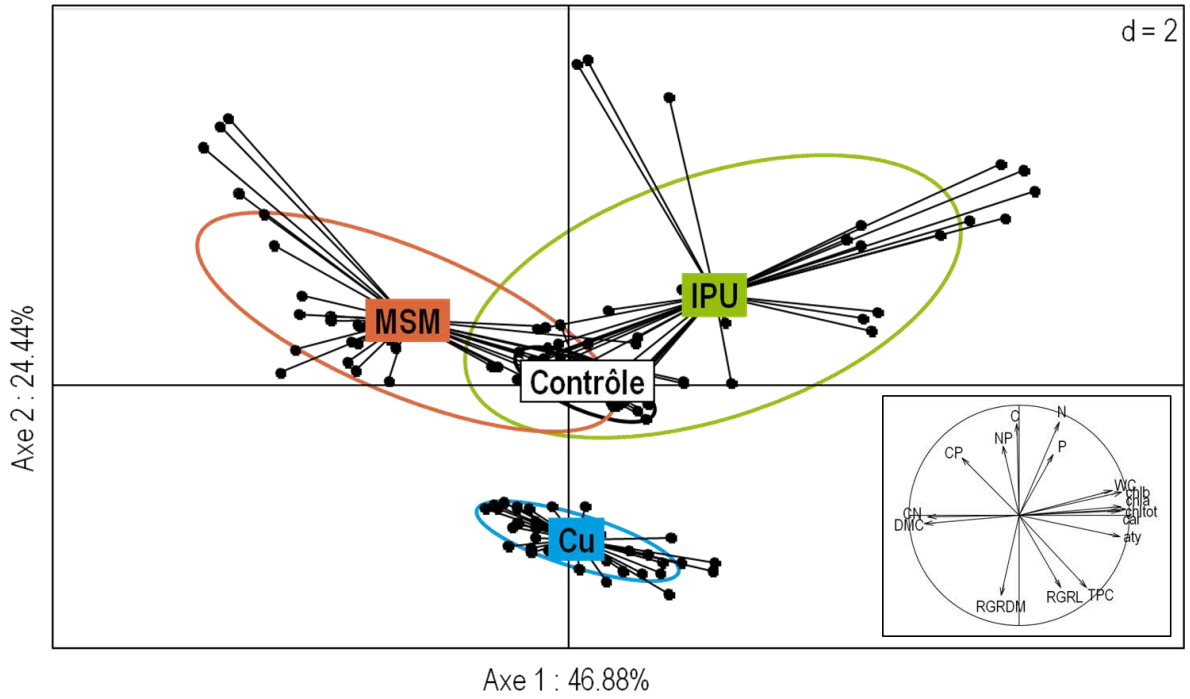


Figure V.I Analyse en composante principale (ACP) des trois polluants testés dans des conditions identiques sur *Myriophyllum spicatum* : l'isoproturon (IPU), un herbicide inhibiteur de la photosynthèse, le mésosulfuron-méthyl (MSM), un herbicide inhibiteur de la synthèse des acides aminés branchés, et le cuivre (Cu) un élément trace métallique (ETM) utilisé comme fongicide.

II. Est-ce que les nutriments modifient les réponses du Myriophylle aux polluants?

Les différentes expérimentations menées durant cette thèse ont mis en avant une spécificité, notamment des effets des herbicides, sur le Myriophylle. Nous avons également montré une forte influence de la composition du milieu sur les effets des différents polluants étudiés. En effet, toutes nos expérimentations montrent un effet significatif des nutriments sur la physiologie du Myriophylle mais également sur ses réponses aux polluants, pour au moins un des paramètres (**Chapitres III.I, IV.I et IV.III**) ou à au moins une des dates de prélèvements (**Chapitres III.II et IV.II**). Par exemple, dans un milieu enrichi en nitrate, l'isoproturon a induit une augmentation moins importante des chlorophylles et le mésosulfuron seul ou en mélange avec l'isoproturon a induit une augmentation du ratio N:P (**Chapitres III.I et III.II**). Pour le cuivre, même si aucune toxicité n'a pu être mise en évidence,

nous avons vu une distinction très nette entre les plantes du milieu normal et celles du milieu enrichi, qui avaient des teneurs en chlorophylles plus faibles, mais un DMC (contenu en matière sèche) et un ratio N:P plus élevé (**Chapitre IV.I**). Notre expérimentation avec l'arséniate a, quant à elle, permit de montrer que la nature de la ressource avait une influence sur les teneurs en chlorophylle et la stœchiométrie, avec un effet important de la présence ou non d'ammonium dans le milieu (**Chapitre IV.II**). Enfin, nous avons montré l'importance de la dose de saccharose dans le milieu de culture sur la physiologie de la plante. Celle-ci passant de photoautotrophe à photomixotrophe lorsque les doses de saccharose augmentent (**Chapitre IV.III**).

Ces effets des nutriments sur la plante corroborent les résultats d'études antérieures présentées dans le **tableau I.6**. Elles avaient également montré une forte influence des concentrations en nutriments dans les milieux sur les effets de polluants comme les herbicides ou les ETM pour différents types de producteurs primaires. De fait, des effets des nutriments ont été mis en évidence sur le périphyton ou le phytoplancton (Interlandi, 2002; Lizotte et al., 2013; Lozano and Pratt, 1994; Murdock et al., 2013; Tubea et al., 1981), sur les macrophytes (Bian et al., 2013; Cedergreen et al., 2016; Krayem et al., 2016), mais également sur leur réponses aux polluants (Cedergreen et al., 2016; Chia et al., 2015; Detenbeck et al., 1996; Interlandi, 2002; Krayem et al., 2016; Lozano and Pratt, 1994; Tubea et al., 1981).

Il est intéressant de constater qu'un enrichissement du milieu en azote a eu un effet positif sur la croissance de la chlorophycée unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa* (Tubea et al., 1981), et également sur une communauté de périphyton, où l'enrichissement en azote a fait augmenter la teneur en chlorophylle a et donc diminuer le ratio caroténoïdes/chlorophylle a (Detenbeck et al., 1996). Dans notre cas au contraire, l'enrichissement en azote a eu un impact négatif chez *M. spicatum*. Une explication possible à cette différence, au-delà de la différence d'organisme, serait la limitation ou non en nutriments de l'organisme testé. En effet, dans l'étude de Tubea et al. (1981), la croissance de *C. pyrenoidosa* est pratiquement nulle dans le milieu non-enrichi, ce qui sous-entend que ces microalgues sont limitées. L'apport de nutriments dans le milieu enrichi comble cette limitation et permet ainsi leur croissance, c'est pourquoi l'effet est bénéfique. En revanche, dans nos expérimentations, les effets d'un enrichissement en azote ont été testés par rapport à une situation dite

"optimale" donc non limitante. Les effets négatifs que nous avons observés suite à l'ajout d'azote semblent donc résulter d'un excès d'azote plutôt que d'une limitation.

Peut-on pour autant parler de toxicité de l'azote? Il est difficile de répondre à cette question. Krayem et al. (2016) ont montré qu'un milieu eutrophe induisait un stress oxydant chez *M. alterniflorum*. Cependant, ils ont attribués ces effets délétères à l'ammonium présent dans leur milieu. De fait, la toxicité de l'ammonium a déjà été montrée, y compris sur le genre *Myriophyllum* (Nimptsch and Pflugmacher, 2007; Zhang et al., 2013). Mais les milieux de nos expérimentations sur les herbicides et le cuivre n'en contenaient pas, ainsi leurs effets négatifs doivent être imputés au nitrate et non à l'ammonium. Concernant le nitrate aucune information n'a pu être trouvée dans la littérature quant à son éventuelle toxicité pour les végétaux (Camargo and Alonso, 2006), néanmoins Ozimek et al. (1993) ont noté une réduction de la croissance d'*Elodea nuttallii* à partir de concentrations en nitrate supérieures à 4 mg L^{-1}, mais sans donner d'explication à ces effets.

Elodea nuttallii et *M. spicatum* n'ont pas les mêmes besoins en nutriments (Gerloff, 1975). De plus, dans leur étude, Ozimek et al. (1993) utilisaient un milieu oligotrophe contrairement à nous. Ainsi il est difficile de comparer nos résultats. Cependant, sachant que nous avons travaillé à respectivement 219,63 pour le milieu normal, et à 878,52 mg N-NO_3 pour le milieu enrichi, nous pouvons supposer que nos concentrations en nitrate dans le milieu enrichi étaient excessives et ont inhibé le Myriophylle.

Ainsi, au regard de la bibliographie trouvée sur le sujet (**Tableau I.6**) et des résultats de nos expérimentations il apparait que les effets des nutriments sur les organismes photosynthétiques et *a fortiori* sur leurs réponses aux polluants soient dépendants de leur état initial (limité ou non) et du type de modification de la ressource appliqué.

III. Quels sont les apports d'une approche couplant écotoxicologie et écologie chimique?

Choisir quel paramètre étudier est une question épineuse, notamment dans le cadre de l'évaluation du risque par les tests standardisés. En effet, la pente des courbes doses-réponses peut être influencée par différents facteurs (le composé testé, l'organisme, ou la durée du test par exemple) mais aussi par les paramètres choisis, qui peuvent induire des différences d'EC50 importantes (Arts et al., 2008; Cedergreen and Streibig, 2005). C'est

pourquoi quelques études se sont employées à comparer les sensibilités de différents paramètres en réponse à des polluants seuls ou en mélanges (Arts et al., 2008; Cedergreen and Streibig, 2005). Mais les paramètres étudiés et ceux choisis au final dans les tests sont tous quasiment exclusivement liés à la croissance en longueur, ou en biomasse (OECD, 2014a, 2014b, 2006a, 2006b). Bien que la croissance soit un paramètre intéressant car intégratif de l'ensemble des processus métaboliques sous-jacents, nous avons pu montrer, avec cette thèse, que ce n'était pas forcément le paramètre le plus informatif.

Dans notre approche, la mesure de la croissance (en longueur et en biomasse) a été combinée à d'autres paramètres utilisés en écotoxicologie, comme les pigments photosynthétiques, ou tirés de l'écologie générale, comme le contenu en matière sèche (DMC), et de l'écologie chimique, comme la stœchiométrie et les métabolites secondaires. Cette approche a permis de montrer des effets complexes mais aussi spécifiques des différents polluants testés. Cette spécificité n'a pu être montrée que par l'utilisation de cette combinaison de paramètres. En effet, les analyses multivariées réalisées pour les différentes expérimentations (**Chapitres III et IV**) ont montré que la discrimination des effets des différents polluants se faisait grâce aux teneurs en pigments (surtout chlorophylles), au DMC, qui avait toujours un effet opposé aux chlorophylles, et à la stœchiométrie essentiellement, qui, selon le ratio ou l'élément considéré suivait un axe similaire ou perpendiculaire aux effets pigment - DMC. Ainsi la croissance bien qu'utile, s'est avérée un paramètre beaucoup moins informatif que les pigments, le DMC ou la stœchiométrie.

Or ce sont des paramètres simples, rapides à mesurer (ou calculer dans le cas du DMC), et peu onéreux, au contraire des approches "omiques". Il pourrait donc être envisagé de les inclure dans les tests standardisés, ou de remplacer une partie des paramètres étudiés autour de la croissance par ces nouveaux paramètres afin de gagner en informativité et sensibilité des tests. En effet, les approches en écotoxicologie n'ont pas cessé d'évoluer depuis la création de la discipline dans les années 70 (**Chapitre I.II**) : les tests et considérations d'hier ne sont plus ceux d'aujourd'hui, de même que ceux d'aujourd'hui ne seront pas ceux de demain. Cette discipline se modifie au gré des découvertes scientifiques, des avancées technologiques, mais aussi par les prises de conscience de ses limites.

Aussi, comme il a été admis par exemple que des tests supplémentaires sur les plantes aquatiques étaient nécessaires (Maltby, 2010; Vervliet-Scheebaum et al., 2006) car les

organismes de différents types ont des sensibilités différentes aux différents polluants (Giddings, 2011; Giddings et al., 2013) ; ce travail de thèse démontre qu'il faut une prise de conscience de la nécessité d'ajouter des paramètres plus informatifs, tels que les paramètres physiologiques et écologiques, dans les tests afin de répondre aux enjeux du stress multiple et améliorer l'évaluation du risque. Ce travail démontre en outre que, comme le préconisaient Artigas et al. (2012) et Vignati et al. (2007), l'interdisciplinarité peut apporter beaucoup à l'évaluation du risque.

IV. Quelles sont les conséquences pour les écosystèmes aquatiques?

Nous avons vu que la présence simultanée, dans les milieux, de polluants et de ressources variables pouvaient conduire à des interactions complexes entre ces deux facteurs de stress sur les différents paramètres mesurés. Nos résultats suggèrent en outre qu'un enrichissement du milieu en nitrate peut accentuer les effets de certains herbicides comme l'isoproturon et le mésosulfuron-méthyl (**Chapitre III**). Cela tend donc à prouver que l'enrichissement des milieux par les activités anthropiques peut conduire à des effets délétères sur les macrophytes de deux façons au lieu d'une seule, contrairement à ce qui était supposé.

Il a, jusqu'à présent, été bien établit que l'enrichissement d'un élément nutritif, surtout un élément limitant, en stimulant le phytoplancton et le périphyton augmente la turbidité de l'eau. Cette augmentation de la turbidité conduit à un changement d'un milieu dominé par des macrophytes submergées à un milieu dominé par des espèces émergentes ou flottantes, voire par du phytoplancton dans les cas où la lumière devient limitante pour l'ensemble des macrophytes (Dalton et al., 2015; Scheffer et al., 1993). Dans ce système, les effets de l'enrichissement sur les macrophytes sont indirects. Mais il semble aussi, au vue de nos résultats, que des effets délétères puissent survenir directement par modification du métabolisme de la plante et de ses réponses à d'autres facteurs de stress comme les polluants.

Enrichissement en nutriments et pollution des milieux : une combinaison gagnante contre les macrophytes? Pas forcément. En effet, Dalton et al. (2015) qui étudiaient en rivière

naturelle les réponses d'une communauté de macrophytes à l'atrazine et à un enrichissement en nutriments ont certes montré une diminution de la qualité floristique et un remaniement de la communauté, mais pas sa disparition. Les espèces sensibles aux nutriments ont disparues, mais d'autres se sont installées et se sont développées. Un tel remaniement n'est évidemment pas sans conséquences pour le fonctionnement de l'écosystème, mais cela montre que les communautés peuvent s'adapter pour faire face à de tels facteurs de stress.

Un autre point intéressant concernant les conséquences écosystémiques des interactions polluants - ressources sont leurs effets sur des paramètres tels que le DMC, les ratios C:N et C:P ou encore les teneurs en composés phénoliques totaux (TPC). En effet, ces paramètres vont permettre de définir la "qualité" de la plante pour les organismes vivant en interaction avec le Myriophylle, comme des herbivores et des compétiteurs (les autres organismes photosynthétiques). Par exemple, une augmentation du DMC diminue la palatabilité de la plante pour les herbivores (Elger and Willby, 2003), des ratios C:N ou C:P plus élevés sont le signe d'une moins bonne valeur nutritive de la plante, ou encore une augmentation du TPC peut être due à une accumulation de tellimagrandine II (**Chapitre I.I**) qui causera une inhibition plus importante des herbivores (Choi et al., 2002; Fornoff and Gross, 2014) ou des compétiteurs (Leu et al., 2002) du Myriophylle.

Ces paramètres sont importants car nous devons de plus en plus travailler à des doses environnementalement réalistes, doses qui n'induisent pas toujours d'effets sur la croissance. Cette absence d'effet, ou des effets à très hautes doses, peuvent conduire les organismes de réglementation à conclure à l'innocuité des molécules testées aux doses environnementales, et ainsi autoriser leur utilisation ou leur mise sur le marché. Or nous montrons bien ici qu'une absence d'effet sur la croissance, ou un effet à des doses élevées ne signifie pas qu'il n'y a pas d'effet sur le métabolisme, et/ou des altérations de certains processus pouvant avoir des conséquences directes et indirectes sur le fonctionnement des écosystèmes à des doses plus environnementalement réalistes.

V. L'évaluation du risque de demain : faut-il revoir certaines approches?

L'analyse de la bibliographie (**Chapitre I.IV**), les différents résultats obtenus au cours de cette thèse, ainsi que les points discutés ci-dessus nous amènent à nous interroger quant à l'évaluation de risque future de telles combinaisons polluant - ressource.

V.1 Quel type de test choisir?

L'analyse de la bibliographie (**Chapitre I.IV**) a révélé l'existence de nombreux systèmes de tests différents, notamment dans le cas des herbicides : systèmes plante - eau axénique, plante - eau - sédiment, microcosme, ou mésocosme. Si les micro- ou mésocosmes, en augmentant la complexité de leur systèmes gagnent en réalisme environnemental, ils augmentent par la même occasion le nombre de facteurs confondants pouvant influencer la ou les réponses des organismes étudiés et gêner les conclusions. Les systèmes plus contrôlés permettent quant à eux plus d'homogénéité des conditions de culture. Mais les tests non-axéniques sur des systèmes plante-eau-sédiments, comme expliqué dans le **chapitre II**, n'empêchent pas le développement de microorganismes, c'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur un système plante - eau en conditions axéniques.

Contrairement aux études trouvées sur l'évaluation des effets des herbicides sur le genre *Myriophyllum* (**Tableaux I.4 et I.6**) dont la plupart étaient réalisées dans des systèmes complexes, nous avons pu, dans nos systèmes axéniques, montrer des effets des facteurs seuls mais également des interactions entre eux dans la plupart de nos expérimentations. Ainsi nos expérimentations confortent une tendance déjà observée dans le **chapitre I.IV** : la mise en évidence d'effets des facteurs de stress est plus facile en conditions contrôlées, mais en même temps, ces systèmes sont moins réalistes d'un point de vue environnemental. C'est pourquoi on peut se demander : quel test choisir pour une évaluation du risque la plus fiable possible ?

Il est reconnu que l'utilisation d'une combinaison de paramètres apporte plus d'information qu'un seul paramètre notamment dans le cadre d'évaluation de stress multiples comme nous l'avons montré ici. De mon point de vu, de la même manière, l'utilisation de différents systèmes de test est également nécessaire. En effet, chaque système de test a ses avantages

et ses limites : les systèmes plus contrôlés sont adaptés pour la mise en évidence des effets individuels ainsi que la recherche des modes d'action toxiques. En revanche, ils ont une faible représentativité environnementale. Au contraire, les tests plus complexes permettent la mise en évidence d'effets globaux à des niveaux d'organisation supérieurs mais sont globalement moins réplicables car dépendant de nombreux facteurs pouvant influencer les réponses des organismes (**Figure V.II**, tiré de Caquet, 2012).

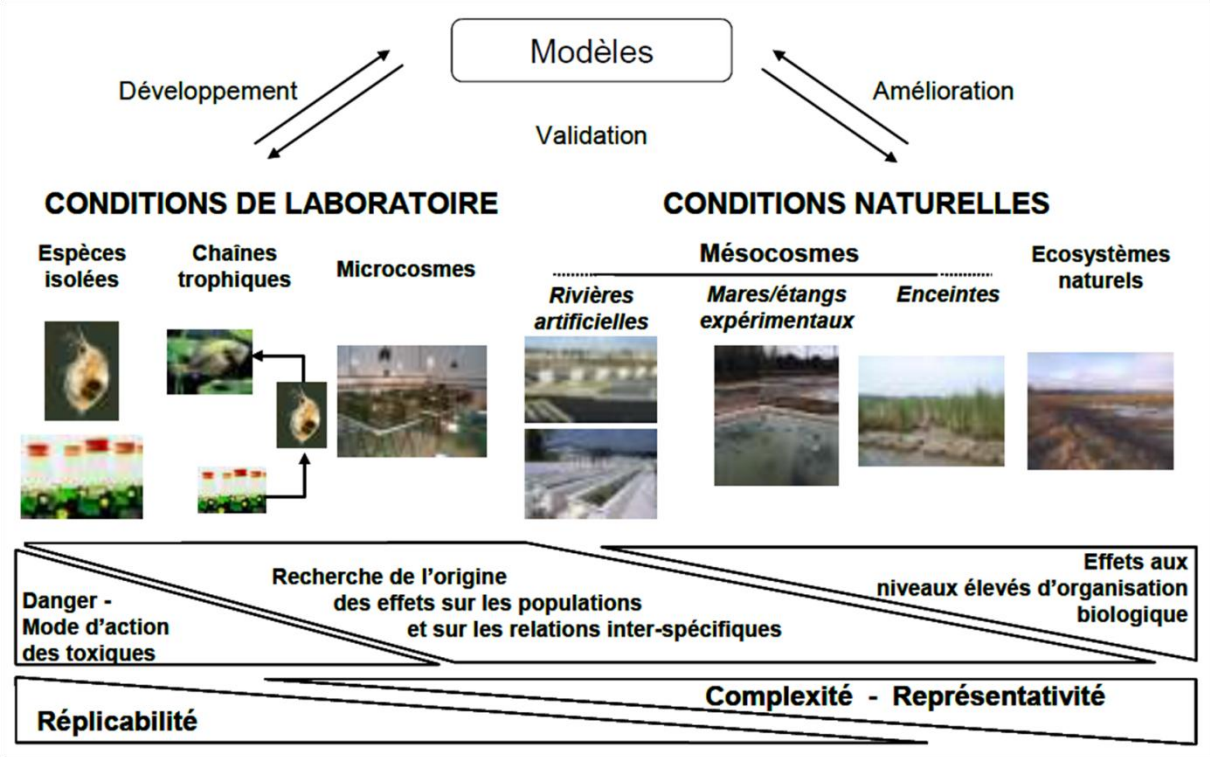


Figure V.II Outils expérimentaux utilisés en écotoxicologie aquatique (Caquet, 2012)

Nous avons vu que le choix du système de test était un compromis entre contrôle et représentativité environnementale. Les tests en conditions axéniques pour le Myriophylle sont souvent critiqués pour leur système excluant les sédiments, alors que le Myriophylle est une macrophyte enracinée. Le choix du milieu de culture dans ces tests axéniques est un autre point sujet à controverse.

V.2. Quel milieu choisir?

Les premières cultures *in vitro* de Myriophylle ont été réalisées par Kane and Gilman (1991) dans le milieu Murashige et Skoog (Murashige and Skoog, 1962). Depuis cette première

étude, des cultures de Myriophylle ont été adaptées dans différents milieux, ayant des teneurs et des sources de nutriments différentes. Roshon et al. (1996) ont comparé la croissance de *Myriophyllum sibiricum* dans cinq de ces milieux : le Murashige et Skoog, le Hoagland, le Gaudet, l'Andrews et l'"eau dure" (Hard Water en anglais). C'est sur la base des conclusions de cette étude que le milieu Andrews a été choisi comme milieu de référence pour le test normalisé n°238 (OECD, 2014b). Ce milieu est moins riche en nutriments que ne l'est le Murashige et Skoog par exemple, mais nous n'avons pas travaillé avec durant cette thèse pour les raisons évoquées dans le **chapitre II** : le début de la thèse était antérieur à l'homologation de la norme et le laboratoire utilisait depuis de nombreuses années un autre milieu qui permettait d'obtenir un bon rendement des cultures.

Nous avons utilisé un milieu de culture dérivé du Murashige et Skoog et appelé 1/2 MinA pour nos cultures et nos tests, que nous avons modifié au besoin (**Chapitres III et IV**). Dans notre milieu, le carbone est apporté sous forme de saccharose à hauteur de 8,76 mM (c'est à dire 0,3 g L^{-1}), contre les 87,6 mM (30 g L^{-1}) préconisés par Kane et Gilman (1991). Cette réduction du saccharose a été choisie avant le début de cette thèse. Néanmoins, c'est suite aux résultats obtenus lors de la première expérimentation (le test de l'effet du cadmium dans des milieux plus ou moins enrichi en saccharose, cf. **chapitre IV.III**), qu'il a été décidé de conserver la concentration de 3 g L^{-1} pour les expérimentations suivantes. Il a en effet été démontré qu'en présence de ce sucre les plantes subissaient un profond bouleversement de leur métabolisme : sous forme d'un passage de photoautotrophie à photomixotrophie (Badr et al., 2015, 2011). En outre, des études ont montré que la présence de saccharose dans le milieu de culture rendait *Arabidopsis thaliana*, une plante terrestre, tolérante à l'Atrazine (Sulmon et al., 2007, 2004). Il n'est donc pas à exclure que l'utilisation de saccharose modifie les réponses du Myriophylle aux polluants. Cependant, comme le saccharose est nécessaire pour obtenir une bonne croissance des plantes, il a été décidé de prendre une concentration suffisamment importante pour permettre une croissance optimale des plantes, tout en limitant au maximum les modifications de réponses aux polluants, et le passage vers de la photomixotrophie, (voir discussion **chapitre IV.3**).

D'autres alternatives à cette réduction du saccharose, qui limite mais n'empêche pas les modifications du métabolisme de la plante, auraient pu être le remplacement de cette source de carbone par une autre, telle qu'un bullage CO_2 ou un amendement de

hydrogénocarbonate. Mais l'installation d'un bullage CO_2 en conditions axéniques dans des enceintes de culture sur des tests de grande ampleur est compliquée ; de plus, le déplacement quotidien des flacons permettant de randomiser les légères variations de température et de luminosité au sein de l'enceinte risque de compromettre la stérilité des cultures par arrachage et/ou mélange des tuyaux d'aération. L'amendement d'hydrogénocarbonate est quant à lui techniquement réalisable. Cependant nous avons pu observer que la croissance en conditions axéniques est moins bonne avec hydrogénocarbonate qu'avec saccharose (*observations personnelles non publiées*). C'est pourquoi ces alternatives n'ont pas été retenues.

Notre milieu de culture basé sur le Murashige & Skoog (Murashige and Skoog, 1962), modifié ou non, est très différent et bien plus riche en nutriments que les eaux naturelles. Il est donc assez peu représentatif des conditions environnementales réelles. Mais, comme en l'absence de sédiment, le Myriophylle doit absorber tous ces nutriments directement dans la colonne d'eau, il faut des concentrations plus importantes pour obtenir une croissance qui soit à la fois bonne et rapide, deux paramètres important pour les études en laboratoire.

Certains auteurs voient le milieu Andrews, préconisé par la norme OCDE (OECD, 2014b) comme une meilleure solution que les milieux très riches. En effet, il est moins riche en nutriments et en ce sens plus réaliste que le 1/2 Min A par exemple, cependant, à l'instar du milieu Murashige et Skoog original, il contient 30 g L^{-1} de saccharose ce qui d'une part n'est pas représentatif des conditions naturelles, et d'autres part, pour les raisons évoquées ci-dessus, biaise totalement l'évaluation du risque (puisque le métabolisme de la plante est complètement bouleversé). En plus, son rapport molaire N:P, de 12:1, est plus bas que ceux trouvés dans beaucoup de milieux aquatiques (Demars and Edwards, 2007; Güsewell and Koerselman, 2002; Hessen, 2013), c'est pourquoi un déséquilibre au niveau de la disponibilité de l'azote ne peut pas être exclu.

Dans ce contexte, certaines études se tournent aujourd'hui vers des milieux dont la composition est calquée sur celle mesurée sur le terrain (Delmail et al., 2011a, 2011b; Krayem et al., 2016). Cependant, comme d'une part les plantes de ces études sont conservées et multipliées dans du milieu Murashige et Skoog avec 30 g L^{-1} de saccharose, avant d'être transférées pour le test dans le milieu moins enrichi, et que d'autre part ces

études ne parlent pas ou peu de la croissance, il est difficile de savoir si ces systèmes de culture en milieu « réaliste » d'un point de vue environnemental sont viables.

En outre, ces études interrogent quant aux effets d'un tel changement de milieu pour les plantes : ces dernières passent d'un milieu très riche en nutriments, à un milieu oligotrophe. Bien que les plantes aient 15 jours d'acclimatation à ce nouveau milieu (Delmail et al., 2011a, 2011b) on peut imaginer que cela représente un stress considérable pour la plante, stress pouvant perturber les résultats des tests réalisés par la suite.

PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a montré des interactions complexes entre les polluants (herbicides et ETM) et les modifications de la ressource sur *Myriophyllum spicatum*. Les résultats ont été obtenus avec un système plante - eau en conditions axéniques. L'analyse de la bibliographie (**Tableaux I.4, I.5 et I.6**) a permis de montrer qu'un même polluant testé dans des conditions différentes pouvait avoir des effets plus ou moins marqués (voir par exemple : Mohr et al., 2013). En condition naturelles, certains polluants pourtant connus pour leur toxicité, comme l'atrazine, n'induisent même plus d'effets (Dalton et al., 2015). C'est pourquoi, il serait intéressant de réaliser des tests similaires mais sur des systèmes plus complexes. A cette fin, de nouvelles expérimentations ont déjà eu lieu au laboratoire sur un système plante - eau - sédiment similaire à celui préconisé par la norme OCDE n°239 (OECD, 2014a). Ces tests s'intéressaient aux effets de l'isoproturon et du mésosulfuron-méthyl. Les premiers résultats montent des effets similaires à ceux mis en évidence dans les expérimentations de cette thèse, mais de plus amples analyses sont nécessaires pour pouvoir bien comparer les résultats des deux systèmes.

Cette étude pourrait également être complétée par des expérimentations testant les effets des facteurs de stress sur les propriétés allélochimiques du Myriophylle. En effet, nous avons pu montrer dans nos expérimentations des modifications du DMC, de la stœchiométrie mais aussi des TPC induites par les polluants testés, les modifications de la ressource ou bien la combinaison des deux. Ces modifications nous ont permis, sur la base de travaux antérieurs (Choi et al., 2002; Fornoff and Gross, 2014; Gross et al., 1996; Leu et al., 2002), d'émettre des hypothèses quant aux effets indirects qu'auraient ces modifications sur les herbivores et les compétiteurs. Il serait bon de pouvoir les vérifier, dans un premier temps à l'aide de tests d'inhibition de croissance de microalgues par des extraits de plantes, puis dans un second temps en réalisant des études en microcosmes avec des communautés de phytoplancton naturelles, des herbivores ainsi que d'autres macrophytes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ærtebjerg, G., Andersen, J.H., Hansen, O.S., 2003. Nutrients and eutrophication in Danish marine waters. A challenge for science and management. National Environmental Research Institute 126.

Altenburger, R., Ait-Aissa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barceló, D., Seiler, T.-B., Brion, F., Busch, W., Chipman, K., de Alda, M.L., de Aragão Umbuzeiro, G., Escher, B.I., Falciani, F., Faust, M., Focks, A., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jäger, F., Jahnke, A., Kortenkamp, A., Krauss, M., Lemkine, G.F., Munthe, J., Neumann, S., Schymanski, E.L., Scrimshaw, M., Segner, H., Slobodnik, J., Smedes, F., Kughathas, S., Teodorovic, I., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Walz, K.-H., Williams, T.D., Van den Brink, P.J., van Gils, J., Vrana, B., Zhang, X., Brack, W., 2015. Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. Science of The Total Environment 512-513, 540–551. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.057

Archaimbault, V., Usseglio-Polatera, P., Garric, J., Wasson, J.-G., Babut, M., 2009. Assessing pollution of toxic sediment in streams using bio-ecological traits of benthic macroinvertebrates: Toxic pollution index and macroinvertebrates. Freshwater Biology 55, 1430–1446. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02281.x

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.-C., García-Río, L., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, Ecosystems & Environment 123, 247–260. doi:10.1016/j.agee.2007.07.011

Arshad, M., Ali, S., Noman, A., Ali, Q., Rizwan, M., Farid, M., Irshad, M.K., 2016. Phosphorus amendment decreased cadmium (Cd) uptake and ameliorates chlorophyll contents, gas exchange attributes, antioxidants, and mineral nutrients in wheat (*Triticum aestivum* L.) under Cd stress. Archives of Agronomy and Soil Science 62, 533–546. doi:10.1080/03650340.2015.1064903

Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A.B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., De Lange, H.J., Lahr, J., Lehtonen, K.K., Lettieri, T., Liess, M., Lofts, S., Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen, C., Usseglio-Polatera, P., van den Brink, N., Vindimian, E., Williams, R., 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. Environmental Pollution 160, 201–206. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.011

Arts, G.H.P., Belgers, J.D.M., Hoekzema, C.H., Thissen, J.T.N.M., 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. Environmental Pollution 153, 199–206. doi:10.1016/j.envpol.2007.07.019

Badr, A., Angers, P., Desjardins, Y., 2011. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 107, 13–24. doi:10.1007/s11240-011-9951-5

Badr, A., Angers, P., Desjardins, Y., 2015. Comprehensive analysis of in vitro to ex vitro transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 122, 491–508. doi:10.1007/s11240-015-0786-3

Baker, L.F., Mudge, J.F., Thompson, D.G., Houlahan, J.E., Kidd, K.A., 2016. The combined influence of two agricultural contaminants on natural communities of phytoplankton and zooplankton. Ecotoxicology 25, 1021–1032. doi:10.1007/s10646-016-1659-1

Ban, S.S., Graham, N.A.J., Connolly, S.R., 2014. Evidence for multiple stressor interactions and effects on coral reefs. Global Change Biology 20, 681–697. doi:10.1111/gcb.12453

Bard, S.M., 2008. Ecotoxicology the focal topics. Encyclopedia of Ecology.

Bauer, N., Blaschke, U., Beutler, E., Gross, E.M., Jenett-Siems, K., Siems, K., Hilt, S., 2009. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on Anabaena variabilis. Aquatic Botany 91, 110–116. doi:10.1016/j.aquabot.2009.03.005

Belgers, J.D.M., Aalderink, G.H., Arts, G.H.P., Brock, T.C.M., 2011. Can time-weighted average concentrations be used to assess the risks of metsulfuron-methyl to *Myriophyllum spicatum* under different time-variable exposure regimes? Chemosphere 85, 1017–1025. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.025

Belgers, J.D.M., Van Lieverloo, R.J., Van der Pas, L.J.T., Van den Brink, P.J., 2007. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. Aquatic Botany 86, 260–268. doi:10.1016/j.aquabot.2006.11.002

Bi, Y.F., Miao, S.S., Lu, Y.C., Qiu, C.B., Zhou, Y., Yang, H., 2012. Phytotoxicity, bioaccumulation and degradation of isoproturon in green algae. Journal of Hazardous Materials 243, 242–249. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.10.021

Bian, J., Berninger, J.P., Fulton, B.A., Brooks, B.W., 2013. Nutrient stoichiometry and concentrations influence silver toxicity in the aquatic macrophyte Lemna gibba. Science of The Total Environment 449, 229–236. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.098

Bird, K.T., 1993. Comparisons of herbicide toxicity using in-vitro culture of *Myriophyllum spicatum*. Journal of Aquatic Plant Management 31, 43–45.

Blair, A.M., Martin, T.D., 1988. A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides. Pesticide Science 22, 195–219.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative damages, and Oxygen deprivation stress: a review. Annals of botany 91, 179 – 194. doi:10.1093/aob/mcf118

Bornette, G., Puijalon, S., 2011. Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. Aquatic Sciences 73, 1–14. doi:10.1007/s00027-010-0162-7

Boutin, C., Freemark, K.E., Keddy, C.J., 1995. Overview and rationale for developing regulatory guidelines for nontarget plant testing with chemical pesticides. Environmental Toxicology and Chemistry 14, 1465–1475. doi:10.1002/etc.5620140905

Breitburg, D.L., Sanders, J.G., Gilmour, C.C., Hatfield, C.A., Osman, R.W., Riedel, G.F., Seitzinger, S.P., 1999. Variability in responses to nutrients and trace elements, and transmission of stressor effects through an estuarine food web. Limnology and Oceanography 44, 837–863.

Brooks, B.W., Fulton, B.A., Hanson, M.L., 2015. Aquatic toxicology studies with macrophytes and algae should balance experimental pragmatism with environmental realism. Science of The Total Environment 536, 406–407. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.085

Bryant, J.P., Chapin, F.S., Klein, D.R., 1983. Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. Oikos 40, 357. doi:10.2307/3544308

Caillat, A., Ciffroy, P., Grote, M., Rigaud, S., Garnier, J.-M., 2014. Bioavailability of copper in contaminated sediments assessed by a DGT approach and the uptake of copper by the aquatic plant *Myriophyllum aquaticum*: Biovailability of copper in sediments. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 278–285. doi:10.1002/etc.2422

Calabrese, E.J., Bachmann, K.A., Bailer, A.J., Bolger, P.M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M.G., Chiueh, C.C., Clarkson, T.W., Cook, R.R., Diamond, D.M., Doolittle, D.J., Dorato, M.A., Duke, S.O., Feinendegen, L., Gardner, D.E., Hart, R.W., Hastings, K.L., Hayes, A.W., Hoffmann, G.R., Ives, J.A., Jaworowski, Z., Johnson, T.E., Jonas, W.B., Kaminski, N.E., Keller, J.G., Klaunig, J.E., Knudsen, T.B., Kozumbo, W.J., Lettieri, T., Liu, S.-Z., Maisseu, A., Maynard, K.I., Masoro, E.J., McClellan, R.O., Mehendale, H.M., Mothersill, C., Newlin, D.B., Nigg, H.N., Oehme, F.W., Phalen, R.F., Philbert, M.A., Rattan, S.I.S., Riviere, J.E., Rodricks, J., Sapolsky, R.M., Scott, B.R., Seymour, C., Sinclair, D.A., Smith-Sonneborn, J., Snow, E.T., Spear, L., Stevenson, D.E., Thomas, Y., Tubiana, M., Williams, G.M., Mattson, M.P., 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. Toxicology and Applied Pharmacology 222, 122–128. doi:10.1016/j.taap.2007.02.015

Calow, P., Forbes, V.E., 2003. Does ecotoxicology inform ecological risk assessment? Environmental science & technology 37, 146A–151A.

Camargo, J.A., Alonso, Á., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. Environment International 32, 831–849. doi:10.1016/j.envint.2006.05.002

Caquet, T., 2012. Evaluation des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides. Innovations Agronomiques 23.

Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P., 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. Journal of Experimental Botany 50, 613–624.

Cardwell, A.J., Hawker, D.W., Greenway, M., 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. Chemosphere 48, 653–663.

Carpenter, S.R., Lodge, D.M., 1986. Effects of submerged macrophytes on ecosystem processes. Aquatic Botany 26, 341 – 370.

Cedergreen, N., 2014. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. PLoS ONE 9, e96580. doi:10.1371/journal.pone.0096580

Cedergreen, N., Felby, C., Porter, J.R., Streibig, J.C., 2009. Chemical stress can increase crop yield. Field Crops Research 114, 54–57. doi:10.1016/j.fcr.2009.07.003

Cedergreen, N., Hansen, N.K.K., Arentoft, B.W., 2016. The influence of nitrogen and phosphorous status on glyphosate hormesis in *Lemna minor* and *Hordeum vulgare*. European Journal of Agronomy 73, 107–117. doi:10.1016/j.eja.2015.11.003

Cedergreen, N., Spliid, N.H., Streibig, J.C., 2004. Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicide. Ecotoxicology and Environmental Safety 58, 314–323. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.04.002

Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? Environmental toxicology and chemistry 24, 1676–1683.

Cedergreen, N., Streibig, J.C., Spliid, N.H., 2004. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. Ecotoxicology and Environmental Safety 57, 153–161. doi:10.1016/S0147-6513(02)00145-8

Chambers, P.A., Lacoul, P., Murphy, K.J., Thomaz, S.M., 2008. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. Hydrobiologia 595, 9–26. doi:10.1007/s10750-007-9154-6

Chapman, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. Marine pollution bulletin 44, 7–15.

Chia, M.A., Lombardi, A.T., da Graça Gama Melão, M., Parrish, C.C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Aquatic Toxicology 160, 87–95. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.002

Choi, C., Bareiss, C., Walenciak, O., Gross, E.M., 2002. Impact of polyphenols on growth of the aquatic herbivore *Acentria ephemerella*. Journal of Chemical Ecology 28, 2245–2256.

Clements, W.H., Rohr, J.R., 2009. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 1789–1800.

Cook, C.D.K., 1999. The number and kinds of embryo-bearing plants which have become aquatic: a survey. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 2, 79–102. doi:10.1078/1433-8319-00066

Correll, D.S., Correll, H.B., 1975. Aquatic and wetland plants of southwestern United States. Stanford University Press, Stanford, Calif.

Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., Amrani, A. El, 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 57, 449–459. doi:10.1093/jxb/erj027

Coutris, C., Merlina, G., Silvestre, J., Pinelli, E., Elger, A., 2011. Can we predict community-wide effects of herbicides from toxicity tests on macrophyte species? Aquatic Toxicology 101, 49–56. doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.017

Crain, C.M., Kroeker, K., Halpern, B.S., 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. Ecology Letters 11, 1304–1315. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x

Dalton, R.L., Boutin, C., Pick, F.R., 2015. Nutrients override atrazine effects on riparian and aquatic plant community structure in a North American agricultural catchment. Freshwater Biology 60, 1292–1307. doi:10.1111/fwb.12563

Damalas, C.A., 2004. Herbicide Tank Mixtures Common Interactions. International Journal of Agriculture and Biology 6, 209–212.

Danger, M., Lacroix, G., Oumarou, C., Benest, D., MéRiguet, J., 2008. Effects of food-web structure on periphyton stoichiometry in eutrophic lakes: a mesocosm study. Freshwater Biology 53, 2089–2100. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02031.x

Davidson, E.A., David, M.B., Galloway, J.N., Goodale, C.L., Haeuber, R., Harrison, J.A., Howarth, R.W., Jaynes, D.B., Lowrance, R.R., Nolan, B.T., 2012. Excess Nitrogen in the U.S. nvironment: Trends, Risks, and Solutions (No. 15), Issues in Ecology.

Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. Aquatic Toxicology 93, 11–17. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.014

Delmail, D., Labrousse, P., Hourdin, P., Larcher, L., Moesch, C., Botineau, M., 2011a. Differential responses of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae) organs to copper: physiological and developmental approaches. Hydrobiologia 664, 95–105. doi:10.1007/s10750-010-0589-9

Delmail, D., Labrousse, P., Hourdin, P., Larcher, L., Moesch, C., Botineau, M., 2011b. Physiological, anatomical and phenotypical effects of a cadmium stress in different-aged chlorophyllian organs of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae). Environmental and Experimental Botany 72, 174–181. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.03.004

Demars, B.O.L., Edwards, A.C., 2007. Tissue nutrient concentrations in freshwater aquatic macrophytes: high inter-taxon differences and low phenotypic response to nutrient supply. Freshwater Biology 52, 2073–2086. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01817.x

Detenbeck, N.E., Hermanutz, R., Allen, K., Swift, M.C., 1996. Fate and effects of the herbicide atrazine in flow-through wetland mesocosms. Environmental Toxicology and Chemistry 15, 937–946. doi:10.1002/etc.5620150616

Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Current Opinion in Plant Biology 1, 258–266. doi:10.1016/S1369-5266(98)80114-3

Dodds, W.K., Clements, W.H., Gido, K., Hilderbrand, R.H., King, R.S., 2010. Thresholds, breakpoints, and nonlinearity in freshwaters as related to management. Journal of the North American Benthological Society 29, 988–997. doi:10.1899/09-148.1

Donnachie, R.L., Johnson, A.C., Moeckel, C., Pereira, M.G., Sumpter, J.P., 2014. Using risk-ranking of metals to identify which poses the greatest threat to freshwater organisms in the UK. Environmental Pollution 194, 17–23. doi:10.1016/j.envpol.2014.07.008

Douchiche, O., Rihouey, C., Schaumann, A., Driouich, A., Morvan, C., 2007. Cadmium-induced alterations of the structural features of pectins in flax hypocotyl. Planta 225, 1301–1312. doi:10.1007/s00425-006-0425-7

Duarte, C.M., 1992. Nutrient concentration of aquatic plants: patterns across species. Limnology and Oceanography 37, 882–889.

Elger, A., Willby, N.J., 2003. Leaf dry matter content as an integrative expression of plant palatability: the case of freshwater macrophytes. Functional Ecology 17, 58–65.

European Environment Agency (Ed.), 2012. European waters: assessment of status and pressures, EEA report. European Environment Agency [u.a.], Copenhagen.

Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Carlson, A.R., 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 1830–1834.

Fan, J.-L., Wei, X.-Z., Wan, L.-C., Zhang, L.-Y., Zhao, X.-Q., Liu, W.-Z., Hao, H.-Q., Zhang, H.-Y., 2011. Disarrangement of actin filaments and Ca^{2+} gradient by $CdCl_2$ alters cell wall construction in *Arabidopsis thaliana* root hairs by inhibiting vesicular trafficking. Journal of Plant Physiology 168, 1157–1167. doi:10.1016/j.jplph.2011.01.031

Fehér, J., Gáspár, J., Szurdiné Veres, K., Kiss, A., Austnes, K., Globevnik, L., Kirn, T., Peterlin, M., Stein, U., Spiteri, C., Prins, T., Deltares, S., Laukkonen, E., Heiskanen, A.-S., Semerádová, S., Künitzer, A., Kristensen, P., 2012. Hydromorphological alterations and pressures in European rivers, lakes, transitional and coastal waters: thematic assessment for EEA Water 2012 Report. European Topic Centre on Inland, Coastal and Marine Waters, Prague.

Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M., 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. Aquatic Toxicology 65, 187–204. doi:10.1016/S0166-445X(03)00133-4

Folke, C., Carpenter, S., Walker, B., Scheffer, M., Elmqvist, T., Gunderson, L., Holling, C.S., 2004. Regime Shifts, Resilience, and Biodiversity in Ecosystem Management. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 35, 557–581. doi:10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105711

Folt, C.L., Chen, C.Y., Moore, M.V., Burnaford, J., 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. Limnology and Oceanography 44, 864–877.

Fornoff, F., Gross, E.M., 2014. Induced defense mechanisms in an aquatic angiosperm to insect herbivory. Oecologia 175, 173–185. doi:10.1007/s00442-013-2880-8

Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in Lemna minor. Environmental and Experimental Botany 49, 159–168.

Frost, P.C., Hicks, A.L., 2012. Human shoreline development and the nutrient stoichiometry of aquatic plant communities in Canadian Shield lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 69, 1642–1650. doi:10.1139/f2012-080

Fulton, B.A., Brain, R.A., Usenko, S., Back, J.A., Brooks, B.W., 2010. Exploring *Lemna gibba* thresholds to nutrient and chemical stressors: Differential effects of triclosan on internal stoichiometry and nitrate uptake across a nitrogen:phosphorus gradient. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 2363–2370. doi:10.1002/etc.289

Fulton, B.A., Brain, R.A., Usenko, S., Back, J.A., King, R.S., Brooks, B.W., 2009. Influence of nitrogen and phosphorus concentrations and ratios on *Lemna gibba* growth

responses to triclosan in laboratory and stream mesocosm experiments. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 2610–2621.

Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation 37, 263–285.

Gauvrit, C., 1996. Efficacité et sélectivité des herbicides. Institut national de la recherche agronomique, Versailles.

Gerloff, G.C., 1975. Nutritional ecology of nuisance aquatic plants. U.S. Environmental Protection Agency, US EPA, Washington, DC, USA.

Getsinger, K.D., Davis, G.J., Brinson M. M., 1982. Changes in a *Myriophyllum spicatum L.* community following 2,4D treatment.pdf. Journal of Aquatic Plant Management 20, 4–8.

Giddings, J.M., 2011. The relative sensitivity of macrophyte and algal species to herbicides and fungicides: an analysis using species sensitivity distributions (Compliance Services International Report No. 11702).

Giddings, J.M., Arts, G., Hommen, U., 2013. The relative sensitivity of macrophyte and algal species to herbicides and fungicides: An analysis using species sensitivity distributions. Integrated Environmental Assessment and Management 9, 308–318. doi:10.1002/ieam.1387

Grace, J.B., Wetzel, R.G., 1978. The production biology of eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum L.*): a review. Journal of Aquatic Plant Management 16, 1–11.

Grillas, P., 1990. Distribution of submerged macrophytes in the Camargue in relation to environmental factors. Journal of vegetation Science 1, 393–402.

Gross, E.M., 2003a. Allelopathy of Aquatic Autotrophs. Critical Reviews in Plant Sciences 22, 313–339. doi:10.1080/713610859

Gross, E.M., 2003b. Differential response of tellimagrandin II and total bioactive hydrolysable tannins in an aquatic angiosperm to changes in light and nitrogen. Oikos 103, 497–504.

Gross, E.M., Meyer, H., Schilling, G., 1996. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. Phytochemistry 41, 133 – 138.

Grudnik, Z.M., Germ, M., 2010. *Myriophyllum spicatum* and *Najas marina* as Bioindicators of Trace Element Contamination in Lakes. Journal of Freshwater Ecology 25, 421–426. doi:10.1080/02705060.2010.9664385

Guittonny-Philippe, A., Masotti, V., Laffont-Schiwob, I., Delmail, D., Viglione, J., 2014. Potentiels d'utilisation des macrophytes pour réduire l'impact des inudstries sur les milieux aquatiques européens. Sciences Eaux et Territoires 15, 74 – 77.

Gunderson, L.H., 2000. Ecological resilience–in theory and application. Annual review of ecology and systematics 31, 425–439.

Güsewell, S., Koerselman, W., 2002. Variation in nitrogen and phosphorus concentrations of wetland plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 5, 37 – 61.

Halstead, N.T., McMahon, T.A., Johnson, S.A., Raffel, T.R., Romansic, J.M., Crumrine, P.W., Rohr, J.R., 2014. Community ecology theory predicts the effects of agrochemical mixtures on aquatic biodiversity and ecosystem properties. Ecology Letters 17, 932–941. doi:10.1111/ele.12295

Hänsch, R., Mendel, R.R., 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Current Opinion in Plant Biology 12, 259–266. doi:10.1016/j.pbi.2009.05.006

Harguinteguy, C.A., Noelia Cofré, M., Fernández-Cirelli, A., Luisa Pignata, M., 2016. The macrophytes *Potamogeton pusillus L.* and *Myriophyllum aquaticum (Vell.) Verdc.* as potential bioindicators of a river contaminated by heavy metals. Microchemical Journal 124, 228–234. doi:10.1016/j.microc.2015.08.014

Harguinteguy, C.A., Pignata, M.L., Fernández-Cirelli, A., 2015. Nickel, lead and zinc accumulation and performance in relation to their use in phytoremediation of macrophytes *Myriophyllum aquaticum* and *Egeria densa*. Ecological Engineering 82, 512–516. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.05.039

Harguinteguy, C.A., Schreiber, R., Pignata, M.L., 2013. *Myriophyllum aquaticum* as a biomonitor of water heavy metal input related to agricultural activities in the Xanaes River (Córdoba, Argentina). Ecological Indicators 27, 8–16. doi:10.1016/j.ecolind.2012.11.018

Haury, J., Peltre, M.C., Muller, S., Thiébaut, G., Tremolieres, M., Demars, B., Barbe, J., Dutartre, A., Daniel, H., Bernez, I., Guerlesquin, M., Lambert, E., 2001. Les macrophytes aquatiques bioindicateurs des systèmes lotiques. Intérêts et limites des indices macrophytiques (No. 87), Etude sur l'eau en france. Ministère de l'Ecologie et du développement durable, Paris, France.

Heine, S., Schmitt, W., Schäffer, A., Görlitz, G., Buresová, H., Arts, G., Preuss, T.G., 2015. Mechanistic modelling of toxicokinetic processes within *Myriophyllum spicatum*. Chemosphere 120, 292–298. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.065

Hering, D., Carvalho, L., Argillier, C., Beklioglu, M., Borja, A., Cardoso, A.C., Duel, H., Ferreira, T., Globevnik, L., Hanganu, J., Hellsten, S., Jeppesen, E., Kodeš, V., Solheim, A.L., Nõges, T., Ormerod, S., Panagopoulos, Y., Schmutz, S., Venohr, M., Birk, S., 2015. Managing aquatic ecosystems and water resources under multiple stress — An introduction to the MARS project. Science of The Total Environment 503-504, 10–21. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.106

Hessen, D., 2013. Inorganic Nitrogen Deposition and Its Impacts on N:P-Ratios and Lake Productivity. Water 5, 327–341. doi:10.3390/w5020327

Heugens, E.H., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. Critical reviews in toxicology 31, 247–284.

Hooper, D.U., Chapin, III, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. Ecological Monographs 75, 3 – 35.

Hooper, M.J., Ankley, G.T., Cristol, D.A., Maryoung, L.A., Noyes, P.D., Pinkerton, K.E., 2013. Interactions between chemical and climate stressors: A role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. Environmental Toxicology and Chemistry 32, 32–48. doi:10.1002/etc.2043

Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicology letters 133, 1–16.

Hughes, T.P., Connell, J.H., 1999. Multiple stressors on coral reefs: a long-term perspective. Limnology and oceanography 44, 932–940.

Husaini, Y., Rai, L.C., 1991. Studies on nitrogen and phosphorus metabolism and the photosynthetic electron transport system of *Nostoc linckia* under cadmium stress. Journal of Plant Physiology 138, 429–435. doi:10.1016/S0176-1617(11)80518-3

Hussner, A., Jahns, P., 2015. European native *Myriophyllum spicatum* showed a higher HCO3- use capacity than alien invasive *Myriophyllum heterophyllum*. Hydrobiologia 746, 171–182. doi:10.1007/s10750-014-1976-4

Interlandi, S.J., 2002. Nutrient–toxicant interactions in natural and constructed phytoplankton communities: results of experiments in semi-continuous and batch culture. Aquatic Toxicology 61, 35–51.

Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. Aquatic Toxicology 76, 93–110. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.001

Junghans, M., Schaefer, M., Drost, W., Hassold, E., Stock, F., Dünne, M., Juffernholz, T., Meyer, W., Ranke, J., 2008. Reconsidering environmental effects assessment of chemicals: Proposal for a dynamic testing strategy. Basic and Applied Ecology 9, 356–364. doi:10.1016/j.baae.2007.08.011

Kane, M.E., Gilman, E.F., 1991. In vitro propagation and bioassay systems for evaluating growth regulator effects on *Myriophyllum* species. Journal of Aquatic Plant Management 29, 29 – 32.

Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., Basibuyuk, M., Forster, C.F., 2003. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*). Process Biochemistry 39, 179–183. doi:10.1016/S0032-9592(03)00045-1

Knauer, K., Mohr, S., Feiler, U., 2008. Comparing growth development of *Myriophyllum spp.* in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. Environmental Science and Pollution Research - International 15, 322–331. doi:10.1007/s11356-008-0008-1

Knauert, S., Singer, H., Hollender, J., Knauer, K., 2010. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. Environmental Pollution 158, 167–174. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.023

Koricheva, J., 2002. The carbon-nutrient balance hypothesis is dead; long live the carbon-nutrient balance hypothesis. Oikos 98, 537 – 539.

Krayem, M., Deluchat, V., Rabiet, M., Cleries, K., Lenain, J.F., Saad, Z., Kazpard, V., Labrousse, P., 2016. Effect of arsenate As (V) on the biomarkers of *Myriophyllum alterniflorum* in

oligotrophic and eutrophic conditions. Chemosphere 147, 131–137. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.093

Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B., Siriwardena, G.M., 1999. The second silent spring? Nature 400, 611–612.

Lambert, S.J., Thomas, K.V., Davy, A.J., 2006. Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes. Chemosphere 63, 734–743. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.08.023

Landi, M., Tattini, M., Gould, K.S., 2015. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. Environmental and Experimental Botany 119, 4–17. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.05.012

Larras, F., Keck, F., Montuelle, B., Rimet, F., Bouchez, A., 2014. Linking diatom sensitivity to herbicides to phylogeny: a step forward for biomonitoring? Environmental Science & Technology 48, 1921–1930. doi:10.1021/es4045105

Lazartigues, A., Thomas, M., Cren-Olivé, C., Brun-Bellut, J., Le Roux, Y., Banas, D., Feidt, C., 2013. Pesticide pressure and fish farming in barrage pond in Northeastern France. Part II: residues of 13 pesticides in water, sediments, edible fish and their relationships. Environmental Science and Pollution Research 20, 117–125. doi:10.1007/s11356-012-1167-7

Leão, G.A., de Oliveira, J.A., Felipe, R.T.A., Farnese, F.S., Gusman, G.S., 2014. Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. Journal of Plant Interactions 9, 143–151. doi:10.1080/17429145.2013.784815

Lerdau, M., 2002. Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis. Oikos 98, 534 – 536.

Lesage, E., Mundia, C., Rousseau, D.P.L., Van de Moortel, A.M.K., Laing, G. Du, Meers, E., Tack, F.M.G., De Pauw, N., Verloo, M.G., 2007. Sorption of Co, Cu, Ni and Zn from industrial effluents by the submerged aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum L.* Ecological Engineering 30, 320–325. doi:10.1016/j.ecoleng.2007.04.007

Leu, E., Krieger-Liszkay, A., Charilaos, G., Gross, E.M., 2002. Polyphenolic Allelochemicals from the Aquatic Angiosperm *Myriophyllum spicatum* Inhibit Photosystem II. PLANT PHYSIOLOGY 130, 2011–2018. doi:10.1104/pp.011593

Lewander, M., Greger, M., Kautsky, L., Szarek, E., 1996. Macrophytes as indicators of bioavailable Cd, Pb and Zn flow in the river Przemsza, Katowice Region. Applied Geochemistry 11, 169–173. doi:10.1016/0883-2927(95)00074-7

Lewis, M.A., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. Environmental Pollution 87, 319 – 336.

Lichtenthaler, H., 1984. Chloroplast biogenesis, its inhibition and modification by new herbicide compounds. Zeitschrift für Naturforschung C. 39, 492–499. doi:10.1515/znc-1984-0538

Lichtenthaler, H., Meier, D., Retzlaff, G., Hamm, R., 1982. Distribution and effects of bentazon in crop plants and weeds. Zeitschrift für Naturforschung C. 37, 889–897. doi:10.1515/znc-1982-1008

Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions 11, 591–592. doi:10.1042/bst0110591

Lizotte, R.E., Testa, S., Locke, M.A., Steinriede, R.W., 2013. Responses of phytoplankton and *Hyalella azteca* to agrichemical mixtures in a constructed wetland mesocosm. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 65, 474–485. doi:10.1007/s00244-013-9927-z

Lozano, R.B., Pratt, J.R., 1994. Interaction of toxicants and communities: The role of nutrients. Environmental Toxicology and Chemistry 13, 361–368. doi:10.1002/etc.5620130302

Lu, Y.C., Zhang, S., Yang, H., 2015. Acceleration of the herbicide isoproturon degradation in wheat by glycosyltransferases and salicylic acid. Journal of Hazardous Materials 283, 806–814. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.034

Maathuis, F.J., 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. Current Opinion in Plant Biology 12, 250–258. doi:10.1016/j.pbi.2009.04.003

Madsen, T.V., Cedergreen, N., 2002. Sources of nutrients to rooted submerged macrophytes growing in a nutrient-rich stream. Freshwater Biology 47, 283–291.

Maltby, L. (Ed.), 2010. Aquatic macrophyte risk assessment for pesticides. CRC Press, Boca Raton, FL.

Mandal, B.K., Suzuki, K.T., 2002. Arsenic round the world: a review. Talanta 58, 201–235.

Matzek, V., Vitousek, P.M., 2009. N : P stoichiometry and protein : RNA ratios in vascular plants: an evaluation of the growth-rate hypothesis. Ecology Letters 12, 765–771. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01310.x

McGregor, E.B., Solomon, K.R., Hanson, M.L., 2008. Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* to atrazine. Chemosphere 73, 249–260. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.045

Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. New Phytologist 154, 29–43.

Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1991. Uptake, accumulation and translocation of arsenate in arsenate-tolerant and non-tolerant *Holcus lanatus L.* New Phytologist 117, 225–231. doi:10.1111/j.1469-8137.1991.tb04903.x

Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies 15, 523.

Millington, L.A., Goulding, K.H., Adams, N., 1988. The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. Water Research 22, 1593–1597. doi:10.1016/0043-1354(88)90173-X

Milojković, J.V., Stojanović, M.D., Mihajlović, M.L., Lopičić, Z.R., Petrović, M.S., Šoštarić, T.D., Ristić, M.Đ., 2014. Compost of aquatic weed *Myriophyllum spicatum* as low-cost biosorbent for selected heavy metal ions. Water, Air, & Soil Pollution 225. doi:10.1007/s11270-014-1927-8

Mkandawire, M., Gert Dudel, E., 2012. Homeostatic regulation of elemental stoichiometry by Lemna gibba L. G3 when nutrient interact with toxic metals. Ecotoxicology 21, 456–464. doi:10.1007/s10646-011-0805-z

Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 1999. Aquatic plants for toxicity assessment. Environmental research 81, 259–274.

Mohr, S., Berghahn, R., Feibicke, M., Meinecke, S., Ottenstroer, T., Schmiedling, I., Schmiediche, R., Schmidt, R., 2007. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. Aquatic Toxicology 82, 73–84. doi:10.1016/j.aquatox.2007.02.001

Mohr, S., Schott, J., Hoenemann, L., Feibicke, M., 2015. *Glyceria maxima* as new test species for the EU risk assessment for herbicides: a microcosm study. Ecotoxicology 24, 309–320. doi:10.1007/s10646-014-1379-3

Mohr, S., Schott, J., Maletzki, D., Hünken, A., 2013. Effects of toxicants with different modes of action on *Myriophyllum spicatum* in test systems with varying complexity. Ecotoxicology and Environmental Safety 97, 32–39. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.06.030

Molle, L., 1984. Éloge du Professeur René Truhaut. Revue d'histoire de la pharmacie 72, 340–348.

Moss, B., Jeppesen, E., Søndergaard, M., Lauridsen, T.L., Liu, Z., 2013. Nitrogen, macrophytes, shallow lakes and nutrient limitation: resolution of a current controversy? Hydrobiologia 710, 3–21. doi:10.1007/s10750-012-1033-0

Mózner, Z., Tabi, A., Csutora, M., 2012. Modifying the yield factor based on more efficient use of fertilizer—The environmental impacts of intensive and extensive agricultural practices. Ecological Indicators 16, 58–66. doi:10.1016/j.ecolind.2011.06.034

Muller, S., Peltre, M.-C., Ollivier, M., Petitdidier, D., Thiébaut, G., Dutartre, A., Moreau, A., Mutterlein, C., Barbe, J., Lagrange, C., 1997. Biology and ecology of prolific vegetal species in France (No. 68), Les études de l'Agence de l'Eau. ISSN 1161-0425

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473–497.

Murdock, J.N., Shields, F.D., Lizotte, R.E., 2013. Periphyton responses to nutrient and atrazine mixtures introduced through agricultural runoff. Ecotoxicology 22, 215–230. doi:10.1007/s10646-012-1018-9

Murray, J.R., Hackett, W.P., 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix L.* Plant Physiology 97, 343–351.

Navarro-Ortega, A., Acuña, V., Bellin, A., Burek, P., Cassiani, G., Choukr-Allah, R., Dolédec, S., Elosegi, A., Ferrari, F., Ginebreda, A., Grathwohl, P., Jones, C., Rault, P.K., Kok, K., Koundouri, P., Ludwig, R.P., Merz, R., Milacic, R., Muñoz, I., Nikulin, G., Paniconi, C., Paunović, M., Petrovic, M., Sabater, L., Sabater, S., Skoulikidis, N.T., Slob, A., Teutsch, G., Voulvoulis, N., Barceló, D., 2015. Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA project. Science of The Total Environment 503-504, 3–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.081

Nelson, L.S., 1996. Growth regulation of Eurasian watermilfoil with flurprimidol. Journal of Plant Growth Regulation 15, 33–38.

Nelson, L.S., Netherland, M.D., Getsinger, K.D., 1993. Bensulfuron methyl activity on eurasian watermilfoil.pdf. Journal of Aquatic Plant Management 31, 179–185.

Nemat Alla, M.M., Hassan, N.M., El-Bastawisy, Z.M., 2008. Changes in antioxidants and kinetics of glutathione-S-transferase of maize in response to isoproturon treatment. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology 142, 5–16. doi:10.1080/11263500701872135

Netherland, M.D., Getsinger, K.D., 1992. Efficacy of Triclopyr on Eurasian watermilfoil concentration and exposure time effects.pdf. Journal of Aquatic Plant Management 30, 1–5.

Ngayila, N., Basly, J.-P., Lejeune, A.-H., Botineau, M., Baudu, M., 2007. *Myriophyllum alterniflorum* DC., biomonitor of metal pollution and water quality. Sorption/accumulation capacities and photosynthetic pigments composition changes after copper and cadmium exposure. Science of The Total Environment 373, 564–571. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.11.038

Ngayila, N., Botineau, M., Baudu, M., Basly, J.-P., 2009. *Myriophyllum alterniflorum* DC. Effect of low concentrations of copper and cadmium on somatic and photosynthetic endpoints: A chemometric approach. Ecological Indicators 9, 307–312. doi:10.1016/j.ecolind.2008.05.006

Nimptsch, J., Pflugmacher, S., 2007. Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. Chemosphere 66, 708–714. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.064

Nimptsch, J., Wunderlin, D.A., Dollan, A., Pflugmacher, S., 2005. Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in Suquía River basin (Córdoba, Argentina). Chemosphere 61, 147–157. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.02.079

Nitschke, L., Wilk, A., Schüssler, W., Metzner, G., Lind, G., 1999. Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. Chemosphere 39, 2313–2323.

Nõges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J.M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., Birk, S., 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. Science of The Total Environment 540, 43–52. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.045

Odum, E.P., Finn, J.T., Franz, E.H., 1979. Perturbation Theory and the Subsidy-Stress Gradient. BioScience 29, 349–352. doi:10.2307/1307690

OECD, 2006a. Test No. 201: Freshwater algae and cyanobacteria, growth inhibition test, OECD Publishing. ed, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.

OECD, 2006b. Test No. 221: *Lemna sp.* growth inhibition test, OECD Publishing. ed, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.

OECD, 2014b. Test No. 238: Sediment-Free *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

OECD, 2014b. Test No. 239: Water-Sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

Ozimek, T., Van Donk, E., Gulati, R.D., 1993. Growth and nutrient uptake by two species of *Elodea* in experimental conditions and their role in nutrient accumulation in a macrophyte-dominated lake. Hydrobiologia 251, 13–18.

Peltre, M.C., Muller, S., Ollivier, M., Dutartre, A., Barbe, J., Haury, J., Tremolieres, M., 2002. Les proliférations végétales aquatiques en France : caractères biologiques et écologiques des principales espèces et milieux propices I. Bilan d'une synthèse bibliographique. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 237–258. doi:10.1051/kmae:2002034

Pérès, F., Florin, D., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M., Boudou, A., 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. Environmental Pollution 94, 141–152. doi:10.1016/S0269-7491(96)00080-2

Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M.S., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., Urcelay, C., Veneklaas, E.J., Reich, P.B., Poorter, L., Wright, I.J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J.G., de Vos, A.C., Buchmann, N., Funes, G., Quétier, F., Hodgson, J.G., Thompson, K., Morgan, H.D., Steege, H. ter, Sack, L., Blonder, B., Poschlod, P., Vaieretti, M.V., Conti, G., Staver, A.C., Aquino, S., Cornelissen, J.H.C., 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. Australian Journal of Botany 61, 167. doi:10.1071/BT12225

Piggott, J.J., Townsend, C.R., Matthaei, C.D., 2015. Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. Ecology and Evolution 5, 1538–1547. doi:10.1002/ece3.1465

Posthuma, L., Suter, G.W., Traas, T.P. (Eds.), 2002. Species sensitivity distributions in ecotoxicology, Environmental and ecological risk assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.

Rahman, A.M., Hasegawa, H., Peter Lim, R., 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. Environmental Research 116, 118–135. doi:10.1016/j.envres.2012.03.014

Rahman, M.A., Hasegawa, H., 2011. Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes. Chemosphere 83, 633–646. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.045

Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, T., Okumura, C., Rahman, M.M., 2007. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza L.*): A good option for phytoremediation. Chemosphere 69, 493–499. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.019

Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, T., Rahman, M.M., 2008. Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza L.*: Interactions with phosphate and iron. Journal of Hazardous Materials 160, 356–361. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.022

Rai, P.K., 2009. Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 39, 697–753. doi:10.1080/10643380801910058

Ramade, F., 1977. Écotoxicologie, Collection d'écologie ; 9. Masson, Paris ; New York. ISBN 10: 2225455309 / ISBN 13: 9782225455308

Ramade, F., 1987. Ecotoxicology, 2nd ed.; Wiley, Chichester [West Sussex] ; New York.

Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., Gouesbet, G., 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. BMC Plant Biology 9, 28. doi:10.1186/1471-2229-9-28

Ramel, F., Sulmon, C., Cabello-Hurtado, F., Taconnat, L., Martin-Magniette, M.-L., Renou, J.-P., Amrani, A. El, Couée, I., Gouesbet, G., 2007. Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in *Arabidopsis thaliana*: novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance. BMC Genomics 8, 450. doi:10.1186/1471-2164-8-450

Richardson, R.J., Haug, E.J., Netherland, M.D., 2016. Response of seven aquatic plants to a new arylpicolinate herbicide. J. Aquat. Plant Manage 54, 26–31.

Ridley, S.M., Horton, P., 1984. DCMU-induced fluorescence changes and photodestruction of pigments associated with an inhibition of photosystem I Cyclic electron flow. Zeitschrift für Naturforschung C. 39, 351–353. doi:10.1515/znc-1984-0507

Robinson, B., Kim, N., Marchetti, M., Moni, C., Schroeter, L., van den Dijssel, C., Milne, G., Clothier, B., 2006. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. Environmental and Experimental Botany 58, 206–215. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.08.004

Rohr, J.R., Kerby, J.L., Sih, A., 2006. Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. Trends in Ecology & Evolution 21, 606–613. doi:10.1016/j.tree.2006.07.002

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology 57, 675–709. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441

Rosenkrantz, R.T., Baun, A., Kusk, K.O., 2013. Growth inhibition and recovery of *Lemna gibba* after pulse exposure to sulfonylurea herbicides. Ecotoxicology and Environmental Safety 89, 89–94. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.017

Roshon, R.D., Stephenson, G.R., Horton, R.F., 1996. Comparison of five media for the axenic culture of *Myriophyllum sibiricum* Komarov. Hydrobiologia 340, 17 – 22.

Rotter, S., Heilmeier, H., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2013. Multiple stressors in periphyton - comparison of observed and predicted tolerance responses to high ionic loads and herbicide exposure. Journal of Applied Ecology 50, 1459–1468. doi:10.1111/1365-2664.12146

Royuela, M., Gonzalez, A., Gonzalez, E.M., Arrese-Igor, C., Aparicio-Tejo, P.M., Gonzalez-Murua, C., 2000. Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plant. Journal of Plant Physiology 157, 345 – 354. doi:0176-1617/00/157/03-345

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

Sajwan, K.S., Ornes, W.H., 1996. Cadmium accumulation in eurasian watermilfoil plants. Water, Air, & Soil Pollution 87, 47–56. doi:10.1007/BF00696828

Sajwan, K.S., Paramasivam, S., Richardson, J.P., Alva, A.K., 2002. Phosphorus alleviation of cadmium phytotoxicity. Journal of Plant Nutrition 25, 2027–2034. doi:10.1081/PLN-120013292

Salminen, J.-P., Karonen, M., 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach: Chemical ecology of tannins. Functional Ecology 25, 325–338. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x

Sánchez, D., Graça, M.A.S., Canhoto, J., 2007. Testing the Use of the Water Milfoil (*Myriophyllum spicatum L.*) in Laboratory Toxicity Assays. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 78, 421–426. doi:10.1007/s00128-007-9131-9

Sapci, Z., Ustun, E.B., 2015. Heavy Metal Uptakes by *Myriophyllum verticillatum* from Two Environmental Matrices: The Water and the Sediment. International Journal of Phytoremediation 17, 290–297. doi:10.1080/15226514.2014.898022

Sardans, J., Rivas-Ubach, A., Peñuelas, J., 2012. The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 14, 33–47. doi:10.1016/j.ppees.2011.08.002

Scarponi, L., Martinetti, L., Nemat Alla, M.M., 1996. Growth response and changes in starch formation as a result of imazethapyr treatment of soybean (*Glycine max L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 1572–1577.

Scheffer, M., Carpenter, S., Foley, J.A., Folke, C., Walker, B., 2001. Catastrophic shifts in ecosystems. Nature 413, 591–596. doi:10.1038/35098000

Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.-L., Moss, B., Jeppesen, E., 1993. Alternative equilibria in shallow lakes. Trends in Ecology & Evolution 8, 275–279. doi:10.1016/0169-5347(93)90254-M

Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., Altenburger, R., 2008. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. Basic and Applied Ecology 9, 337–345. doi:10.1016/j.baae.2007.08.008

Schock, N.T., Murry, B.A., Uzarski, D.G., 2014. Impacts of Agricultural Drainage Outlets on Great Lakes Coastal Wetlands. Wetlands 34, 297–307. doi:10.1007/s13157-013-0486-x

Schreiber, R., Küster, A., Feiler, U., Grote, M., Altenburger, R., 2011. A non-invasive observation parameter to complement sediment bioassays using *Myriophyllum aquaticum*. Journal of Soils and Sediments 11, 1419–1431. doi:10.1007/s11368-011-0410-z

Segner, H., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2014. Assessing the Impact of Multiple Stressors on Aquatic Biota: The Receptor's Side Matters. Environmental Science & Technology 48, 7690–7696. doi:10.1021/es405082t

Serra, A., Guasch, H., Admiraal, W., Van der Geest, H.G., Van Beusekom, S.A.M., 2010. Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors. Ecotoxicology 19, 770–780. doi:10.1007/s10646-009-0454-7

Sharma, V.K., Sohn, M., 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. Environment International 35, 743–759. doi:10.1016/j.envint.2009.01.005

Sistla, S.A., Appling, A.P., Lewandowska, A.M., Taylor, B.N., Wolf, A.A., 2015. Stoichiometric flexibility in response to fertilization along gradients of environmental and organismal nutrient richness. Oikos 124, 949–959. doi:10.1111/oik.02385

Sivaci, A., Elmas, E., Gümüş, F., Sivaci, E.R., 2008. Removal of cadmium by *Myriophyllum heterophyllum Michx.* and *Potamogeton crispus L.* and its effect on pigments and total phenolic compounds. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54, 612–618. doi:10.1007/s00244-007-9070-9

Sivaci, A., Sivaci, E.R., Sökmen, M., 2007. Changes in antioxidant activity, total phenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants *Myriophyllum spicatum L.* and *Myriophyllum triphyllum* Orchard exposed to cadmium. Ecotoxicology 16, 423–428. doi:10.1007/s10646-007-0145-1

Sivaci, R., E., Sivaci, A., Sökmen, M., 2004. Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum L.* and *Myriophyllum triphyllum* orchard. Chemosphere 56, 1043–1048. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.05.032

Smedley, P.., Kinniburgh, D.., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry 17, 517–568. doi:10.1016/S0883-2927(02)00018-5

Smith, C.S., Barko, J.W., 1990. Ecology of Eurasian watermilfoil. Journal of Aquatic Plant Management 28, 55 – 64.

Sørensen, H., Cedergreen, N., Skovgaard, I.M., Streibig, J.C., 2007. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. Environmental and Ecological Statistics 14, 383–397. doi:10.1007/s10651-007-0022-3

Srivastava, M., Ma, L.Q., Singh, N., Singh, S., 2005. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. Journal of Experimental Botany 56, 1335–1342. doi:10.1093/jxb/eri134

Sterner, R.W., Elser, J.J., 2002. Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University Press, Princeton.

Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., Amrani, A. El, Couée, I., 2007. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. Environmental Pollution 145, 507–515. doi:10.1016/j.envpol.2006.04.018

Sulmon, C., Gouesbet, G., Couée, I., Amrani, A.E., 2004. Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on psbA mRNA and D1 protein levels. Plant Science 167, 913–923. doi:10.1016/j.plantsci.2004.05.036

Suzuki, N., 2005. Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. Plant Biotechnology 22, 19–25.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., Murphy, A. (Eds.), 2015. Plant Physiology and Development, 6th ed.; Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.

Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G., 1999. Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). Environmental Pollution 106, 39–45. doi:10.1016/S0269-7491(99)00066-4

Teodorović, I., Knežević, V., Tunić, T., Čučak, M., Lečić, J.N., Leovac, A., Tumbas, I.I., 2012. *Myriophyllum aquaticum* versus *Lemna minor*: Sensitivity and recovery potential after exposure to atrazine. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 417–426. doi:10.1002/etc.748

Tripathi, R.D., Singh, R., Tripathi, P., Dwivedi, S., Chauhan, R., Adhikari, B., Trivedi, P.K., 2014. Arsenic accumulation and tolerance in rootless macrophyte *Najas indica* are mediated through antioxidants, amino acids and phytochelatins. Aquatic Toxicology 157, 70–80. doi:10.1016/j.aquatox.2014.09.011

Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J.M., 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. Trends in Biotechnology 25, 158–165. doi:10.1016/j.tibtech.2007.02.003

Tripathi, R.D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Chatterjee, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., 2012. Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. Frontiers in Physiology 3. doi:10.3389/fphys.2012.00275

Tubea, B., Hawxby, K., Mehta, R., 1981. The effects of nutrient, pH and herbicide levels on algal growth. Hydrobiologia 79, 221–227.

Tunić, T., Knežević, V., Kerkez, Đ., Tubić, A., Šunjka, D., Lazić, S., Brkić, D., Teodorović, I., 2015. Some arguments in favor of a *Myriophyllum aquaticum* growth inhibition test in a water-sediment system as an additional test in risk assessment of herbicides: *Myriophyllum aquaticum* in risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 34, 2104–2115. doi:10.1002/etc.3034

Turgut, C., Fomin, A., 2002. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to Seventeen Pesticides Determined on the Basis of EC 50. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 69, 601–608. doi:10.1007/s00128-002-0103-9

Vallée, R., Dousset, S., Billet, D., Benoit, M., 2014. Sorption of selected pesticides on soils, sediment and straw from a constructed agricultural drainage ditch or pond. Environmental Science and Pollution Research 21, 4895–4905. doi:10.1007/s11356-013-1840-5

Van den Brink, P.J., Blake, N., Brock, T.C.M., Maltby, L., 2006. Predictive Value of Species Sensitivity Distributions for Effects of Herbicides in Freshwater Ecosystems. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 12, 645–674. doi:10.1080/10807030500430559

Van Leeuwen, C.J., Bro-Rasmussen, F., Feijtel, T.C.J., Arndt, R., Bussian, B.M., Calamari, D., Glynn, P., Grandy, N.J., Hansen, B., Van Hemmen, J.J., Hurst, P., King, N., Koch, R., Müller, M., Solbé, J.F., Speijers, G.A.B., Vermeire, T., 1996. Risk assessment and management of new and existing chemicals. Environmental Toxicology and Pharmacology 2, 243–299. doi:10.1016/S1382-6689(96)00072-5

Van Straalen, N.M., 2003. Ecotoxicology Becomes Stress Ecology. Environmental Science & Technology 37, 324A–330A. doi:10.1021/es0325720

van Wijck, C., Grillas, P., de Groot, C.J., Ham, L.T., 1994. A comparison between the biomass production of *Potamogeton pectinatus L.* and *Myriophyllum spicatum L.* in the Camargue (southern France) in relation to salinity and sediment characteristics. Vegetatio 113, 171–180.

Vazan, S., Oveisi, M., Baziar, S., 2011. Efficiency of mesosulfuron-methyl and clodinafop-propargyl dose for the control of *Lolium perenne* in wheat. Crop Protection 30, 592–597. doi:10.1016/j.cropro.2011.01.004

Ventura, M., Liboriussen, L., Lauridsen, T., SøNdergaard, M., SøNdergaard, M., Jeppesen, E., 2008. Effects of increased temperature and nutrient enrichment on the stoichiometry of primary producers and consumers in temperate shallow lakes. Freshwater Biology 53, 1434–1452. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.01975.x

Vervliet-Scheebaum, M., Knauer, K., Maund, S.J., Grade, R., Wagner, E., 2006. Evaluating the necessity of additional aquatic plant testing by comparing the sensitivities of different species. Hydrobiologia 570, 231–236. doi:10.1007/s10750-006-0185-1

Vervliet-Scheebaum, M., Straus, A., Tremp, H., Hamer, M., Maund, S.J., Wagner, E., Schulz, R., 2010. A microcosm system to evaluate the toxicity of the triazine herbicide simazine on aquatic macrophytes. Environmental Pollution 158, 615–623. doi:10.1016/j.envpol.2009.08.005

Vignati, D.A.L., Ferrari, B.J.D., Dominik, J., 2007. Laboratory-to-Field Extrapolation in Aquatic Sciences. Environmental Science & Technology 41, 1067–1073. doi:10.1021/es0724745

Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! Oikos 116, 882–892. doi:10.1111/j.2007.0030-1299.15559.x

Wan, L., Zhang, H., 2012. Cadmium toxicity: Effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction. Plant Signaling & Behavior 7, 345–348. doi:10.4161/psb.18992

Wendt-Rasch, L., Pirzadeh, P., Woin, P., 2003. Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems. Aquatic Toxicology 63, 243–256.

Wersal, R.M., Madsen, J.D., Woolf, T.E., Eckberg, N., others, 2010. Assessment of herbicide efficacy on Eurasian watermilfoil and impacts to the native submersed plant community in Hayden Lake, Idaho, USA. Journal of Aquatic Plant Management (JAPM) 48, 5.

Wilson, P.C., Whitwell, T., Klaine, S.J., 2001. Simazine toxicity and uptake by parrotfeather. Journal of Aquatic Plant Management 39, 112–116.

Wind, J., Smeekens, S., Hanson, J., 2010. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. Phytochemistry 71, 1610–1614. doi:10.1016/j.phytochem.2010.07.007

Xia, C., Yu, D., Wang, Z., Xie, D., 2014. Stoichiometry patterns of leaf carbon, nitrogen and phosphorous in aquatic macrophytes in eastern China. Ecological Engineering 70, 406–413. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.06.018

Yabanli, M., Yozukmaz, A., Sel, F., 2014. Heavy metal accumulation in the leaves, stem and root of the invasive submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum L.*

(Haloragaceae): an example of Kadın Creek (Mugla, Turkey). Brazilian Archives of Biology and Technology 57, 434-440. doi:10.1590/S1516-8913201401962

Yan, C.Z., Xue, P.Y., 2013. Copper accumulation, tolerance, and release by a submerged aquatic plant *Myriophyllum spicatum L.* Proceedings of the 13th International Conference on Environmental Science and Technology 1–10 (CEST2013_0226).

Zabalza, A., Orcaray, L., Gaston, S., Royuela, M., 2004. Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr Is Due to a Decrease in Sink Strength. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7601–7606. doi:10.1021/jf0486996

Zhang, L., Wang, S., Jiao, L., Zhao, H., Zhang, Y., Li, Y., 2013. Physiological response of a submerged plant (*Myriophyllum spicatum*) to different NH_4Cl concentrations in sediments. Ecological Engineering 58, 91–98. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.06.006

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Analytica Chimica Acta 606, 135–150. doi:10.1016/j.aca.2007.11.018

Textes de loi

Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE) du 23 Octobre 2000 (directive 2000/60/CE)

http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0001.02/DOC_1&format=PDF

Plan Ecophyto I (ou Ecophyto 2018)

http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/110786233307360592329934193591/PLAN_ECOPHYTO_2018.pdf

Plan Ecophyto II (ou Ecophyto 2025)

agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf

Sites internet

https://en.wikipedia.org/wiki/Tellimagrandin_II

(consulté le 04/02/16)

http://www.galvbayinvasives.org/Guide/Species/MyriophyllumSpicatum

(consulté le 04/02/16)

http://wildflowerfinder.org.uk/Flowers/F/FringeCups/FringeCups.htm

(consulté le 03/06/16)