

Université de Limoges
ED 614 - Chimie , Environnement, Géosciences, Agrosciences
(CEGA)
PEIRENE EA 7500

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Eau, Sol, Environnement

Mohamad Baydoun

Soutenue
Le 19 octobre 2018

**Intérêt du macrophyte *Myriophyllum alterniflorum* pour la détection
des contaminants dans l'environnement**

Thèse dirigée par **Véronique Deluchat**

JURY :

Rapporteurs

Mme. Marie Noëlle PONS, Professeur, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine

M. Antoine El SAMRANI, Professeur, Plateforme PRASE, Université Libanaise

Examineurs

Mme. Céline GIRARD, Maître de conférences, HDR, PEIRENE EA 7500, Université de Limoges

M. Gilles GUIBAUD, Professeur, PEIRENE EA 7500, Université de Limoges

M. Fabien MONNET, Maître de conférences, Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire des plantes, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Mme. Véronique DELUCHAT, Professeur, PEIRENE EA 7500, Université de Limoges



“If you wish to succeed in life, make perseverance your bosom friend, experience your wise counselor, caution your elder brother, and hope your guardian genius.”

Joseph Addison

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu tout puissant, de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour la réalisation de ce travail de thèse.

Je souhaite commencer ces remerciements avec Madame Rachida Zerrouki la directrice de l'école doctorale n°614 Chimie, Écologie, Géosciences, Agrosociétés – CEGA. Ensuite je remercie, Monsieur le Professeur Michel Baudu, directeur du laboratoire GRESE, pour l'accueil chaleureux au sein du laboratoire. J'adresse simultanément mes remerciements à l'Université de Limoges et son président Monsieur le professeur Alain Célérier, ainsi que l'association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique pour leurs aides personnelles et financières pendant toute la durée de thèse.

Je tiens à remercier mon encadrante, Madame Véronique Deluchat, Professeur à la faculté des Sciences et techniques, qui m'a dirigé durant ce travail. Je suis reconnaissant pour ses encouragements, son enthousiasme et sa confiance. Je vous remercie beaucoup pendant la dernière ligne droite, et à votre précieuse contribution dans la correction de ce manuscrit. Votre expérience et votre savoir ont été déterminants dans la réalisation de cette thèse, mais également votre soutien moral.

Je tiens tout particulièrement à témoigner ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Madame Anne Blondeau, Professeur à la faculté des sciences de m'avoir conseillé, orienté, encouragé et de m'apporter une attention au traitement statistique des résultats.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe du groupement de recherche Eau- sol et environnement : les enseignants, les chercheurs, les techniciens et les collègues, pour toutes les aides techniques, scientifiques et pour leur sympathie, leur accueil chaleureux pendant cette étude.

Un grand remerciement pour tout le jury de suivi de thèse composé par Mme. Laetitia Le petit, Mme. Rachida Zerrouki, M. Jean Philippe Basly, M. Michel Baudu, Mme Céline Girard, Mme. Anne Blondeau, M. Fabien Monnet et ma directrice Mme Véronique Deluchat pour tous les conseils, les aides et les facilités qu'ils m'ont apporté pour le bien avancement des travaux.

J'ai envie d'adresser mes sincères remerciements à tous les membres de jury de thèse, Monsieur Gilles GUIBAUD, Professeur à l'Université de Limoges, d'avoir accepté d'être président de jury, Madame Marie Noëlle PONS, Professeur à l'Université de Lorraine et Monsieur Antoine El SAMRANI, Professeur à l'Université Libanaise, comme étant rapporteurs de ce travail de thèse. Egalement, je voudrais remercier Madame Céline GIRARD, Maître de conférences, HDR, à l'Université de Limoges et Monsieur Fabien MONNET, Maître de conférences, à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, comme étant examinateurs, d'avoir acceptés de lire et examiner ce manuscrit, et donner leurs suggestions et propositions afin de l'améliorer.

Depuis 9 ans, j'ai eu la chance de rencontrer une belle fille Nour Ghazzoui, tu mériterais une page entière de remerciements ! Simplement, merci pour ta bonne humeur sans faille, ta gentillesse, pour tous ces moments de détente et de travail aussi, voire les deux en même temps, d'être toujours là quand il faut... Merci de m'avoir supporté sans broncher quand je suis devenu insupportable sur la fin, tout en continuant d'organiser cette superbe soutenance pour

moi. J'espère qu'on partagera les beaux moments de bonheur et de la réussite toute la vie. Je resterai à côté de toi comme toujours... bientôt docteur de l'Université de Limoges !

Et je ne peux continuer mes remerciements sans parler de mon ami Ahmad Issaoui qui m'a soutenu, encouragé, et aider pour surmonter mes problèmes toujours pour enrichir mes objectifs, ainsi que mes amis libanais, français et étrangers que j'ai rencontrés en France. Je pense quand même à Thierry, Karine, Philippe, Rémy, Isabelle, Robin, Lourdes, Emmanuelle, Omar, Patrice, Anne, Diep, Asmaa, Maha, Nathalie et d'autres collègues dans le laboratoire.

Pour le meilleur, c'est surtout une profonde pensée pour ma famille de leur soutien sans faille et à tout ce qu'ils ont pu m'apporter pour franchir les obstacles les plus difficiles. Merci pour votre patience, surtout pendant la dernière ligne droite. Je remercie tous les voisins et toute personne je l'ai oubliée.

Et finalement, J'espère que vous en profitez de ces résultats obtenus.

Grand Merci et bonne lecture.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	19
Chapitre I. Etude bibliographique	23
I.1. Evaluation de la qualité des eaux.....	23
I.1.1. Contexte réglementaire	23
I.1.2. Origines des contaminants	24
I.1.3. Modalités de suivi	26
I.1.3.1. Echantillonnage ponctuel	27
I.1.3.2. Echantillonnage passif	28
I.1.3.3. Biomonitoring	30
I.1.4. Biomonitoring : bilan des organismes utilisés	30
I.1.4.1. Bryophytes	31
I.1.4.2. Algues.....	32
I.1.4.3. Macrophytes aquatiques	34
I.2. Interaction contaminants- plantes	37
I.2.1. Spéciation des métaux et métalloïdes dans l'eau et biodisponibilité pour les plantes	37
I.2.2. Mécanismes de bioaccumulation.....	39
I.2.2.1. Exsudats racinaires.....	40
I.2.2.2. Adsorption.....	41
I.2.2.2.1. La paroi cellulaire	41
I.2.2.2.2. Affinité des cations ou d'anions pour les sites d'adsorption de la paroi cellulaire.....	42
I.2.2.3. Absorption.....	43
I.2.2.3.1. Système de transport membranaire.....	43
I.2.2.3.1.1. Diffusion simple.....	43
I.2.2.3.1.2. Diffusion facilitée	43
I.2.2.3.1.3. Transport actif	44
I.2.2.3.2. Transporteurs membranaires.....	45
I.2.2.3.3. Transduction des signaux.....	47
I.2.2.3.4. Séquestration dans la vacuole des cellules racinaires	47
I.2.2.3.5. Homéostasie cellulaire des contaminants	48
I.2.2.3.6. Translocation par le xylème	49
I.2.2.3.7. Adsorption/absorption par la surface foliaire	49
I.2.2.3.8. Absorption de l'arsenic	50
I.2.2.4. Facteurs influençant la bioaccumulation des métaux et métalloïdes	51
I.2.2.4.1. La durée d'exposition.....	51
I.2.2.4.2. La température de l'eau	52
I.2.2.4.3. Nutriments	53
I.2.2.4.4. Effet des phosphates sur l'absorption de l'arsenic par la plante.....	53
I.2.3. Effets des contaminants sur la plante	54
I.3. Les biomarqueurs	55
I.3.1. Biomarqueurs morphologiques	56
I.3.2. Biomarqueurs physiologiques.....	56
I.3.2.1. Pigments chlorophylliens.....	56
I.3.2.2. Potentiel osmotique (PO)	58

I.3.3. Biomarqueurs biochimiques	59
I.3.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les enzymes antioxydants	59
I.3.3.2. La concentration en peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	61
I.3.3.3. Le malondialdéhyde (MDA).....	61
I.3.3.4. La proline libre	63
I.3.3.5. L'activité de la nitrate réductase (NR).....	63
I.3.3.6. L'activité de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)	65
I.3.3.7. L'activité de γ-glutamyl cystéine synthétase (γ-GCS)	65
I.3.3.8. L'activité de glutathion réductase (GR).....	67
I.3.3.9. L'activité de la phytochélatine synthase (PC)	67
I.3.4. Influence de la durée d'exposition sur la réponse des biomarqueurs.....	68
I.4. Conclusion bibliographique	71
I.4.1. Quel est l'intérêt de la bioindication avec les macrophytes, et avec <i>Myriophyllum alterniflorum</i> en particulier ?	71
I.4.2. Quels contaminants étudier et dans quel contexte ?.....	72
I.4.3. Quelle réponse de la plante peut être suivie pour détecter la présence des contaminants ?.....	72
Chapitre II. Matériels et méthodes	75
II.1. Matériel biologique, milieu de test et présentation des sites d'études.....	76
II.1.1. Matériel végétal utilisé	76
II.1.2. Culture <i>in Vitro</i> de myriophylle dans le milieu Vienne	76
II.1.3. Mise en œuvre de la culture en système <i>In situ</i>	77
II.1.4. Choix des sites d'étude.....	77
II.1.4.1. Saint Denis les Murs (S1) (bassin amont)	80
II.1.4.2. Sites Vienne (Amont, S2 et Aval Vienne, S3) (bassin médian).....	80
II.1.4.3. Sites Valoine (Amont, S4 et Aval Valoine, S5) (bassin médian)	80
II.2. Méthodologie de mesure des paramètres de l'étude	81
II.2.1. Paramètres physico-chimiques.....	81
II.2.2. Dosage des éléments majeurs	81
II.2.3. Analyse du COD.....	82
II.2.4. Dosage des teneurs en métaux (teneur acidifiée-filtrée (AF) ou teneur dans la fraction dissoute).....	82
II.2.5. Analyse des concentrations des contaminants dans la plante	83
II.2.5.1. Echantillons de végétaux	83
II.2.5.2. Facteur de bioconcentration (BCF)	83
II.2.6. Analyse de biomarqueurs	83
II.2.6.1. Extraction des protéines totales	83
II.2.6.2. Dosage des protéines totales.....	83
II.2.6.3. Dosage de l'activité de glucose 6-phosphate déshydrogénase	84
II.2.6.4. Dosage de l'activité du γ-glutamylcystéine synthétase	84
II.2.6.5. Analyse de la teneur en malondialdéhyde (MDA).....	84
II.2.6.6. Dosage de la concentration en proline libre	85
II.2.6.7. Analyse de potentiel osmotique.....	85
II.2.6.8. Dosage de l'activité de nitrate réductase.....	85
II.2.6.9. Mesure des concentrations en chlorophylle a, b et caroténoïdes	86
II.3. Méthodologie de traitement des résultats.....	86
Chapitre III. Résultats et discussion.....	89

III.1. Influence des conditions environnementales sur l'accumulation des métaux et métalloïdes par <i>Myriophyllum alterniflorum</i>	90
III.1.1. Synthèse des résultats des paramètres relatifs aux conditions environnementales dans les cinq sites d'études	90
III.1.2. Assessment of metal/metalloid accumulation in <i>Myriophyllum alterniflorum</i> - Impact of anthropogenic activities	95
III.1.2.1. Introduction	95
III.1.2.2. Materials and methods	96
III.1.2.2.1. Plant material, growth conditions and reintroduction <i>in situ</i>	96
III.1.2.2.2. Studied area	96
III.1.2.2.3. Physicochemical parameters	98
III.1.2.2.4. Sample preparation for water analysis	98
III.1.2.2.5. Sample preparation for plant analysis	99
III.1.2.2.6. Data analysis	99
III.1.2.3. Results and discussion	100
III.1.2.3.1. Physicochemical characterization of studied sites	100
III.1.2.3.2. Contaminant levels in water	103
III.1.2.3.3. Contaminants accumulation in <i>M. alterniflorum</i>	106
III.1.2.3.4. Bio-concentration factor (BCF) variation in <i>M. alterniflorum</i>	110
III.1.2.3.5. Effect of exposure time on contaminant absorption by <i>M. alterniflorum</i>	113
III.1.2.3.6. Correlation study between contaminants content in <i>Myriophyllum alterniflorum</i> and dissolved contaminant levels in water.	116
III.1.2.4. Conclusion	118
III.2. Optimisation des conditions de déploiement de <i>Myriophyllum alterniflorum</i> pour la détection de contaminants	122
III.2.1. Introduction	123
III.2.2. Materials and methods	125
III.2.2.1. Plant material, growth conditions and reintroduction <i>in situ</i>	125
III.2.2.2. Studied area	125
III.2.2.3. Physicochemical parameters	125
III.2.2.4. Sample preparation for water analysis	126
III.2.2.5. Sample preparation for plant analysis	126
III.2.2.6. Biomarkers analysis	127
III.2.2.6.1. Analysis of the Malondialdehyde content (MDA)	127
III.2.2.6.2. Analysis of nitrate reductase activity	127
III.2.2.6.3. Data analysis	127
III.2.3. Results and discussion	128
III.2.3.1. Water quality and Seasonal variation in study sites	128
III.2.3.2. Seasonal variation of contaminant accumulation in plant	133
III.2.3.3. Correlation study between contaminant content in water and in <i>M. alterniflorum</i>	135
III.2.3.4. Evolution of biomarkers responses in different seasons	137
III.2.3.4.1. MDA content	137
III.2.3.4.2. Nitrate reductase activity (NR)	138
III.2.3.5. Effect of duration of exposure on biomarkers responses	141
III.2.3.6. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in water	141

III.2.3.7. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in plant.....	142
III.2.4. Conclusion.....	144
III.3. Identification des biomarqueurs de <i>Myriophyllum alterniflorum</i> les plus sensibles pour la détection des contaminants dans des sites anthropiques.....	147
III.3.1. Introduction.....	148
III.3.2. Materials and methods	149
III.3.2.1. Plant material, growth conditions and reintroduction <i>in situ</i>	149
III.3.2.2. Studied area.....	149
III.3.2.3. Biomarkers analysis	149
III.3.2.3.1. Analysis of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity	149
III.3.2.3.2. Analysis of γ -glutamylcysteine synthetase activity	150
III.3.2.3.3. Analysis of the malondialdehyde content (MDA).....	150
III.3.2.3.4. Analysis of free proline concentration	151
III.3.2.3.5. Osmotic potential analysis	151
III.3.2.3.6. Analysis of nitrate reductase activity	151
III.3.2.3.7. Analysis of chlorophyll a, b and carotenoid concentrations	151
III.3.2.4. Data analysis	152
III.3.3. Results and discussion	153
III.3.3.1. Evolution of biomarker responses	153
III.3.3.2. Global effect of studied sites on biomarkers responses <i>in situ</i>	160
III.3.3.3. Effect of duration of exposure on biomarkers response.....	161
III.3.3.4. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in water.....	164
III.3.3.5. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in plant.....	166
III.3.4. Conclusion.....	167
Conclusion et perspectives.....	169
Références bibliographiques	174
Annexes	199

Table des illustrations

Figure 1. Méthodologie d'évaluation de la qualité des eaux en utilisant les bioindicateurs via la bioaccumulation et via les biomarqueurs (d'après Lagadic, 1997)	21
Figure 2. Représentation de l'échantillonnage ponctuel et passif (POCIS) au cours du temps (Fauvelle <i>et al.</i> , 2010).....	28
Figure 3.Représentation graphique du gradient de concentration établi à l'état stationnaire au sein d'un dispositif Diffusive Gradients in Thin films (DGT) en contact avec une solution (Devillers, 2017).	28
Figure 4. Différentes formes chimiques des métaux et métalloïdes dans les eaux (d'après Devillers, 2017).	29
Figure 5. La bryophyte aquatique <i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw (Bleuel <i>et al.</i> , 2005)	32
Figure 6. (a) <i>Enteromorpha compressa</i> ; (b) <i>Fucus vesiculosus</i> ; (c) <i>Ulva lactuca</i> ; (d) <i>Cladophora glomerata</i>	33
Figure 7.Trois modèles de base concernant la prise en charge des métaux par les plantes en fonction de la concentration des métaux dans le milieu (Baker et Walker, 1990).....	35
Figure 8. (a) <i>Myriophyllum alterniflorum</i> utilisé dans cette étude et (b) sa répartition en France d'après Julve, 2016. Version 2016.11. Programme chorologie départementale de tela-botanica.....	36
Figure 9. Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. M^{Z+} = ion métallique libre ; ML = métal complexé ; L^{Z-} = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^- , etc.); M-X = métal complexé à la surface cellulaire (Campbell <i>et al.</i> , 2002).	38
Figure 10. Mécanismes de bioaccumulation des métaux et métalloïdes dans les plantes. ...	39
Figure 11. Schéma du mécanisme de diffusion facilitée (Hopkins <i>et al.</i> , 2003) (les ions en vert foncé sont les espèces chargées et ceux en vert clair sont les espèces non chargées).	43
Figure 12. Schéma des mécanismes de transport actifs (Hopkins <i>et al.</i> , 2003).	44
Figure 13. Modèle schématique de la cellule végétale, des transporteurs et des mécanismes d'accumulation des métaux et métalloïdes (Luo <i>et al.</i> , 2016).....	45
Figure 14. Schéma représentatif d'une cascade MAPK incluant MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MAPKK) et MAP kinase (MAPK). (P) représente la phosphorylation. (T) se réfère aux résidus thréonine, tandis que (Y) se réfère aux résidus tyrosine (George, 2014).....	47
Figure 15. Séquestration vacuolaire des métaux/métalloïdes (Cd) dans les cellules végétales source : (Yang et Chu, 2011).....	48
Figure 16. Présentation des effets des polluants sur les plantes à différents niveaux : morphologiques, physiologiques et métaboliques. () : Diminution ; () : Augmentation (Farid <i>et al.</i> , 2013; Fernandes et Henriques, 1991; Hussain <i>et al.</i> , 2013).	54
Figure 17. Stress oxydatif induit par les métaux, mécanismes de tolérance et de désintoxication dans la cellule végétale (Sytar <i>et al.</i> , 2013).....	55

Figure 18. Schéma du stress oxydatif induit par les métaux. APX, ascorbate peroxydase; CAT, catalase; H ₂ O ₂ , peroxyde d'hydrogène; M ⁽ⁿ⁾ , métal oxydé redox-actif; M ⁽ⁿ⁻¹⁾ , métal redox-actif réduit; O ₂ ⁻ , superoxyde; OH ⁻ , ion hydroxyde; [•] OH, radical hydroxyle; SOD, superoxyde dismutase (Cuypers <i>et al.</i> , 2016).....	59
Figure 19. Les étapes du processus de peroxydation lipidique (Grotto <i>et al.</i> , 2009).	61
Figure 20. Mécanismes d'absorption, du transport et de l'assimilation du nitrate dans les plantes (NR : nitrate réductase) (Ruamrungsri <i>et al.</i> , 2010).....	64
Figure 21. Voie des pentose phosphate ("Pentose Phosphate Pathway," n.d.).....	65
Figure 22. Cycle enzymatique du gamma glutamyl pour la synthèse du glutathion (Manjula Ramen, 2015).....	66
Figure 23. Schéma des composants principaux du système de défense enzymatique-antioxydant associés au GSH (glutathion), y compris la glutathion réductase (GR) (Gill <i>et al.</i> , 2013).....	67
Figure 24. Mécanisme de détoxification des métaux/métalloïdes, et du stress oxydatif dans les cellules végétales. Cys, cystéine ; γ-Glu-Cys, γ-l-glutamyl-l-cystéine ; γ-ECS, γ-glutamylcystéine synthétase (γ-GCS) ; GSH, glutathion ; GSSG, glutathion oxydé ; PC, phytochélatine ; HMI (Heavy metal ions), métaux/métalloïdes ; HMI-PC, complexe métal/ou métalloïde- phytochélatine ; Toxine, xénobiotiques ; Toxine-SG, conjugué de toxine-GSH. (1) la γ-glutamylcystéine synthétase ; (2) la glutathion synthétase ; (3) la phytochélatine synthase ; (4) la glutathion S-transférase (GST) (Peuke et Rennenberg, 2005).	68
Figure 25. Récapitulatif chronologique de l'étude.	75
Figure 26. Implantation des myriophylles <i>in situ</i> dans les cages pendant 28 jours.....	77
Figure 27. Carte d'occupation du sol des cinq sites étudiés (S1 "Saint-Denis", S2 " amont Vienne ", S3 "aval Vienne ", S4 " amont Valoine ", S5 " aval Valoine ") (géoportail).	78
Figure 28. Schéma représentatif de l'analyse statistique.	87
Figure 29. Map of land occupation of the five studied sites (S1 "Saint-Denis", S2 "Vienne upstream ", S3 "Vienne downstream ", S4 "Valoine upstream", S5 "Valoine downstream") (géoportail).	97
Figure 30. Representative schema of statistical analysis.	99
Figure 31. Principal Component analysis (PCA) of water composition related to anthropogenic site's impact in P2015.	102
Figure 32. Dissolved concentrations of Cu, Ni, Cd and As in water surface in five sites of P2015-2016 period study (µg/L) (mean of five measures).	103
Figure 33. Principal Component analysis (PCA) of metals and metalloids related to anthropogenic site's impact at P2015.	105
Figure 34. Cu and Ni content in water (mean of five measures) and in <i>M. alterniflorum</i> (µg/g DW) in five sites at different exposure times (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to 7, 14, 21 and 28 exposure times) (mean of three measures). Different letters mean a significant difference at p<0.05. Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis. (E1, E2, E3 and E4): different evolution of contaminant accumulation pattern during time.	106

Figure 35. Cd and As content in water (mean of five measures) and in <i>M. alterniflorum</i> ($\mu\text{g/g}$ DW) (mean of three measures) in five sites at different exposure times (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to seven, 14, 21 and 28 exposure times). Different letters mean a significant difference at $p < 0.05$. Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis. (E1, E2, E3 and E4): different evolutions of contaminant accumulation pattern during time.	108
Figure 36. Cu and Ni content in water (mean of five measures) and BCF in <i>M. alterniflorum</i> (mean of three measures) in five sites. (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to 7, 14, 21 and 28 exposure times). Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis.	110
Figure 37. Cd and As content in water (mean of five measures) and BCF in <i>M. alterniflorum</i> (mean of three measures) in five sites. (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to 7, 14, 21 and 28 exposure times). Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis.	112
Figure 38. Principal component analysis (PCA), to evaluate the relationship between contaminants content in plants ($\mu\text{g/g}$ DW) with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t21 days at P2015 ($n=30/\text{contaminant}$) ($p < 0.05$).	116
Figure 39. Representative schema of statistical analysis.	127
Figure 40. Dissolved Cu, Ni, Cd and As in water surface in five sites in P2015, A2015 and P2016 ($\mu\text{g/L}$) (mean of five measures). Different letters mean significant differences at $p < 0.05$. (—) means no significant difference with other campaigns.	130
Figure 41. Seasonal distribution of physicochemical parameters and contaminants according to plan D1x D2.	132
Figure 42. Seasonal variation of contaminant (Cu, Ni, Cd and As) accumulation in plant at t21 in five studied sites in spring (P2015), autumn 2015 (A2015) and spring 2016 (P2016) ($n=\text{three measures}$). Different letters mean significant differences ($p < 0.05$). (—) means no significant differences.	133
Figure 43. MDA variations in ' <i>Myriophyllum alterniflorum</i> ' during P2015, A2015, and A2016 exposure for 28 days ($n=\text{nine measures}$). Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).	137
Figure 44. NR activity variation in ' <i>Myriophyllum alterniflorum</i> ' during P2015, A2015 and P2016 for 28 days exposure ($n=\text{nine measures}$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).	139
Figure 45. Contaminates accumulation over time (28 days) for five field campaigns at S5, in the three study periods (spring and autumn 2015, and spring of 2016) ($n=\text{three measures}$).	145
Figure 46. Representative schema of statistical analysis.	152
Figure 47. Nitrate reductase activity in different sites in spring 2015 for 28 days ($n = 9/\text{field campaign}$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). (°) indicates that the downstream differ from upstream ($p < 0.05$). (*) Indicates that the site is different from the control site ($p < 0.05$). (E) Represent different evolution pattern.	153

Figure 48. Physiological biomarkers responses (Chla, Chlb and carotenoids) in different sites in spring 2015 for 28 days (n = nine/field campaign). Different letters indicate significant difference (p <0.05). (°) indicates that the downstream differ from upstream (p <0.05). (*) Indicates that the site is different from the control site (p <0.05). (E) Represent different evolution pattern.....	154
Figure 49. Biochemical and physiological biomarkers responses (MDA, Free proline and O.P.) in different sites in spring 2015 for 28 days (n = nine/field campaign). Different letters indicate significant differences (p <0.05). (°) indicates that the downstream differ from upstream (p <0.05). (*) Indicates that the site is different from the control site (p <0.05).....	156
Figure 50. Biochemical biomarkers responses (G6PDH, γ-GCS) in different sites in spring 2015 for 28 days (n = nine/field campaign). Different letters indicate significant differences (p <0.05). (°) indicates that the downstream differ from upstream (p <0.05). (*) Indicates that the site is different from the control site (p <0.05). (E) Represent different evolution pattern. (E) Represent different evolution pattern.....	158
Figure 51. Principal Component analysis (PCA) of biomarkers response distribution in five sites at t21	161
Figure 52. Principal component analysis (PCA), used to evaluate the relationship between biomarkers responses in <i>M. alterniflorum</i> with dissolved contaminant content in water (µg/L) in five sites at t21 (p<0,05).	164
Figure 53. Principal component analysis (PCA), used to evaluate the relationship between biomarkers responses and contaminant level into <i>M. alterniflorum</i> in five sites at t21 (p<0.05).	167
Figure 54. Protocole opératoire pour l'utilisation des biomarqueurs de <i>M. alterniflorum</i> pour la détection des contaminants dans l'environnement.	173
Figure 55. Variations de la pluviométrie dans les cinq sites d'étude en printemps 2015 (p2015), automne 2015 (A2015), printemps 2016 (P2016) pendant 28 jours. L'axe des (Y) représente les valeurs de la pluviométrie en mm, L'axe des (X) représente le temps en jours des cinq sites (référence : infoclimat/ station de Limoges-Bellegrade).....	204
Figure 56. Variations temporelles de la vitesse de courant dans l'eau en m/s (n=trois/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	204
Figure 57. Variations temporelles de l'oxygène dissous en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	205
Figure 58. Variations temporelles du pH (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.	205
Figure 59. Variations temporelles de la conductivité en µS/s (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.	206
Figure 60. Teneurs moyennes (n= cinq) en COD (mg/L) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	206
Figure 61. Variations temporelles des teneurs en chlorures en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	207
Figure 62. Variations temporelles des teneurs en sulfates en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	207

Figure 63. Variations temporelles des teneurs en calcium en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	208
Figure 64. Variations temporelles des teneurs en phosphates en µg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	208
Figure 65. Variations temporelles des teneurs en nitrates en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	209
Figure 66. Variations temporelles des teneurs en Cu dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	210
Figure 67. Variations temporelles des teneurs en Co dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.....	210
Figure 68. Variations temporelles des teneurs en Ni dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes de 2015-2016.....	211
Figure 69. Variations temporelles des teneurs en Pb dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes 2015-2016.....	211
Figure 70. Variations temporelles des teneurs en Cd dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes 2015-2016.....	212
Figure 71. Variations temporelles des teneurs en As dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes 2015-2016.....	212

Table des tableaux

Tableau 1. Composition du milieu Vienne oligotrophe (Krayem, 2015).....	76
Tableau 2. Limites de quantification des anions et cations majeurs analysés par chromatographie ionique (Dionex dx.20)	81
Tableau 3. Limite de détection et de quantification des éléments mineurs analysés par ICP-MS (7700, Agilent technologie).....	82
Table 4. Limits of quantification of anions and major cations analyzed by ion chromatography (Dionex dx. 20)	98
Table 5. Limit of quantification of minor elements analyzed by ICP-MS (7700, Agilent Technology).	99
Table 6. Water quality level for the five studied sites (blue level: very good state; green level: good state) N.M.: Not measured.....	100
Table 7. Pearson “R” correlation test used for the relationship between contaminants content in plants ($\mu\text{g/g}$ DW) with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t14, T21, t28 at P2015 (n=30/contaminant) ($p<0.05$).	117
Table 8. Examples of correlation studies between levels of contaminants in water and plants in the literature.....	119
Table 9. Examples of correlation studies between levels of contaminants in water and plants in the literature.....	120
Table 10. Limits of quantification of anions and cations analyzed by ion chromatography (Dionex dx.20).....	126
Table 11. Limit of quantification of contaminants analyzed by ICP-MS (7700, Agilent Technology).	126
Table 12. Physicochemical parameters and major elements level for the three campaigns study.	128
Table 13. Correlation of Pearson (R), CCA and Co-inertia analysis, for the relationship between contaminants content content in plants ($\mu\text{g/g}$ DW) with dissolved contaminants content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at 21 days of P2015, A2015 and P2016 (n=15/contaminant) ($p<0,05$).	135
Table 14. Pearson “R” correlation analysis between nitrate reductase activity and the chlorophyll pigments at t21 at spring 2015 (n=45)	140
Table 15. Correlation of Pearson (R) for the relationship between biomarkers responses in <i>M. alterniflorum</i> with dissolved contaminants content in water in five sites at 21 days of spring, autumn 2015 and P2016 ($\mu\text{g/L}$) (n=45/contaminant) ($p<0,05$).	142
Table 16. Correlation of Pearson (R), for the relationship between biomarkers responses with contaminants levels in <i>M. alterniflorum</i> at 21 days of spring, autumn 2015 and P2016 ($\mu\text{g/L}$) (n=45/contaminant) ($p<0,05$).	143
Table 17. <i>Analysis of contaminants in water compared to the EQS. (In red > at the EQS).</i> 145	

Table 18. Pearson (R) correlation test used to evaluate the relationship between biomarkers responses in <i>M. alterniflorum</i> with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t21 (n=45/contaminant) ($p < 0,05$).	165
Table 19. Pearson (R) correlation test used to evaluate the relationship between biomarkers responses and contaminant level into <i>M. alterniflorum</i> in five sites at t21 (n=45/contaminant) ($p < 0,05$).....	166
Tableau 20. Gamme de concentrations de contaminants métalliques (mg/kg) dans les roches ignées et sédimentaires (Cannon <i>et al.</i> , 1978)	200
Tableau 21. Présence de contaminants métalliques dans les effluents de diverses industries (Nagajyoti <i>et al.</i> , 2010).	200
Tableau 22. Normes et concentrations des contaminants métalliques dans l'eau et dans la plante.	201
Tableau 23. Normes d'état de la qualité des eaux (Arrêté du 27 juillet 2015).	202
Tableau 24. Concentrations des macro-, oligo-éléments, des vitamines et du sucre utilisés pour concevoir le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)	203
Tableau 25. Comparaison entre les contaminants dans les échantillons (AF) avec les valeurs NQE (en rouges les teneurs qui sont supérieures aux valeurs de références NQE pour les différents métaux et métalloïdes étudiés).....	209
Tableau 26. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques. ..	213
Tableau 27. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques. ..	214
Tableau 28. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques. ..	215
Tableau 29. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques. ..	216
Tableau 30. Les durées d'exposition observées pour une accumulation maximale dans les plantes aquatiques.	217
Tableau 31. Réponses des différents biomarqueurs aux contaminants <i>in situ</i> et <i>in vitro</i> dans les plantes aquatiques.....	218
Tableau 32. Réponses des différents biomarqueurs aux contaminants <i>in situ</i> et <i>in vitro</i> dans les plantes aquatiques.....	219
Tableau 33. Réponses des différents biomarqueurs aux contaminants <i>in situ</i> et <i>in vitro</i> dans les plantes aquatiques.....	220

Abréviations

ABC	ATP-binding cassette
ALAD	δ -aminolevulinic acid dehydratase
APX	Ascorbate peroxidase
As	Arsenic
ATP	Adénosine triphosphate
BCF	Bioconcentration factor
CAT	Catalase
CAX	Cation exchanger
Cd	Cadmium
CDF	Cation diffusion facilitator
Cl⁻	Chlorures
Co	Cobalt
CO₃²⁻	Carbonate
COD	Carbone organique dissous
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
DBO5	Demande biochimique en oxygène
DCE	Directive-cadre sur l'eau
DCO	Demande chimique en oxygène
DDC	N, N'-dicyclohexylcarbodiimide
DGT	Diffusive gradients in thin films
DM	Dry Mass
DMA	Dimethylarsinate
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique Acide
ELS	Espace libre apparent
EROS	Espèces réactives d'oxygènes
Fe	Fer
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GF-AAS	Graphite furnace atomic absorption spectroscopy
GLY	Glycine
GR	Glutathione reductase activity
GSH	Glutathione
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂S	hydrogen sulfide
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HMA	Heavy metal ATPases
HMW	High molecular weight
IBD	Indice biotique diatomées
IBGN	Indice Biologique Global Normalisé
IBML	Indice Biologique Macrophytique Lac
IBMR	Indice Biologique Macrophytique en Rivière
IC	Ion Chromatography
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES	ICP optical emission spectrometry
IPR	Indice Poisson Rivières
LD	Limite de détection
LEMA	Loi sur l'eau et les milieux aquatiques
LMW	Low molecular weight
LQ	Limite de quantification
MAP Kinases	Mitogen-activated protein kinases

MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MDA	Malondialdehyde
MES	Matières en suspension
MF	Masse plante fraîche
MIP	Major Intrinsic Proteins
MLB	Modèle ligand biotique
MMA	Monomethylarsonate
Mn	Manganèse
MO	Matière organique
MP-AES	Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy
MS	Masse sèche
MT	Metallothioneins
MTP	Metal tolerance proteins
NA	Nicotianamine
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NH₄⁺	Ammonium
Ni	Nickel
NiCl₂	Chlorure de nickel(II)
NIP	Nodulin 26-like intrinsic protein
NPK	Nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K)
NR ACTIVITY	Nitrate reductase activity
NRAMP	Natural Resistance Associated Macrophage Protein
Pb	Plomb
PC	Phytochelatins
PCB	Polychlorobiphényles
PCDD	Polychlorodibenzo-p-dioxines
pH	Potentiel hydrogène
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PO₄³⁻	phosphates
POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Samplers
POD	Peroxidase
POX	Peroxidase
PX	Peroxydase
RCO	Réseau de contrôle opérationnel
RCS	Réseau de contrôle de surveillance
ROS	Reactive oxygen species
RRP	Réseau de Référence Pérenne
SAGE	Schéma d'aménagement et de gestion des eaux
SDAGE	Schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux
SO₄²⁻	Sulfates
SOD	Superoxyde dismutase
STEU	Station de Traitement des Eaux Usées
UV	Ultra-violet
WWTP	Waste Water Treatment Plant
XANT	Ethylxanthate
Y-GCS	Y -Glutamylcysteine synthetase activity
YSL	Yellow stripe-like
Zn	Zinc

Introduction

La recherche d'outils de surveillance de la qualité des écosystèmes et de méthodes d'évaluation de la qualité des eaux mobilise la communauté scientifique depuis les dernières décennies. La surveillance de la qualité des milieux aquatiques est nécessaire afin de définir l'état des systèmes et de façon à identifier les actions correctives à mettre en place pour atteindre leur bon état. Dans ce contexte, le développement d'outils fiables, robustes, simples et peu coûteux est important. Trois modes de surveillance sont utilisés pour évaluer la qualité des eaux : l'échantillonnage ponctuel, l'échantillonnage passif et le biomonitoring.

Le biomonitoring peut renseigner sur la biodisponibilité des polluants *in situ* et montrer les effets intégratifs des contaminants sur l'écosystème pour une longue durée d'exposition, ce qui n'est pas assuré par les autres modes de surveillance (Amiard et Amiard-Triquet, 2008) (figure 1). Le bioindicateur utilisé dans le biomonitoring est défini comme « une espèce végétale, fongique ou animale, mais aussi un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal, dont la présence ou l'état renseigne sur des caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatiques, biologiques et fonctionnelles) de l'environnement ou sur l'influence de certaines activités humaines » (Markert *et al.*, 2003). Ces bioindicateurs sont utilisés pour surveiller la qualité de l'environnement, détecter différentes sortes de pollution et définir les changements qui se produisent dans les milieux (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

L'utilisation des espèces bioindicatrices et sentinelles dans le cadre de la biosurveillance de la qualité des eaux est intéressante car elle permet d'indiquer la présence et l'effet d'un contaminant ou un mélange des contaminants *in situ*, pour l'évaluation de la qualité des eaux. Deux approches de biosurveillance peuvent être mises en place : la biosurveillance passive qui utilise des espèces présentes naturellement dans les sites étudiés, et la biosurveillance active utilisant des espèces transplantées sur une durée d'exposition fixée.

Ce mode de biosurveillance implique l'utilisation de biomarqueurs. Un biomarqueur est un « changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic, 1997). L'utilisation de biomarqueurs pour évaluer la qualité des eaux s'est développée au cours des dernières années. Ainsi, le suivi des biomarqueurs des macrophytes aquatiques pourrait être un outil efficace pour détecter la présence de contaminants dans l'environnement et leur effet sur l'écosystème. Cette approche est intéressante car elle permet de montrer l'effet des contaminants sur les organismes et par suite sur l'écosystème, ce que ne permet pas le suivi de l'accumulation des contaminants dans des organismes aquatiques. .

La réponse des biomarqueurs permet d'indiquer que la qualité des eaux subit une altération et par suite une dégradation progressive de l'écosystème. Cette réponse est définie comme une indication des effets des impacts anthropiques à long terme. Les biomarqueurs doivent répondre à certains critères pour être pertinents pour l'évaluation de la qualité des eaux. La réponse des biomarqueurs doit pouvoir être analysée de façon précise pour détecter une altération de la qualité de l'eau d'une façon précoce, avant que cette altération atteigne des niveaux plus élevés d'organisation biologique dans l'environnement. Les biomarqueurs peuvent être spécifiques d'un seul contaminant, d'un mélange des contaminants ou d'un type

de stress. Enfin les facteurs biotiques et abiotiques qui impactent la réponse des biomarqueurs doivent être identifiés (Amiard *et al.*, 1998). Cependant, tous ces critères ne sont pas disponibles avec un seul biomarqueur.

Ainsi, une approche multiparamétrique, utilisant plusieurs types de biomarqueurs spécifiques ou non du stress étudié, est nécessaire pour une meilleure évaluation de la qualité des eaux. Les biomarqueurs non-spécifiques, simples et moins coûteux (par exemple les biomarqueurs de stress oxydatif et les biomarqueurs physiologiques), peuvent détecter une perturbation de la qualité des eaux, et l'utilisation d'autres biomarqueurs spécifiques de certains stress, permettra de détecter les contaminants associés à l'altération observée dans l'environnement. Les mécanismes de réaction des biomarqueurs avec les contaminants peuvent se faire à différents niveaux allant d'une première interaction du contaminant avec un récepteur cellulaire jusqu'à des altérations au niveau physiologique, biochimique, moléculaire ou histologique. Ainsi des biomarqueurs d'exposition et d'effet peuvent se mettre en place. Les biomarqueurs d'exposition sont impliqués dans les mécanismes de détoxification des contaminants et de défense cellulaire, alors que, lorsque ces mécanismes de défense cellulaire ne sont pas suffisants pour réduire les effets délétères des contaminants, les biomarqueurs d'effet se mettent en place surtout en réponse au stress oxydatif généré par les contaminants dans l'organisme.

Dans un milieu pollué, la structure et l'état écologique des espèces bioindicatrices seront modifiés, avec une apparition et/ou une prolifération de certaines espèces, et une disparition plus ou moins rapide du peuplement initial ou d'une partie de celui-ci. Ainsi, la réponse des espèces bioindicatrices pourrait mettre en évidence l'impact des activités humaines sur les écosystèmes aquatiques (Lévêque et Mounolou, 2008 ; Kaiser, 2001 ; Landres *et al.*, 1988 ; Barbour *et al.*, 1999).

Pour déterminer le potentiel d'indication d'une espèce, il est nécessaire de définir son cycle de vie, son interaction avec les contaminants et ses mécanismes de réaction face aux contaminants. Dans le cadre du biomonitoring, les sept bioindicateurs utilisés le plus couramment sont les bactéries, les animaux (macro-invertébrées benthiques, poissons, oiseaux, zooplancton) et les végétaux (algues et macrophytes) (Gerhardt, 2002 ; Haury *et al.*, 2006).

L'indice biotique est un indice d'évaluation quantitatif de la qualité des écosystèmes sur la base de changements chez les bioindicateurs. L'indice biologique diatomique (IBD), l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR) et l'indice biologique global normalisé (IBGN) sont des exemples. Ces différents indices sont basés sur l'abondance relative des espèces, et la présence/ou l'absence d'espèces indicatrices. Ces bioindicateurs peuvent être classés selon leurs mécanismes d'action (bioaccumulation, exposition, dommages), leur niveau d'organisation biologique (individu, population, communauté, écosystème...) et le type de changement observable (Kaiser, 2001 ; Marques, 2009 ; Markert *et al.*, 2003).

L'utilisation des macrophytes aquatiques dans la biosurveillance des masses d'eau, en particulier pour la biosurveillance de la pollution des métaux et métalloïdes est couramment étudiée à cause de leur facilité de manipulation et leur abondance dans le milieu aquatique (Bonanno, 2013; Bonanno et Giudice, 2010; Calzoni *et al.*, 2007; Demirezen et Aksoy, 2006). Les macrophytes aquatiques ont une capacité d'accumulation de métaux/métalloïdes dans leurs tissus assez élevée (Bragato *et al.*, 2006; Fritioff et Greger, 2006; Lesage *et al.*, 2007;

Mishra *et al.*, 2009a, 2009b). Des corrélations significatives ont été signalées entre les concentrations de métaux/métalloïdes dans l'eau et dans les plantes (Mishra et Tripathi, 2008). Par ailleurs des corrélations entre les teneurs en contaminants dans l'eau et la réponse des biomarqueurs de certains macrophytes ont été relevées. Ainsi, les macrophytes aquatiques apparaissent comme des outils intéressants pour la biosurveillance de la qualité des eaux.

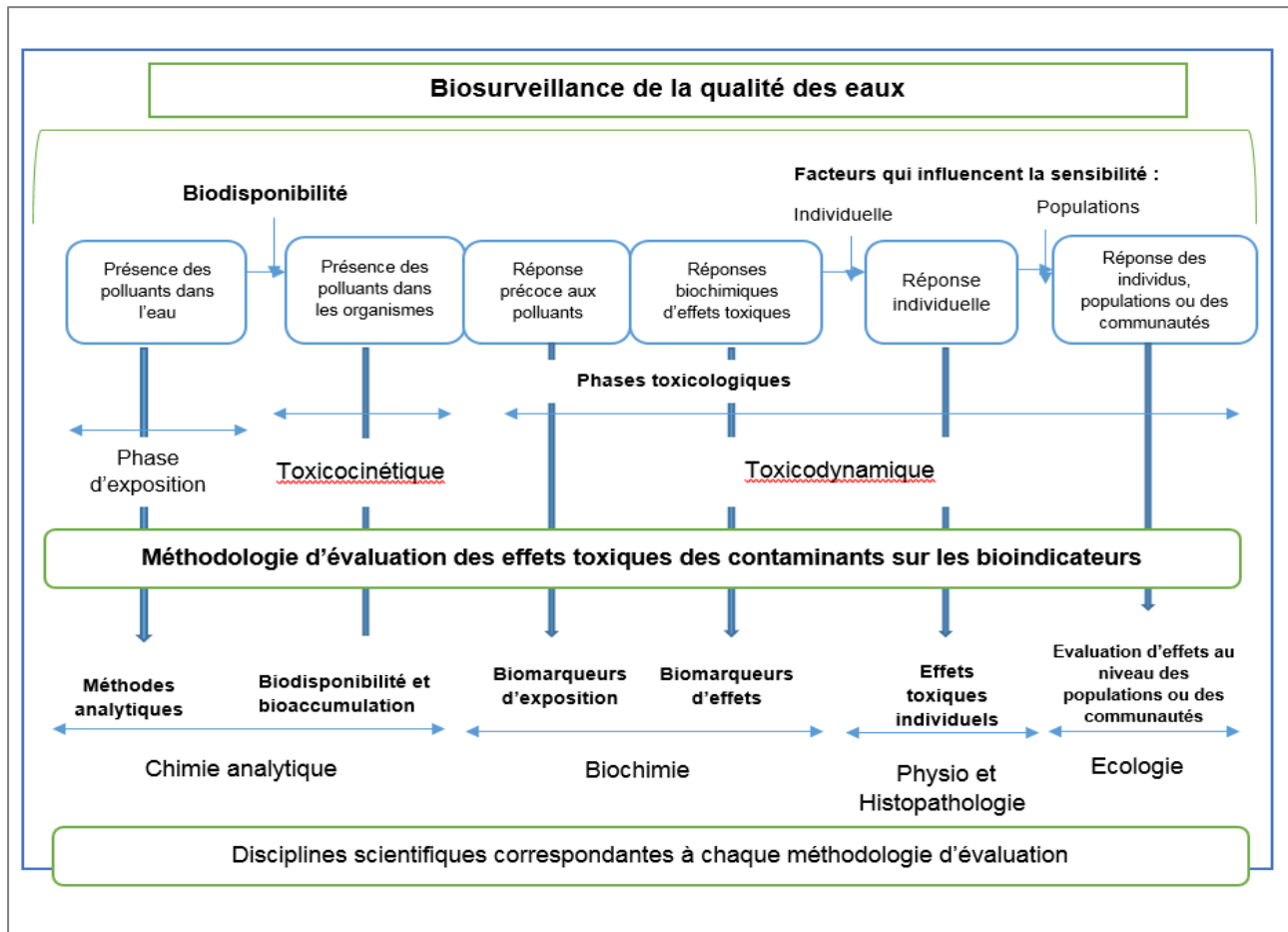


Figure 1. Méthodologie d'évaluation de la qualité des eaux en utilisant les bioindicateurs via la bioaccumulation et via les biomarqueurs (d'après Lagadic, 1997)

M. alteriflorum est couramment observée dans les eaux douces dans plusieurs pays du monde. Il est indigène en France, et se trouve dans la plupart des régions. De plus, il est facile à manipuler et robuste, et se développe rapidement sans être une espèce envahissante. Le macrophyte aquatique *Myriophyllum alterniflorum* présente des caractéristiques qui en font un candidat intéressant pour la biosurveillance, de par sa capacité d'accumulation des métaux et métalloïdes et de par la réponse de certains de ses biomarqueurs à la présence de contaminants (Chatenet *et al.*, 2006; Delmail *et al.*, 2011; Krayem *et al.*, 2016; Ngayila *et al.*, 2007, 2009).

L'objectif général de ce travail de thèse est d'étudier la capacité de *Myriophyllum alterniflorum*, comme espèce sentinelle, utilisable dans le cadre du biomonitoring, pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau et de définir chez cette espèce une gamme de biomarqueurs sensibles et pertinents pour détecter des contaminations par des métaux ou métalloïdes.

Il convient de déterminer si l'accumulation des contaminants dans la plante et si des biomarqueurs du myriophylle peuvent être utilisés pour détecter la présence de contaminants inorganiques.

Dans ce contexte, une étude bibliographique complète sera réalisée en rappelant les modalités de suivi de la qualité de l'eau utilisées actuellement, en présentant les organismes utilisés dans le biomonitoring, ainsi que l'intérêt des macrophytes et leurs biomarqueurs par rapport aux autres techniques de surveillance.

Dans un deuxième temps, la méthodologie utilisée pour le déploiement du myriophylle sera présentée, avec tous les paramètres expérimentaux analysés dans l'eau et la plante. Les sites d'étude, sélectionnés afin de mettre en évidence l'impact d'activités urbaines et industrielles, seront décrits, ainsi que les conditions de surveillance, avec trois campagnes de terrain (printemps 2015, automne 2015 et printemps 2016).

Les résultats seront présentés au travers de trois parties.

- Une première partie sera consacrée à la présentation des conditions environnementales et de la signature chimique des eaux, avec les paramètres physicochimiques et les teneurs en contaminants dans l'eau. Les corrélations entre les teneurs en contaminants dissous dans l'eau et les teneurs en contaminants dans *Myriophyllum alterniflorum* seront étudiées, en considérant l'influence de la durée d'exposition, afin de montrer le potentiel de suivi de l'accumulation des contaminants dans *M. alterniflorum* pour l'évaluation de la qualité des eaux. L'influence des conditions environnementales sur le facteur de bioconcentration (BCF) sera présentée.
- La seconde partie s'intéressera aux résultats obtenus pour les trois campagnes de terrain, concernant la réponse des biomarqueurs malondialdéhyde (MDA) et activité nitrate réductase (NR), en relation avec les teneurs en contaminants dans l'eau et dans la plante. Il s'agira de comparer les résultats relatifs à l'accumulation des contaminants dans la plante avec la réponse des biomarqueurs, en considérant l'influence des sites et des saisons.
- La troisième partie présentera les résultats des réponses de neuf biomarqueurs de *Myriophyllum alterniflorum* lors de la campagne de printemps 2015. L'objectif sera d'identifier les biomarqueurs les plus sensibles en réponse aux impacts urbains et industriels.

Le manuscrit d'achèvera avec une conclusion générale et les perspectives à ce travail.

Chapitre I. Etude bibliographique

I.1. Evaluation de la qualité des eaux

I.1.1. Contexte réglementaire

La loi de 16 décembre 1964, est la première loi importante sur l'eau en France. Elle instaure une vision globale et transversale de la politique de l'eau avec pour ambition de rassembler les usages et usagers de l'eau autour des problématiques des ressources aquatiques. L'un des apports importants de cette loi consiste en un régime économique et financier qui repose sur les agences financières de bassin. En effet, le principe pollueur-payeur est appliqué : les différents usagers de l'eau doivent verser des redevances à l'agence, qui redistribue ensuite ces fonds pour la restauration de la qualité de l'eau ("Loi n° 64-1245 du 16 décembre 1964 relative au régime et à la répartition des eaux et à la lutte contre leur pollution | Legifrance").

La loi du 3 janvier 1992 affiche les ressources en eau comme « patrimoine commun de la nation ». En outre, elle favorise l'exigence de la protection de la quantité et de la qualité des eaux. Cette loi fixe de nouveaux outils pour la gestion des ressources en eau qui sont : les SDAGE (Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux) et les SAGE (Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux) (Loi n° 92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau, 1992).

Le SDAGE « fixe pour chaque bassin les orientations fondamentales d'une gestion équilibrée de la ressource en eau ». L'échelle géographique de ces plans d'action correspond aux six bassins versants hydrographiques français, les quatre bassins des DOM (Martinique, Réunion, Guyane, Guadeloupe) et le bassin de Mayotte.

Les SDAGE sont évalués par un diagnostic. Selon l'état des milieux et les impacts, les enjeux pour chaque bassin sont identifiés. Ainsi, des objectifs sont fixés selon les enjeux. Ensuite, un programme de mesures à prendre pour atteindre les objectifs est dressé. Ils sont valables entre dix à quinze ans à partir du moment où ils sont mis en place ; ils sont ensuite révisés tous les six ans.

Les SAGE déterminent les objectifs et les règles pour une gestion intégrée de l'eau, au niveau local. Ils ont alors pour ambition de rassembler les différents usages et usagers de la ressource en eau sur un territoire défini, afin d'atteindre les objectifs fixés.

Toutes les décisions prises dans le domaine de l'eau par les services de l'Etat et les collectivités publiques doivent être cohérentes avec les SDAGE et les SAGE.

Une grande partie de la réglementation française résulte des directives européennes en particulier de la directive cadre sur l'eau (DCE). **La directive européenne n°2000/60/CE du 23 octobre 2000** établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Cette directive a été transposée en droit français par la loi n°2004-338 du 21 avril 2004. Elle a pour objectifs : de faire une gestion durable des ressources en eau, de prévenir la dégradation des écosystèmes aquatiques, d'assurer une alimentation suffisante en eau potable de bonne qualité, de réduire la pollution des eaux souterraines et les rejets de substances dangereuses et de supprimer les rejets de substances dangereuses prioritaires ("Directive n° 2000/60/CE du 23/10/00 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau | AIDA,").

D'autre part, elle a mis en place un calendrier commun aux pays membres pour la mise en application de cette directive, ce qui aboutira à financer et à mettre des actions pour atteindre le bon état et avoir une amélioration de la qualité des eaux.

Des arrêtés ont été fixés en France pour mettre en application la DCE. Citons :

L'arrêté du 12 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères pour délimiter les masses d'eau et dresser l'état des lieux (modifié le 8 juillet 2010) établissant la liste des 33 substances prioritaires et substances dangereuses prioritaires et fixant les modalités et délais de réduction et élimination de ces substances (2021 à 2028) (NOR : DEVO1000661A).

De plus, un premier arrêté du 25 janvier 2010 présente les méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface (NOR : DEVO1001032A). Un second arrêté du 25 janvier 2010 établit le programme de surveillance de l'état des eaux pour chaque bassin, les méthodes et critères servant à caractériser les différentes classes d'état écologique ou chimique et de potentiel écologique des eaux de surface, et la liste des polluants avec les normes de qualité environnementales (NQE) (NOR: DEVO1001031A).

Ensuite, l'arrêté de 27 juillet 2015 a modifié l'arrêté du 25 janvier 2010 ; il redéfinit les méthodes et les critères utilisés pour évaluer l'état écologique et l'état chimique des eaux de surface au sens de la directive-cadre sur l'eau (directive 2000/60/CE). La modification de l'arrêté du 25 janvier 2010 a pour but de mettre à jour les règles d'évaluation de l'état des eaux, notamment avec de nouveaux indices (phytoplancton, macrophytes, phytobenthos) des seuils uniformisés au niveau de l'union européenne, et une liste actualisée des polluants chimiques dont As, Cr, Cu, et Zn.

La Loi sur l'Eau et les milieux aquatiques (LEMA) du 30 décembre 2006 a rénové le cadre global défini par les lois sur l'eau du 16 décembre 1964 et du 3 janvier 1992. Elle donne les outils permettant d'atteindre le bon état des eaux (fixé par la DCE), et de développer le service public de l'eau et de l'assainissement. La LEMA prend en compte l'adaptation au changement climatique dans la gestion des ressources aquatiques (NOR : DEVX0400302L).

Plusieurs dispositions ont été mises en œuvre par la LEMA : (i) la rénovation de l'organisation institutionnelle, (ii) la création de l'office national de l'eau et des milieux aquatiques (ONEMA, l'AFB depuis 2017), (iii) la proposition de nouveaux outils pour lutter contre les pollutions diffuses, et (iv) donner des outils nouveaux aux maires pour gérer les services publics de l'eau et de l'assainissement dans la transparence...

I.1.2. Origines des contaminants

Différents contaminants engendrent des dégradations de la qualité des masses d'eau, tels que les polluants métalliques (le cuivre, le cadmium, le chrome, le nickel, le cadmium, le plomb...), les métalloïdes (arsenic...) et les polluants organiques (PCB, HAP, PCDD-F...). Ils affectent tous les constituants des écosystèmes, les organismes vivants (faune et flore) et leur habitat. Ces substances peuvent être d'origine naturelle ou anthropique.

Les polluants d'origine naturelle peuvent être diffusés via l'air, l'eau ou les sols. Via l'air, les polluants sont générés par les incendies de forêts, les activités volcaniques (pluies acides), et

les phénomènes d'érosion éolienne. Concernant les contaminants sous forme insoluble (mais qui peuvent rester en suspension), leur conséquence sur les microorganismes est souvent limitée étant donnée leur faible biodisponibilité (Garelick *et al.*, 2009). Des contaminations naturelles (Cr, Cu, Pb, Ni, Zn et As) peuvent être rencontrées dans certains systèmes, du fait de la composition géochimique des sols (Al-Juboury, 2009; Tarzia *et al.*, 2002). L'arsenic est un métalloïde présentant des teneurs pouvant atteindre plusieurs mg/L dans les eaux souterraines de certaines régions. Ce métalloïde peut être d'origine anthropique (industrie, pesticides...) ou d'origine naturelle, et c'est le cas de la région étudiée en Limousin où le fond géochimique présente des teneurs élevées en arsenic, et peut induire des concentrations en arsenic dans les eaux de plus de 10µgAs/L (Bossy, 2010).

Les activités industrielles (agroalimentaire, papeterie, traitement de surface, industrie chimique, mécanique et électrique...), peuvent émettre des substances dangereuses de natures différentes : des métaux/métalloïdes (pétrochimie, teinturerie, métallurgie, mécanique...), des hydrocarbures (pétrochimie...), des solvants (organochlorés...), des détergents... (Alloway, 2013 ; Singh *et al.*, 2005).

Outre les activités industrielles, les rejets d'eaux usées domestiques peuvent également contribuer à disséminer des contaminants proviennent des différents usages domestiques tel que, les eaux ménagères qui proviennent des salles de bain et des cuisines (chargées en détergents, graisses, solvants et débris organiques...), et les eaux « vannes » qui proviennent des rejets des toilettes et qui sont chargées de diverses matières organiques azotées et de germes fécaux.

Enfin, les rejets des activités agricoles induisent la dissémination de produits fertilisants et des produits phytosanitaires appliqués sur les cultures. Les activités d'élevage, les déjections animales, entraînent le rejet de pollution microbiologique mais aussi de nutriments, et de composés pharmaceutiques...

Les activités telles que l'exploitation minière, la métallurgie et l'agriculture ont contaminé de vastes régions du monde. Citons les exemples du Japon, de l'Indonésie et de la Chine dont les sols sont contaminés par le Cd, le Cu et le Zn (Herawati *et al.*, 2000) ; le Cu, le Cd et le Pb en Grèce du Nord (Zantopoulos *et al.*, 1999), et en Albanie (Shallari *et al.*, 1998) ; et le Cr, le Pb, le Cd, le Cu, le Ni et le Zn en Australie (Smith *et al.*, 1996).

Les contaminants sont distribués dans l'eau dans différentes fractions : dissoutes, colloïdales et particulaires. Par ailleurs la spéciation des contaminants dans l'eau doit être prise en compte pour évaluer leur impact sur les êtres vivants d'un écosystème. En effet, plusieurs facteurs agissent sur cette spéciation dans l'eau tel que la température, la matière organique, les matières en suspension, l'alcalinité, le pH, le potentiel redox... Par exemple, les métaux/métalloïdes complexés à la matière organique ne seront en général que peu biodisponibles (Hatano et Shoji, 2010).

Les contaminants peuvent également interagir avec différentes espèces biologiques aquatiques telles que les végétaux, les espèces phytoplanctoniques, le zooplancton ou les bactéries. Les polluants métalliques peuvent toucher toutes ces espèces, s'y accumuler et provoquer des effets néfastes sur tout l'écosystème.

Dans les écosystèmes aquatiques, les macrophytes sont en interaction constante avec le milieu impacté par les métaux et les métalloïdes, et ils peuvent jouer un rôle important dans le suivi de la qualité des eaux de l'écosystème. Les macrophytes montrent, comme d'autres organismes aquatiques, une grande sensibilité à la présence des métaux/métalloïdes (Bonanno et Giudice, 2010, 2010; Krayem et al., 2016; Ladislav et al., 2012; Lewis, 1995; Melzer, 1999; Peng et al., 2008).

I.1.3. Modalités de suivi

Le contrôle de surveillance est effectué, pour chaque site de surveillance, durant la période couverte par le SDAGE. Ce contrôle comprend les paramètres indicatifs des (1) paramètres de qualité physico-chimique ; (2) paramètres de qualité biologique ; (3) paramètres de qualité hydro-morphologique ; (4) les substances de l'état chimique, qui sont rejetées dans le bassin hydrographique (Cd, Pb et Ni) ; et (5) les polluants spécifiques de l'état écologique (Zn, As, Cr, et Cu). (Arrêté du 7 août 2015, NOR : DEVL1513988A).

De manière générale, la période à laquelle les contrôles sont effectués doit être déterminée de manière à réduire au maximum l'effet des variations saisonnières sur les résultats. Les mesures sont effectuées sur un point de prélèvement, et les prélèvements d'eau sont réalisés dans la veine centrale du chenal principal pour les prélèvements d'eau de surface en rivière (Arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement - Article V).

Le mode d'échantillonnage doit tenir compte du contexte du site d'étude : le niveau de qualité de l'eau (niveau de risque étudié), les paramètres altérés (paramètres de l'état écologique et/ou de l'état chimique), l'occupation du sol et l'origine des contaminants (rejets urbains, industriels et/ou agricoles), pollutions ponctuelles et/ou diffuses, mais aussi l'existence de variations saisonnières.

Le choix des sites de prélèvement actif doit être réalisé selon l'implantation des activités anthropiques. Un échantillonnage en amont et en aval des activités anthropiques, peut permettre de mettre en évidence l'impact d'une activité. Il est également nécessaire de comparer les résultats avec ceux d'un site de référence loin de toute activité anthropique.

La fréquence des contrôles requise pour tout paramètre est déterminée de manière à apporter des données suffisantes pour une évaluation valable de l'état de l'élément de qualité en question (Arrêté du 7 août 2015, NOR : DEVL1513988A).

Les paramètres physico-chimiques et chimiques avec leur fréquence sont comme suit : (1) température, oxygène dissous, % saturation, pH, conductivité, DBO₅, DCO, P total, MES, turbidité, chlorophylle a, phéopigments (six fois par an) ; (2) chlorures, sulfates, bicarbonates, calcium, magnésium, sodium, potassium, dureté TH, TAC (deux fois par an); (3) NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻ (six fois par an); (4) carbone organique total (une fois par an), et (5) les métaux/métalloïdes mesurés sur la fraction dissoute (quatre fois par ans). (NOR : DEVO1001031A).

Ensuite, les éléments hydro-morphologiques tels que le régime hydrologique (quantité et dynamique du débit, connexion avec les eaux souterraines), la continuité écologique (présence de seuils et/ou ouvrages, transit sédimentaire, déconnexion lit mineur/ lit majeur),

et les conditions morphologiques (modifications des variations de largeur et de profondeur, altérations des faciès et des vitesses d'écoulement, altérations de l'état et de la structure des rives, altérations du substrat) sont contrôlés régulièrement (une fois par an).

Enfin, les paramètres biologiques sont contrôlés tous les six mois à trois ans selon les espèces utilisées qui peuvent être des espèces phytoplanctoniques (inventaire et dénombrement après sédimentation tous les six mois), des diatomées (IBD NF T90-354 (2007) tous les trimestres), des macrophytes : angiospermes, bryophytes, ptéridophytes et macroalgues (IBMR NF T90-395 (2003) tous les trois ans), des invertébrés (tous les trois ans), des poissons (IPR tous les trois ans) ...

Les populations des poissons sont étudiées lors de pêches électriques. Le suivi de leur démographie constitue l'Indice Poissons Rivière (IPR) qui correspond à l'écart entre le peuplement observé et un peuplement de référence (en absence de perturbations anthropiques). Pour les algues, l'association et la diversité des diatomées dans un cours d'eau reflètent les stress environnementaux. Ainsi l'étude de la population diatomique par l'Indice Biologique Diatomées (IBD) peut renseigner sur la présence de pollution et reflète également le degré d'eutrophisation. En revanche, les effets des pesticides et des métaux ne peuvent être distingués de ceux des polluants organiques. L'Indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR) montre essentiellement le degré trophique de la rivière par l'utilisation des plantes aquatiques (NF T90-395 (Octobre 2003)).

L'échantillonnage ponctuel et le biomonitoring sont donc mis en œuvre comme différents modes de suivi pour l'évaluation de la qualité des eaux.

I.1.3.1. Echantillonnage ponctuel

Les techniques de surveillance de la qualité d'eau les plus utilisées sont les techniques d'échantillonnage actif ponctuel, suivies d'une analyse chimique permettant d'identifier les teneurs en contaminants (Liger *et al.*, 2012). Cependant, la détection des métaux et métalloïdes n'est pas toujours possible avec certains appareils d'analyses (ICP-OES, GF-AAS et MP-AES), pour lesquels, les limites de quantification sont de quelques µg/L ou même par ICP-MS, avec une limite de quantification de quelques ng/L (Tyler, 1995). Ce mode d'échantillonnage est coûteux. Il nécessite un nombre de prélèvements et d'analyses important afin d'avoir un suivi assez précis et un résultat représentatif du système aquatique étudié. Par ailleurs, les effets des contaminants sur les êtres vivants de l'écosystème étudié ne sont pas évalués.

Conjointement à cet échantillonnage, les paramètres physicochimiques comme le pH, la température, la teneur en oxygène dissous, la conductivité, la demande biochimique en oxygène sont mesurés. Outre les concentrations en métaux et métalloïdes (Mn, Zn, Co, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr et As), les concentrations en éléments chimiques majeurs (chlorures, sodium, calcium, magnésium) ainsi que celles en nutriments (sulfates, phosphates, phosphore total, ammonium, nitrates, nitrites, azote total), et la teneur en carbone organique dissous et en matière en suspension, sont également mesurées.

Ce mode d'échantillonnage donne une information sur la qualité des eaux au point d'échantillonnage à un moment précis mais cette information est donc incomplète pour avoir une vision globale au cours du temps.

I.1.3.2. Echantillonnage passif

Les techniques d'échantillonnages ponctuels utilisées pour quantifier les contaminants dans les eaux de surface sont le plus souvent limitantes, par les limites de quantification, par manque de représentativité et/ou par le coût analytique important. Ainsi l'échantillonnage passif peut être une alternative à l'échantillonnage ponctuel.

Du fait de l'accumulation continue des contaminants du milieu dans le dispositif, ce mode d'échantillonnage permet d'avoir une meilleure représentativité de la qualité des eaux en intégrant les teneurs en contaminants. Le résultat permettra d'avoir une estimation de la teneur moyenne en contaminant dans le milieu pour la période de déploiement. Ainsi, le résultat sera plus représentatif (Figure 2).

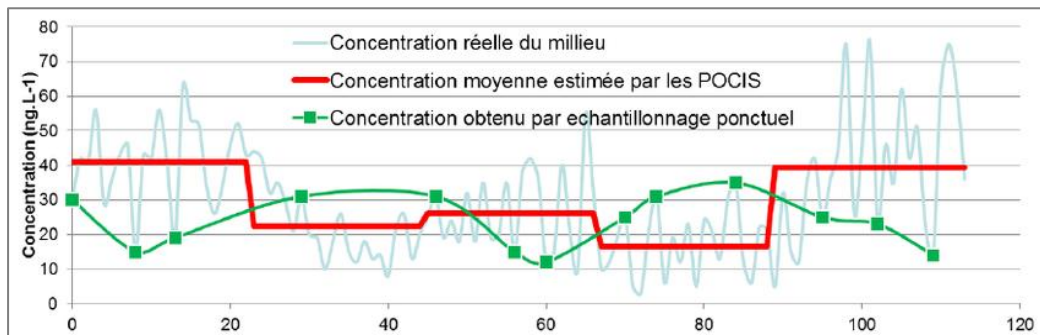


Figure 2. Représentation de l'échantillonnage ponctuel et passif (POCIS) au cours du temps (Fauvelle *et al.*, 2010).

L'échantillonnage passif permet d'obtenir une concentration moyenne d'un contaminant sur une durée d'exposition de plusieurs jours (14 à 28 jours) (Devillers, 2017). Cependant il ne permet pas d'avoir accès aux pics de concentration, qui peuvent engendrer un effet de toxicité aiguë.

L'échantillonneur passif est constitué d'une phase réceptrice de nature solide ou liquide avec une affinité élevée pour les molécules d'intérêt (figure 3). Cette phase est séparée du milieu par une membrane. Les molécules dans la colonne d'eau diffusent à travers la couche d'eau statique.

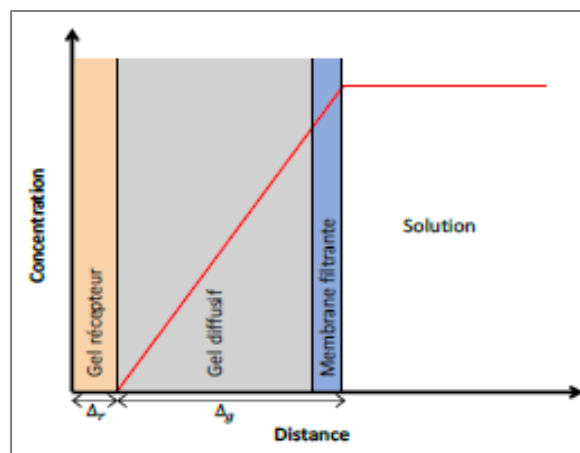


Figure 3. Représentation graphique du gradient de concentration établi à l'état stationnaire au sein d'un dispositif Diffusive Gradients in Thin films (DGT) en contact avec une solution (Devillers, 2017).

La présence d'une couche de diffusion (constituée du gel diffusif et de la membrane filtrante) permet de contrôler le transport des éléments, qui est régi par les lois de la diffusion (loi de Fick), où la vitesse des molécules qui diffusent d'une région à une autre est en fonction de leur différence de concentration, et ainsi de déterminer la concentration en contaminant dans la solution (Devillers, 2017).

La technique DGT permet de concentrer les contaminants dans la phase réceptrice qui est ensuite éluee dans un volume faible. Ainsi, cette technique permet de détecter et de quantifier des concentrations plus faibles par rapport à la méthode d'échantillonnage ponctuel.

Les métaux/métalloïdes peuvent être présents sous différentes formes chimiques qui sont les espèces labiles (les ions libres et certains complexes), les espèces partiellement labiles (certains complexes organiques) et les espèces non labiles (certains complexes, les espèces adsorbées sur la phase particulaire) (figure 4). Ainsi, la fraction labile ne correspond qu'à une partie de la fraction dissoute. L'échantillonnage ponctuel permet d'obtenir la concentration en contaminant total ou dissous, tandis que la technique DGT reflète la concentration en espèce labile indicatrice de la fraction biodisponible (Devillers, 2017).

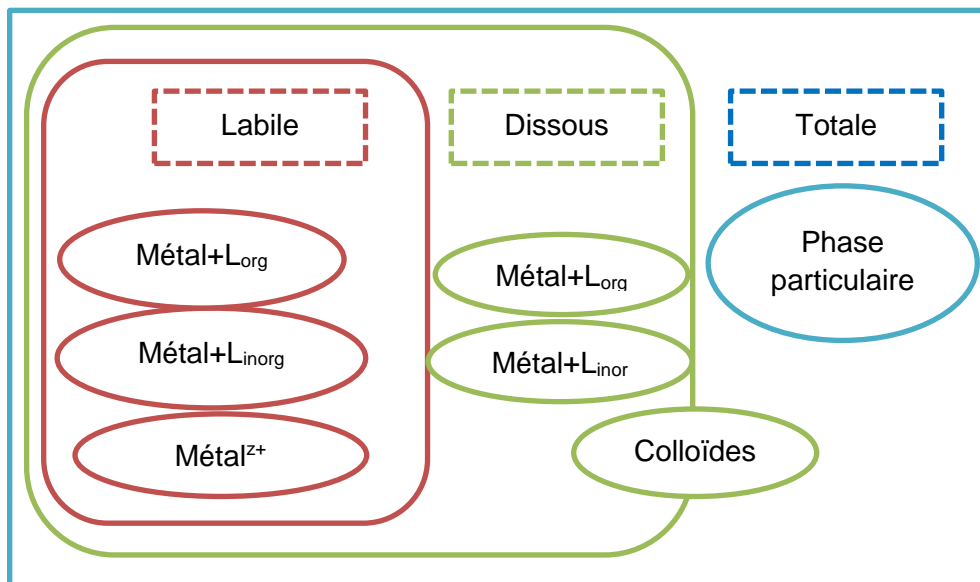


Figure 4. Différentes formes chimiques des métaux et métalloïdes dans les eaux (d'après Devillers, 2017).

Cependant, certains paramètres tels que la température, la vitesse du courant, la constante d'échantillonnage R_s (volume d'eau échantillonné par unité temps (L/j)) et la composition des eaux (Devillers *et al.*, 2017; Lobpreis *et al.*, 2008), peuvent influencer l'accumulation des contaminants et par conséquent limiter la fiabilité des résultats obtenus par ce mode d'échantillonnage.

De façon générale, l'échantillonnage passif, comme le ponctuel, ne donnent pas d'information sur les effets des contaminants sur les êtres vivants dans l'écosystème étudié. Les limites des deux modes soulignent l'intérêt de trouver d'autres modalités de suivi complémentaires, comme la biosurveillance qui signifie selon Garrec et Haluwyn (2002) « l'utilisation à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique,

tissulaire, morphologique et écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution». Ce mode de suivi permet de mettre en évidence, de façon intégrative, les effets combinés des contaminants et plusieurs familles de contaminants (inorganiques et organiques) sur les êtres vivants de l'écosystème.

I.1.3.3. Biomonitoring

La technique de biomonitoring identifie des espèces polluo-sensibles permettant de détecter la dégradation de la qualité de l'eau avant que les polluants n'impactent plus sévèrement les différents organismes de la chaîne trophique de l'écosystème (phytoplancton, plantes aquatiques, zooplancton, poissons...). Plusieurs espèces (macrophytes, lichens, mousses, insectes, etc.) ont démontré une efficacité à détecter la présence de contaminants et permettent un suivi de la qualité des écosystèmes (Sammarco *et al.*, 2007). L'accumulation des contaminants dans ces bioindicateurs et les biomarqueurs activés par la présence de contaminants, peuvent renseigner sur l'état du milieu.

Le biomonitoring peut être réalisé de deux façons :

- Une méthode passive qui étudie les populations indigènes dans les milieux étudiés. La nature des espèces indigènes, de par leur tolérance plus ou moins importante par rapport aux contaminants, permettant de porter un diagnostic sur l'état du milieu.
- Une méthode active, qui consiste à introduire des populations saines dans un site pour définir le niveau de qualité des eaux (Rai, 2008; Samecka-Cymerman et Kempers, 2003; Scherman *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008)

Ainsi l'étude des bioindicateurs et de leurs biomarqueurs est importante en complément des analyses chimiques réalisées dans le cadre des échantillonnages ponctuels et passifs. Dans les 20 dernières années, on remarque un développement de la recherche dans le domaine du suivi de la qualité des écosystèmes aquatiques en utilisant les indicateurs biologiques (suivi état des populations, de l'état morphologique, physiologique et biochimique...) (Ceschin *et al.*, 2010; Ferrat *et al.*, 2003; Iliopoulou-Georgudaki *et al.*, 2003; Klumpp *et al.*, 2002; Ladislav *et al.*, 2012).

I.1.4. Biomonitoring : bilan des organismes utilisés

Les espèces bioindicatrices sont des organismes polluo-sensibles qui voient leur métabolisme perturbé lorsqu'ils sont exposés à des teneurs en contaminants au-delà de certains seuils spécifiques pour chaque organisme. Les conséquences de ces perturbations peuvent se traduire au niveau morphologique, physiologique, métabolique, histologique et/ou moléculaire, et peuvent ensuite être corrélées avec le niveau de contamination de l'écosystème.

Ces espèces peuvent donner une information qualitative et quantitative du niveau de contamination d'un site.

Pour atteindre ces objectifs, Calow (2009) propose la règle de « cinq-R » qui repose sur cinq critères afin de définir et valider l'utilisation du bioindicateur :

- L'analyse est simple et adaptable au laboratoire (Robustness)

- L'espèce est fiable et sensible (Reliability)
- La variabilité de la réponse par rapport aux différents facteurs non toxiques (espèce, environnement, méthode) est faible (Repeatability)
- La méthode est reproductible (Reproductibility)
- Le choix de l'espèce est pertinent par rapport au site d'étude, afin de faciliter l'extrapolation des résultats à d'autres populations et communautés (Relevance).

Généralement les espèces choisies sont des espèces sentinelles sensibles à un ou plusieurs contaminants et obéissant à la règle de « cinq-R ».

Les bioindicateurs se caractérisent par leur abondance, leur accessibilité et leur longévité (pour des durées d'exposition de plusieurs semaines). En plus d'être facile à manipuler (Burger, 2006), leur utilisation peut être moins coûteuse que les méthodes d'échantillonnage et d'analyse usuelles, tout en permettant une détection des polluants au travers de la bioaccumulation et de la réponse des biomarqueurs (Markert *et al.*, 2003).

Les bioindicateurs reflètent l'impact des contaminants sous forme biodisponible, de par leurs effets sur les organismes dans un écosystème (Markert *et al.*, 2003).

Les espèces autochtones constituent des bons bioindicateurs par rapport aux espèces exotiques, car elles sont moins sensibles au stress environnemental et sont plus compétitives (Morin, 2006).

I.1.4.1. Bryophytes

Les bryophytes ont été étudiées pour leur rôle dans le biomonitoring des milieux aquatiques de par leur capacité à accumuler les métaux (Samecka-Cymerman *et al.*, 2000). La plupart des bryophytes impliquées dans la bioindication sont immergées. D'après Samecka-Cymerman *et al.* (2000), les bryophytes sont de bons indicateurs des polluants (organiques et inorganiques), et donnent une image sur le potentiel de biodisponibilité des contaminants.

D'autres bioindicateurs comme les hépatiques et les sphaignes sont également utilisés (Carballeira et López, 1997). Ils sont caractérisés par l'absence de racines et reflètent la qualité du milieu par un échange entre l'eau et les feuilles. De plus, leur absence de système vasculaire réduit le transfert des contaminants à l'intérieur des plantes.

L'une des caractéristiques des bryophytes est leur résistance à des concentrations très élevées de polluants, avec une capacité importante de bioaccumulation (Tyler, 1990). Il est à noter que l'échantillonnage et la manipulation des bryophytes ont l'avantage d'être simples.

Les bryophytes sont des bons bioindicateurs de la pollution métallique dans les eaux douces (Gagnon *et al.*, 1999). *Fontinalis antipyretica* Hedw fait partie des bryophytes couramment utilisés en Europe pour la bioindication (figure 5) (Bleuel *et al.*, 2005; Bruns *et al.*, 1997; Dazy *et al.*, 2009; Rau *et al.*, 2007; Samecka-Cymerman *et al.*, 2005; Siebert *et al.*, 1996).

Fontinalis antipyretica est une espèce submergée qui se trouve dans les régions tempérées d'Europe. Elle est rencontrée principalement dans les eaux oligotrophes, avec un fort courant ; et elles ont la capacité de tolérer des concentrations élevées en nutriments et en polluants (Siebert *et al.*, 1996). Selon Bleuel *et al.* (2005), l'exposition de *F. antipyretica* à 100 µgCd/L a

montré une accumulation plus élevée après dix jours d'exposition ($5 \mu\text{mol/g MF}$) par rapport à t_0 ($0 \mu\text{mol/g MF}$), et une augmentation quatre fois plus élevée de l'activité enzymatique de GSH après sept jours par rapport à t_0 . Une autre étude menée par Siebert *et al.* (1996) *in situ* a montré une accumulation cinq fois plus élevée de Cd chez *F. antipyretica* (indigènes) en aval des activités anthropiques ($5 \mu\text{gCd/g MS}$) par rapport à l'amont de ces activités ($1 \mu\text{gCd/g MS}$).



Figure 5. La bryophyte aquatique *Fontinalis antipyretica* Hedw (Bleuel *et al.*, 2005)

L'utilisation des bryophytes comme bioindicateurs présente un intérêt aux niveaux financier et technique, par comparaison aux autres modes de surveillance de la qualité des eaux. Cependant, les principaux inconvénients de leur utilisation sont liés aux variabilités dans les mécanismes d'accumulation des organismes et à la connaissance restreinte des incertitudes au niveau du traitement de l'échantillon.

I.1.4.2. Algues

Ces végétaux aquatiques photosynthétiques (45% de la production végétale) et autotrophes vivent dans les eaux douces ou salées, libres ou stagnantes (Bellinger et Sigee, 2015). Ces espèces sont des producteurs primaires et constituent une ressource alimentaire essentielle pour la macrofaune aquatique. Leur utilisation en tant que bioindicateur permet d'obtenir une réponse quantifiable aux stress environnementaux (Chouteau *et al.*, 2004). Les algues planctoniques vivent à la surface d'eau (dans les quinze premiers mètres) ; elles suivent une dynamique saisonnière avec une abondance maximale au printemps et à la fin de l'été.

Les algues sont affectées par la présence de polluants organiques et inorganiques mais aussi par des paramètres généraux tels que la lumière, la température, les teneurs en nutriments, la présence de matière organique, le pH et la vitesse de courant (Bellinger et Sigee, 2015).

Plusieurs avantages de l'utilisation des diatomées (algues) comme bioindicateurs de la qualité des eaux ont été soulignés (Reid *et al.*, 1995) :

- Les algues sont des bioindicateurs efficaces pour les pollutions avec une durée d'exposition pas assez longue.
- Étant des producteurs primaires, les algues sont plus directement affectées par les facteurs physiques et chimiques de l'eau.
- L'échantillonnage est facile et peu coûteux.

Dans le biomonitoring, plusieurs algues sont utilisées comme les diatomées, qui sont des algues unicellulaires à paroi silicatée (Reid *et al.*, 1995). L'indice biologique diatomées (IBD) consiste à analyser les peuplements de diatomées épiphytiques, par l'identification et le comptage des espèces. L'IBD permet d'étudier la composition floristique des sites en fonction de la densité relative des organismes et leur polluo-sensibilité, en donnant une image de la qualité de l'écosystème aquatique (Davis et Simon, 1995).

Les algues *Enteromorpha* (eaux salées mais peuvent s'adapter aux eaux douces), *Fucus* (eau salée) et *Ulva* (eau salée) constituent les principales espèces utilisées comme bioindicateurs dans le domaine du biomonitoring (figure 6) (Lafabrie *et al.*, 2007). L'algue verte *Cladophora glomerata* (eaux salées mais peuvent s'adapter aux eaux douces) permet une bonne évaluation de la pollution aquatique par les contaminants métalliques (Chmielewská et Medved, 2001).

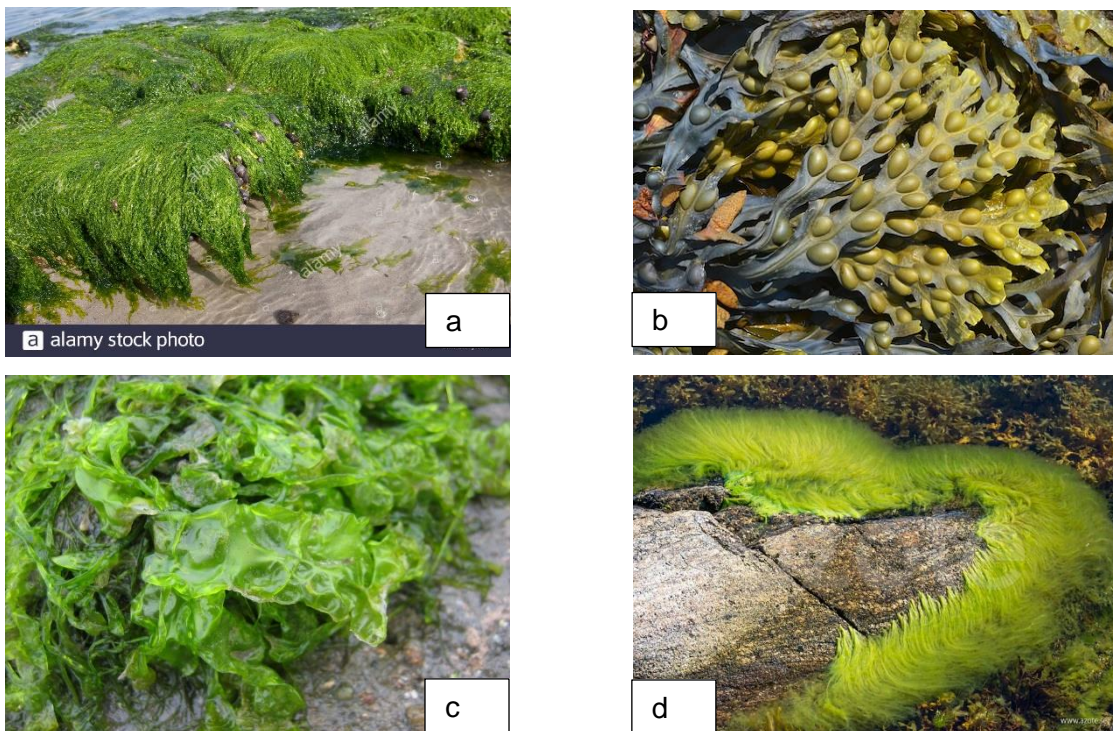


Figure 6. (a) *Enteromorpha compressa* ; (b) *Fucus vesiculosus* ; (c) *Ulva lactuca* ; (d) *Cladophora glomerata*.

I.1.4.3. Macrophytes aquatiques

Les macrophytes aquatiques sont des espèces submergées ou flottantes. En plus de l'eutrophisation (Carbiener *et al.*, 1990; Szoszkiewicz *et al.*, 2002), différents facteurs agissent sur leur développement: la pente, le débit et l'hydromorphologie du système aquatique. Du fait du développement du phytoplancton et des cyanobactéries en particulier, les macrophytes sont souvent plus présents dans les milieux oligotrophes ou mésotrophes, par rapport aux milieux eutrophes (Abou-Hamdan *et al.*, 2005). Trémolières *et al.* (2008) ont montré que le niveau trophique élevé perturbe le développement des macrophytes.

L'échantillonnage des macrophytes peut être réalisé par cartographie ou inventaire floristique. Ces deux méthodes sont réalisées suivant la télédétection par imagerie satellite, par imagerie vidéo, par des observations visuelles et par l'utilisation de sonars (Lauret *et al.*, 2011). Les macrophytes sont utilisés pour diagnostiquer l'état des cours et des plans d'eau, avec respectivement l'IBMR et l'IBML. Le suivi des macrophytes est réalisé du début de printemps jusqu'à l'automne. La méthode de bioindication IBMR est moins coûteuse par rapport à la méthode IBGN puisque l'identification des macrophytes aquatiques peut se faire directement sur le terrain (Lauret *et al.*, 2011).

Ces macrophytes assurent un rôle important dans l'écosystème aquatique comme support ou abri pour le zooplancton et le phytoplancton. Par ailleurs, les macrophytes influencent la vitesse du courant et par conséquent sur la sédimentation des particules en suspension, sur lesquels de nombreux contaminants sont fixés.

De plus, ils sont capables d'accumuler des teneurs élevées de contaminants; En effet, certains macrophytes sont utilisés pour extraire des polluants de l'environnement (phytoremédiation) (Mishra et Tripathi, 2008).

Selon Baker et Walker (1990) les stratégies exercées par les plantes en termes d'absorption des contaminants sont classées en trois catégories (figure 7) :

- La stratégie d'accumulation, où les contaminants sont accumulés dans les tissus végétaux. En Slovaquie, Jamnická *et al.* (2006) ont étudié l'accumulation de métaux dans 21 types de macrophytes aquatiques (tels que *Myriophyllum spicatum*, *Batrachium aquatile*, *Lemna minor*), et les valeurs moyennes les plus élevées de la teneur en Zn, Cu, Pb et Cd ont été détectées chez le macrophyte submergé *Myriophyllum spicatum* par rapport aux autres macrophytes aquatiques. Ces macrophytes ont montré une accumulation de deux à dix fois plus élevée des contaminants dans les sites industriels par rapport aux sites de référence.
- La stratégie de l'indicateur, où l'absorption des contaminants et le transport vers les feuilles sont contrôlés. L'absorption passive des contaminants se produit de sorte que leur concentration interne reflète leur concentration externe dans le milieu. Les macrophytes aquatiques utilisés dans la biosurveillance ont été choisis grâce à leur capacité à accumuler des teneurs élevées de polluants sans être altérés (Cardwell *et al.*, 2002; Dhir *et al.*, 2009; Mazej et Germ, 2009; Miretzky *et al.*, 2004; Mishra et Tripathi, 2008; Peng *et al.*, 2008; Rai et al., 1995; Vardanyan et Ingole, 2006).
- La stratégie d'exclusion, où les concentrations des contaminants dans les tissus de la plante sont maintenues constantes en dessous de la concentration critique. Pour limiter la toxicité dans les tissus, les macrophytes mettent en place le phénomène d'exclusion.

Pour cela, Berry (1986) suggère trois mécanismes fondamentaux de la réponse des plantes au stress métallique : l'évitement, la détoxification et la tolérance biochimique.

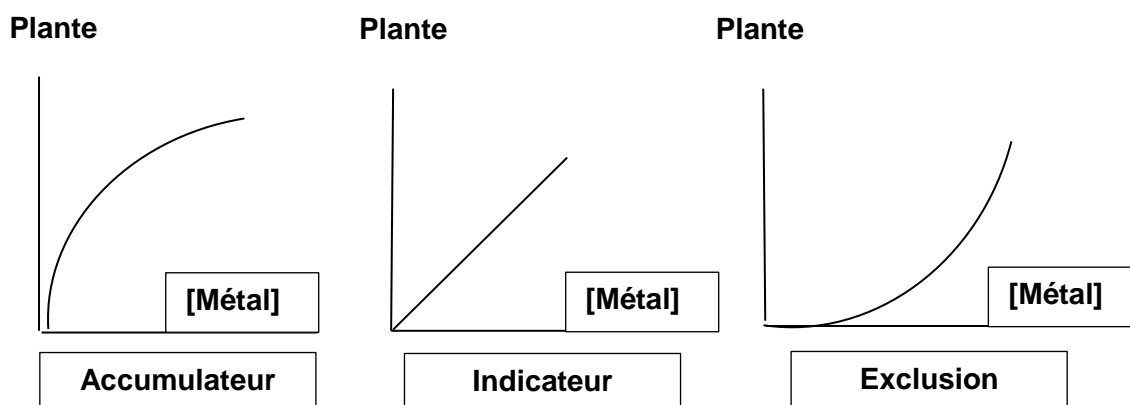


Figure 7. Trois modèles de base concernant la prise en charge des métaux par les plantes en fonction de la concentration des métaux dans le milieu (Baker et Walker, 1990).

Les mécanismes qui limitent l'absorption de contaminants au niveau des racines ou leur transport de la partie racinaire vers la partie foliaire constituent les mécanismes d'évitement. Les mécanismes de désintoxication résultent des mécanismes internes, par compartimentation cellulaire (séquestration vacuolaire), alors que la tolérance biochimique se traduit par la présence de voies métaboliques spécialisées et d'adaptations enzymatiques (système de défense antioxydant). Taylor (1987) souligne l'importance de l'exclusion des métaux/métalloïdes du symplasme dans le milieu (par réduction d'absorption ou par efflux vers l'extérieur), comme mécanisme fondamental de la tolérance de certaines plantes aux contaminants. Il a aussi souligné l'importance de la prise en compte de ce phénomène, pour éviter de sous-estimer la teneur en contaminant dans les milieux aquatiques, en se basant sur les teneurs accumulées dans les plantes.

« *Myriophyllum alterniflorum* »

Le déploiement de macrophytes aquatiques peut être considéré comme une technologie sensible et simple pour évaluer l'état des écosystèmes et mettre en évidence l'effet des contaminants.

Une souche de *Myriophyllum alterniflorum* (figure 8), prélevée dans la rivière « Vienne », a été étudiée pour sa capacité à absorber les éléments traces métalliques et les accumuler (Krayem *et al.*, 2016; Ngayila *et al.*, 2007), sans oublier l'utilisation de ses biomarqueurs pour la détection des contaminants (Delmail *et al.*, 2011; Krayem *et al.*, 2018; Krayem *et al.*, 2016; Ngayila *et al.*, 2007).

Myriophyllum alterniflorum est une espèce du genre *Myriophyllum* qui comprend environ quarante espèces appartenant à la famille des Haloragacées, dont le nom commun est le myriophylle à fleurs alternes (Lavoie, 2010). Elle existe dans les milieux aquatiques riches en oxygène, à des pH compris entre cinq et sept, et des températures de 15 à 20°C (Lavoie,

2010). Ce macrophyte aquatique est qualifié d'holarctique étant donnée sa présence au nord et au centre d'Europe.

C'est une espèce géophyte, monoïque, caractérisée par une tige enracinée par un rhizome dans les sédiments. Ses feuilles sont molles, fines et verticillées. Les fleurs de terminaisons sont de petite taille (un à trois mm), de couleur jaunâtre et unisexuées. Les fleurs inférieures sont femelles, leur floraison a lieu de Juillet à Septembre. Leur pollinisation est anémophile et sa reproduction est végétative (Barbe, 1984).

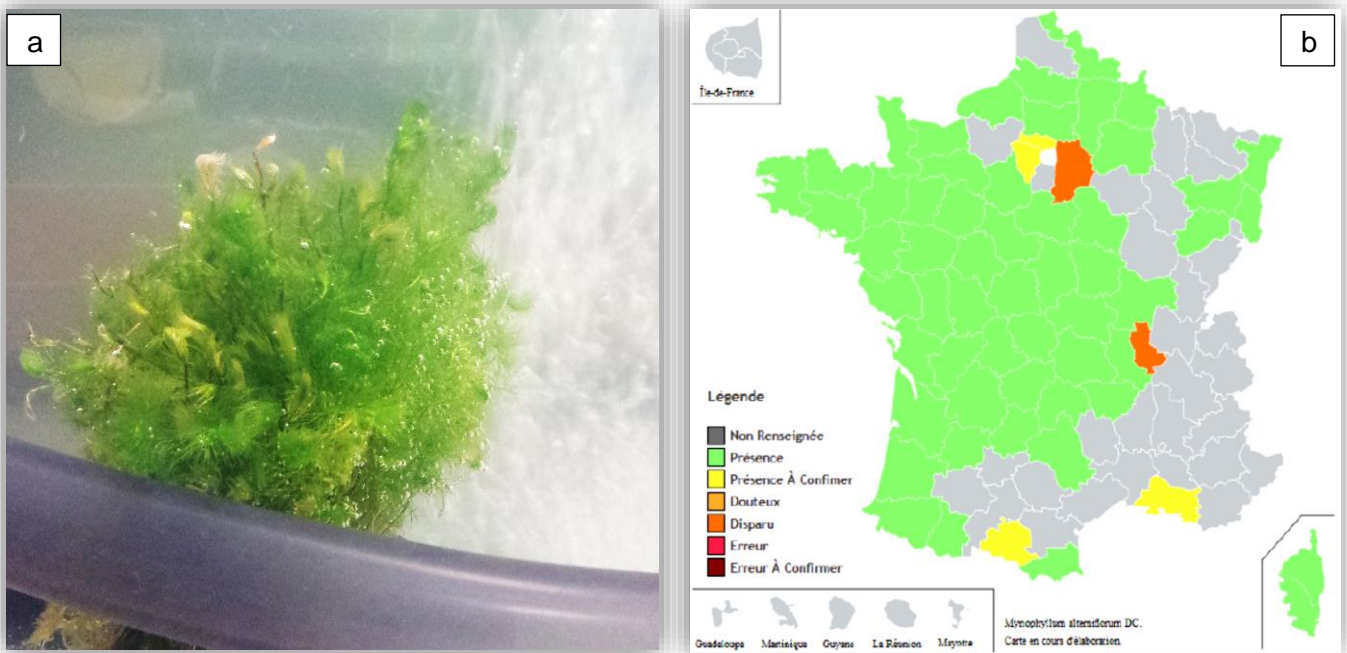


Figure 8. (a) *Myriophyllum alterniflorum* utilisé dans cette étude et (b) sa répartition en France d'après Julve, 2016. Version 2016.11. Programme chorologie départementale de tela-botanica.

Cette espèce vit dans les eaux stagnantes et moyennement courantes, jusqu'à une profondeur de 2,5 m (Delmail, 2011). Sa fixation se fait sur des substrats sableux ou de graviers. *Myriophyllum alterniflorum* se développe surtout dans les eaux douces (pauvres en magnésium et calcium) et dans les eaux oligotrophes à mésotrophes (Haury *et al.*, 2006).

Parmi ses avantages opérationnels, on peut citer qu'il est facile à manipuler et robuste. Il se développe rapidement sans être une espèce envahissante. Il est couramment observé dans les eaux de surface dans plusieurs pays du monde. Cette espèce est indigène, et elle se trouve dans presque toutes les régions en France (figure 8).

Ce myriophylle est abondant dans les eaux douces du Limousin, surtout sur les parties amont de certains cours d'eau : Vienne, Taurion, Gartempe (Chatenet *et al.*, 2000). Il tolère un léger enrichissement en nitrates mais est sensible à l'apport en phosphates (Delmail, 2011).

Les macrophytes aquatiques tels que *Myriophyllum alterniflorum* pourraient être des indicateurs de la présence des contaminants et de leur effet sur les écosystèmes, étant

donnée la réponse des biomarqueurs physiologiques et métaboliques de *Myriophyllum alterniflorum* lors de l'exposition aux polluants (Chatenet *et al.*, 2006; Delmail *et al.*, 2011; Ngayila *et al.*, 2007).

I.2. Interaction contaminants- plantes

I.2.1. Spéciation des métaux et métalloïdes dans l'eau et biodisponibilité pour les plantes

La toxicité des métaux / métalloïdes ne dépend pas seulement de leur teneur totale dans l'eau, mais aussi de leur spéciation chimique et physique. La connaissance de la spéciation des contaminants est nécessaire pour déterminer leur mobilité dans l'environnement et évaluer leur biodisponibilité.

Le terme spéciation désigne la distribution des métaux/métalloïdes sous différentes formes dans les eaux de surface (Templeton *et al.*, 2000). Les facteurs qui l'influencent dans les eaux de surface comprennent : (1) le pH, (2) la force ionique, (3) la dureté de l'eau, (4) la teneur en matière organique, et (5) le potentiel redox.

Nystrand *et al.* (2012) classent les métaux/métalloïdes suivant une spéciation physique avec trois fractions : dissoutes (<1 kDa), colloïdales (entre 1 kDa et 0,45 µm) et particulaire (supérieur à 0,45 µm). La forme dissoute est la plus mobile et la plus biodisponible, correspondant à la fraction la plus toxique. Les métaux/métalloïdes dissous peuvent migrer vers la fraction particulaire des sédiments par des mécanismes d'adsorption, d'échange d'ions ou de complexation avec des oxyanions ; ce changement de spéciation conduit à une limitation de leur biodisponibilité (Bjerregaard et Andersen, 2007). Dans l'environnement, la biodisponibilité correspond à la teneur en métal/métalloïde qui peut être prise en charge par la plante, absorbée par la plante et intégrée dans les mécanismes métaboliques. En toxicologie, la biodisponibilité est définie comme la fraction de la concentration du métal/métalloïde qui est absorbée ou adsorbée par la plante. Cette fraction assimilée interagit avec les récepteurs et les sites physiologiquement actifs impliqués dans le métabolisme des plantes ce qui peut induire des effets toxiques.

De nombreux facteurs influencent la biodisponibilité des métaux et métalloïdes pour la plante : (1) leur concentration, (2) leur spéciation, (3) la présence de ligands organiques ou inorganiques dans le milieu, (4) la présence d'ions majeurs (compétition), (5) le pH, (6) la température, (7) le milieu d'exposition (sol, eau, air), et le métabolisme de l'espèce exposée (aptitude à sécréter des exopolymères...) (Vijver *et al.*, 2004). Ces facteurs peuvent varier en fonction des saisons et interagir entre eux.

Le pH est le paramètre physicochimique qui influence le plus la spéciation des métaux/métalloïdes dans l'eau. Un faible pH peut induire la dissociation des métaux complexés ou précipités, et conduire à la prédominance des formes libres, plus toxiques. En milieu alcalin, les métaux peuvent précipiter sous forme d'hydroxydes ou d'oxyde et sont alors moins biodisponibles.

En se basant sur le modèle conceptuel semblable au modèle d'interaction des sites branchiaux proposé par Pagenkopf (1983), le modèle de ligand biotique (MLB) de toxicité a été développé. A la différence des autres modèles, le MLB considère non seulement l'effet des concentrations

de métaux dissous, mais aussi les interactions des métaux avec les ligands inorganiques et organiques (abiotiques et biotiques) ainsi que les interactions compétitives des métaux et d'autres cations présents dans le milieu. Ainsi, il offre une meilleure vision de la biodisponibilité des métaux et des effets toxiques attendus.

Le modèle du ligand biotique (figure 9) est un modèle dérivé du modèle de l'ion libre; la toxicité et la biodisponibilité des métaux sont considérées comme directement proportionnelles à la teneur en ion libre, pour un pH et des caractéristiques d'eau déterminées (Hatano et Shoji, 2010; Lavoie *et al.*, 2016; Niyogi et Wood, 2004).

Le MLB définit la biodisponibilité d'un métal (hydrophile) chez un organisme aquatique comme étant sa capacité à interagir avec la membrane plasmique et à déclencher ainsi une réponse biologique. Ainsi, dans ce modèle, la membrane biologique constitue le site primaire d'interaction du métal avec l'organisme (Campbell *et al.*, 2002; Lavoie *et al.*, 2016; Niyogi et Wood, 2004).

L'application du MLB (figure 9) permet de prédire plus précisément la toxicité des métaux et métalloïdes en milieu aquatique par rapport à l'ancienne approche qui n'était basée que sur la teneur totale des métaux et métalloïdes dissous (Lavoie *et al.*, 2016).

Pour être absorbés, les métaux doivent être transportés par des systèmes de transport membranaire de cations de sorte que seul l'ion libre se lie aux sites d'adsorption ($-X$ -cellule). En revanche, certains complexes métalliques peuvent prendre une voie alternative pour pénétrer dans la cellule. Les complexes métalliques neutres lipophiles peuvent traverser la membrane cellulaire par diffusion passive ($Pb(DDC)_2^0$ et $Cd(XANT)_2^0$) (Boullemant *et al.*, 2009; Florence *et al.*, 1992; Lavoie *et al.*, 2016).

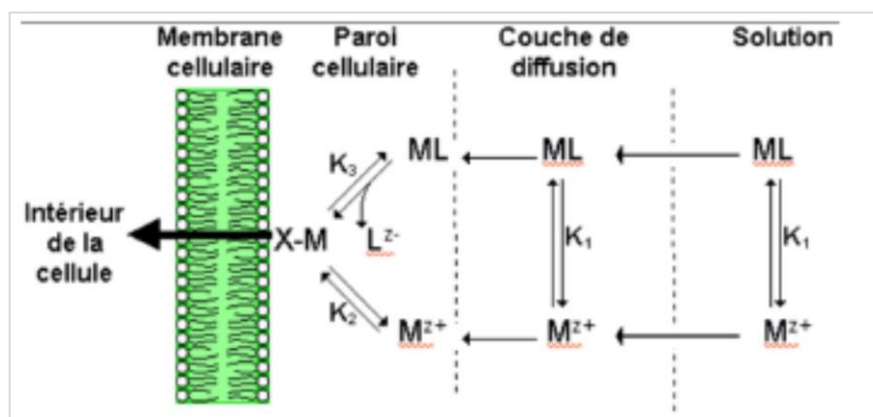
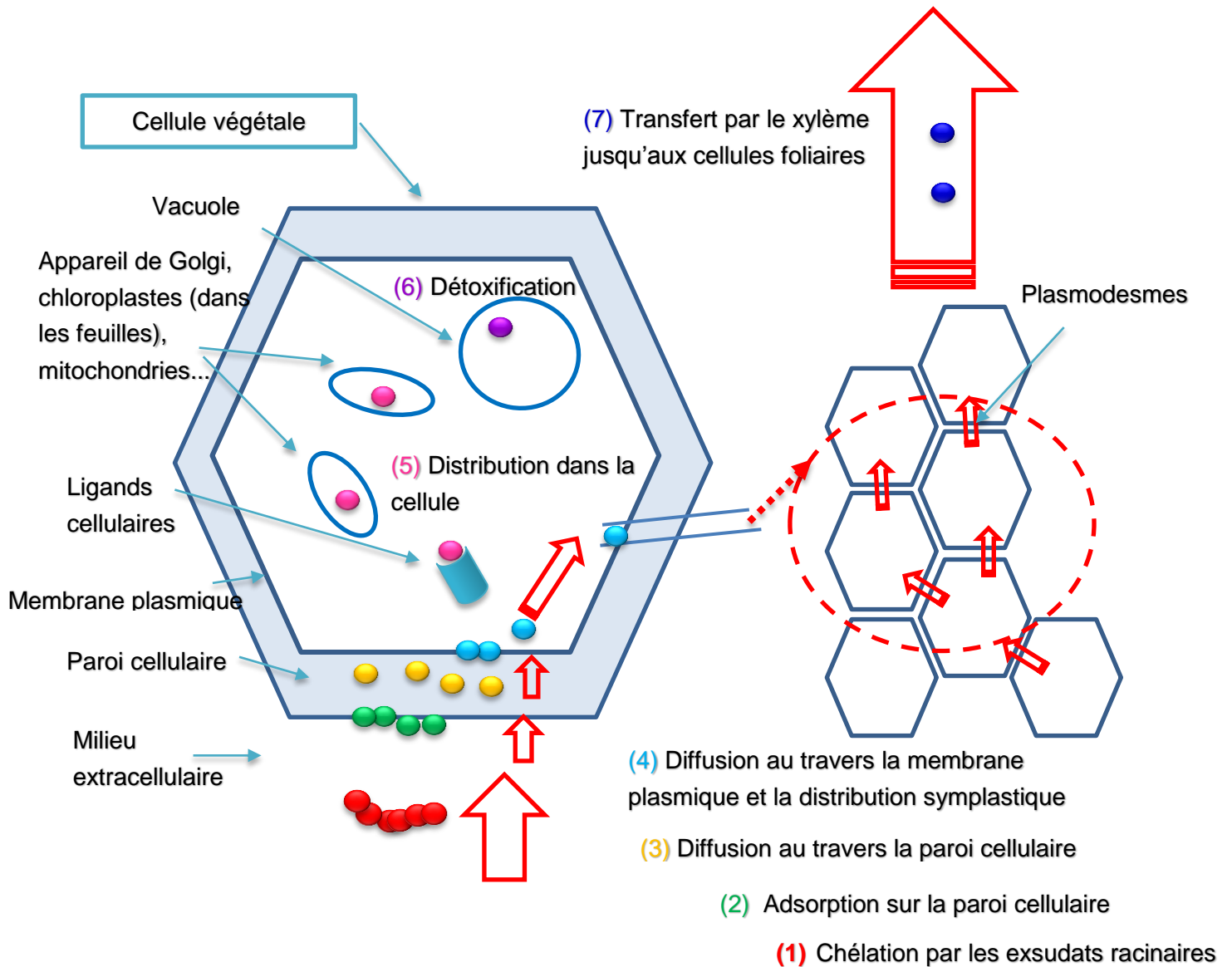


Figure 9. Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. M^{z+} = ion métallique libre ; ML = métal complexé ; L^{z-} = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^- , etc.); $M-X$ = métal complexé à la surface cellulaire (Campbell *et al.*, 2002).

Certains complexes hydrophiles chargés négativement (formés avec un métabolite de faible poids moléculaire comme le citrate, ou un ligand inorganique comme le thiosulfate) peuvent être accumulés par des transporteurs membranaires spécifiques à ces métabolites ou ces ligands inorganiques ($Cd(\text{citrate})^{-1}$, $Zn(\text{citrate})^{-1}$, $CdS_2O_3^0 \dots$) (Boily, 2004).

I.2.2. Mécanismes de bioaccumulation

Les mécanismes de bioaccumulation des métaux ou métalloïdes dans les plantes comprennent successivement : (1) la chélation dans la rhizosphère par les exsudats produits par les plantes, (2) l'adsorption sur la paroi cellulaire racinaire, puis, (3) la diffusion au travers de la paroi cellulaire. Ensuite, (4) le transport au travers de la membrane plasmique et la distribution symplastique entre les cellules, (5) la distribution dans les cellules, (6) la détoxification dans les cellules, (7) le transfert par le xylème jusqu'aux cellules foliaires (Clemens *et al.*, 2002; Parrotta *et al.*, 2015) (figure 10).



Les mécanismes de bioaccumulation des métaux ou métalloïdes dans les plantes aux niveaux racinaire et foliaire (Clemens *et al.*, 2002 ; Parrotta *et al.*, 2015).

(●●●●●●●) Métaux ou métalloïdes

Figure 10. Mécanismes de bioaccumulation des métaux et métalloïdes dans les plantes.

I.2.2.1. Exsudats racinaires

Les exsudats des racines peuvent être classés en deux types, ceux de poids moléculaire élevé HMW (par exemple le mucilage composé de polysaccharides, de l'acide polyuronique et des ecto-enzymes) et ceux de faible poids moléculaire LMW (acides organiques, sucres, phénols et divers acides aminés, y compris les acides aminés non protéiques tels que les phytosidérophores). Ces exsudats aident les plantes à absorber, accumuler, stabiliser les contaminants du milieu. Ainsi ils affectent la solubilité, la mobilité et la biodisponibilité des ions métalliques du milieu (Colzi *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2001).

Les exsudats racinaires comprennent des hydrates de carbone, des acides organiques, des acides humiques, des polypeptides, des protéines, des acides aminés et des ligands inorganiques (Cl^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , CO_3^{2-} , PO_4^{3-}) (Dong *et al.*, 2007). Ces exsudats agissent comme des ligands qui complexent les ions métalliques, tout en influençant aussi les conditions de pH et d'Eh dans la rhizosphère (Anjum *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014; Tu *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2001). Des exsudats racinaires, tels que l'histidine et le citrate peuvent complexer le Ni. Ce complexe peut s'accumuler dans les exsudats racinaires et ainsi contribuer à réduire l'absorption de Ni (Richau *et al.*, 2009).

En revanche, les exsudats libérés par les racines d'*Echinochloa crusgalli* augmentent la translocation des ions métalliques tels que le Cd, Cu et Pb des racines aux feuilles (Kim *et al.*, 2010).

Les acides organiques comme l'histidine, le malate, le citrate et la nicotianamine sont excrétés par les plantes et agissent comme chélateurs de métaux/métalloïdes (Eapen et D'souza, 2005; Kozhevnikova *et al.*, 2014; Salt *et al.*, 1995). La plupart de ces chélateurs organiques augmentent l'absorption et la translocation des contaminants dans les plantes (Revathi et Venugopal, 2013; Souza *et al.*, 2013). Par exemple, l'acide citrique réduit la toxicité du Cd par complexation dans les radis et stimule sa translocation des racines vers les cellules foliaires, en transformant le métal sous une forme plus facilement transportable et être finalement séquestré dans la vacuole.

Les plantes aquatiques absorbent et accumulent les contaminants de l'eau et des sédiments. Dans la plupart des cas, cette accumulation se fait au niveau des racines, contrairement à d'autres cas, où un transfert vers les tissus foliaires est observé.

L'absorption de contaminants dans les plantes aquatiques est facilitée par des structures spécialisées, appelées rhizo-concrétions, riches en hydroxydes de fer, présentes à la surface des racines. Ces plaques d'hydroxydes de fer limitent l'absorption des métaux à des pH de 5 à 6, mais facilitent leur absorption à des pH supérieurs à 8 (Dhir, 2013).

Le taux d'absorption, d'accumulation et de translocation des contaminants dans les plantes dépend des espèces végétales ; il est en outre contrôlé par des facteurs environnementaux tels que la température, le pH, le potentiel redox, la durée d'exposition, la teneur en contaminants dans les eaux, la vitesse d'agitation et la salinité. En effet, ces facteurs influencent la spéciation des métaux (Dhir, 2013).

Les ligands, tels que les acides organiques et les phénols libérés par le système racinaire des plantes, influencent la spéciation des contaminants, et par conséquent leur biodisponibilité (Dhir, 2013).

I.2.2.2. Adsorption

I.2.2.2.1. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est la structure la plus externe de la cellule végétale et donc la première en contact avec l'environnement. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, de cellulose, de pectine, de protéines et éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine).

La paroi est composée de trois parties essentielles : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire. La cellulose y est organisée selon une hiérarchie de structure fibrillaire. Les fibrilles de cellulose sont partiellement reliées entre elles par une matrice homogène amorphe constituée de pectines et d'hémicelluloses. Une centaine de molécules de cellulose s'organisent parallèlement entre elles en un faisceau micellaire ou fibrilles élémentaires, au sein duquel les molécules établissent entre elles des ponts d'hydrogène qui maintiennent une distance constante entre les chaînes et les stabilisent.

Les composants principaux de la paroi cellulaire contiennent des groupes fonctionnels actifs qui vont être des sites d'interaction avec les cations et anions sur la surface cellulaire. Ces sites peuvent être :

- Des groupes hydroxyles (-OH) dans la cellulose, les hémicelluloses, les pectines, les lignines, les protéines et les phosphates.
- Des groupes carboxyles (-COOH) dans les hémicelluloses, les pectines et les protéines.
- Des groupes méthyl (-CH₃) dans les hémicelluloses, les pectines et les lignines.
- Des groupes carbonyle (C=O) dans les pectines.
- Des groupes amino (-NH₂) dans les protéines.
- Des groupes hydrogènes (-H) dans les pectines.

Outre le fait d'entourer et de protéger les protoplastes végétaux, la paroi cellulaire peut être affectée par le stress nutritionnel et subir des variations de composition. Par exemple, une plante soumise à une déficience en soufre, azote et phosphore, présente des parois avec une teneur réduite en cellulose, une quantité accrue de lignine et des altérations de la méthylestérification de la pectine (plus le degré d'estérification est faible, plus la pectine est rigide) (Fernandes *et al.*, 2013).

Ainsi, un déficit en minéraux conduit à une évolution de la composition des parois et par conséquent à une évolution de l'internalisation des contaminants.

La paroi cellulaire est riche en composés, qui sont capables de complexer les métaux et métalloïdes : les polysaccharides, qui sont les composés essentiels de la paroi cellulaire, jouent un rôle essentiel dans l'adsorption des métaux et métalloïdes à la surface cellulaire. Cependant, d'autres composés tels que les protéines, les acides aminés et les phénols participent également à ce processus. Leur capacité à complexer les métaux et métalloïdes dépend du nombre de leurs groupes fonctionnels de surface (Dronnet *et al.*, 1996; Kartel *et al.*, 1999; Pelloux *et al.*, 2007).

Les métaux et métalloïdes peuvent modifier la structure physique de la paroi cellulaire en interagissant avec des molécules chargées négativement (groupes carboxyle et sulfates). Le métal/métalloïde peut diminuer la résistance de la paroi cellulaire à la pression de turgescence. De plus, le métal/métalloïde peut inhiber les activités enzymatiques dans les parois cellulaires, ce qui peut aussi réduire la résistance de la paroi cellulaire.

En outre, le métal/métalloïde peut affecter directement ou indirectement la synthèse des composants de la paroi cellulaire (Parrotta *et al.*, 2015). Des études récentes concernant différentes espèces végétales ont montré que la paroi cellulaire peut être modifiée en réponse à la présence de métaux/métalloïdes (Krzyszowska, 2011). La modification de la paroi cellulaire consiste surtout en une augmentation de la quantité de polysaccharides (en particulier les pectines). Des modifications de la formation de la paroi cellulaire ont été détectées dans des études portant sur la réponse de *Funaria hygrometrica protonemata* au Pb (Krzyszowska *et al.*, 2010, 2009). La paroi cellulaire après le traitement au Pb avait une structure et une composition différente de celle de la paroi cellulaire du témoin. L'une des différences les plus importantes était l'augmentation importante de la quantité de pectine faiblement méthylestérifiée capable de se lier aux métaux/métalloïdes, pectine qui était absente dans la paroi cellulaire du témoin (Krzyszowska *et al.*, 2010, 2009).

Ainsi, la paroi cellulaire peut jouer un rôle important dans la régulation de la diffusion des contaminants.

I.2.2.2. Affinité des cations ou d'anions pour les sites d'adsorption de la paroi cellulaire

Le premier contact au cours de l'adsorption des métaux et métalloïdes sur la paroi cellulaire se fait par interaction physico-chimique avec les groupes fonctionnels présents sur la surface des cellules végétales. Les interactions peuvent être de type électrostatique, échange d'ions ou complexation. Les composés de la paroi cellulaire sont riches en groupes fonctionnels tels que carboxyle, hydroxyle, hydrogène, sulfate, phosphate et groupes amines. Cette phase est relativement rapide et peut être réversible (Niad *et al.*, 2014)

Les mécanismes impliqués dans l'adsorption des cations et anions sur la paroi cellulaire (Sinha, 2014) sont :

- (1) La diffusion passive : les cations ou anions sont adsorbés sur la paroi cellulaire par diffusion du fait d'un gradient de concentration. L'ion diffuse à travers la paroi cellulaire jusqu'à atteindre un équilibre de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule.
- (2) L'échange d'ions : les cations de la solution externe s'échangent avec les protons adsorbés sur la paroi cellulaire. Les anions s'échangent avec les ions hydroxyle libres (OH⁻) adsorbés sur la paroi.
- (3) La complexation : il s'agit de liaisons de coordination (liaison d'un cation métallique entouré de ligands anioniques ou neutres) entre les contaminants avec les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire. Les plantes peuvent produire des acides organiques (citrique, oxalique, gluconique, lactique ou malique), qui peuvent complexer les contaminants par la formation de molécules métallo-organiques.
- (4) Les interactions électrostatiques : l'adsorption physique a lieu au travers de liaisons de type électrostatique de faible intensité, entre les ions métalliques en solution et les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire (carboxyles, phosphates...).

I.2.2.3. Absorption

Les contaminants contenus dans le milieu sont (1) premièrement adsorbés sur la paroi cellulaire, puis (2) absorbés par les cellules racinaires et (3) partiellement stockés et séquestrés dans les racines, ensuite (4) transportés dans les vaisseaux du xylème, (5) séquestrés et détoxifiés dans les vacuoles de cellules foliaires (figure 10) (Clemens *et al.*, 2002).

I.2.2.3.1. Système de transport membranaire

Il y a normalement trois mécanismes principaux impliqués dans le transport membranaire à travers la membrane plasmique à l'intérieur des cellules végétales : (1) diffusion simple, (2) diffusion facilitée et (3) transport actif. Ces trois mécanismes constituent la base de système de transport à travers les membranes de tous les organismes (Hopkins *et al.*, 2003).

I.2.2.3.1.1. Diffusion simple

La vitesse à laquelle les molécules dans le milieu diffusent de l'extérieur vers l'intérieur est fonction de la différence de concentration. La membrane plasmique étant principalement de nature lipidique, les molécules de soluté non polaires ont tendance à passer plus rapidement. Parmi les molécules utiles pour la plante, seules trois (O_2 , CO_2 , NH_3) sont absorbées par simple diffusion à travers la membrane plasmique. L'eau, malgré sa haute polarité, diffuse également rapidement à travers la membrane plasmique, parce qu'elle passe par des canaux sélectifs appelés aquaporines (Hopkins *et al.*, 2003). Ces aquaporines sont des protéines formant un canal qui facilite la diffusion de l'eau à travers les membranes, et la force qui provoque cette diffusion est la différence de potentiel hydrique (Hopkins *et al.*, 2003).

I.2.2.3.1.2. Diffusion facilitée

La membrane plasmique contient un grand nombre de protéines, dont beaucoup fonctionnent comme des protéines de transport (figure 11). La diffusion facilitée est déterminée par le gradient de concentration (pour les solutés non chargés) ou par le gradient électrochimique (pour les ions). Le transport par diffusion simple ou facilitée, est considéré comme un transport passif (Hopkins *et al.*, 2003). Ce mécanisme de transport passif est défini comme un mécanisme qui ne nécessite pas d'apport direct d'énergie métabolique provenant du gradient de concentration du soluté transporté.

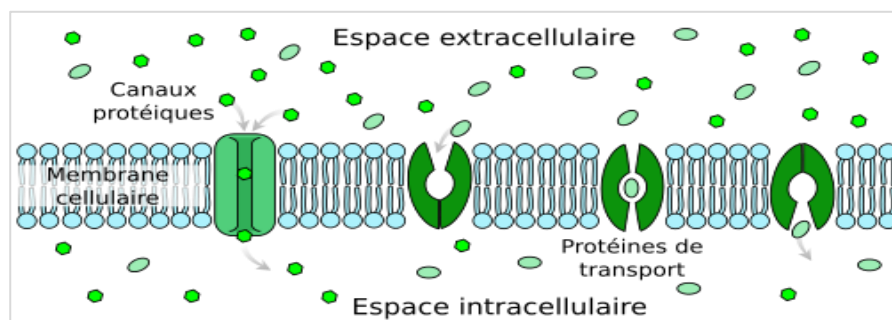


Figure 11. Schéma du mécanisme de diffusion facilitée (Hopkins *et al.*, 2003) (les ions en vert foncé sont les espèces chargées et ceux en vert clair sont les espèces non chargées).

Deux catégories de protéines de transport passif sont déterminées : les protéines pouvant véhiculer de molécules de soluté (espèces non chargées) (H_2O , glucides, acides aminés, nucléotides...), et les protéines qui transportent les molécules chargées (ions) (figure 11) (Hopkins *et al.*, 2003).

I.2.2.3.1.3. Transport actif

Le transport actif nécessite de l'énergie et il est réalisé par des protéines porteuses spécifiques ou translocases, qui lient sélectivement un substrat et le transportent à travers la membrane plasmique (Hopkins *et al.*, 2003).

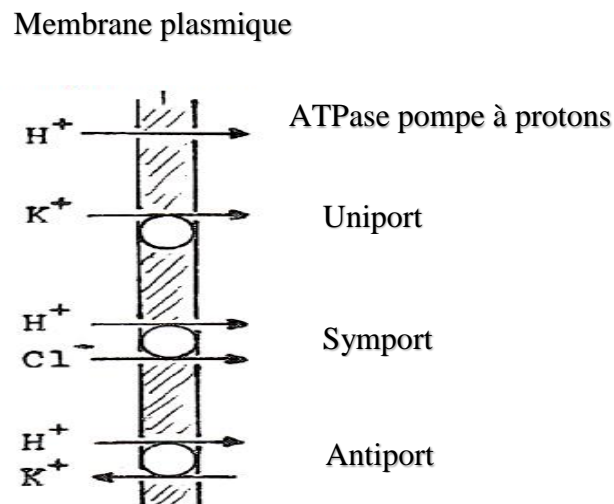


Figure 12. Schéma des mécanismes de transport actifs (Hopkins *et al.*, 2003).

Contrairement à la diffusion facilitée, le transport actif est unidirectionnel à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule, et il est toujours effectué par des protéines porteuses. La majorité des transporteurs sont spécifiques pour un nombre limité d'ions. Le transport actif aboutit à accumuler des solutés dans la cellule lorsque la teneur de soluté dans le milieu extérieur est très faible. Lorsqu'il est appliqué pour transporter du soluté à l'extérieur de la cellule, le transport actif sert à maintenir une faible teneur en soluté interne.

Le système de transport actif véhicule les solutés contre le gradient électrochimique, ils sont appelés pompes (Hopkins *et al.*, 2003).

Il existe généralement trois processus du transport actif (figure 12) :

- Système Uniport : un seul ion est transporté par un seul transporteur dans une direction. La forme spécifique de ce système est la pompe ATPase-proton.
- Système de Symport – Co-transport, permet le transport de deux ions de charges opposées, dans la même direction, en même temps par un seul transporteur.
- Système Antiport –Co-transport permet le transfert de deux ions de même charge dans des directions opposées, en même temps par un seul transporteur.

I.2.2.3.2. Transporteurs membranaires

Après avoir traversé les parois cellulaires des racines, les contaminants atteignent la membrane plasmique et pénètrent dans le cytosol par des transporteurs transmembranaires impliqués dans l'absorption des oligoéléments essentiels, tels que Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} (Clemens, 2006; Gallego *et al.*, 2012) (figure 13). Aucun transporteur spécifique pour les contaminants toxiques n'a été identifié dans les plantes jusqu'à présent. L'absorption des contaminants peut être inhibée par l'ajout des oligoéléments dans le milieu, mais elle est favorisée en cas d'une faible disponibilité des oligoéléments dans la rhizosphère (Hart *et al.*, 2002; Wojas *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2006).

La plupart des transporteurs membranaires ont été identifiés chez *A. thaliana*. Généralement, les contaminants toxiques sont en compétition avec les oligoéléments essentiels (Gallego *et al.*, 2012; Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2015)

La famille MATE (Multidrug And Toxin Efflux) est une famille de transporteurs de molécules organiques de faible poids moléculaire qui sont actifs dans la translocation des métaux et métalloïdes dans les plantes (Métal+ ligand organique). FDR3, un gène codant pour un membre de cette famille, est surexprimé dans les racines des plantes exposées aux métaux et métalloïdes (Talke *et al.*, 2006; Van de Mortel *et al.*, 2006).

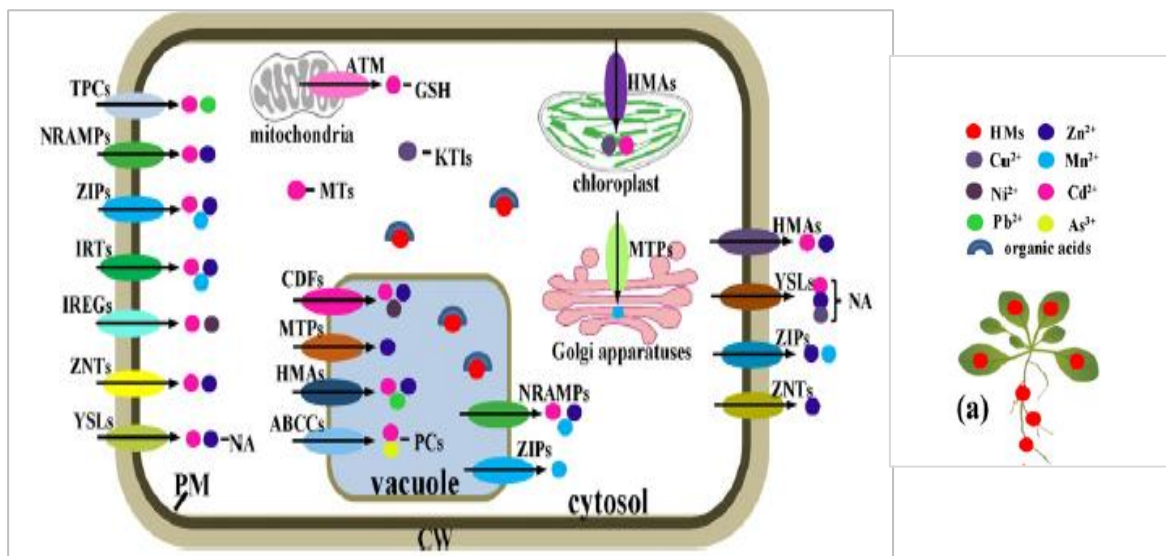


Figure 13. Modèle schématique de la cellule végétale, des transporteurs et des mécanismes d'accumulation des métaux et métalloïdes (Luo *et al.*, 2016).

Les transporteurs ZIP (ZRT, IRT-like Protein) avec ZRT (Zinc-regulated transporter) et IRT1 (iron-regulated transporter) jouent un rôle clé dans la translocation de Zn, Fe, Mn, Cd et Ni dans les plantes (Milner *et al.*, 2013; Nishida *et al.*, 2011). Les systèmes ZIP transportent passivement les métaux dans les cellules à l'aide du gradient de concentration transmembranaire en contaminants (Blaby-Haas et Merchant, 2012). Milner *et al.* (2013) ont trouvé que ZIP1 est impliqué dans la remobilisation du Mn vacuolaire au cytosol dans les cellules racinaires, alors que ZIP2 intervient dans le mouvement de Mn et / ou Zn vers le système vasculaire de la racine chez *A. thaliana*. De plus, les transporteurs tels que ZIP1,

ZIP2, ZIP3 et ITR1, sont également des transporteurs essentiels impliqués dans l'absorption des métaux et métalloïdes toxiques dans les racines des plantes (Eapen et D'souza, 2005; Migeon *et al.*, 2010).

La plupart des membres des CDF (Cation Diffusion Facilitator) sont localisés au niveau du tonoplaste (membrane de la vacuole) et agissent comme des anti-transporteurs de Zn^{2+} / H^+ , Cd^{2+} / H^+ et Ni^{2+} / H^+ (Ovečka et Takáč, 2014). Les CDF sont également appelés protéines à tolérance métallique (MTP). Les systèmes CDF peuvent exporter les métaux/métalloïdes des cellules en couplant l'exportation de métaux/métalloïdes à l'internalisation du potassium ou de protons par des systèmes de transport qui utilisent le potentiel électrique membranaire comme force motrice (système antiport). AtMTP11 (un membre des CDF) est localisé dans l'appareil de Golgi, fonctionne comme un anti-transporteur Zn^{2+}/H^+ transportant le Zn^{2+} cytosolique dans les vacuoles chez *Arabidopsis* (Kawachi *et al.*, 2008).

Les membres des NRAMP (Natural resistance-associated macrophage proteins) sont des protéines membranaires qui fonctionnent comme des transporteurs pour les métaux et métalloïdes, notamment Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} (Migeon *et al.*, 2010; Ovečka et Takáč, 2014). Dans les racines et les feuilles d'*A. thaliana*, AtNRAMP3 et AtNRAMP4 sont localisés au niveau de la membrane vacuolaire. AtNRAMP3 transporte Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} et Cd^{2+} , et AtNRAMP4 fonctionne comme transporteur de Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} (Lanquar *et al.*, 2010; Oomen *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009).

Les ATPases (HMA) de la famille des P-type ATPase de type 1B (Axelsen et Palmgren, 2001) dans les plantes sont impliqués dans le transport de divers métaux, y compris Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+} (Bernal *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2004; Wong et Cobbett, 2009). Les systèmes P-type ATPase sont des transporteurs actifs qui utilisent directement l'ATP comme source d'énergie. Seigneurin-Berny *et al.* (2006) ont constaté que chez *A. thaliana*, HMA1 est localisé à la membrane de l'enveloppe interne du chloroplaste et transporte Cu^{2+} vers le stroma. En outre, AtHMA4 est localisé dans la membrane plasmique transportant le Zn^{2+}/Cd^{2+} cytoplasmique vers les vaisseaux du xylème, afin de favoriser la translocation de ces métaux des racines vers les feuilles (Hussain *et al.*, 2004; Verret *et al.*, 2004).

Les transporteurs de la cassette de liaison à l'ATP (ABC) participent au transport de diverses molécules à travers les membranes des cellules végétales (Verrier *et al.*, 2008), en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Certains transporteurs ABC sont impliqués dans la translocation de chélateurs de métaux cytoplasmiques vers des vacuoles pour la séquestration et la détoxification (Brunetti *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2010). Park *et al.* (2012) ont démontré que les deux transporteurs AtABCC1 et AtABCC2 sont localisés au niveau de la membrane du tonoplaste et sont impliqués dans le transport des complexes de Cd-PC (phytochélatines- Cd) du cytoplasme vers les vacuoles. Brunetti *et al.* (2015) ont montré que AtABCC3 peut également agir comme transporteur de chélateurs de Cd-PC et que son activité était simultanée avec les activités de AtABCC1 / AtABCC2.

Les transporteurs de la famille CAX (calcium exchanger) sont des antiports cation/ H^+ ou cation/ Na^+ qui échangent H^+ ou Na^+ contre des cations tels que Cd^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+} . Ils ont un rôle important dans la séquestration vacuolaire des métaux qui existent en excès dans le cytoplasme (Clemens, 2006). La surexpression de CAX2 a induit une forte augmentation (trois fois) de la teneur en Cd au niveau racinaire chez des plantes de tabac (Hirschi *et al.*, 2000).

I.2.2.3.3. Transduction des signaux

La membrane cellulaire végétale participe à la transmission de signaux exogènes déclenchés par des facteurs abiotiques (froid, sécheresse, stress métalliques, stress hydrique) (Humphrey *et al.*, 2007). Plusieurs récepteurs tels que les MAP kinases (mitogen-activated protein kinase) ont été étudiés. Ces protéines contiennent une sérine thréonine kinase cytoplasmique, présente dans la région transmembranaire de la paroi cellulaire, jouant un rôle particulièrement important dans la transmission des signaux environnementaux chez les plantes (Cristina *et al.*, 2010 ; Opdenakker *et al.*, 2012).

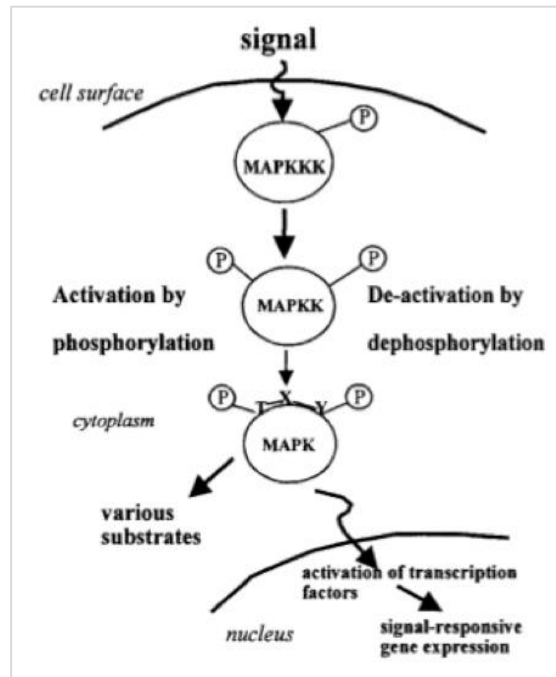


Figure 14. Schéma représentatif d'une cascade MAPK incluant MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MAPKK) et MAP kinase (MAPK). (P) représente la phosphorylation. (T) se réfère aux résidus thréonine, tandis que (Y) se réfère aux résidus tyrosine (George, 2014).

L'activation des MAP kinases par phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine du motif TXY (figure 14) ne se limite pas à la réponse aux facteurs de croissance, mais elle s'étend à une multitude de signaux extracellulaires (stress métallique par exemple, en relation avec la production d' H_2O_2 et des EROs). De ce fait, les MAPK ont été renommées Protéine kinase extra-cellulaire (Jonak *et al.*, 2004; Mittler, 2002; Pitzschke et Hirt, 2006; Sinha *et al.*, 2011; Yeh *et al.*, 2004).

I.2.2.3.4. Séquestration dans la vacuole des cellules racinaires

La séquestration peut avoir lieu au niveau de la paroi cellulaire (adsorption) et dans les compartiments cellulaires, c'est-à-dire la vacuole (Ovečka et Takáč, 2014). Les parois des cellules racinaires peuvent réduire l'entrée du métal dans le cytoplasme et limiter ainsi l'absorption des contaminants dans la plante.

La vacuole joue un rôle essentiel dans le stockage et la détoxification des métaux/métalloïdes (Hall, 2002) (figure 15). En effet, elle occupe un volume important et participe moins aux réactions métaboliques en comparaison avec d'autres organelles cellulaires (Ovečka et Takáč, 2014). Ainsi, à l'entrée dans le cytosol, certains métaux/métalloïdes sont immédiatement séquestrés dans les vacuoles (Küpfer *et al.*, 2000; Leitenmaier et Küpfer, 2013; Van Belleghem *et al.*, 2007).

Les métaux et métalloïdes sont présents dans la vacuole sous forme complexée avec des ligands de faible poids moléculaire (LMW) ou de poids moléculaire élevé (HMW) (Gallego *et al.*, 2012; Huguet *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014). Dans le cytosol, les ligands présents sont le glutathione (GSH), les phytochélatines (PC) ou les métallothionéines (MT) (Pal et Rai, 2010; Song *et al.*, 2014). En milieu acide, les complexes HMW peuvent être dissociés dans la vacuole et les ions métalliques libérés peuvent être complexés par des acides organiques, tels que le citrate, l'oxalate et le malate, et des acides aminés (Choppala *et al.*, 2014).

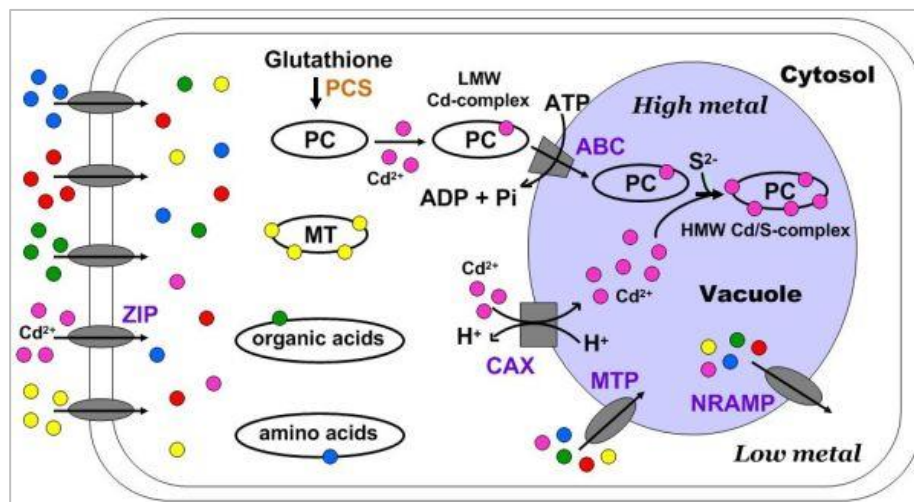


Figure 15. Séquestration vacuolaire des métaux/métalloïdes (Cd) dans les cellules végétales source : (Yang et Chu, 2011).

La chélation cytoplasmique des métaux/métalloïdes par divers chélateurs (le GSH, les PC, les MTs, les acides organiques, les acides aminés et les composés phénoliques) est un processus de détoxification, qui peut réduire le contact direct des métaux et métalloïdes avec les enzymes et les composés métaboliques, empêchant ainsi l'inactivation des enzymes et des réactions métaboliques.

1.2.2.3.5. Homéostasie cellulaire des contaminants

Les plantes absorbent les contaminants du milieu, et à l'échelle des cellules, il y a transport vers le cytoplasme et des compartiments subcellulaires spécifiques, tels que le noyau, les mitochondries et les chloroplastes, tandis que les vacuoles servent de réservoir pour réguler l'équilibre ionique cellulaire. Le transport des métaux est assuré par un ensemble de protéines membranaires.

Pour limiter l'internalisation des métaux et métalloïdes, les plantes utilisent différents agents chélateurs, tels que la phytochélatine, la nicotianamine (NA), l'acide désoxymuginique (DMA), le citrate, l'ascorbate et les composés phénoliques. Ces complexes permettent de limiter la

biodisponibilité des métaux et métalloïdes et de protéger ainsi les cellules contre les dommages oxydatifs associés (Bashir *et al.*, 2016; Grillet *et al.*, 2014; Jeong et Guerinot, 2009).

Les transporteurs appartenant à diverses familles de protéines déjà décrites (cf.1.2.2.3.2) participent à la régulation de l'homéostasie cellulaire des métaux, cela correspond aux transporteurs des Yellow Stripe-like (YSL), ZIP, NRAMP, CDF, HMA, les CAX...(Boutigny *et al.*, 2014; Finazzi *et al.*, 2015).

Ces transporteurs peuvent exporter les contaminants à l'extérieur de la cellule (ce qui peut être en relation avec les phénomènes d'efflux des contaminants). Un grand nombre de ces transporteurs a été caractérisé chez *A. thaliana*. Ils sont localisés dans la membrane plasmique et appartiennent au groupe des ATP-ases CPx (Mills *et al.*, 2005; Williams et Mills, 2005).

I.2.2.3.6. Translocation par le xylème

Suite à l'absorption des métaux, leur transport des ions continue par le symplasma. Après avoir été absorbé par la membrane plasmique des cellules racinaires, l'ion diffuse très rapidement d'une cellule à une autre via les plasmodesmes (qui laissent passer des molécules jusqu'à 800 Da). Pour accéder aux vaisseaux de xylème qui véhiculent la sève brute, l'ion traverse à nouveau la membrane plasmique pour arriver à un vaisseau de xylème (Hopkins *et al.*, 2003).

La circulation dans la plante des ions cationiques ou anioniques implique trois types de transport (Hopkins *et al.*, 2003) :

- La diffusion dans l'apoplasme ou le symplasma à l'échelle d'un tissu ou d'un organe.
- Le transport à long distance (entre organe ex : racine et feuilles) par le flux de sève.
- La traversée de membranes plasmiques à chaque étape d'entrée et de sorties de ces voies.

Tout le long de ce trajet, des ions et des molécules en provenance des cellules avoisinantes rejoignent la sève, probablement par un transport actif ou à l'aide d'un transporteur, alors que d'autres molécules quittent la sève brute pour aller au phloème et entrer dans les cellules foliaires (Hopkins *et al.*, 2003).

I.2.2.3.7. Adsorption/absorption par la surface foliaire

Dans les plantes aquatiques submergées, les feuilles sont le principal site d'adsorption/absorption des métaux. L'adsorption foliaire des métaux se produit par un mouvement passif à travers la cuticule (normalement très fine ou absente chez les plantes aquatiques). Les charges négatives des polymères de la pectine et de la cutine d'une part et de l'acide polygalacturonique des parois cellulaires d'autre part, favorisent l'adsorption des cations (Dhir, 2013)

Ainsi, le mécanisme d'absorption des métaux dans les plantes submergées implique (Dhir, 2013) :

- Tout d'abord une pénétration passive des cations dans l'espace libre apparent (ELS), puis une adsorption sur la paroi cellulaire.
- Ensuite, une absorption active des cations dans le cytoplasme à travers la membrane plasmique.

-Enfin, une détoxification et un stockage actif des cations dans les vacuoles du cytoplasme.

Les métaux et métalloïdes peuvent atteindre les cellules foliaires soit par les mécanismes d'adsorption et d'absorption au niveau racinaire (cf. 1.2.2.2 et 1.2.2.3), soit par adsorption puis absorption directement au niveau des cellules foliaires (pour les plantes aquatiques immergées).

1.2.2.3.8. Absorption de l'arsenic

L'arsenic est un métalloïde, qui se trouve principalement sous forme inorganique dans les eaux, l'arséniate étant prédominant en condition oxydante (eaux de surface) et l'arsénite en condition réductrice (eaux souterraines). L'arséniate peut être absorbé par les plantes en raison de ses propriétés voisines de celles des phosphates, qui sont un nutriment essentiel pour les plantes (Dhir, 2013).

Les racines des plantes absorbent l'arsénite du fait de sa neutralité $\text{As}(\text{OH})_3$ (espèce non chargée). L'arséniate est absorbé par les racines des plantes via des transporteurs de phosphates.

Le mécanisme d'absorption et d'accumulation des ions arséniate, étant chargés négativement dans les conditions de pH des eaux de surface, diffère de celui des cations métalliques. Dans le contexte de cette étude, l'origine de l'arsenic est liée à la géochimie du bassin versant étudié, alors que l'origine des métaux est liée aux activités anthropiques.

L'arsénite, pénètre dans les racines des plantes par l'intermédiaire de protéines intrinsèques de type noduline 26-Like (NIPs) (Wallace *et al.*, 2006). Les NIPs sont une sous-famille des protéines intrinsèques majeures (MIP) de la plante, généralement appelées aquaporines ou canaux d'eau (Maurel *et al.*, 2008). Dans la plupart des plantes, l'arsénite est la forme principale transportée dans la sève brute du xylème. La dominance de l'arsénite dans les tissus végétaux met en évidence la réduction des arséniate, qui est la forme prédominante dans le milieu (Dhir, 2013). L'arsénite est détoxifié par complexation avec des peptides riches en thiol et séquestré dans les vacuoles des plantes. L'arsenic est un inducteur puissant de la synthèse de PCs (phytochélatines).

Un certain nombre de gènes ou d'enzymes impliqués dans la synthèse, le métabolisme et le transport du glutathion sont régulés positivement à l'exposition à l'arséniate, reflétant ainsi une demande plus élevée de GSH sous le stress d'arséniate.

Les complexes PC-arsénite sont susceptibles d'être stockés dans les vacuoles. Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) confèrent une résistance à l'arsénite en le transportant de façon conjuguée au glutathion-S dans la vacuole (Zhao *et al.*, 2010).

Les mécanismes d'interaction entre les métaux et métalloïdes avec les plantes sont largement présentés dans la littérature (Ahmad, 2016; Clemens, 2006; Jalmi et al., 2018; Krzesłowska, 2011; Meharg, 2005; Parrotta *et al.*, 2015; Tiwari et Lata, 2018). Cependant, ces études sont généralement menées en laboratoire et peu de travaux sont effectués *in situ*. Par ailleurs, les macrophytes aquatiques submergés sont peu étudiés, et en particulier *Myriophyllum alterniflorum*.

Par conséquent, une étude plus approfondie de ce macrophyte submergé semble intéressante, considérant les avantages de cette plante (facilité de manipulation, reproduction...) pour son déploiement dans les milieux naturels et son intérêt comme outil de biosurveillance de la qualité des eaux (aptitude à accumuler les contaminants et réponse des biomarqueurs).

I.2.2.4. Facteurs influençant la bioaccumulation des métaux et métalloïdes

Les macrophytes aquatiques peuvent être utiles pour réduire les concentrations de métaux dans les eaux de surface, car ils peuvent accumuler de grandes quantités des métaux dans leurs tissus (Cardwell *et al.*, 2002; Miretzky *et al.*, 2004; Mishra et Tripathi, 2008; Rai *et al.*, 1995; Vardanyan et Ingole, 2006). L'absorption des métaux et métalloïdes par les macrophytes aquatiques dépend de facteurs abiotiques comme la durée d'exposition, la température, la salinité, la lumière, les teneurs en nutriments ... et un ensemble des facteurs biotiques tels que l'âge, le sexe et la taille de la plante... (Dibong et Ndjouondo, 2014).

I.2.2.4.1. La durée d'exposition

Pour l'ensemble des études effectuées, *in vitro* ou *in situ*, la durée d'exposition des plantes aux contaminants influence leur niveau d'accumulation. Ainsi, il est important de considérer l'effet de ce paramètre, pour pouvoir définir une gamme de durée d'exposition optimale afin d'évaluer la qualité d'un milieu aquatique.

Cependant, cette influence n'est pas la même pour toutes les plantes ; elle dépend à la fois de l'espèce et de la concentration des métaux et métalloïdes. Normalement, l'absorption des contaminants augmente avec l'augmentation de leurs teneurs dans l'eau. Au contraire, lorsque les teneurs en contaminants deviennent très élevées dans l'eau, au cours du temps il peut y avoir une réduction de l'absorption des contaminants, par diminution de leurs teneurs dans les tissus de la plante par mécanismes d'efflux. Considérant les résultats de la littérature qui illustrent les durées d'exposition des plantes dans les études de biosurveillance de la qualité des milieux aquatiques (cf. annexe 5, tableau 30), différents modèles d'évolution de la teneur en contaminant dans les plantes aquatiques (Arán *et al.*, 2017; Bokhari *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Delmail *et al.*, 2011; Harguinteguy *et al.*, 2013) :

(E1) Pas d'évolution de la teneur en contaminant dans la plante au cours du temps.

(E2) Augmentation croissante de la teneur en contaminant dans la plante au cours du temps.

(E3) Augmentation de la teneur en contaminant dans la plante, puis stabilisation (deux phases).

(E4) Augmentation de la teneur en contaminant dans la plante au cours du temps, puis diminution (deux phases).

Quand la concentration en contaminants dans le milieu est très faible, l'accumulation est également très faible et la durée d'exposition n'a pas d'impact sur l'évolution des teneurs en contaminants dans la plante (E1).

L'accumulation régulière de contaminant dans la plante est généralement observée avec les éléments essentiels ou non essentiels et des concentrations assez faibles (E2). La durée d'accumulation est généralement plus importante avec les éléments essentiels tels que le Cu (30 jours), le Mn (30 jours) et le Ni (21 jours) qu'avec les éléments non essentiels (Cd (14 jours), et Pb (14 jours)).

Ces études montrent que pour des teneurs des contaminants élevées dans le milieu, la durée pour atteindre l'accumulation maximale dans les plantes diminue (E3 ou E4).

L'accumulation des contaminants par les plantes évolue donc en fonction de la durée d'exposition. Celle-ci est conditionnée par la mise en place des mécanismes pour contrôler les teneurs des contaminants dans la plante par des mécanismes de défense (réduction d'absorption, chélation dans les cellules et séquestration, efflux des contaminants à l'extérieur...) au stress oxydatif, généré par les métaux/métalloïdes non essentiels et l'excès des métaux essentiels (E3 et E4).

L'efflux des contaminants accumulés dans les tissus des plantes vers l'extérieur, est généralement observé pour des durées d'exposition de plus de trente jours. Ces phénomènes d'efflux peuvent être observés directement après une phase d'accumulation (E4) ou suite à une stabilisation de la teneur en contaminant accumulée.

1.2.2.4.2. La température de l'eau

La température de l'eau est un facteur qui influence le métabolisme et la croissance des plantes, ainsi que l'absorption des métaux par les macrophytes. Un effet direct et important de la température sur les macrophytes aquatiques concerne le taux de croissance, où l'augmentation de la température entraîne l'augmentation de la production de biomasse (Rooney et Kalf, 2000).

La diminution de la température modifie la composition de la membrane plasmique, ce qui modifie la fluidité de la membrane, entraîne une diminution de la perméabilité membranaire et par suite une diminution de l'absorption des métaux et métalloïdes par les macrophytes (Lynch et Steponkus, 1987; Uemura *et al.*, 1995). En outre, l'augmentation de la température augmente la synthèse des protéines, et cela peut engendrer une absorption plus élevée des métaux par la plante (Orcutt, 2000).

L'explication la plus connue sur l'effet de la température sur l'absorption des métaux est que la température croissante va stimuler le métabolisme et la production de la biomasse et par suite une augmentation de la surface d'absorption de la plante et de l'accumulation des métaux dans la plante. A la période de croissance printanière des plantes, les macrophytes aquatiques se caractérisent par une absorption rapide de nutriments et des oligoéléments (Duman *et al.*, 2006).

A l'inverse, Villares *et al.* (2002) ont montré que l'accumulation des contaminants (Cr, Cu, Mn, Ni, Zn) dans deux algues *Ulva rigida* et *Enteromorpha intestinalis*, était plus élevée en automne (température faible) que durant l'été. Ils ont suggéré que cela était dû à un effet de dilution du

fait de la distribution des contaminants dans une quantité de biomasse plus importante (croissance printanière et conséquence de températures plus élevées).

I.2.2.4.3. Nutriments

Plusieurs études ont montré que l'augmentation des teneurs en nutriments, en particulier en nitrates et phosphates peut entraîner l'augmentation de l'absorption des métaux par la plante.

L'enrichissement des nutriments dans l'eau a entraîné l'augmentation de l'accumulation du cadmium chez l'algue verte *Ulva fasciata* (Lee et Wang, 2001). De même pour le macrophyte aquatique *Ipomoea*, cultivé en Asie dans les eaux douces, l'absorption du cadmium et du plomb est accrue à la suite de l'augmentation de l'apport de nutriments (Göthberg *et al.*, 2004).

Deux mécanismes peuvent expliquer l'effet des nitrates sur l'accumulation des métaux dans la plante : la synthèse de ligands protéiques, qui contiennent des groupes fonctionnels amine ($-NH_2$), stimulée directement par l'augmentation des teneurs en nitrate, ou la synthèse des ligands qui contiennent des groupes carboxyles ($-COOH$) ou carbonyles ($-CHO$), stimulée indirectement par l'amélioration de la photosynthèse liée à l'augmentation des teneurs en nitrates (Lee et Wang, 2001).

L'augmentation des teneurs en nitrates augmente le taux de croissance de la plante ce qui facilite l'accumulation des métaux. En effet, lorsque la croissance de la plante est plus rapide, une augmentation de l'absorption des métaux surtout les oligoéléments a lieu (Lee et Wang, 2001).

I.2.2.4.4. Effet des phosphates sur l'absorption de l'arsenic par la plante

Etant donné la similarité d'un point de vue chimique entre les ions arséniate et phosphates, un effet de compétition existe dans l'absorption de l'arsenic et des phosphates par les plantes.

Après cinq jours d'incubation à différentes concentrations de phosphates dans l'eau, l'accumulation de l'arsenic par la plante aquatique *S. natans* L était de $0,24 \mu\text{molAs.g}^{-1}$ MS dans un milieu pauvre en phosphate ($0 \mu\text{molP/L}$) alors qu'il était réduit à $0,14 \mu\text{molAs.g}^{-1}$ MS dans un milieu riche en phosphate ($100 \mu\text{molP/L}$) ($r = -0,662$; $p < 0,05$) (Rahman *et al.*, 2008). Mkandawire et Dudel (2005) ont montré que l'absorption d'arsenic chez *L. gibba* L. a diminué de 32 à 28%, lorsque la concentration en phosphates augmentait de $0,014$ à $421 \mu\text{mol/L}$. Rahman *et al.* (2008) ont également démontré l'effet de compétition entre l'absorption des arséniate et des phosphates dans les plantes. Chez *Spirodela polyrhiza* L., lorsque les teneurs en phosphates dans le milieu de culture augmentent de $0,02$ à $500 \mu\text{mol/L}$ avec une concentration constante d'arséniate de $4 \mu\text{mol/L}$, l'accumulation d'arsenic dans le *S. polyrhiza* L. a diminué de 68% (Rahman *et al.*, 2008).

Etant donnée l'influence de ces facteurs sur l'accumulation des métaux et métalloïdes dans les plantes, et celle de la durée, l'évaluation de la qualité des eaux au travers de l'accumulation des contaminants dans les plantes devra être considérée avec précaution. Le recours à l'utilisation des biomarqueurs des macrophytes pourrait permettre d'éviter ces biais et une meilleure évaluation de la qualité des eaux.

I.2.3. Effets des contaminants sur la plante

Les métaux et métalloïdes génèrent un stress oxydatif entraînant notamment la production de peroxyde d'hydrogène et des espèces réactives de l'oxygène EROs. Ces EROs vont induire une lipoperoxidation des membranes, une augmentation des teneurs en proline libre, une diminution du potentiel osmotique et une réduction de l'activité nitrate réductase à la suite d'altérations de la photosynthèse.

Par conséquent, ces effets vont induire une réduction des teneurs en pigments chlorophylliens, et une inhibition des activités enzymatiques et non enzymatiques dans les chloroplastes (notamment le cycle de Calvin et le transport des électrons), ainsi qu'au niveau du cycle de Krebs dans la mitochondrie (Stoeva *et al.*, 2005). Afin de réduire l'impact des métaux et métalloïdes sur les cellules, des molécules complexant ces contaminants peuvent être produites par les macrophytes afin de les inactiver en les stockant au niveau des vacuoles notamment : ces molécules sont les phytochélatines (Pal et Rai, 2010). En réponse à ces altérations, une augmentation de l'activité des enzymes du système de défense antioxydant est également observée (figure 16).

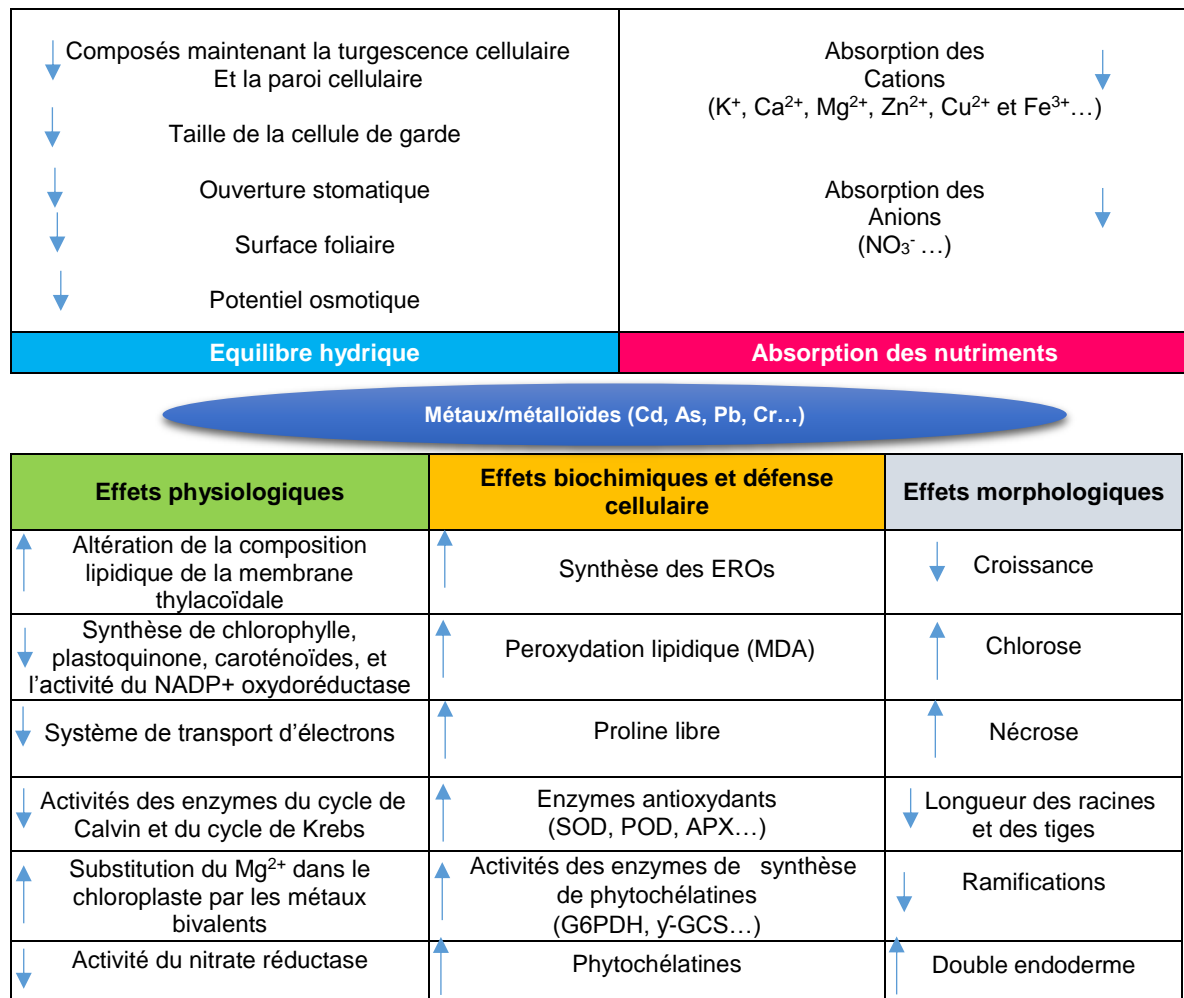


Figure 16. Présentation des effets des polluants sur les plantes à différents niveaux : morphologiques, physiologiques et métaboliques. (↓) : Diminution ; (↑) : Augmentation (Farid *et al.*, 2013; Fernandes et Henriques, 1991; Hussain *et al.*, 2013).

I.3. Les biomarqueurs

Etant donné l'impact des contaminants sur les biomarqueurs, la réponse de ces derniers peut être intéressante pour l'évaluation de la qualité des eaux (figure 17).

Il faudra cependant définir la nature des biomarqueurs les plus pertinents, en fonction des contextes. Il sera également nécessaire de déterminer les facteurs qui influencent leur réponse.

L'impact des activités urbaines et industrielles sur le métabolisme, la physiologie et la morphologie des plantes (en particulier les algues et les macrophytes aquatiques) a été étudié dans plusieurs travaux, en testant les réponses de plusieurs biomarqueurs biochimiques (cf. annexe 6, tableaux 31-33), tel que le MDA, le peroxyde d'hydrogène, les enzymes antioxydants, la proline libre... D'autres biomarqueurs physiologiques sont étudiés comme l'activité photosynthétique et la respiration, le potentiel osmotique, les teneurs en pigments chlorophylliens, et des biomarqueurs morphologiques tels que les ramifications, la croissance, les longueurs des racines... (cf. annexe 6, tableaux 31-33), et enfin des biomarqueurs histologiques et moléculaires comme les micronoyaux, les dommages de l'ADN et l'expression des gènes...

Les plantes ont un système antioxydant qui constitue un système de défense pour maintenir l'équilibre métabolique dans la plante. Dans des conditions normales, les EROs et d'autres oxydants sont contrôlés par le système de défense antioxydant, qui est composé d'enzymes (CAT, POX et SOD), des métabolites cellulaires (proline...) et des chélateurs (phytochélatines, tocophérol, ascorbate ...). Cependant, lors d'un stress métallique, cet équilibre métabolique est perturbé, une augmentation de l'accumulation des EROs est provoquée générant ainsi une réponse spécifique au stress oxydatif (figure 17).

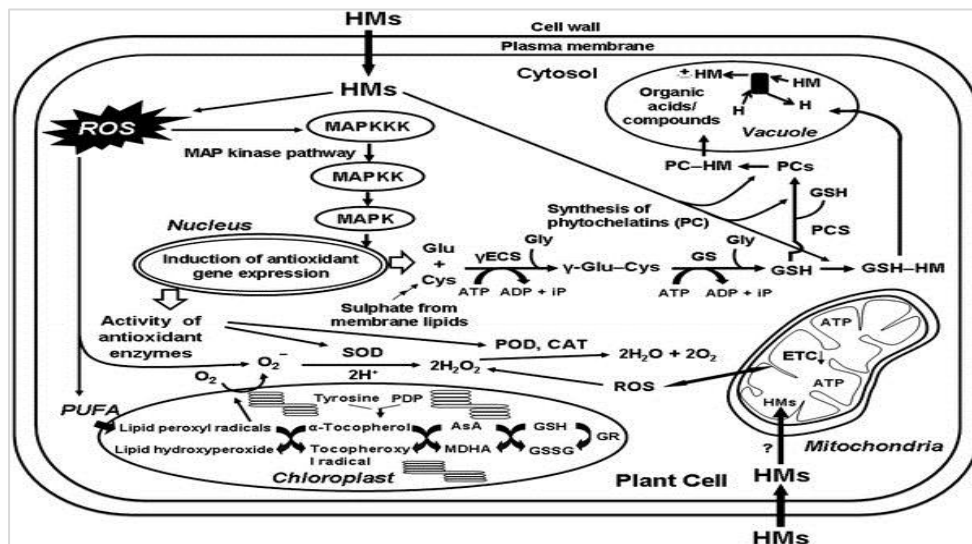


Figure 17. Stress oxydatif induit par les métaux, mécanismes de tolérance et de désintoxication dans la cellule végétale (Syta *et al.*, 2013).

Cette réponse commence par la transmission des signaux auprès des protéines MAP kinases, suivie par la peroxydation des lipides membranaires, des perturbations de l'équilibre hydrique,

la réduction des mécanismes photosynthétiques et respiratoires et des altérations morphologiques. Ces perturbations du fonctionnement cellulaire induisent la mise en place de systèmes de défense antioxydants, avec l'activation des enzymes antioxydants et des métabolites cellulaires, favorisant ainsi la séquestration des contaminants au niveau des vacuoles, et limitant par conséquent l'effet des contaminants dans les cellules végétales (figure 17).

I.3.1. Biomarqueurs morphologiques

L'excès de métaux et métalloïdes (cuivre, zinc, cadmium, chrome, plomb, nickel et arsenic) dans les plantes conduit à l'inhibition de leur croissance.

Les symptômes de chlorose et de nécrose, la diminution de la longueur de la tige principale, du système racinaire et des ramifications sont des biomarqueurs morphologiques pour l'identification des effets phytotoxiques des contaminants dans les plantes (Delmail *et al.*, 2011; Krayem *et al.*, 2016). Arán *et al.* (2017) ont observé que tous les paramètres morphologiques mesurés reflètent des différences entre les plantes exposées ou non aux métaux ; les durées d'exposition ont également un impact sur la morphologie des macrophytes. Suite à l'exposition de *L. laevigatum* à différentes concentrations de Cr, Ni, Pb et Zn, Arán *et al.* (2017) ont observé une diminution de la taille des racines avec l'augmentation des concentrations (1 à 1000 µg/L).

Ces biomarqueurs morphologiques sont faciles à observer en laboratoire mais moins dans le cadre d'études *in situ* (en raison des conditions hydrodynamiques qui s'ajoutent rendant l'observation de ces biomarqueurs difficile). Par ailleurs, ils ne sont pas spécifiques des polluants métalliques.

I.3.2. Biomarqueurs physiologiques

Les pigments chlorophylliens et le potentiel osmotique, constituent des biomarqueurs physiologiques essentiels des plantes.

I.3.2.1. Pigments chlorophylliens

La photosynthèse est un phénomène biologique essentiel chez les espèces chlorophylliennes aquatiques. Elle se déroule en deux phases : lors de la première, les réactions photochimiques dépendantes de la lumière captent l'énergie lumineuse et l'utilisent pour produire un coenzyme réduit, le NADPH, et un coenzyme qui stocke l'énergie chimique, l'ATP. Lors de la seconde phase, des réactions biochimiques indépendantes de la lumière entraînent la formation de glucides à partir du CO₂ fixé pendant le cycle de Calvin.

Un photosystème est constitué d'associations de protéines et de pigments portant une antenne collectrice de lumière et un centre réactionnel (impliqués dans la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique via le transport d'électrons). Il existe deux types de photosystèmes : I et II. Les deux photosystèmes interviennent dans la phase photochimique de la photosynthèse et dans le transport des électrons. En outre, le photosystème II est le premier à intervenir dans le phénomène de la photosynthèse.

La chlorophylle est un élément essentiel pour l'activité photosynthétique, qui permet aux plantes de convertir le dioxyde de carbone et l'eau en présence de l'énergie du soleil pour produire des glucides.

Prasad *et al.* (2001) a lié la baisse de la teneur en chlorophylle induite par les contaminants à des dommages structurels et fonctionnels dans le chloroplaste. Les métaux divalents (Cu, Ni, Cd, Zn, Pb...) peuvent se substituer à l'ion magnésium dans la molécule de chlorophylle, induisant ensuite une diminution de l'activité photosynthétique. En outre, les contaminants peuvent induire un stress oxydatif, qui inhibe la biosynthèse de la chlorophylle (Ferrat *et al.*, 2003). De plus, la fonctionnalité des membranes est altérée par les contaminants du fait d'une part de l'augmentation de la peroxydation lipidique (Rucińska-Sobkowiak, 2010), qui provoque des perturbations au niveau des chloroplastes, inhibant alors la biosynthèse des pigments chlorophylliens (chlorophylles a et b), et d'autre part en réduisant l'activité des enzymes impliquées dans la fixation du CO₂ (De Filippis, 1979; Stobart *et al.*, 1985).

La destruction des pigments photosynthétiques par les contaminants pourrait être due à (i) une altération de la chaîne de transport des électrons, (ii) une inhibition des enzymes importants telles que le δ-aminolevulinic acid déshydratase (ALA- déshydratase) et le protochlorophyllide reductase dans les processus de biosynthèse de la chlorophylle (Assche et Clijsters, 1990), ou (iii) la peroxydation lipidique de la membrane chloroplastique par les EROs (Sandalio *et al.*, 2001).

Les métaux comme le zinc, le cuivre, le chrome et le cadmium peuvent réduire, voire empêcher, la synthèse des pigments chlorophylliens au-delà de certaines concentrations (Appenroth *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2007).

Les pigments chlorophylliens sont le centre de l'énergie du métabolisme des plantes et par conséquent, toute modification significative de leurs niveaux est susceptible de provoquer un effet remarquable sur l'ensemble du métabolisme de la plante. La réduction de la croissance enregistrée dans l'étude de Radić *et al.* (2010) peut être due en partie à la diminution des teneurs en pigments chlorophylliens générée par les contaminants présents dans l'effluent industriel.

Les contaminants peuvent aussi entraîner l'altération de la chaîne de transfert d'électrons dans les chloroplastes produisant ainsi la production du radical O₂⁻, et la réduction de l'activité du photosystème II (Chugh et Sawhney, 1999).

Des corrélations inverses sont observées entre les concentrations en métaux dans les plantes et le contenu pigmentaire en chlorophylle, ainsi qu'une induction de la chlorose chez les plantes stressées (Padmaja *et al.*, 1990). Une diminution significative des teneurs de chlorophylle a été observée pour une exposition des plants du riz *Oryza sativa*, à des teneurs élevées en métaux tels que le cadmium et le cuivre (Ahsan *et al.*, 2007).

Des études physiologiques sur l'effet des contaminants non essentiels ont montré qu'ils contribuent à l'inhibition de Fe (III) réductase, causant ainsi à une déficience en Fe (II), ce qui impacte la photosynthèse, comme cela a été observé par Alcántara *et al.* (1994) pour les plantes exposées au cadmium.

Cette réduction en pigments chlorophylliens est aussi observée chez *V. faba* traitée au plomb *in vitro* (Shahid, 2010), chez *Pistia stratiotes* L traitée au nickel (teneur supérieure à la teneur critique dans la plante) (Singh et Pandey, 2011), et chez *Zea mays* L. traitée au cadmium (Lagriffoul *et al.*, 1998).

L'impact des activités humaines sur les teneurs en chlorophylle (a et b) chez *Myriophyllum aquaticum* (qui se trouve dans les eaux relativement chaudes, stagnantes et riches en nutriments) a été étudié *in situ* par Harguinteguy *et al.* (2013). Les résultats ont montré des niveaux significativement plus élevés sur le site témoin (zone de montagne) par rapport au site impacté par les activités humaines. Cette diminution dans les teneurs en pigments chlorophylliens a été également observée chez d'autres plantes aquatiques soumises à un stress métallique, telles que *M. quitense* (Nimptsch *et al.*, 2005), *M. heterophyllum* (Sivaci *et al.*, 2008), *M. spicatum* (Grudnik et Germ, 2010), *M. alterniflorum* (Delmail *et al.*, 2011; Ngayila *et al.*, 2009), *L. gibba* (Megateli *et al.*, 2009), *E. densa* et *M. aquaticum* (Harguinteguy *et al.*, 2015) et *L. laevigatum* (Arán *et al.*, 2017).

La baisse de la teneur totale en chlorophylle et en caroténoïdes ainsi que l'inhibition de la croissance de *Lemna minor* L. (plante qui se trouve dans les eaux stagnantes et autochtones) ont été observées après sept jours puis pendant trois mois consécutifs d'exposition à des effluents industriels dilués et non-dilués, contenant des teneurs en Zn, Cu, Ni, Pb et Cr de 1 à 190 µg/L (Radić *et al.*, 2010) (cf. annexe 6, tableau 32). La diminution des teneurs en chlorophylle a et b était de l'ordre de 17 à 23% par rapport au contrôle dans les plantes exposées à des échantillons d'eau non dilués après les premiers sept jours d'exposition, et cette diminution atteignait 99% à la fin de l'expérience.

Les teneurs en caroténoïdes sont beaucoup moins affectées par rapport à celles de la chlorophylle. La diminution significative des caroténoïdes a été observée seulement dans l'échantillon d'eau recueilli après le premier mois. Les caroténoïdes sont impliqués dans la protection de la chlorophylle (Anderson et Robertson, 1960), mais ils servent aussi d'antioxydants pour inhiber ou récupérer les radicaux libres et réduire les dommages à la membrane cellulaire et l'ADN (Das et Roychoudhury, 2014)

Le nickel étant un oligoélément, pour une exposition à 1µmol/L (58,71 µg/L), Maleva *et al.* (2009) ont observé une légère augmentation (15-20%) des concentrations de pigments dans les feuilles d'*Elodea* par rapport à un témoin avec une exposition de 0 µmol/L. Cependant, pour des concentrations de 50 µmol/L, les teneurs en pigments étaient réduites de 75% (cf. annexe 6, tableau 32).

I.3.2.2. Potentiel osmotique (PO)

Le potentiel osmotique (MPa) représente l'excès de la pression hydrostatique par rapport à la pression atmosphérique, et dépend de la teneur en solutés dans la solution dans laquelle se trouve la plante. L'augmentation de la concentration des solutés dans le cytoplasme (comme la proline libre, le MDA...) aboutit à une diminution du potentiel osmotique.

Chez les plantes, l'absorption, le transport et l'utilisation d'éléments nutritifs par les plantes peuvent être affectés par la présence des contaminants (Das *et al.*, 1997; Nagajyoti *et al.*, 2010; Yadav, 2010). Ces contaminants génèrent également des perturbations au niveau du bilan hydrique et peuvent inhiber l'ouverture stomatique (Barcelo *et al.*, 1986; Bazzaz *et al.*,

1974; Kastori *et al.*, 1992; Lamoreaux et Chaney, 1978; Llamas *et al.*, 2008; Poschenrieder et Barceló, 1999).

Plusieurs études ont montré une diminution du potentiel osmotique en réponse à l'exposition à des polluants métalliques, par l'augmentation des teneurs en acides aminés dans le cytosol (Hayat *et al.*, 2012; Sharma et Dietz, 2006). Delmail *et al.* (2011) a observé une diminution du potentiel osmotique lors de l'exposition de *M. alterniflorum* au cuivre à 100 µg/L (1,5 µmol/L) suite avec une augmentation de la concentration en proline libre.

L'accumulation de métaux et métalloïdes perturbe l'état osmotique de la plante entraînant un stress osmotique et la réduction de la croissance des plantes (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). Les plantes ont montré leur capacité à accumuler une grande variété de solutés organiques comme les hydrates de carbone et des composés d'ammonium quaternaire pour que l'équilibre hydrique ne soit pas perturbé (Matysik *et al.*, 2002). Un effet indirect sur le potentiel osmotique est induit par l'accumulation de certains acides aminés comme la proline, sous l'effet du stress métallique (Hayat *et al.*, 2012; Whitacre, 2014). L'accumulation de la proline libre peut être associée non seulement avec l'osmorégulation, mais aussi liée au système de défense antioxydant (Matysik *et al.*, 2002).

Au niveau physiologique, les pigments chlorophylliens correspondent aux biomarqueurs les plus étudiés dans la littérature. Le potentiel osmotique est également un biomarqueur important pour montrer l'état hydrique à l'intérieur des cellules, qui est en relation avec l'accumulation des métabolites (proline, MDA...), influencée par la présence de contaminants. Ainsi, ces deux biomarqueurs (pigments chlorophylliens et potentiel osmotique) semblent essentiels pour évaluer la réponse physiologique des plantes au stress induit par les métaux et métalloïdes.

I.3.3. Biomarqueurs biochimiques

I.3.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les enzymes antioxydants

Lors de l'exposition aux métaux, l'équilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants est perturbé, ce qui engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Sies, 1991).

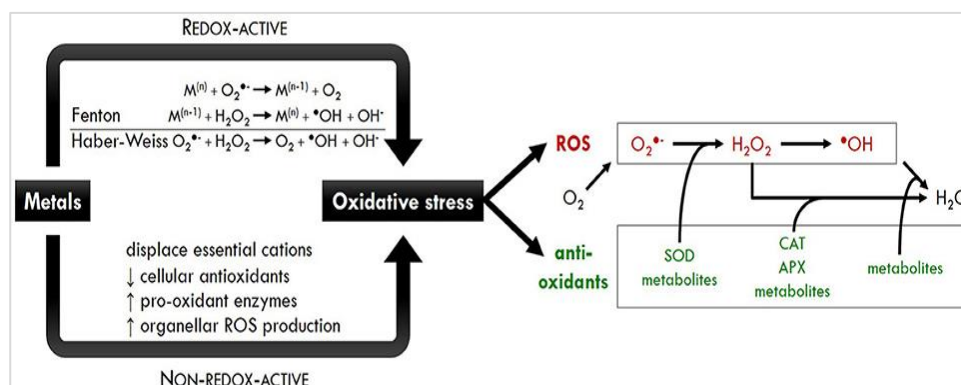


Figure 18. Schéma du stress oxydatif induit par les métaux. APX, ascorbate peroxydase; CAT, catalase; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; M⁽ⁿ⁾, métal oxydé redox-actif; M⁽ⁿ⁻¹⁾, métal redox-actif réduit; O₂^{*}, superoxyde; OH⁻, ion hydroxyde; *OH, radical hydroxyle; SOD, superoxyde dismutase (Cuypers *et al.*, 2016).

Les réactions de Fenton, avec des métaux rédox-actifs tels que Cu et Fe (figure 18), déclenchent la formation de radicaux libres (Cuypers *et al.*, 2016). Du fait de la présence de certains métaux (cuivre, nickel, zinc, cadmium, chrome, plomb et arsenic), au cours des réactions de propagation de Haber-Weiss (figure 18), les EROs sont également produites. Les EROs engendrent la formation de radical hydroxyle hautement réactif (HO[•]) à partir de l'anion superoxyde (O₂^{•-}).

D'autre part, les métaux non redox-actifs, tels que le Cd et le Zn, peuvent contribuer indirectement à la production de EROs (i) en déplaçant les cations essentiels (Mg²⁺), (ii) en diminuant l'activité des enzymes antioxydants cellulaires et/ou (iii) en augmentant l'activité des enzymes productrices de EROs.

Ces radicaux libres sont à l'origine de dommages membranaires.

A ce stade, les systèmes de défense antioxydants s'activent et jouent un rôle détoxifiant en contribuant à supprimer les espèces radicalaires (Mittler, 2002). Trois enzymes constituent le principal système de défense antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la peroxydase (PX) (figure 18).

La SOD est une métalloenzyme qui active la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, et est considérée comme la première ligne de défense dans le système antioxydant (Scandalios, 2002).

Le peroxyde d'hydrogène est éliminé par la catalase (CAT) durant l'oxydation de substrats (H₂R en R) par les peroxydases (PX) (figure 18). Les PX spécifiques des plantes sont dites PX de classe III (PX III) (Valério *et al.*, 2004). L'activité de l'enzyme CAT, participe au système de défense principal contre l'accumulation du peroxyde d'hydrogène intracellulaire (Panda *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2006).

De même, pour les peroxydases (PX), de fortes inductions ont été observées (200%) après un jour d'exposition au cuivre à 5 µmol/L chez *Lemna minor* (Teisseire et Guy, 2000).

Radić *et al.* (2010) (cf. annexe 6, tableau 33) ont étudié l'enzyme antioxydant PX (peroxydase) pendant trois mois chez *L. minor in vitro*, avec des dilutions d'effluent industriel contenant du Zn, Cu, Ni, Pb et du Cr. En comparaison avec le témoin, l'activité PX variait entre 135% et 225% pour les échantillons d'eau contenant de 5% à 100% de l'effluent industriel respectivement. Une augmentation de la PX corrélée avec la concentration en contaminant a été observée (Radić *et al.*, 2010).

Maleva *et al.* (2009) (cf. annexe 6, tableau 33) ont étudié *Elodea canadensis* exposées *in vitro* au Ni (1, 10, 50 µmol/L). Après cinq jours d'exposition, une induction des radicaux libres a entraîné l'activation de plusieurs enzymes antioxydants, tels que le SOD et la catalase. L'activité de la catalase a diminué de 30% et 43% dans les plantes traitées avec respectivement 10 et 50 µmol/L de Ni, alors que l'activité de SOD était plus élevée (13%) chez les plantes traitées avec 10 µmol/L de Ni.

Les travaux de la littérature montrent donc que les enzymes antioxydantes peuvent être utilisées comme des biomarqueurs de la pollution métallique, en réponse au stress oxydatif. Cela a été mis en évidence également pour le *Myriophyllum alterniflorum* (Delmail, 2011 ; Krayem, 2015).

I.3.3.2. La concentration en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) agit en déclenchant des réponses secondaires dans les plantes (Dietz *et al.*, 1999). Les contaminants métalliques, de même que d'autres facteurs de stress, ont été signalés pour induire une surproduction de EROs dans les tissus végétaux (Gratão *et al.*, 2005).

L'accumulation de H₂O₂ a été observée dans plusieurs plantes suite à leur exposition au Cd (Kuo et Kao, 2004), Cu (Drażkiewicz *et al.*, 2004), Cr (Pandey *et al.*, 2005).

Le traitement des feuilles et des racines de *Lemna minor in vitro* avec différentes concentrations de Cu (0, 20, 50, 100 µmol/L) a engendré une augmentation de la teneur en H₂O₂ après 48 h ; la plus forte augmentation a été observée avec la concentration en Cu la plus élevée. Après 48 h d'exposition *in vitro* à 100 µmol/L de Cu, la teneur en H₂O₂ a augmenté de 60% dans les feuilles et de 146% dans les racines (Panda, 2008).

Ces résultats montrent l'intérêt du biomarqueur H₂O₂ pour la détection de la présence de contaminants métalliques dans les eaux. Cependant, d'autres types de stress peuvent engendrer une augmentation de la concentration en H₂O₂ dans des macrophytes aquatiques (Collén et Pedersén, 1996; Parveen *et al.*, 2017; Radić et Pevalek-Kozlina, 2010). Pour cela, ce biomarqueur n'est pas considéré comme spécifique des métaux et métalloïdes.

I.3.3.3. Le malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est un des biomarqueurs les plus utilisés pour détecter le stress oxydatif généré par la présence des contaminants. Plusieurs études ont montré que l'exposition de différentes plantes aux contaminants entraîne l'augmentation de la concentration de MDA dans les plantes aquatiques (Banu Doğanlar, 2013; Dazy *et al.*, 2009; Krayem *et al.*, 2016; Panda *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2005; Verma et Dubey, 2003; Zhang *et al.*, 2007). La formation de malondialdéhyde (MDA) (mmol/g MF) est toujours observée dans les cellules suite à un stress ayant entraîné la formation d'EROs et de radicaux libres (figure 19).

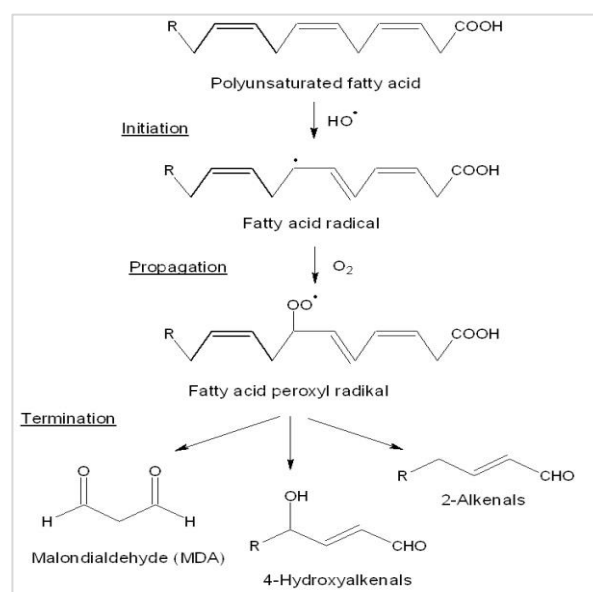


Figure 19. Les étapes du processus de peroxydation lipidique (Grotto *et al.*, 2009).

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit de décomposition des acides gras polyinsaturés (AGPI) des membranes, et l'augmentation de sa teneur dans les tissus des plantes indique qu'il y a une augmentation de la peroxydation lipidique des membranes montrant que les plantes sont soumises à un stress antioxydant (Hou *et al.*, 2007).

Des corrélations positives ont été relevées entre les teneurs en MDA dans les plantes aquatiques et les teneurs des contaminants dans l'eau pour le zinc, le cuivre, le cadmium et le plomb chez *F. antipyretica* (Dazy *et al.*, 2009).

Néanmoins, d'autres études ont observé une diminution de la concentration en MDA chez *Phaseolus aureus* exposée au Co (50-200 $\mu\text{mol/L}$). Ceci peut être expliqué par (i) l'induction du système antioxydant, qui cause la réduction du peroxyde d'hydrogène dans les cellules végétales, ou (ii) par le caractère anti-peroxydant du cobalt (Tewari *et al.*, 2002).

Harguinteguy *et al.* (2013) (cf. annexe 6, tableau 31) ont montré que les teneurs en MDA, était significativement supérieure dans *M. aquaticum* exposé pendant 126 jours, sur un site impacté par des rejets agricoles et industriels (Co, Cu, Mn, Ni, Zn et Pb) par rapport à un site témoin. Dans le cadre d'étude *in vitro* menée sur *L. laevigatum* exposées à des métaux (Pb, Cr, Ni et Zn), Arán *et al.* (2017) ont montré une augmentation significative des teneurs en MDA au cours des 28 jours de l'étude (cf. annexe 6, tableau 31).

En revanche, les métaux non-redox sensibles tels que Zn, Ni et Pb ne peuvent pas produire directement des EROs, mais ils peuvent générer un stress oxydatif par le système de défense antioxydant de la plante (Aravind et Prasad, 2003; Garnczarska et Ratajczak, 2000; Panda et Choudhury, 2005). Ainsi, ces métaux peuvent aussi contribuer à l'augmentation des teneurs en MDA.

Radić *et al.* (2010) ont étudié la peroxydation lipidique chez les lentilles d'eau *Lemna minor L.* exposées à un effluent industriel contenant différents métaux (Fe, Zn, Cu, Ni, Pb, Cr) *in situ* pendant trois mois (cf. annexe 6, tableau 31). La formation de MDA a augmenté de manière significative (de 135% à 175%). Les dommages oxydatifs à la biomembrane de *L. minor* peuvent être principalement attribués au zinc ou cuivre comme ils étaient présents dans des quantités élevées dans les échantillons d'eau testés.

La mesure du malondialdéhyde (MDA) par Maleva *et al.* (2009) (cf. annexe 6, tableau 31) avait pour but de montrer l'évolution du niveau de la peroxydation lipidique chez *E. canadensis* traitée au Ni pendant cinq jours *in vitro*. Avec ce test, une augmentation graduelle dose-dépendante de la peroxydation lipidique a été observée. Ce biomarqueur a augmenté de 120 à 260 $\mu\text{mol/g MS}$ dans les feuilles traitées de 0 à 50 $\mu\text{mol/L}$ de Ni. L'augmentation progressive du niveau de peroxydation lipidique, indique que des concentrations élevées de Ni peuvent causer une lésion membranaire oxydative dans les cellules d'*Elodea* (Mittler, 2002).

Ce biomarqueur de peroxydation lipidique peut donc être considéré comme une indication de stress oxydatif généré par les contaminants inorganiques tels que Ni, Cu, Zn, Cd, As, Pb et Cr. Cependant, comme pour le biomarqueur H_2O_2 , le MDA est non spécifique du stress métallique, car sa production peut aussi être liée à d'autres types de stress (salinité, température, pollution organique...).

I.3.3.4. La proline libre

La proline est un acide aminé qui agit comme un osmolyte métabolique ; il joue plusieurs rôles dans la plante comme osmoprotecteur (Hayat *et al.*, 2012; Mattioni *et al.*, 1997), stabilisateur de protéines (Szabados et Savoure, 2010), chélateur des métaux (Schat *et al.*, 1997), destructeur de radicaux libres (Matysik *et al.*, 2002), et capteur d'oxygène singulet (Mohanty et Matysik, 2001).

Ainsi, l'exposition aux contaminants peut engendrer l'accumulation de proline libre dans les cellules, ce qui a un effet protecteur pour la plante (Siripornadulsil *et al.*, 2002).

La proline libre réduit le stress dû aux contaminants par la détoxification des radicaux libres induits par ce stress, ce qui limite ensuite les dommages engendrés par les radicaux. L'augmentation de la teneur en proline libre augmente la synthèse de GSH (glutathion), qui facilite la synthèse des phytochélatines, et par suite la séquestration des contaminants métalliques par leur complexation aux phytochélatines dans la vacuole. L'induction de la production de la proline n'est pas seulement générée par le stress métallique, mais également par des facteurs comme la salinité, la sécheresse, les rayons UV et le stress oxydatif (Szabados et Savoure, 2010).

Des études sur *Shorea robusta*, exposées au cadmium, au plomb et à l'arsenic ont montré une production importante de proline (Pant *et al.*, 2011). Suite à l'exposition d'*Oryza sativa L* durant 20 jours à des teneurs en cadmium de 100 à 500 µmol/L, des teneurs élevées en proline libre ont été observées. Les plantes exposées à 100 µmol/L de Cd ont accumulé 0,8 et 0,7 mg/g MS en proline libre dans les racines et les feuilles respectivement et pour une exposition à 500 µmol/L de Cd, elles ont accumulé 1,6 et 1,1 mg/g MS de proline libre dans les racines et dans les feuilles respectivement. Une corrélation positive entre les teneurs en proline libre et les teneurs en Cd dans l'eau a donc été mise en évidence.

L'augmentation de la teneur en proline libre induit des perturbations physiologiques, en particulier une diminution du potentiel osmotique des cellules végétales (Shah et Dubey, 1997). La réponse de ces deux biomarqueurs devra être étudiée de façon plus approfondie pour bien mettre en évidence cette relation en réponse à l'impact des métaux/métalloïdes.

La proline est donc un biomarqueur de défense au stress oxydatif généré par les contaminants dans la plante, qu'il convient de prendre en compte dans le cadre de la biosurveillance des eaux.

I.3.3.5. L'activité de la nitrate réductase (NR)

La nitrate réductase (NR) est une enzyme clé du métabolisme de l'azote ; elle permet la réduction des nitrates en nitrites (Tischner, 2000) (figure 20). L'activité NR dans les plantes exposées aux métaux peut être inhibée (Rai *et al.*, 2004; Vajpayee *et al.*, 2000).

Il a été montré que la diminution d'activité NR est corrélée avec la diminution du contenu pigmentaire et de l'activité photosynthétique (Gouia *et al.*, 2000a). En outre, il a été montré que chez *O. tenuiflorum* traitées au chrome, la réduction de l'activité NR était due à la réduction de la photosynthèse suite à l'inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle (Francko *et al.*, 1993).

De même, une autre étude menée sur la plante aquatique *Nymphaea alba L.* cultivée *in vitro* à différents niveaux de chrome (VI) allant de 1 à 200 $\mu\text{mol/L}$ pendant 12 jours a montré une diminution de l'activité de nitrate réductase pour les concentrations supérieures à 1 $\mu\text{mol Cr/L}$. Une inhibition maximale de 68% de l'activité NR a été enregistrée à un niveau de Cr de 200 $\mu\text{mol/L}$ après un traitement de 12 jours. Il a été montré que cette diminution était liée à l'activité photosynthétique (Vajpayee *et al.*, 2000).

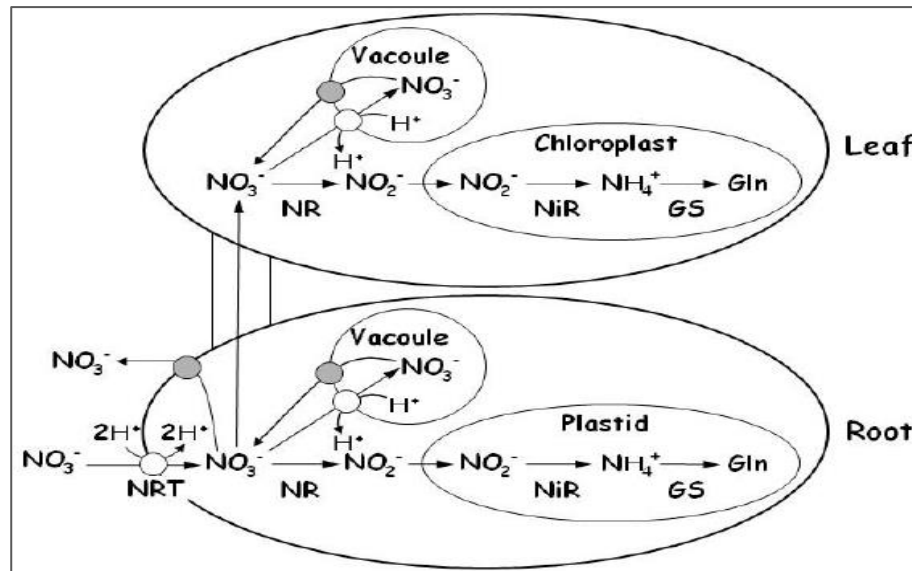


Figure 20. Mécanismes d'absorption, du transport et de l'assimilation du nitrate dans les plantes (NR : nitrate réductase) (Ruamrungsri *et al.*, 2010).

De plus, la diminution de la concentration en azote inorganique dans la plante peut être induite par la réduction de l'activité NR, l'enzyme contrôlant le taux d'assimilation des nitrates (Gouia *et al.*, 2000a; Xiong *et al.*, 2006). Chez *Brassica pekinensis*, Xiong *et al.* (2006) ont signalé que l'exposition au plomb (4-8 mmol/kg) réduit significativement la teneur en nitrates dans les feuilles (70% et 80%), l'activité NR (100% et 50%) et la teneur en acides aminés libres (81% et 82%).

Chez *P. vulgaris*, le cadmium (50-100 $\mu\text{mol/L}$) induit une diminution de l'activité de NR après 24 h d'exposition. Cependant, après sept jours de traitement au Cd, l'activité du NR remonte au niveau observé dans les plantes non traitées. Ceci peut être dû à la réactivation de NR en augmentant la production de protéine nitrate réductase et par suite une induction de l'activité de nitrate réductase (Gouia *et al.*, 2000a).

Les résultats de la littérature montrent que l'activité NR est un biomarqueur approprié pour le stress oxydatif généré par les contaminants en même temps que sa relation avec l'assimilation de nitrates et l'activité photosynthétique. Cependant une attention particulière doit être portée à l'évolution de sa teneur en fonction de la durée d'exposition.

I.3.3.6. L'activité de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)

Le glucose-6-phosphate déshydrogénase G6PDH est un enzyme cytosolique de la voie des pentoses phosphates, une voie métabolique fournissant l'énergie réductrice aux cellules en régulant le niveau de NADPH (Honjoh *et al.*, 2003) (figure 21). Le G6PDH produit le NADPH nécessaire au cycle ascorbate-glutathion, et ceci permet de maintenir un niveau suffisant de GSH (glutathion) et d'ascorbate dans le cytosol pour protéger les cellules des dommages engendrés par les EROs (Corpas et Barroso, 2018).

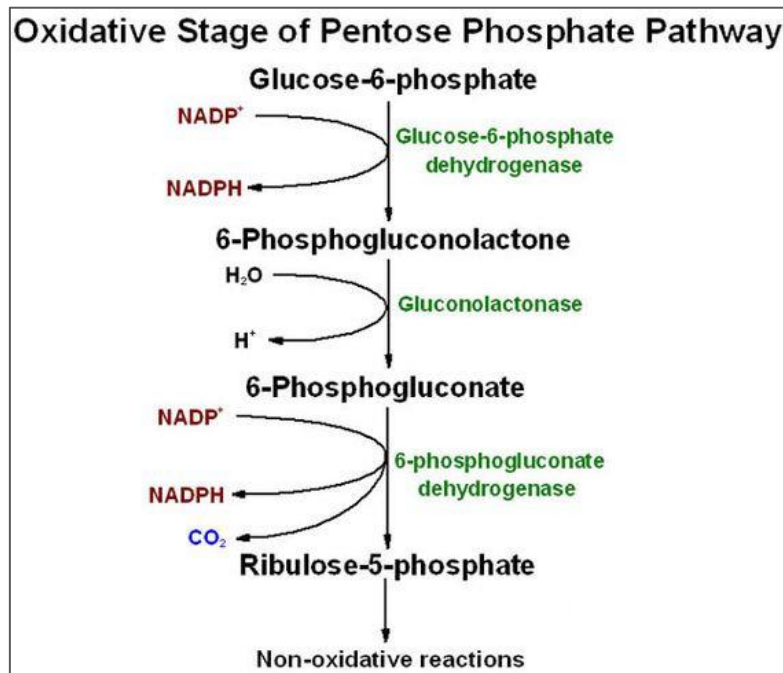


Figure 21. Voie des pentose phosphate ("Pentose Phosphate Pathway," n.d.).

Mattioni *et al.* (1997) ont étudié les effets de Ni²⁺ et de Cd²⁺ sur l'activité de la G6PDH chez *S. italic in vitro* (0,5, 2,5, 7,5, 15 μmol/L). Ces deux ions métalliques induisent une augmentation de l'activité de G6PDH de 250 et 320 % respectivement par rapport au témoin après dix jours d'exposition. Plusieurs études ont montré que ce biomarqueur est pertinent pour plusieurs types de stress incluant le stress métallique (Delmail, 2011; León *et al.*, 2002; Van Assche *et al.*, 1988)

I.3.3.7. L'activité de γ-glutamyl cystéine synthétase (γ-GCS)

Les plantes ont développé un mécanisme pour lutter contre les problèmes de toxicité des métaux et métalloïdes. Elles produisent des thiols de faible masse moléculaire qui présentent une forte affinité pour les métaux/métalloïdes toxiques. Le glutathion est l'un des thiols les plus importants dans la plante. La synthèse du GSH est catalysée par deux enzymes dépendantes de l'ATP, la γ-glutamylcystéine synthétase (γ-GCS) et la glutathion synthétase (GSH2) (figure 22).

Le γ -GCS combine le Glutamyl et la Cystéine pour former γ -GluCys. C'est l'étape majeure qui contrôle de la synthèse du glutathion (Anderson et Meister, 1983). Le glutathion synthétase permet la combinaison de la Glycine (Gly) avec l' γ -GluCys pour produire le glutathion (GSH) (Law et Halliwell, 1986). La synthèse de PC dans les plantes utilise le GSH en tant que substrat et est catalysée par un dipeptidyle γ -GluCys, appelé PC synthase (Grill *et al.*, 1985).

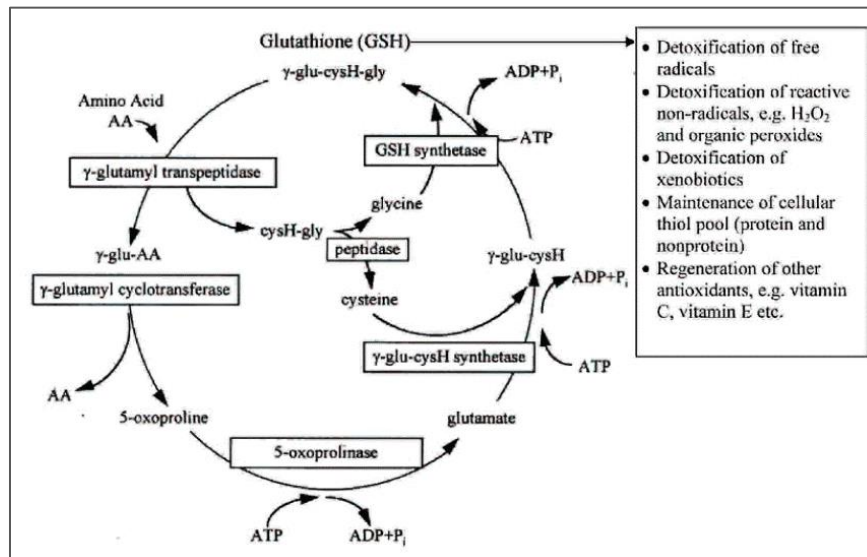


Figure 22. Cycle enzymatique du gamma glutamyl pour la synthèse du glutathion (Manjula Ramen, 2015).

Les phytochélatines (PC) sont de petits polypeptides riches en cystéine se liant aux métaux/métalloïdes et ayant la structure générale de (γ -Glu-Cys) n Gly ($n = 2-11$). L'exposition des cellules végétales aux métaux et métalloïdes (Cd, As, Ni, Cu...) induit la synthèse des phytochélatines. La synthèse de phytochélatines (PC), en réponse aux contaminants, aboutit à la formation de complexes intracellulaires (PC-contaminants). Ces complexes sont considérés comme essentiels pour la tolérance des plantes aux contaminants. En effet, par le mécanisme de séquestration des contaminants, les phytochélatines limitent la réactivité des contaminants et les dommages conséquents aux cellules végétales.

Il a été montré que le traitement des plantes avec le BSO (L-Buthionine Sulfoximine), un inhibiteur de l'activité de γ -GluCys synthétase, empêche la synthèse des PC et réduit la tolérance au Cd (Chen et Goldsbrough, 1994). Il a également été montré que l'exposition des plantes au Cd entraîne une augmentation des activités d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du GSH (Chen et Goldsbrough, 1994).

En outre, une surexpression simultanée d'AtPCS1 (codant la synthèse des phytochélatines) et de GSH1 (codant la synthèse du γ -GCS) chez *A. thaliana* a entraîné une tolérance et une accumulation élevée de Cd et As, ainsi qu'une augmentation de la production des phytochélatines, par rapport à des plantes qui ont exprimé seulement un de ces deux gènes (AtPCS1 ou GSH1) (Yadav, 2010).

Ces résultats ont montré l'intérêt de la réponse de biomarqueur γ -GCS comme spécifique des métaux et métalloïdes, et la relation importante qui existe avec la synthèse des

phytochélatines, identifiés comme biomarqueurs essentiels dans le système de défense contre le stress métallique.

I.3.3.8. L'activité de glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase (GR) est un biomarqueur spécifique du stress métallique. En effet, le glutathion et la glutathion réductase jouent un rôle essentiel dans la désintoxication des EROs, en tant que composants du cycle ascorbate-glutathion (Gupta *et al.*, 1999) (figure 23).

Dans l'étude menée par Maleva *et al.* (2009), la GR a augmenté deux fois plus dans les feuilles d'*E. canadensis* traitées avec 10 $\mu\text{mol/L}$ de Ni par rapport au témoin. L'augmentation de l'activité de la glutathion réductase, corrélée avec une concentration croissante de groupes thiol indique que le glutathion et ses dérivés (phytochélatines) sont synthétisés dans les feuilles en réponse à l'exposition aux métaux et métalloïdes tels que le nickel (Tomaszewska, 2002).

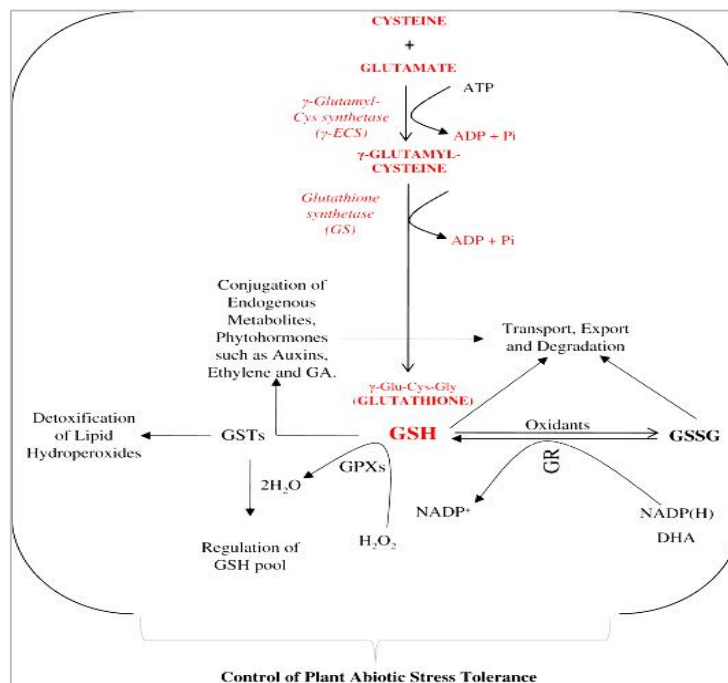


Figure 23. Schéma des composants principaux du système de défense enzymatique-antioxydant associés au GSH (glutathion), y compris la glutathion réductase (GR) (Gill *et al.*, 2013).

I.3.3.9. L'activité de la phytochélatine synthase (PC)

La production de phytochélatines (figure 24) est l'un des processus adoptés par les plantes pour détoxifier les polluants métalliques en produisant des peptides de faible poids moléculaires riches en thiol synthétisés à partir du glutathion (GSH) par l'intermédiaire d'une enzyme, la phytochélatine-synthétase. Ces phytochélatines sont des ligands ont une grande affinité avec les polluants métalliques (Gupta *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2003).

Dans le cytosol, les phytochélatines complexent les métaux/métalloïdes, puis les transportent et les stockent dans les vacuoles (Satofuka *et al.*, 2001). L'augmentation des niveaux de PCs dans les parties foliaires et racinaires sont dues à l'induction du gène de la phytochélatine synthase. L'expression de la phytochélatine synthase a entraîné chez le macrophyte *aquatique*

Ceratophyllum demersum L. une augmentation de l'accumulation de cadmium et d'arsenic dans les tissus de la plante de tabac (Shukla *et al.*, 2013).

En conclusion, l'expression de la phytochélatine synthase, enzyme clé de la synthèse des phytochélatines suite à l'exposition aux métaux et métalloïdes, indique que ce biomarqueur est approprié pour détecter le stress métallique.

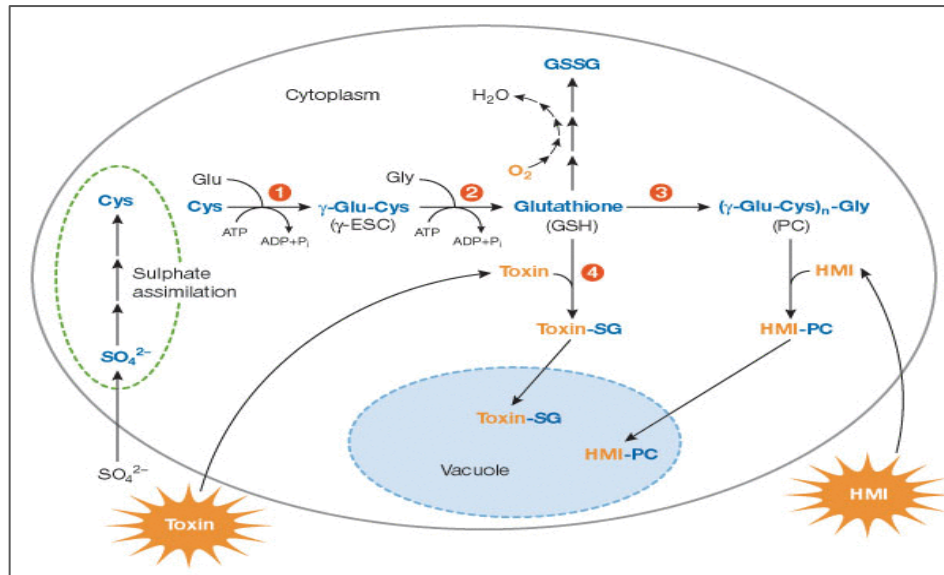


Figure 24. Mécanisme de détoxification des métaux/métalloïdes, et du stress oxydatif dans les cellules végétales. Cys, cystéine ; γ -Glu-Cys, γ -l-glutamyl-l-cystéine ; γ -ECS, γ -glutamylcystéine synthétase (Y-GCS) ; GSH, glutathion ; GSSG, glutathion oxydé ; PC, phytochélatine ; HMI (Heavy metal ions), métaux/métalloïdes ; HMI-PC, complexe métal/ou métalloïde- phytochélatine ; Toxine, xénobiotiques ; Toxine-SG, conjugué de toxine-GSH. (1) la γ -glutamylcystéine synthétase ; (2) la glutathion synthétase ; (3) la phytochélatine synthase ; (4) la glutathion S-transférase (GST) (Peuke et Rennenberg, 2005).

I.3.4. Influence de la durée d'exposition sur la réponse des biomarqueurs

La durée d'exposition des plantes aux contaminants influence la réponse des différents biomarqueurs des plantes. Ainsi, comme cela a déjà été montré pour l'évolution des teneurs en contaminants dans les plantes, il est nécessaire d'étudier l'effet de la durée d'exposition sur la réponse des biomarqueurs, et par suite diagnostiquer la présence des contaminants dans les milieux aquatiques.

Cet impact dépend des plantes, de la nature des contaminants et de leur teneur dans l'eau. L'évolution de la réponse de chaque biomarqueur au cours du temps montre la pertinence de ces biomarqueurs pour leur utilisation pour la biosurveillance de la qualité des eaux pour des durées d'exposition élevées. Ainsi il convient de considérer l'évolution de la réponse des biomarqueurs, suivant l'activation ou l'inhibition qui se mettent en place :

(E1) Pas d'évolution de la réponse des biomarqueurs au cours du temps.

(E2) Augmentation/ ou diminution continue de la réponse des biomarqueurs au cours du temps.

(E3) Augmentation/ ou diminution puis stabilisation de la réponse des biomarqueurs au cours du temps (deux phases).

(E4) Augmentation/ ou diminution, puis diminution/ ou augmentation de la réponse des biomarqueurs au cours du temps (deux phases).

Les réponses des biomarqueurs peuvent ne pas évoluer au cours du temps (E1), comme cela a été observé pour l'activité POD de *C. Demersum L* exposé *in vitro* à des teneurs élevées en Pb (40 et 80 µmol/L), pendant 21 jours (Chen *et al.*, 2015). De même, chez *Lemna polyrrhiza L.*, l'exposition au Pb à 48 µmol/L *in vitro* pendant une durée trente jours, n'a pas induit d'évolution significative des teneurs en Chla et en Chl total (John *et al.*, 2008)

Cependant, avec l'augmentation des teneurs en contaminants, une augmentation ou une diminution linéaire de la réponse de certains biomarqueurs peut être observée (E2).

Une augmentation croissante des teneurs en MDA a été observée chez *C. demersum L* exposée *in vitro* à des teneurs de Pb de 5 et 10 µmol/L pendant 21 jours. Cette augmentation était corrélée avec l'activité des enzymes antioxydantes, en réponse à la production des EROs pour des concentrations de Pb de 5 µmol/L pour le SOD et de 20 µmol/L pour le CAT (Chen *et al.*, 2015).

Harguinteguy *et al.* (2013) ont observé une augmentation croissante de la teneur en MDA au cours de toute la durée de l'exposition (126 jours) chez *Myriophyllum aquaticum*, exposé à un mélange des métaux (Co, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn) *in situ*.

De plus, Duman *et al.* (2010) ont réalisé des observations analogues chez *Lemna minor L.* exposée à l'As (III) ou l'As (V) pendant six jours *in vitro*, où le test « two way anova » a montré une diminution linéaire des teneurs en pigments chlorophylliens au cours du temps par l'effet significatif de la durée d'exposition sur la réponse de ce biomarqueur ($p < 0,001$).

Hadad *et al.* (2011) ont montré une diminution progressive des teneurs en pigments chlorophylliens de *E. crassipes* exposée aux métaux Cr, Ni et Zn *in vitro* durant 30 jours. En outre, *Myriophyllum alterniflorum* exposé au Cd (10 µmol/L) *in vitro*, a montré une diminution linéaire de ce biomarqueur physiologique au cours de toute la durée d'exposition de 27 jours (Delmail *et al.*, 2011).

Les teneurs en Chla, Chlb et le Chl total ont montré des diminutions chez *Lemna polyrrhiza L.* suite à son exposition à des teneurs de Cd de 8,9 et 89 µmol/L et de Pb de 4,8 et 48 µmol/L *in vitro* durant la durée d'exposition de 30 jours (John *et al.*, 2008). À l'inverse, le biomarqueur biochimique, la proline libre, a montré une augmentation linéaire pendant toute la durée d'exposition de 30 jours pour le Cd à 89 µmol/L et pour le Pb à 48, 96 et 145 µmol/L (John *et al.*, 2008).

Dans certains cas, une stabilisation s'observe à la suite d'une augmentation/ou diminution de la réponse des biomarqueurs (E3).

Chez *Lemna polyrrhiza L.* exposée *in vitro* au Pb à 145 µmol/L et au Cd à 357 µmol/L, les teneurs en Chla diminuent progressivement en réponse au stress métallique, jusqu'au 18ème jour pour le Cd et le 24ème jour pour le Pb. Ensuite, une stabilisation progressive de la teneur en Chla est observée jusqu'à la fin de la durée d'exposition de 30 jours, indiquant ainsi une adaptation de la plante au stress métallique en améliorant la production des pigments chlorophylliens (John *et al.*, 2008).

Dans cette même étude (John *et al.*, 2008) pour une exposition au Cd à 267 µmol/L, la teneur en proline augmente jusqu'à 24ème jour, puis reste stable jusqu'à la fin de la durée de

l'exposition de 30 jours. La production de la proline libre est liée à la production des EROs générées par le stress oxydatif, et sa réduction indique que la plante a pu réduire la production des EROs par le système de défense cellulaire contre le stress métallique (John *et al.*, 2008). Selon, Delmail *et al.* (2011), au cours de l'exposition au Cd (10 $\mu\text{mol/L}$) de *Myriophyllum alterniflorum in vitro*, une augmentation progressive de la teneur en proline a été relevée jusqu'à 21^{ème} jours d'exposition, puis une stabilisation jusqu'à la fin de l'exposition (27 jours). Chez *C. Demersum L* exposée *in vitro* a des teneurs en Pb de 10 et 20 $\mu\text{mol/L}$, l'activité de l'enzyme antioxydant (SOD) a augmenté progressivement jusqu'au 14^{ème} jour, puis s'est stabilisé jusqu'à la fin de la durée d'exposition (21 jours) (Chen *et al.*, 2015). Dans l'étude Arán *et al.* (2017), chez *L. laevigatum* traitée aux métaux (Pb, Cr, Ni et Zn) *in vitro*, le nombre des feuilles chlorotiques et nécrotiques ont augmenté jusqu'à 21 jours, sans variations enregistrées dans ces paramètres dans les étapes ultérieures d'exposition observées (28 jours).

Parfois, les réponses des biomarqueurs évoluent en augmentant ou en diminuant jusqu'à un certain pas de temps, puis la réponse évolue de façon opposée, indiquant des modifications dans les mécanismes d'adaptation des plantes au stress (E4).

Cette situation est rencontrée dans plusieurs études, telles que celle de Chen *et al.* (2015) qui ont observé des teneurs maximales en MDA chez *C. Demersum L* exposée *in vitro* au bout de 14 jours pour les teneurs 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ en Pb et sept jours pour la teneur de 80 $\mu\text{mol/L}$ en Pb. Au-delà de ces durées d'exposition (14 et 7 jours), il y a une diminution significative de la teneur en MDA jusqu'à 21 jours. Chez *L. laevigatum* exposée aux métaux (Pb, Cr, Ni et Zn) *in vitro* pour 28 jours d'étude, la teneur en MDA la plus élevée a été relevée au bout de 14 jours d'exposition, puis la teneur en MDA a diminué jusqu'à la fin de l'étude (28 jours) (Arán *et al.*, 2017). Ces résultats montrent que *L. laevigatum* a déclenché son système de défense contre la dégradation des membranes lipidiques à partir de quatorzième jour d'exposition aux contaminants.

Chez *Myriophyllum aquaticum* exposé aux métaux (Co, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn) dans une étude *in situ*, les teneurs en pigments chlorophylliens ont diminué pendant une durée d'exposition de 84 jours (Harguinteguy *et al.*, 2013). Cette diminution est suivie par une augmentation progressive des teneurs en pigments entre 84 et 126 jours, indiquant l'adaptation de la plante au stress métallique. Chez *Myriophyllum alterniflorum* le potentiel osmotique a montré une diminution progressive jusqu'à 19 jours, puis il augmente jusqu'à la fin de l'expérience (27 jours) en réponse à l'exposition au Cd (10 $\mu\text{mol/L}$) *in vitro* (Delmail *et al.*, 2011). Ce changement de réponse après un certain temps d'exposition est lié à l'adaptation de la plante au stress.

La durée d'exposition doit donc être prise en compte pour évaluer la réponse des biomarqueurs utilisés dans le cadre de la biosurveillance des eaux.

I.4. Conclusion bibliographique

I.4.1. Quel est l'intérêt de la bioindication avec les macrophytes, et avec *Myriophyllum alterniflorum* en particulier ?

Différents modes de surveillance de la qualité des eaux sont disponibles : ponctuel, passif et biomonitoring. Chacun d'eux présentent des limites dans le cadre du suivi de la qualité des eaux *in situ*. Ainsi, l'étude des bioindicateurs tels que les macrophytes aquatiques semble importante en complément des analyses chimiques réalisées dans le cadre des échantillonnages ponctuels et passifs, ces bioindicateurs ayant l'avantage de pouvoir détecter la présence des contaminants et d'indiquer leurs effets sur l'écosystème.

D'après la littérature, les macrophytes possèdent des capacités de bioindication pour évaluer l'état des masses d'eau d'une façon intégrative, sur une durée d'exposition de plusieurs jours à plusieurs semaines, au travers de l'accumulation des contaminants et de la réponse de certains biomarqueurs, qui en font des outils intéressants pour la surveillance de la qualité des eaux.

Les macrophytes aquatiques d'intérêt, pour être des outils de détection pertinents, doivent être faciles à manipuler, non invasifs, capables d'accumuler les contaminants et avoir des biomarqueurs qui réagissent à la présence des contaminants.

Parmi les plantes aquatiques étudiées dans la littérature et couramment utilisées dans le biomonitoring on trouve : *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Elodea canadensis*, *Ceratophyllum demersum*, *Ceratodon purpureus*, *Fontinalis antipyretica*, *Myriophyllum aquaticum*, *Limnobium laevigatum*, *Hydrilla verticillata*, *Egeria densa*, *Myriophyllum quitense*, *Myriophyllum heterophyllum*, *Myriophyllum spicatum*, *Eichhornia crassipes*... Le choix de ces plantes est fait en fonction des conditions physico-chimiques des eaux (salinité, alcalinité, vitesse du courant, température...).

Le mode de biosurveillance actif utilisé dans notre étude permet de détecter une altération de la qualité de l'eau durant la durée d'exposition étudiée, alors que dans le cadre du biomonitoring passif, les espèces bioindicatrices peuvent être influencées par des contaminations antérieures à la période d'étude et l'évaluation de l'impact actuel des activités humaines sur l'écosystème aquatique peut être biaisée (Nasci *et al.*, 1999).

Dans le cas des eaux douces, oligotrophes, avec une faible vitesse de courant, en milieu tempéré, des études précédentes (Delmail, 2011; Krayem, 2015; Ngayila *et al.*, 2009, 2007) ont montré l'intérêt de *Myriophyllum alterniflorum*, qui répond aux critères de facilité de mise en œuvre et d'aptitude à la bioindication (accumulation des contaminants et réponse de certains biomarqueurs à la présence de contaminants). Cependant, peu de travaux le concernant ont été menés *in situ*, et des connaissances restent donc à acquérir dans ce contexte.

Ainsi, ce macrophyte est retenu pour effectuer ces travaux d'évaluation *in situ* de la qualité des eaux.

I.4.2. Quels contaminants étudier et dans quel contexte ?

Le suivi dans notre étude concerne huit métaux (Cu, Co, Ni, Cd, Pb, Cr, Zn et Mn) et un métalloïde (As), listés dans la circulaire du 7 mai 2007 définissant les "normes de qualité environnementale (NQE)". Cette circulaire fixe également les objectifs nationaux de réduction des émissions de ces substances et modifie la circulaire DCE 2005/12 du 28 juillet 2005 relative à la définition du " bon état ".

Parmi ces métaux/métalloïdes, le cuivre, le nickel, le cobalt, le zinc et le manganèse sont considérés comme essentiels pour la plante, tandis que l'arsenic, le cadmium, le plomb et le chrome sont considérés comme non essentiels. Au-delà de certaines concentrations seuil, ces contaminants induisent un effet toxique pour la plante et leur absorption peut être limitée par les mécanismes de défense cellulaire. Cependant, pour des concentrations faibles, les mécanismes seront différents pour ces deux types de métaux/métalloïdes.

La biodisponibilité des métaux et métalloïdes correspond à la teneur qui peut être prise en charge par la plante et intégrée dans les mécanismes métaboliques. De nombreux facteurs l'influencent : la nature et la concentration des métaux et métalloïdes, la spéciation des métaux et métalloïdes, la présence de ligands organiques ou inorganiques, la présence d'ions majeurs (compétition), le pH... (Vijver *et al.*, 2004).

Généralement, les contaminants sont étudiés en considérant la fraction totale ou la fraction acidifiée-filtrée (AF). Dans notre étude, seule la fraction dissoute est considérée pour l'étude de la biodisponibilité et des effets des métaux et métalloïdes sur la plante. Il sera également intéressant de considérer les teneurs en contaminants biodisponibles, au travers des logiciels de modélisation de la spéciation des contaminants, en considérant la composition des eaux.

Dans la littérature, la majorité des études sont menées *in vitro*. Cependant, il est important de détecter ces contaminants *in situ*, pour considérer l'influence des paramètres environnementaux. Les études *in situ* s'intéressent souvent à un type d'impact anthropique (urbain, agricole ou industriel), et dans des conditions environnementales qui peuvent être variables (effet des saisons, situation géographique).

Ainsi, le déploiement de *Myriophyllum alterniflorum*, en amont et en aval de rejets anthropiques, susceptibles de déverser des flux significatifs des contaminants sélectionnés (STEU, zone industrielle avec des activités de traitement de surface) semblerait intéressant. Les effets phénologiques (effet des saisons) pourront aussi être pris en compte.

I.4.3. Quelle réponse de la plante peut être suivie pour détecter la présence des contaminants ?

Les mécanismes de bioaccumulation des métaux ou métalloïdes dans les plantes sont complexes et comprennent différentes étapes (figure 10).

La plupart des études bibliographiques ont étudié la capacité des macrophytes aquatiques à absorber et à accumuler des contaminants en fonction de leur teneur dans les systèmes. Cependant, l'influence de la durée d'exposition sur l'accumulation des contaminants peut jouer un rôle majeur en considérant en particulier les phénomènes d'efflux ou de limitation de l'absorption. Ce paramètre a peu été pris en compte, et dans la plupart des travaux, les durées d'exposition ne dépassent pas quelques heures à quelques jours. Ainsi, une étude impliquant

le suivi de l'accumulation des contaminants par *Myriophyllum alterniflorum* à plus long terme pourra contribuer à enrichir les connaissances.

Suivant les résultats, le choix de la durée d'exposition pourra varier en fonction des contextes (teneur en contaminant, niveau trophique, température).

Outre le suivi de l'accumulation des teneurs en métaux et métalloïdes dans *Myriophyllum alterniflorum*, le suivi de l'effet intégratif des contaminants, au travers des biomarqueurs, est nécessaire pour détecter de façon plus précise et globale l'impact des métaux et métalloïdes sur l'environnement.

Les biomarqueurs les plus couramment utilisés sont les enzymes antioxydants, la teneur en MDA, les pigments chlorophylliens en relation avec les activités photosynthétiques, ainsi que les biomarqueurs morphologiques (croissance, racines, ramifications...).

Ainsi, l'étude des biomarqueurs de *Myriophyllum alterniflorum* est importante pour sélectionner ceux qui sont spécifiques des contaminants d'intérêt. Il sera par conséquent intéressant de suivre l'activité de γ -glutamyl cystéine synthétase spécifique du stress métallique (Reisinger *et al.*, 2008).

Par ailleurs, pour avoir une vision globale des effets des contaminants, un large panel de biomarqueurs doit être étudié :

- Au niveau physiologique, il s'agira du potentiel osmotique et des pigments chlorophylliens.
- Au niveau biochimique, ce seront d'une part, (i) les biomarqueurs liés au système de défense antioxydant :
 - a. La proline libre : chélateur de métaux et antioxydant.
 - b. L'activité de γ -GCS : enzyme de la voie de biosynthèse des PC qui complexent les métaux/métalloïdes.
 - c. L'activité de G6PDH : enzyme de voie des pentoses phosphates sensibles à différents stress dont le stress métallique.

Et d'autre part, (ii) au système oxydant :

- (a) L'activité de nitrate réductase : enzyme du métabolisme azoté sensible à une diminution de l'activité photosynthétique provoqué notamment par le stress métallique.
- (b) Le MDA : produit de dégradation des lipides membranaires en lien avec le stress oxydant (peroxydation) provoqué par la présence de métaux/métalloïdes.

D'après la bibliographie, la durée d'exposition des plantes aux contaminants influence les réponses de leurs biomarqueurs. Ainsi, l'influence de la durée d'exposition devra être prise en compte dans l'étude de la réponse des biomarqueurs des plantes dans les études *in situ*.

L'objectif de cette étude sera donc d'identifier les biomarqueurs de *Myriophyllum alterniflorum* les plus pertinents en termes d'effet global des pressions anthropiques (urbaines ou industrielles) et en termes de détection de contaminants spécifiques associées à ces pressions, en considérant l'impact de la durée d'exposition.

Chapitre II. Matériels et méthodes

Les matériels et méthodes utilisés pour cette étude de l'intérêt de *Myriophyllum alterniflorum* pour la détection de contaminants sont présentés dans ce chapitre.

Dans un premier temps, le protocole de culture de *Myriophyllum alterniflorum* sera décrit, ainsi que les conditions de son déploiement *in situ*, avec le choix des sites d'études. Un bilan concernant les modalités de suivi de la qualité des eaux sera fait. Par la suite, la méthodologie de suivi de l'accumulation des métaux/métalloïdes dans le myriophylle ainsi que le suivi de la réponse des biomarqueurs sera exposée (figure 25).

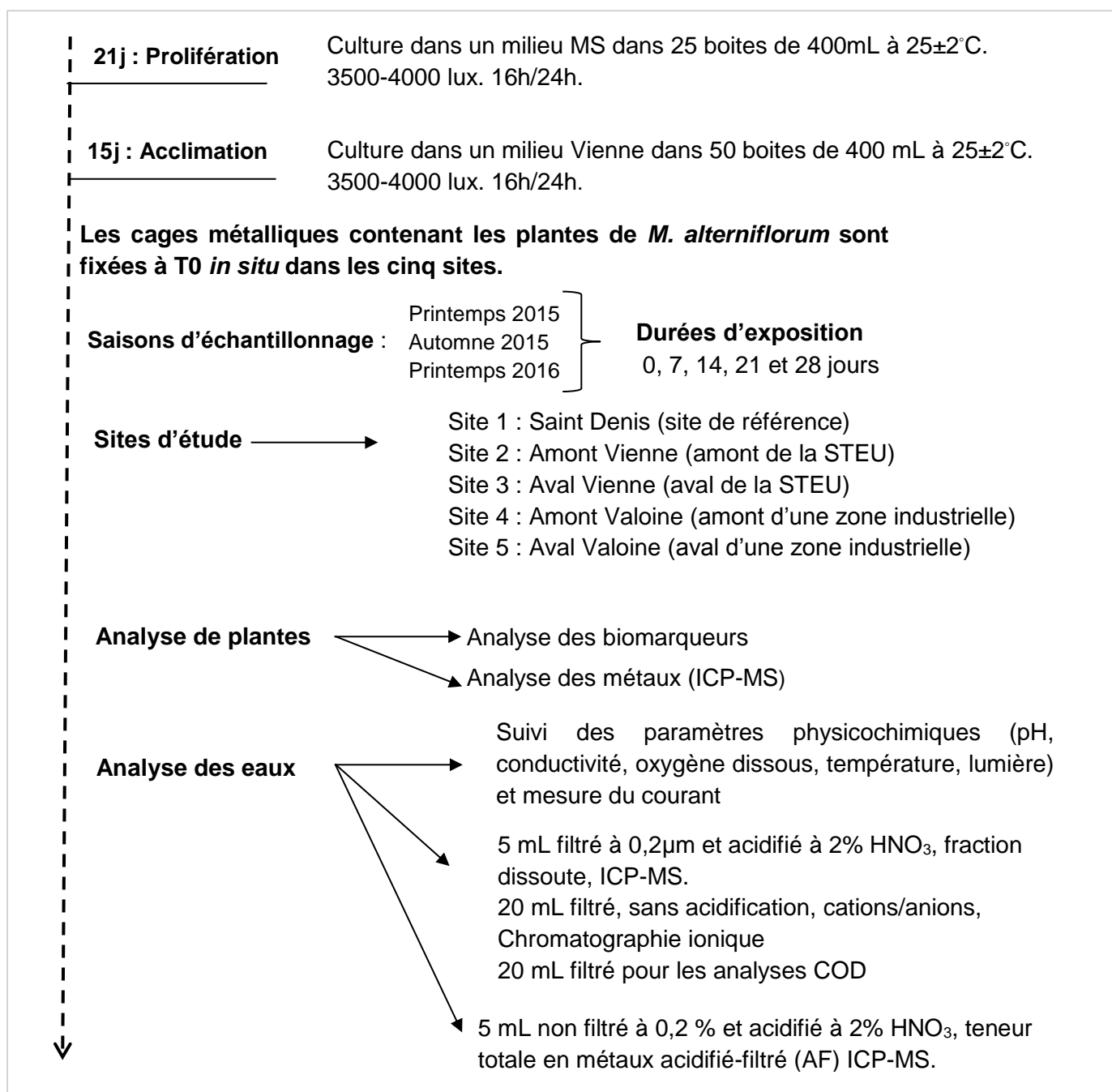


Figure 25. Récapitulatif chronologique de l'étude.

II.1. Matériel biologique, milieu de test et présentation des sites d'études

II.1.1. Matériel végétal utilisé

Myriophyllum alterniflorum ou Myriophylle à fleurs alternes, est la plante utilisée dans ce travail. Cette plante a été collectée dans la rivière Vienne près du pont Fournet à Rempnat (Haute Vienne), à 23,9 km de la source (Delmail, 2011). Elle a été désinfectée et cultivée *in vitro* dans un milieu Murashige et Skoog «MS» stérile (Murashige et Skoog, 1962) (cf. annexe 2, tableau 24), afin d'obtenir une population clonale d'individus identiques pour réaliser les tests de paramètres étudiés.

II.1.2. Culture *in Vitro* de myriophylle dans le milieu Vienne

Un milieu synthétique, nommé « milieu Vienne », ayant une composition comparable aux eaux de la rivière Vienne est préparé (tableau 1). Un ajout de saccharose, utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la plante est fait. Le milieu de la préparation est distribué dans des boîtes de 400 mL stérilisées. Les macrophytes de chaque boîte (cultivés dans le milieu Murashige et Skoog «MS» (Murashige et Skoog, 1962)) sont divisés en deux pour obtenir deux lots qui seront repiqués dans les boîtes contenant la solution Vienne (Krayem, 2015). Ces macrophytes repiqués sont laissés pour 15 jours d'acclimatation dans les conditions de culture de ce milieu Vienne, avant d'être mis en place *in situ*.

Tableau 1. Composition du milieu Vienne oligotrophe (Krayem, 2015).

Réactifs	Concentration massique en mg/L
<i>Solution A</i>	
CaCl_2	18,22
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	3,15
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	11,21
<i>Solution B</i>	
KHCO_3	3
NaHCO_3	14,87
NaNO_3	0
<i>Solution C</i>	
KH_2PO_4	0,143
NH_4NO_3	0,444
<i>Solution D</i>	
H_2SiO_3	11,48
<i>Oligoéléments</i>	
<i>Solution E</i>	
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,00120
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,00392
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,0131
$\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,0121
Na_2SeO_3	0,0022
$\text{MnSO}_4, 1\text{H}_2\text{O}$	0,073
<i>Solution F</i>	
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1,05
H_3BO_3	0,57

II.1.3. Mise en œuvre de la culture en système *In situ*

Après 15 jours d'acclimatation dans le milieu synthétique Vienne en laboratoire, les plantes de *Myriophyllum alterniflorum* sont réintroduits *in situ* dans les différents sites (profondeur 50cm en moyenne ; et pas très loin (1-3 m) de la berge de la rivière). Les conditions correspondant à chaque site sont rappelées ci-dessous :

Site 1 : Saint-Denis : site référence (Combade, Amont confluence Vienne- Pont du Rateau).

Site 2 : Amont Vienne, zone urbanisée mais peu d'entrants anthropiques.

Site 3 : Aval Vienne, aval du rejet de la station de traitement des eaux usées de Limoges.

Site 4 : Amont Valoine : pollution agricole diffuse, amont des rejets de la zone industrielle.

Site 5 : Aval Valoine : aval des rejets industriels.

Les plants de *M. alterniflorum* cultivés dans le milieu Vienne sont placés par lot de neuf boîtes de culture (100-150 plants/boîte), dans des cages métalliques (en acier) grillagées conçues spécifiquement pour les expérimentations de terrain. Les cages sont positionnées dans les sites dans le courant de la rivière (figure 26). Pour rester stables, elles sont reliées avec du fil métallique à des pierres immergées (parpaings). Ces plantes sont disposées pour une durée de 28 jours.



Figure 26. Implantation des myriophylles *in situ* dans les cages pendant 28 jours.

II.1.4. Choix des sites d'étude

Le département de la Haute Vienne est constitué de plateaux formés de roches cristallines et métamorphiques, il appartient au massif central. En milieu de socle cristallin fissuré et altéré, les ressources aquifères sont généralement médiocres. Les sources sont nombreuses, souvent diffuses, à débit faible et fluctuant.

Forêts de conifères	■
Forêts de feuillus	■
Prairies et autres zones encore en herbe pour l'agriculture	■
Zones industrielles et commerciales	■
Zones urbanisées	■
Voies et cours d'eau	■

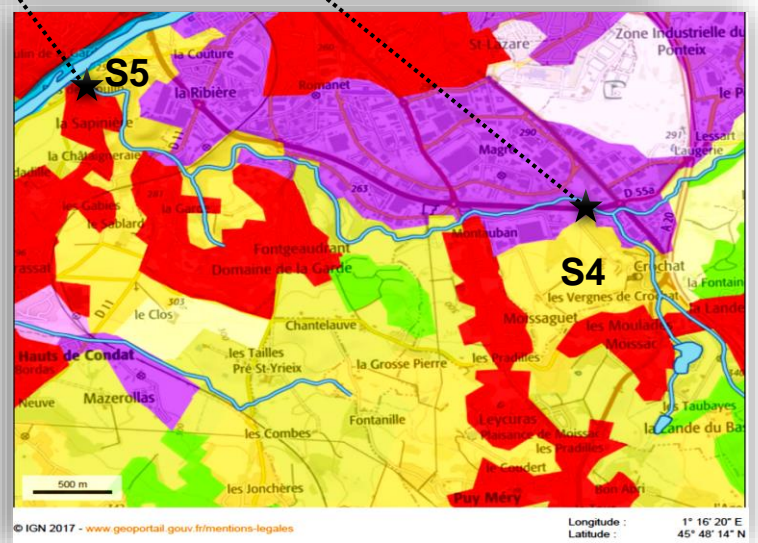
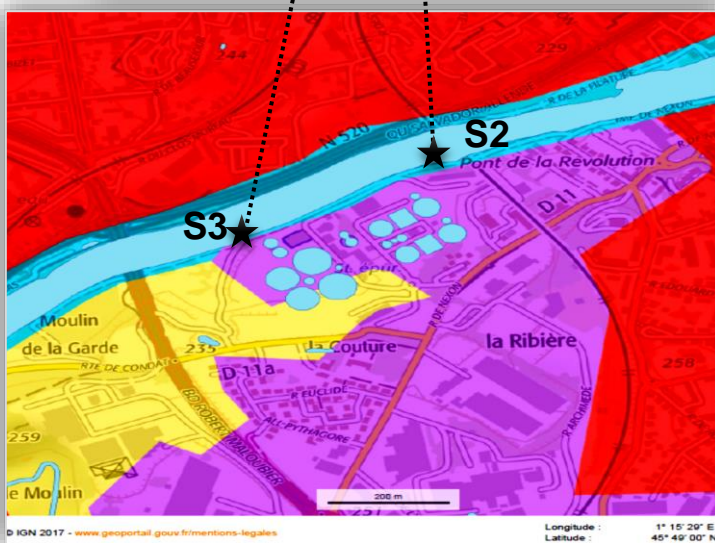
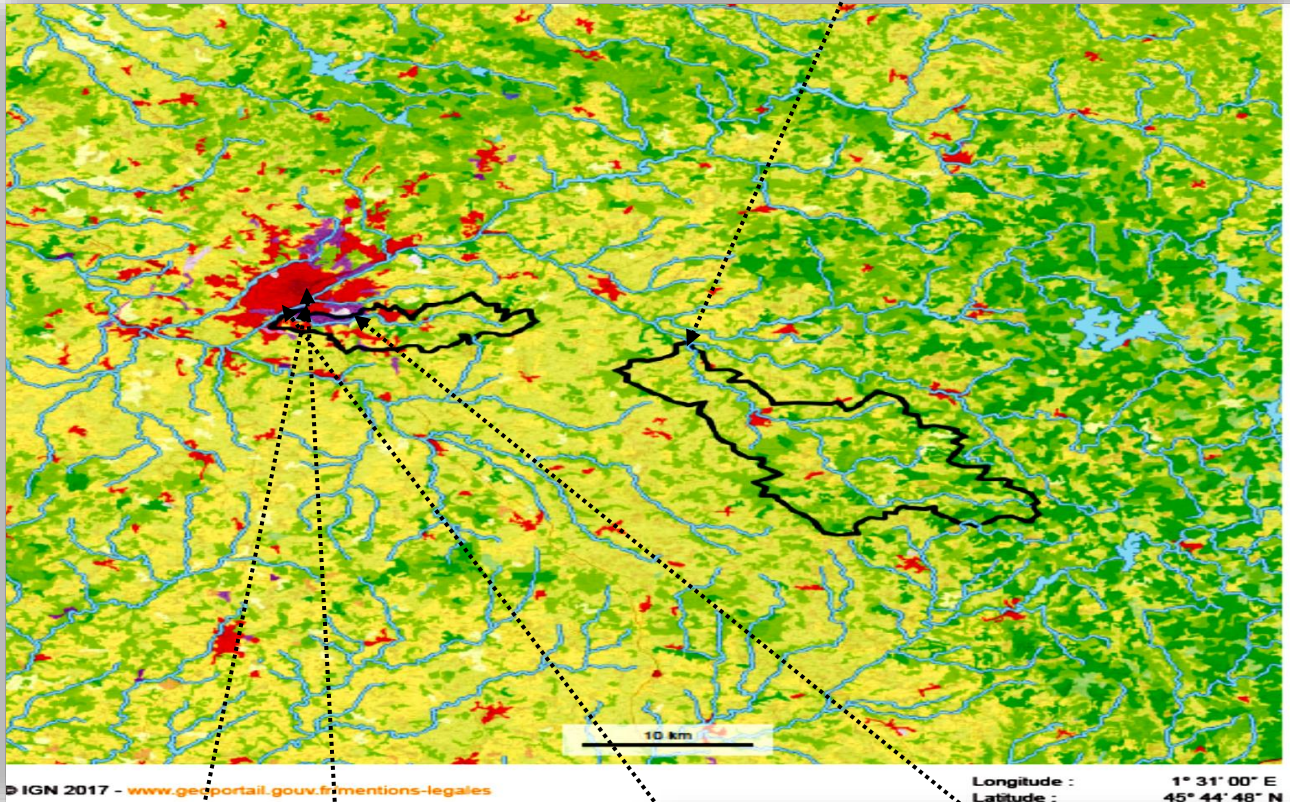


Figure 27. Carte d'occupation du sol des cinq sites étudiés (S1 "Saint-Denis", S2 "amont Vienne", S3 "aval Vienne", S4 "amont Valoine", S5 "aval Valoine") (géoportail).

En Limousin, l'acidité est le caractère commun des sols du bassin versant de la Vienne. La zone des sources s'étend sur des sols bruns marqués par la podzolisation et riches en matières organiques. Le fond géochimique des sols dans et sur lesquels circulent les eaux peut aussi conduire à la présence de polluants (exemple, arsenic) dans les milieux aquatiques (l'arsenic est présent dans le massif cristallin, et dans le Limousin, il est principalement lié aux zones aurifères) (Bossy, 2010). Les caractéristiques des eaux correspondant au fond géochimique de l'ensemble des sites d'étude sont des eaux douces et agressives, avec des teneurs en TAC et TH faibles (2 à 4°F).

En règle générale, on observe sur les cours d'eau, de l'amont à l'aval, une augmentation du débit, de la profondeur, de la largeur du lit et de la vallée, et à l'inverse, une diminution de la pente, de la vitesse de l'eau et de la granulométrie.

Malgré l'artificialisation des débits, les régimes des cours d'eau sont marqués par les épisodes pluviométriques des bassins amont. Ainsi, le régime annuel des cours d'eau du bassin présente deux périodes bien marquées, avec des hautes eaux de novembre à mai et des basses eaux de juin à octobre. Cette différenciation saisonnière est d'autant plus marquée que l'on va vers l'aval.

En région Limousin, les débits sont compris entre 12 et 22 L/s/km². Les débits de la Vienne à l'amont de Limoges sont étroitement dépendants de la gestion des ouvrages EDF sur les deux chaînes de barrages : la Maulde et le Taurion.

Dans le bassin de la Vienne, les activités agricoles sont importantes. En effet, elles représentent 12% de l'emploi au niveau départemental. En Limousin, se trouve l'un des plus importants troupeaux de bovins à viande de France. Il représente 11% du troupeau national. Les surfaces en herbe correspondent aux espaces où domine l'élevage ovin (Forces et faiblesses du bassin de la Vienne, conseil régional de Limousin - 2004).

L'industrie du bassin de la Vienne est une industrie manufacturière qui repose sur de petites et moyennes entreprises. En outre, l'activité industrielle est ancienne dans le Limousin, les activités traditionnelles du bois, du cuir, des porcelaines... Les industries agricoles et alimentaires (en particulier la transformation porcine) représentent 1% de l'ensemble national des industries agroalimentaires. Les industries bois-papier carton et édition-imprimerie représente 5 % de la production nationale (Forces et faiblesses du bassin de la Vienne, conseil régional de Limousin - 2004).

L'occupation du sol traduit l'influence de la géologie, des reliefs et du climat.

Le bassin versant amont (où se trouve le site S1) est marqué par le développement des forêts, des prairies et par la présence des tourbières. En revanche, les activités urbaines et industrielles sont absentes. Une bonne qualité d'eau et des peuplements piscicoles riches avec notamment la truite caractérisent les cours d'eau dans ce bassin ("Elaboration du SAGE Vienne - Etablissement Public Territorial du Bassin de la Vienne, 2006").

Le bassin médian (où se trouve les sites S2, S3, S4 et S5) est caractérisé par une dense activité économique qui repose sur la présence de l'agglomération de Limoges, d'une zone industrielle importante et d'une agriculture extensive. Les forêts majoritaires à l'amont laissent la place aux terres arables, aux prairies et aux cultures. Les cours d'eau sont particulièrement

sensibles aux pollutions liées à ces activités (“Elaboration du SAGE Vienne - Etablissement Public Territorial du Bassin de la Vienne, 2006”).

II.1.4.1. Saint Denis les Murs (S1) (bassin amont)

La ville de Saint Denis les Murs se situe au Sud-Est de la Haute Vienne, à environ 20 km à l'Est de Limoges (Latitude 45.785470, Longitude 1.553173). La Combade est un affluent de la Vienne, de 40,8 km de longueur. Le sol du bassin versant est occupé par des prairies permanentes et temporaires, ainsi que par quelques cultures de blé et céréales (figure 27). Les roches correspondent à l'ère Cénozoïque. À Masléon, sur la Combade, le débit moyen annuel est de 3,59 m³/s pour un bassin versant de 188 km² et à 290 m d'altitude.

La rivière présente des fluctuations saisonnières de débit typiques de la région, avec des crues hivernales de décembre à avril inclus, et des basses eaux de juillet à octobre. Ce site a été sélectionné comme site référence, avec peu de perturbations liées aux activités humaines.

II.1.4.2. Sites Vienne (Amont, S2 et Aval Vienne, S3) (bassin médian)

Le bassin de la Vienne est caractérisé par des sols de gneiss et de granites. Le sol est imperméable, ce qui induit un important ruissellement durant les périodes de précipitations, et augmente le lessivage des sols et par suite le transfert de pollution.

Le second site de prélèvement amont de la station d'épuration (S2) se situe en zone urbaine (Latitude 45.818801, Longitude 1.259659). Les rejets industriels ne sont pas importants et les activités agricoles se limitent à quelques zones de culture et de pâturages en amont (figure 27).

Le troisième site de prélèvement se trouve en aval de la station de traitement des eaux usées (S3), d'une capacité de 285 000 EH, à proximité du point du rejet (Latitude 45.817552, Longitude 1.256487) (figure 27). La station d'épuration de Limoges traite les pollutions azotée et phosphorée de façon poussée, la Vienne étant classée comme sensible à l'eutrophisation (comme tout le bassin Loire-Bretagne).

Les points d'échantillonnage sélectionnés, se situant en amont et en aval de la station de traitement des usées doivent permettre de mettre en évidence la réponse spécifique des biomarqueurs du myriophylle, générée par le rejet des eaux résiduaires urbaines.

II.1.4.3. Sites Valoine (Amont, S4 et Aval Valoine, S5) (bassin médian)

La Valoine est un affluent de la Vienne en rive gauche. La Valoine naît au Séchères, sur la commune d'Aureil (Haute-Vienne). D'une longueur de 19,4 km ; elle draine un bassin versant de 46 km². La Valoine traverse cinq communes (Aureil, Eyjeaux, Feytiat, Limoges, Condat). La zone subit de fortes pressions anthropiques et est imperméabilisée. En amont de la zone industrielle de la Valoine sur le bassin versant (Latitude 45.803208, Longitude 1.291386), les eaux de surface sont affectées par les activités agricoles (figure 27).

En aval, les activités industrielles (traitement de surface entre autres) peuvent ou ont occasionné des rejets de métaux dans cette zone (Latitude 45.812427, Longitude 1.247920) (“Forces et faiblesses du bassin de la Vienne, conseil régional de Limousin - 2004”) (figure 27).

Les points d'échantillonnage sélectionnés, se situant en amont et en aval de cette zone industrielle, doivent permettre de mettre en évidence la réponse spécifique des biomarqueurs du myriophylle à ce type de pollution métallique.

II.2. Méthodologie de mesure des paramètres de l'étude

II.2.1. Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques (pH, température, conductivité, oxygène dissous) ont été mesurés *in situ* à l'aide d'un système multi paramètres (Water Quality WTW Multi-Parameter Field Meters) de Geotech Environmental Equipment «MULTI 3430 SET F WTW». Le Multi 3430 SET F comporte une sonde de pH IDS SenTix®940 (+-0,004), une sonde optique pour la détermination de la teneur en oxygène dissous FDO®925 (+-0,5%) et une cellule de mesure de conductivité IDS TetraCon®925 (+-0,5%). La vitesse de courant est mesurée par un courantomètre (Marsh-McBirney Model 2000 Flo-Mate), et l'intensité de la lumière est mesurée par un luxmètre (Light meter).

Le calibrage s'effectue au moyen de solutions standardisées spécifiques pour les paramètres à mesurer. Les solutions tampons utilisées pour le pH sont quatre et sept. Le récipient de stockage pour le capteur d'oxygène de WTW (FDO* Control) permet le calibrage à saturation (air saturé en vapeur d'eau). Le contrôle de la conductivité de l'eau se fait par des solutions étalons adaptées (KCl (NORMAPUR) 10^{-3} M correspondant à 141 μ S/cm).

Dans le cas de ce travail où les rivières ont une faible profondeur, l'échantillonnage se fait par remplissage des tubes à la main, au milieu de la rivière, face au courant. Après au minimum trois rinçages avec l'eau à prélever, les flacons sont remplis (absence d'air), puis les échantillons sont conservés en glacière $4\pm 3^{\circ}\text{C}$, à l'obscurité.

II.2.2. Dosage des éléments majeurs

Après avoir été conservés dans la chambre froide à 4°C , une filtration des échantillons destinés à l'analyse des éléments majeurs dans l'eau était faite à l'aide d'un filtre seringue en acétate de cellulose $0,2\ \mu\text{m}$ (Minisart Sartorius stedim VWR). 500 μL de l'échantillon sont analysés par chromatographie ionique (Dionex Dx 120).

Tableau 2. Limites de quantification des anions et cations majeurs analysés par chromatographie ionique (Dionex dx.20)

	Anions				Cations			
	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
LQ validée (mg/L)	0,25	0,075	0,45	0,075	0,1	0,15	0,25	0,25

Les concentrations en phosphate dans le milieu étant inférieures aux limites de quantification de l'appareil Dionex Dx120, elles ont été analysées par colorimétrie, selon la méthode normalisée standard (NFT 90-023) de Murphy et Riley (1962).

Ce dosage colorimétrique pour les phosphates, consiste en la formation d'un complexe phosphomolybdique de couleur bleu après réduction par l'acide ascorbique. Le protocole appliqué consiste à ajouter à 2 mL d'échantillon, 0,1 mL d'acide ascorbique à 20g/L (agitation forte) et 0,4 mL de réactif combiné (tartrate de potassium et d'antimoine à 2,8g/L (Sigma-Aldrich), molybdate d'ammonium à 40g/L (Sigma-Aldrich, 99%).

Après agitation, le développement de la coloration bleue aura lieu pendant 30 min. L'absorbance est ensuite, mesurée par un spectrophotomètre (Helios β Thermo Spectronic) à 880 nm de longueur d'onde dans une cuve de 10mm (LQ 10 μ g/L).

Une droite d'étalonnage est faite avec des concentrations de 0 à 1 mg/L à partir d'une solution mère de phosphate (40mg P/L) préparée avec du dihydrogénophosphate de potassium KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich Normapur, 99%).

II.2.3. Analyse du COD

La détermination du carbone organique dissous (COD) (mg/L) a permis d'évaluer la quantité de matière organique présente dans les échantillons. La mesure du COD est réalisée à l'aide d'un COT-mètre SHIMADZU® TOC-L (précision \pm 2%, limite de détection 50 μ gC.L⁻¹). Une première étape d'acidification (HCl 1M) et de bullage à l'air synthétique (qualité 5.0, 3 min) permet de dégazer le carbone inorganique.

L'échantillon est ensuite oxydé thermiquement à 720°C et le CO₂ produit par la combustion de la MO est quantifié par détection par infrarouge. La quantification du COD nécessite un étalonnage avec une solution connue d'hydrogénophthalate de potassium. L'analyse est effectuée en duplicat ou triplicat sur un échantillon préalablement filtré à 0,2 μ m sur filtre seringue en acétate de cellulose.

II.2.4. Dosage des teneurs en métaux (teneur acidifiée-filtrée (AF) ou teneur dans la fraction dissoute)

Cette méthode est issue des travaux de Krayem (2015). La teneur « AF » en contaminant dans l'échantillon est obtenue en acidifiant 10 mL de l'échantillon brut avec 200 μ L de HNO₃ (69%, Suprapur for trace element analysis). Par la suite une filtration via un filtre seringue en acétate de cellulose 0,2 μ m est réalisée avant de procéder à l'analyse par ICP-MS (7700, Agilent technologie).

Pour déterminer la teneur en contaminant dans la fraction dissoute, un autre volume de 10 mL a été filtré par un filtre seringue en acétate de cellulose 0,2 μ m, et ensuite, l'acidification est appliquée avec 200 μ L de HNO₃ (69%, Suprapur for trace element analysis) et suivie par l'analyse par ICP-MS (7700, Agilent technologie).

Tableau 3. Limite de détection et de quantification des éléments mineurs analysés par ICP-MS (7700, Agilent technologie)

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As
LD (μ g/L)	0,02	0,01	0,02	0,03	0,73	0,01
LQ (μ g/L)	0,03	0,02	0,03	0,04	0,93	0,03

Avec :

LD : la concentration la plus faible du métal/métalloïde à analyser, et peut être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc (avec une probabilité donnée), mais non nécessairement quantifiée.

LQ : la concentration la plus faible du métal/métalloïde à analyser, et peut être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites par ICP-MS avec une variabilité définie.

II.2.5. Analyse des concentrations des contaminants dans la plante

II.2.5.1. Echantillons de végétaux

Une minéralisation est réalisée pour mesurer les concentrations en métaux accumulées par la plante. Pour chaque échantillon, 0,5 g de masse fraîche de myriophylle a été séché pendant 48 heures à l'étuve à 60°C.

Une fois sèche, 4 ml HNO₃ 69% (Xilab, for trace element analysis), et 2 ml H₂O₂ 30% (Prolabo, 30 %) sont ajoutés à l'échantillon ; le mélange est laissé sous la hotte pendant la nuit, puis une minéralisation est réalisée à l'étuve avec une température 60°C pendant 48h. Ensuite, le volume de l'échantillon est ajusté à 10 ml par de l'eau ultra-pure. Les échantillons sont filtrés et conservés à 4°C avant leur analyse par ICP-MS (7700, Agilent technologie) (Delmail, 2011).

II.2.5.2. Facteur de bioconcentration (BCF)

Après l'analyse des concentrations des métaux/métalloïdes accumulées à l'intérieur des myriophylles par ICP-MS, le facteur de bioconcentration (BCF) a été calculé selon Liu *et al.* (2014). Le BCF (L/kg MS) est défini comme le ratio à l'état d'équilibre entre la concentration en contaminant dans la plante (C_B µg/Kg MS) sur la concentration en contaminant dissous dans l'eau (n=5 par site) (C_E, µg/L). (C_B, µg/g MS x 1000 = C_B, µg/Kg MS).

$$BCF = \frac{[C_b]}{[C_E]} \quad \text{Equation (1)}$$

II.2.6. Analyse de biomarqueurs

II.2.6.1. Extraction des protéines totales

Le protocole d'extraction employé a été inspiré à partir de celui de Srivastava *et al.* (2006). 500 mg de *M. alterniflorum* en masse fraîche sont broyés à 4°C avec un pilon dans un mortier entouré de glace pilée. Le broyage se fait en présence d'un mélange réactionnel de 800µL composé de 100mM de KH₂PO₄ et 100mM de K₂HPO₄ (pH à 7), 0,1mM d'EDTA pour réduire l'activité protéolytique des protéases, 1mM de fluorure de phényl-méthane-sulfonyle (PMSF) ayant le même rôle que l'EDTA et 3,75% de polyvinyl pyrrolidone (PVP) (m/v) pour éviter que les phlorotanins ne perturbent les activités enzymatiques.

Une fois que l'extrait est homogène, le mélange (800µL) est centrifugé à 15000rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et utilisé comme extrait protéique pour les différentes analyses biochimiques telles que le G6PDH, le dosage de protéines totales, les activités des enzymes antioxydants.

II.2.6.2. Dosage des protéines totales

La méthodologie de Bradford (1976) est utilisée pour déterminer la concentration en protéines totales présente dans chaque échantillon. Ce dosage colorimétrique en spectrophotométrie UV-visible est basé sur le changement d'absorbance à 595 nm de bleu de Coomassie. Après complexation avec les domaines hydrophobes des acides aminés constituant les protéines, le bleu de Coomassie contenu dans le réactif de Bradford vire du rouge au bleu. L'absorbance est ensuite mesurée à 595 nm.

Cette valeur est ensuite reportée sur une courbe étalon établie à partir d'une solution d'albumine de sérum de bovin (BSA) de concentration connue et mesurée à 595 nm, permettant ainsi de déterminer la concentration en protéines totales de l'échantillon étudié.

II.2.6.3. Dosage de l'activité de glucose 6-phosphate déshydrogénase

L'activité enzymatique de la G6PDH est analysée par une méthodologie établie à partir du protocole de Delmail (2011) mesurant la capacité de cette protéine à catalyser la première réaction des pentoses phosphates en oxydant le G6P (glucose 6-phosphate) en 6PG (6-phosphogluconolactone) et en réduisant le NADP en NADPH. NADPH est aussi indispensable pour que se réalise la destruction du peroxyde d'hydrogène (toxique pour la cellule). Le taux de formation de NADPH est proportionnel à l'activité de la G6PDH et sa concentration est déterminée par son absorbance à 340 nm en spectrophotométrie UV.

Dans une cuve de spectrophotomètre, un mélange réactionnel de 3mL est réalisé ; il est composé de : 0,15 M de Tris-HCL (pH 8,0), 0,1mM de NADP, 1mM de PMSF pour réduire l'activité protéinique des protéases, 3mM de β -mercaptoéthanol et 2% d'extrait protéique (v/v). L'augmentation de l'absorbance est mesurée durant 3 min. L'activité de la G6PDH est exprimée en μ kat/mg P, par l'équation suivante (un μ katal correspondant à la quantité de protéine nécessaire pour augmenter l'absorbance de $1,66 \cdot 10^{-4}$ à 340 nm par minute) :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta\text{Abs}_{340}}{(1,66E-04 \times m_{\text{prot}})} \quad \text{Equation (2)}$$

Avec : ΔAbs_{340} , différence d'absorbance de l'échantillon par minute mesurée à 340 nm. m_{prot} masse de protéines totales de l'échantillon (partie 1, 2) (mg) (Delmail, 2011).

II.2.6.4. Dosage de l'activité du γ -glutamylcystéine synthétase

Le réactif utilisé (800 μ L) est composé de 100 mM d'acide N-[2- Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthane sulfonique] (HEPES) à pH 7,5, 150 mM de NaCl, 20 mM de MgCl_2 , 5 mM d'ATP, 2 mM de phosphoénol pyruvate, 10 mM de cystéine, 20 mM de glutamate, 0,2 mM de NADH, 5 unités de pyruvate kinase de muscle de lapin et 10 unités de lactate déshydrogénase de type II de muscle de lapin (Jez *et al.*, 2004).

La réaction débute avec l'ajout à température ambiante de 75 μ g de protéines dans un mélange d'extraction (200 μ L). L'absorbance (DO) est lue au spectrophotomètre à 340 nm à $T = 0$ min et $T = 5$ min. La diminution de la DO correspond à la consommation de NADH (nicotinamide-adénine dinucléotide) pour générer l'ATP nécessaire à l'activité de l'enzyme testée. Elle est donc proportionnelle à la quantité de γ -glutamylcystéine formée. Une gamme étalon est réalisée avec du NADH de 0 à 2 μ mol/L. L'activité enzymatique spécifique est exprimée en nmoles de γ -glutamylcystéine formée par minute et par mg de protéines.

II.2.6.5. Analyse de la teneur en malondialdéhyde (MDA)

L'analyse du malondialdéhyde (MDA) est effectuée en broyant 250 mg de masse fraîche dans de l'acide trichloracétique (TCA) (Sigma Aldrich, 98%) à 1%, à l'aide de sable de Fontainebleau (Prolabo, 150-200 μ m). Le mélange est ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min à 4° C dans une centrifugeuse (3-18 K, Sigma). Pour 1 mL du surnageant, 1 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,5% a été ajouté (Krayem, 2015).

Le mélange est chauffé pendant 30 min à 100°C dans un bain-marie. Après une deuxième centrifugation (5000 rpm, 10 min, 4°C), l'absorbance est lue à 532 nm. La quantité de MDA a été calculée selon l'équation suivante et exprimée en mmol/g de matière fraîche :

$$[\text{MDA} = \frac{\text{Abs}_{532} \times 1000}{(\epsilon \times l \times \text{Mé})}] \quad \text{Equation (3)}$$

Avec : Abs₅₃₂, absorbance de l'échantillon à 532nm ; ϵ , coefficient d'extinction molaire (155mM⁻¹ cm⁻¹) ; l , longueur du trajet optique (1 cm) ; Mé, masse de l'échantillon (0,25g).

II.2.6.6. Dosage de la concentration en proline libre

La concentration en proline libre est dosé à partir du protocole de Bates *et al* (1973). 200 mg de *M. alterniflorum* en masse fraîche sont broyés à 4°C avec un pilon dans un mortier entouré de glace pilée, et contenant 1g de sable de fontainebleau et 2 mL d'acide 5 sulfosalicylique à 3% (v/v). Le broyat est centrifugé à 10000 rpm durant 10 min à 4°C (3-18K, Sigma Aldrich).

Le surnageant (1mL) est placé dans un tube à essai contenant au préalable 2 mL de ninhydrine à 10 % (m/v) (composé aromatique se complexant à la proline libre en formant une liaison imine caractérisée par une double liaison carbone azote, et permettant la formation d'un chromophore) dans de l'acide acétique glacial pur. Les tubes sont enveloppés dans une feuille d'aluminium pour limiter la photo-dégradation de l'acide aminé étudié, puis les tubes sont placés au bain marie à 100 °C durant une heure. La réaction est ensuite arrêtée rapidement en plongeant le tube dans un bain de glace pilée à 4°C.

4 mL de toluène sont ajoutés dans le mélange réactionnel afin de séparer le chromophore de la phase aqueuse. L'ensemble est soumis à un vortex durant 30 secondes et l'absorbance du chromophore présent dans la phase organique est mesurée à 520 nm en spectrophotométrie UV-visible. Cette valeur est ensuite reportée sur un courbe étalon établi à partir d'une solution de L-proline pure et mesurée à 520 nm, permettant ainsi de déterminer la concentration en proline de l'échantillon étudié.

II.2.6.7. Analyse de potentiel osmotique

Le potentiel osmotique (Ψ_s) a été déterminé à l'aide d'un osmomètre à pression de vapeur (13 DR Automatic, Roebing). 100 mg de matières fraîches issues de l'apex des plantes de myriophylle ont été broyées avec 500 μ L d'eau distillée dans un mortier avec un pilon, puis centrifugés à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C dans une centrifugeuse (3-18 K, Sigma). 100 μ L du surnageant ont été utilisés pour l'analyse. Les données obtenues en mosmol/kg sont converties en MPa (-2,5 MPa correspondant à 1000 mosmol/kg) (Krayem, 2015).

II.2.6.8. Dosage de l'activité de nitrate réductase

L'activité de nitrate réductase (NR) a été déterminée à l'aide de la méthode de Srivastava (1974). 0,3g de masse fraîche ont été coupés en petits morceaux et mis dans des tubes de 5mL remplis de milieu d'incubation (solution tampon de phosphate de 0,1 M 7,5 pH et 200 mM à KNO₃ et à 0,5 % n-propanol), et laissés dans l'obscurité pendant deux heures à 30°C. Ensuite, à la partie aliquote de 1 ml, la sulfanilamide de 1 ml (1% dans 3N HCL) et l'éthylènediaminhydrochloride de naphthyle de 1 ml 0,02% ont été ajoutés et secoués complètement. Après avoir été conservé pendant 25 minutes pour le développement de couleur, l'absorbance de l'échantillon est lue à 540nm. L'activité de NR est calculée en utilisant le courbe étalon établie à partir d'une solution du nitrite et exprimée en μ mol/h/g MF.

II.2.6.9. Mesure des concentrations en chlorophylle a, b et caroténoïdes

Les mesures de la concentration en chlorophylle sont réalisées sur les apex (2 cm) selon le protocole adapté par Delmail (2011). 250 mg de masse fraîche sont broyées à 4°C, dans un mortier avec 0,4 g de sable de Fontainebleau (Normapur Prolabo, 150-200 µm), et 5 mg de carbonate de magnésium MgCO₃ (Merck, 99%) pour éliminer l'acidité des tissus. Ensuite, 20mL d'acétone pur à 100% (Fisher chemical, 99,98%) sont ajoutés au mélange avec une masse 1,25 g de sodium sulfate Na₂SO₄ (Normapur Prolabo, 99%), puis mélangés ensemble, jusqu'à l'homogénéisation complète de la solution. La solution est ensuite centrifugée à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C, dans une centrifugeuse (3-18 K, Sigma).

Une partie du surnageant (6 mL) est récupérée et additionnée avec de l'eau distillée (1,5 mL) pour avoir un extrait acétonique à 80 %. L'absorbance de la solution est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible (Heliosβ Thermo Spectronic) à trois longueurs d'ondes : 470, 646,6 et 663,6 nm. Les concentrations des chlorophylles a et b (Chl a et Chl b) sont calculées selon les formules de Porra (2002) et selon Lichtenthaler et Wellburn (1983) pour les caroténoïdes (CAR).

$$[\text{Chl a}] = \frac{1000 \times V \times E \times (12,25 \times \text{Abs}_{663,6} - 2,55 \times \text{Abs}_{646,6})}{(\text{Mé} \times S)} \quad \text{Equation (4)}$$

$$[\text{Chl b}] = \frac{1000 \times V \times E \times (12,25 \times \text{Abs}_{646,6} - 2,55 \times \text{Abs}_{663,6})}{(\text{Mé} \times S)} \quad \text{Equation (5)}$$

$$[\text{Cart}] = \frac{1000 \times V \times E \times (\text{Abs}_{470} - 3,27 \times [\text{Chl a}] - 104 \times [\text{Chl b}])}{(227 \times \text{Mé} \times S)} \quad \text{Equation (6)}$$

Avec : [Chl a], concentration en chlorophylle en (µg/g masse fraîche) ; [Chl b] concentration en chlorophylle b (µg/g masse fraîche) ; [Cart] concentration en caroténoïdes (µg/g masse fraîche) ; V, volume d'acétone pur utilisé ; E, volume de l'extrait acétonique à 80 %, Abs_x, absorbance de l'échantillon mesurée à la longueur X nm ; Mé, masse de l'échantillon ; S, volume de surnageant récupéré.

II.3. Méthodologie de traitement des résultats

Une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de Tuckey de comparaison post-hoc, dans le programme PAST 3.17 (Hammer *et al.*, 2001), a été utilisée pour l'évaluation des données univariées avec un seuil de confiance de 95 % (p < 0,05). La corrélation de Pearson entre les différents paramètres dans l'eau et la plante a été appliquée. L'analyse en composantes principales (ACP), l'analyse canonique des correspondances (ACC) et les analyses de Co-inertie ont été effectuées en utilisant Past 3.17 et R v. 3.1.2 (Hammer *et al.*, 2001 ; R Development Core Team, 2015).

L'ANOVA à un facteur (analyse de variance) est une procédure statistique pour tester l'hypothèse nulle que plusieurs ensembles de données univariées (en colonnes) ont la même moyenne. Les ensembles de données doivent être proches de la distribution normale (Dufour).

Avec un grand nombre de variables, la matrice de dispersion peut être trop grande pour être étudiée et interprétée correctement. Il y aurait trop de corrélations par paire entre les variables à considérer. Ainsi, pour interpréter les données sous une forme plus significative, il est nécessaire de réduire le nombre de variables à quelques combinaisons linéaires interprétables des données. Chaque combinaison linéaire correspondra à un composant principal. L'analyse en composantes principales (ACP) est une procédure de recherche hypothétique variable (composants) qui représente une vision multidimensionnelle des données étudiées (Dufour, 2009).

L'ACC est une méthode statistique exploratoire permettant d'explorer les relations entre deux ensembles de variables multivariées (vecteurs), toutes mesurées sur le même individu (Dufour, 2009). L'analyse de Co-inertie mesure la concordance entre deux ensembles, La relation entre les deux ensembles de données est fourni par l'analyse de Co-inertie (Dufour, 2009). Nous avons effectué un test de permutation pour étudier la force de la relation entre les deux ensembles de données, c'est-à-dire la significativité du coefficient RV entre 0 et 1 ($p < 0,05$). Ce test est utilisé pour mesurer la proximité par exemple entre les niveaux de contaminants dissous dans l'eau et la teneur en contaminants ou la réponse des biomarqueurs dans les plantes. Ce coefficient est une généralisation multivariée du coefficient de corrélation de Pearson.

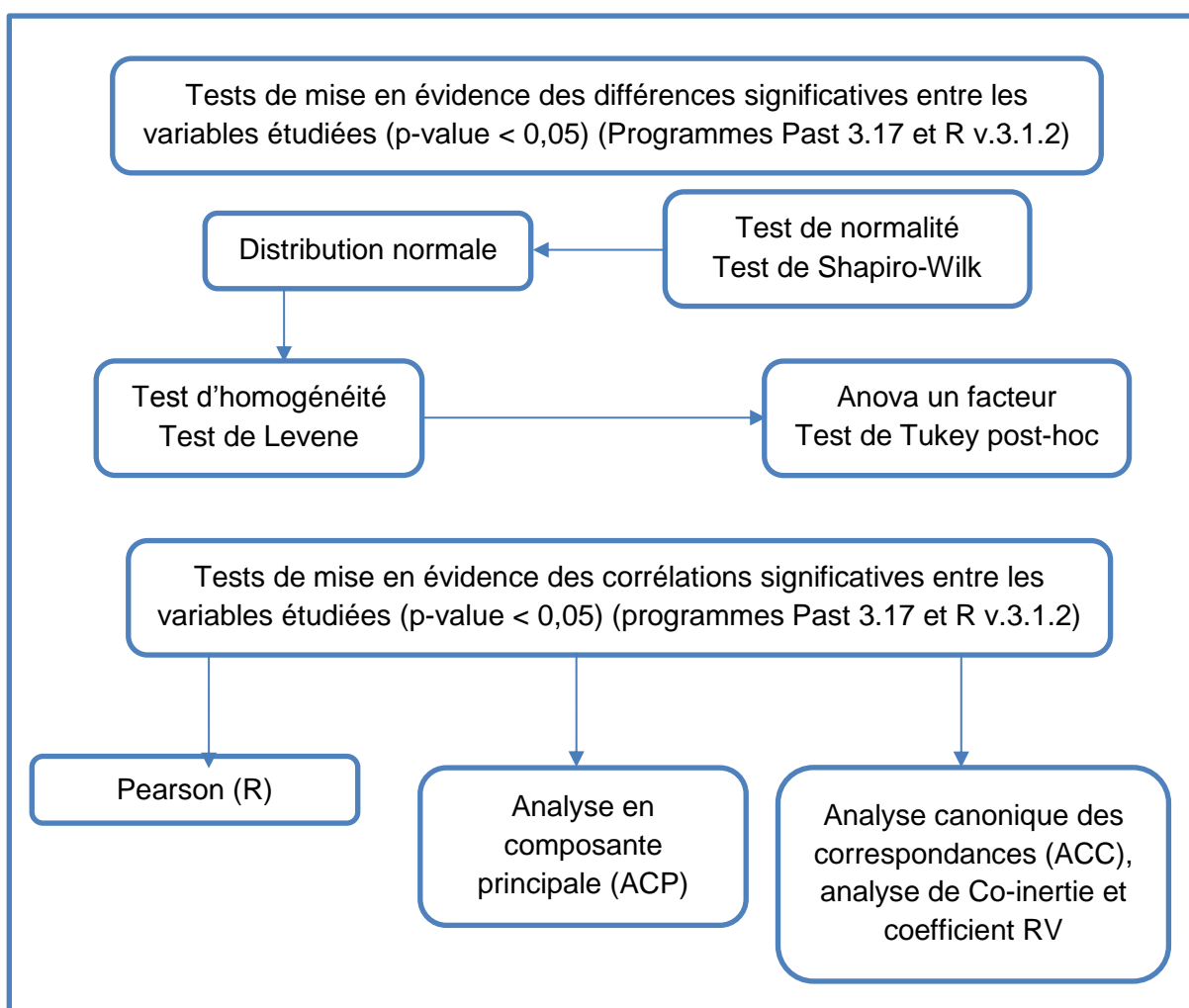


Figure 28. Schéma représentatif de l'analyse statistique.

Chapitre III. Résultats et discussion

Les résultats des analyses réalisées lors des trois campagnes de terrain (printemps 2015 (P2015), automne 2015 (A2015) et printemps 2016 (P2016)), dans les cinq sites d'études (S1, S2, S3, S4, S5). Pour chaque campagne de terrain, les études ont été menées pour cinq durées d'expositions (t0, t7, t14, t21, t28 ; mesures hebdomadaires).

- Une première partie sera consacrée à la présentation des conditions environnementales et de la signature chimique des eaux, avec les paramètres physicochimiques et les teneurs en métaux/métalloïdes dans l'eau. Les corrélations entre les teneurs en métaux dissous dans l'eau et les teneurs en contaminants dans *Myriophyllum alterniflorum* seront étudiées, en considérant l'influence de la durée d'exposition.
- La seconde partie s'intéressera aux résultats obtenus pour les trois campagnes de terrain, concernant la réponse des biomarqueurs MDA et activité NR, en relation avec les teneurs en métaux/métalloïdes dans l'eau et dans la plante.
- La troisième partie présentera les résultats des réponses de l'ensemble des biomarqueurs de *Myriophyllum alterniflorum* lors de la campagne de printemps 2015. L'objectif sera d'identifier les biomarqueurs les plus pertinents en réponses aux impacts urbains et industriels.

Toutes les analyses ont été soumises à des tests statistiques (ANOVA, analyse par composante principale (ACP), analyse canonique (CCA), analyse de Co-inertie, analyse de corrélation par le coefficient de Pearson (R) ...).

III.1. Influence des conditions environnementales sur l'accumulation des métaux et métalloïdes par *Myriophyllum alterniflorum*

Le suivi de la qualité des eaux de surface peut s'effectuer par la mesure de paramètres physico-chimiques et la teneur des métaux/métalloïdes dans l'eau ainsi que par l'utilisation des macrophytes aquatiques via l'accumulation de ces métaux et métalloïdes dans la plante.

Dans ce cadre, ces outils de monitoring seront appliqués pour le suivi de l'évolution de la qualité de cours d'eau, suite à des rejets d'origine anthropique (effluents urbains et industriels).

Ainsi, cinq sites d'études ont été choisis : un site de référence, avec des impacts anthropiques limités ; deux sites situés en amont et en aval du rejet d'une STEU et deux sites situés en amont et en aval du rejet d'une zone industrielle avec des activités de traitement de surface, occasionnant des rejets de contaminants métalliques.

Les conditions environnementales (pluviométrie, vitesse de courant, température), les paramètres physico-chimiques des eaux (teneur en oxygène dissous, pH, conductivité, les teneurs en COD, et les teneurs en éléments majeurs) et les teneurs en contaminants dans l'eau (cuivre, cobalt, nickel, plomb, cadmium et arsenic) seront présentés, ainsi que l'évolution des teneurs en contaminants accumulés dans la plante. Les corrélations entre les teneurs des contaminants dans l'eau et dans la plante seront étudiées. Ce chapitre s'intéressera (i) aux variations spatiales avec l'impact des différentes pressions anthropiques (avec les cinq sites d'études), (ii) aux variations temporelles avec l'effet des saisons (deux campagnes réalisées au printemps, et une en automne) et (iii) à l'influence de la durée de déploiement *in situ* des macrophytes, avec cinq pas de temps.

III.1.1. Synthèse des résultats des paramètres relatifs aux conditions environnementales dans les cinq sites d'études

Les données de pluviométrie sont issues de la base de données de la station météo France de Limoges ("Limoges-Bellegarde (Haute-Vienne - France) | Relevés météo en temps réel - Infoclimat,"). La campagne la plus pluvieuse était celle du printemps 2016 avec une moyenne de 7mm/j (maximum 30 mm/j), suivi par le printemps 2015 avec 3 mm/j (maximum 10 mm/j), et enfin l'automne 2015 avec 2 mm/j (maximum 9 mm/j) (cf. annexe 3, figure 55). Les précipitations peuvent conduire à une augmentation des débits et un accroissement du lessivage des sols, qui entraîne une augmentation des flux de pollution particulaire, mais aussi des teneurs en espèces chimiques solubles, tels que les nutriments ou les métaux. L'augmentation de la concentration des polluants dépend de différents facteurs : intensité des précipitations, coefficient de ruissellement, nature des surfaces, nature des activités sur le bassin versant, etc. Cependant, lorsque les précipitations persistent, elles peuvent induire un phénomène de dilution, en conduisant à une diminution des concentrations en nutriments ou en contaminants dans l'eau.

En fonction des aménagements présents sur les cours d'eau, la vitesse de courant est météo-sensible, elle est influencée par la pluviométrie. Ainsi, les vitesses de courants étaient les plus élevées au printemps 2016 (cf. annexe 3, figure 56). Les vitesses de courant relevées (0,1 à 0,4 m/s) étaient compatibles avec le développement du myriophylle.

Les rejets d'eaux usées urbaines et industrielles n'induisaient pas une différence de température notable lors de ces campagnes. Au printemps, les températures des eaux des différents sites ont montré une homogénéité spatiale dans les cours d'eau. Les valeurs observées sont conformes aux résultats attendus pour les cours d'eau du Limousin ; elles changent entre 10°C et 15°C en automne et 15°C et 20°C en printemps en moyenne. La température des eaux est influencée par les précipitations (diminution de la température).

Cependant il n'est pas relevé d'écart notable entre les températures du printemps 2015 et celles du printemps 2016. Les températures dans les eaux n'ont pas excédé 24°C qui apparaît comme une limite de qualité dans l'arrêté du 27 juillet 2015, pour les eaux cyprinicoles. Concernant les températures basses observées parfois au S1 en automne 2015, elles sont influencées par l'heure de prélèvement des échantillons (avant 10h du matin et à t21-t28), et ces températures augmentent progressivement durant la journée, ce qui n'a pas inhibé le métabolisme de la plante. Les températures moyennes de l'air durant l'automne 2015 ont été de 14,8°C ("Limoges-Bellegarde (Haute-Vienne - France) | Relevés météo en temps réel - Infoclimat,"). Dans ces conditions, ce macrophyte n'a pas eu des perturbations de développement et de métabolisme.

Le site S3 présentait les niveaux de concentration en oxygène dissous les plus faibles ($p < 0,05$), alors que les sites S1 et S5 ($p > 0,05$) présentaient les concentrations les plus élevées (cf. annexe 3, figure 57). La diminution de la concentration d'oxygène dissous observée à S3 peut être attribuée au rejet de matières oxydables de la STEU.

Les sites S1, S2, S3 et S4 ont montré des valeurs de pH similaires (entre 6 et 7), cohérentes dans le contexte géochimique local (socle granitique). Le pH est impacté par l'activité biologique (photosynthèse) et par le pouvoir tampon de l'eau (faible dans le contexte des eaux douces du socle granitique).

En S5, une augmentation du pH a été observée (écart de 5 % par rapport à S1 ($p < 0,05$)), avec des valeurs enregistrées comprises entre 7,6 et 8 pendant les 3 campagnes (cf. annexe 3, figure 58). Cette augmentation du pH peut être expliquée par les rejets industriels (effluents de traitement de surface, qui ont subi un traitement basique pour l'élimination des métaux par précipitation).

Le pH est un des facteurs de contrôle de la spéciation des éléments chimiques dans les écosystèmes aquatiques. La fraction dissoute des métaux dans l'eau augmente avec la baisse du pH (Elder, 1988). Dans ces conditions de pH acide la spéciation des métaux est affectée et ils se trouvent sous des formes plus biodisponibles. Les métaux / métalloïdes libres sont généralement la forme la plus toxique pour les plantes aquatiques (Salomons, 1995).

Les concentrations en COD montrent des variations significatives entre les quatre sites anthropiques et le site témoin (S1) en particulier au printemps 2015 ($p < 0,05$) (cf. annexe 3, figure 60). Les teneurs en COD les plus élevées (6 mg/L) ont été relevées en S3, ce qui est lié aux rejets de la STEU à la Vienne, alors que les sites S2, S4 et S5 ont montré des teneurs moyennes en COD similaires (5 mg/L). Les teneurs en COD dans les différents sites sont donc globalement dans le même ordre de grandeur (3 à 6mg/L), mais la nature de la matière organique dans les eaux n'a probablement pas la même origine : elle peut être due principalement aux matières humiques dans le site S1, alors que les teneurs en COD sont influencées par les rejets de la STEU sur le site S3. Des analyses d'absorbance spécifique UV

(à 254 nm) pourraient donner une idée plus précise sur la nature de la matière organique dans les sites étudiés.

Les métaux ont une forte affinité pour la matière organique, conduisant à la formation de complexes stables. Ainsi, le COD pourra contribuer à la diminution des teneurs des métaux biodisponibles dans l'eau surtout au niveau du site S3.

Les matières en suspension, représentent l'ensemble des particules minérales et organiques contenues dans les eaux. Elles sont fonction de la nature des terrains traversés, de la saison, de la pluviométrie, du régime d'écoulement des eaux, de la nature des rejets, etc. (Rodier *et al.*, 1996). Les teneurs élevées en matières en suspension peuvent être considérées comme une forme de pollution. Généralement, les valeurs des matières en suspension sont élevées pendant les jours de pluie par rapport à celles pendant les jours secs. Les moyennes relevées dans les cours d'eau dans le bassin versant de la Vienne sont comprises entre 12 mg/L et 75mg/L (Breard, 1990). En Limousin, Bossy (2010) a observé que les concentrations en matières en suspension variaient de 0,2 à 30,2 mg/L dans les eaux de surface avec une moyenne de 14,2 mg/L.

La conductivité électrique est maximale au niveau du site S3 (395 à 477 $\mu\text{S}/\text{cm}$), le rejet de la station de traitement des eaux usées impacte donc fortement ce paramètre (cf. annexe 3, figure 59). La conductivité électrique traduit le degré de minéralisation globale, et renseigne sur le taux de salinité, elle a un rôle écologique important (Elhassan *et al.*, 2010).

La concentration en éléments majeurs (chlorures et sulfates en particulier) dans l'eau est plus élevée en S3 par rapport aux autres sites (cf. annexe 3, figure 61-63). Ceci montre que les rejets d'eaux usées ont un effet remarquable sur la concentration de ces ions majeurs, et cet effet est plus important que celui des rejets industriels en S5.

La concentration en phosphates plus élevée est relevée dans le site S3 ($p < 0,05$) (cf. annexe 3, figure 64). Les rejets de la STEU, malgré les déphosphatations biologique et physico-chimique mises en place sur la station, expliquent ce résultat (teneur réglementaire de 1mg/L en P en sortie). En S5, les teneurs en phosphates étaient plus élevées qu'en S4 ($p < 0,05$). Les activités industrielles ont donc un impact sur les teneurs en phosphates dans le milieu.

Selon le conseil canadien des ministres de l'environnement (2004), les masses d'eau oligotrophes doivent présenter des teneurs en P de moins de 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, ce qui est probablement le cas pour les sites S1, S2 et S4 où les teneurs phosphates, exprimées en P-PO_4^{3-} étaient inférieures à 10 $\mu\text{g}/\text{L}$. Cependant, en S3, en ne considérant que les teneurs en phosphates, les teneurs sont supérieures à 50 $\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{L}$, soit 16 $\mu\text{gP-PO}_4^{3-}/\text{L}$, ce qui correspond à un système classé comme mésotrophe ([P] de 10 à 30 $\mu\text{g}/\text{L}$). Le phosphate a un rôle important dans le processus d'accumulation des métaux et métalloïdes, en le favorisant (activation du métabolisme global et de l'internalisation des contaminants) ou en l'inhibant, comme dans le cas de l'arsenic, où il y a un effet de compétition du fait de l'analogie des transporteurs dans la plante.

La concentration maximale en ammonium a été relevée en S3 (300 % par rapport à S1 ($p < 0,05$)). Les rejets de la STEU, malgré le traitement de la pollution azotée à la STEU, expliquent ce résultat (concentration maximale de 10mg/L en NGL en sortie, suivant l'arrêté préfectoral relatif au fonctionnement de la STEU de Limoges). Au printemps 2015, l'absence

des ions ammonium à S3 est attribuée à l'oxydation poussée de ces ions en ions nitrates (nitrification) au sein des réacteurs de la STEU. La concentration en nitrates est la plus élevée en S3 durant les trois campagnes (cf. annexe 3, figure 65). En S3 et S5, les concentrations en nitrates excèdent le seuil de 10 mgNO₃⁻/L mais restent inférieures à 50 mgNO₃⁻/L (Arrêté du 27 juillet 2015) ; ces eaux sont considérées comme de bonne qualité. L'ion nitrate est la forme des composés azotés la plus présente dans les eaux de surface, car c'est le produit final de la décomposition aérobie de la matière azotée organique ; il s'agit de la forme la plus oxydée. L'ion nitrate joue un rôle dans l'accumulation dans les plantes, en favorisant l'absorption des métaux et métalloïdes. Tout comme pour les nitrates, les teneurs en nitrites plus élevées observées en S3 peuvent être attribuées à l'influence du rejet de la STEU. La production des nitrites lors des réactions de nitrification et de dénitrification, contribuent à cette augmentation.

L'accroissement de la biodisponibilité des métaux/métalloïdes dans les eaux se traduit par le passage de la forme colloïdale et particulaire à la forme dissoute. Le pH, la dureté, la teneur en carbone organique, le potentiel redox influencent la spéciation de ces contaminants et affectent par conséquent leur biodisponibilité dans l'eau (cf. 1.2.1). La spéciation et la biodisponibilité des contaminants dans les différents sites d'étude sera donc différentes (moindre en S3 et S5) étant données les différentes observées pour les paramètres pH et COD en particulier.

L'analyse des eaux de S1 montre des teneurs en contaminants (AF) inférieures aux NQE pour la plupart des contaminants durant les trois périodes d'étude, excepté pour le zinc (cf. annexe 3, tableau 25). L'origine majeure du zinc est liée aux eaux de ruissellement (toitures) et aux activités d'élevage ; ce contaminant est très fréquemment observé dans l'environnement. Le site Saint Denis a été choisi comme site témoin avec un impact limité des pollutions anthropiques, ce qui correspond aux résultats obtenus par rapport aux teneurs en métaux observées.

En S2, seules les teneurs en zinc (AF) et en cuivre (AF) sont supérieures aux NQE lors des trois campagnes (cf. annexe 3, tableau 25). En P2016, les teneurs en arsenic, plomb et cobalt (AF) étaient également supérieures aux NQE. Ces teneurs élevées au P2016, pourraient induire une réponse des biomarqueurs testés pour cette campagne par rapport aux deux autres campagnes. L'analyse des échantillons au point S3 montre des teneurs plus élevées que S2 et S1 (cf. annexe 3, tableau 25). Pendant les trois périodes d'étude, les teneurs en cobalt, zinc et cuivre (AF) ont été supérieures aux NQE, auxquelles s'ajoutent celle du plomb et de l'arsenic en P2016, suite aux facteurs environnementaux qui agissent sur les teneurs des contaminants dans l'eau comme la pluviométrie (lessivage des sols).

En S4, les teneurs en manganèse, zinc et arsenic (AF) ont montré des teneurs supérieures aux NQE durant les trois campagnes, auxquelles s'ajoutent les teneurs en cobalt en P2015 et P2016, en plomb et en cuivre en P2016 (cf. annexe 3, tableau 25). L'utilisation des engrais chimiques dans les cultures à proximité de S4 peut être à l'origine de la présence du cuivre ou du zinc au printemps 2016. Les teneurs élevées en arsenic peuvent être plutôt liées au fond géochimique.

Les teneurs en cadmium, zinc, cuivre et l'arsenic ont montré des teneurs supérieures aux NQE durant les trois campagnes sur S5 (cf. annexe 3, tableau 25). En outre, à ces contaminants, s'ajoutent le cobalt et le plomb en P2015 et P2016, le nickel en P2015 et le manganèse en

P2016. Ces métaux sont d'origine industrielle, liés aux activités de traitement de surface en particulier.

La plupart des teneurs en contaminants excèdent les normes guides de NQE dans les eaux contaminées par les effluents des eaux usées urbaines (S3) et industrielles (S5), et pour certains contaminants en S4 suite à l'impact des rejets diffus agricoles. Pour cela, suivant les résultats obtenus par rapport à l'arrêté de 27 juillet 2015 (NOR : DEVL1513989A), le cuivre a été choisi comme spécifique à la fois de l'impact urbain et industriel, tandis que le cadmium, le nickel et l'arsenic sont spécifiques de l'impact industriel. Suivant l'arrêté de 27 juillet 2015, le cuivre et l'arsenic sont considérés comme substances spécifiques de l'état écologique, alors que le nickel et cadmium sont considérés comme substances prioritaires de l'état chimique.

Ce paragraphe ci-après sera présenté sous forme de publication, à soumettre à «Environmental Monitoring and Assessment». Il reprend les données relatives aux deux campagnes en 2015 et 2016.

Les travaux présentés se focaliseront sur le potentiel de suivi des métaux/métalloïdes dans l'eau par rapport à l'évolution de de l'accumulation de ces métaux/métalloïdes dans la plante au cours du temps. Les paramètres qui influencent la spéciation et la biodisponibilité des métaux/métalloïdes dans l'eau, les concentrations des métaux/métalloïdes dans l'eau et l'évolution de leur teneur dans la plante sont présentés en considérant l'influence de la durée d'exposition. Les corrélations entre les teneurs des métaux/métalloïdes dans la plante et dans l'eau sont étudiées pour différentes durée d'exposition (t14, t21 et t28) en P2015 et P2016. Le but est de définir s'il existe une durée optimale d'exposition des myriophylles pour l'évaluation de la qualité des eaux, en fonction des contextes (type de pression anthropique).

III.1.2. Assessment of metal/metalloid accumulation in *Myriophyllum alterniflorum*- Impact of anthropogenic activities

III.1.2.1. Introduction

In the aquatic environment, many metals and metalloids are released into the water due to urban and industrial activities. The presence of these contaminants can affect the ecological balance and thus alter the natural ecosystem in the long term. Therefore, the monitoring of water quality is a necessity to point out these contaminants and to put in place corrective actions allowing reaching the good state of water masses. Hence the development of water quality monitoring tools, which reflect water quality in an integrative way, and to accurately and rapidly detect the presence of contaminants that are a major issue (Hunting et al., 2017)

Water quality monitoring using active or passive sampling can meet these requirements but they have certain limiting factors. The active sampling requires a large number of samples and analyzes in order to have a precise monitoring and a representative result of the aquatic system studied; it is therefore expensive. Moreover, this sampling method gives information on the quality of the water at the sampling point at a given moment, but this information is therefore incomplete in order to have an overall view over time. In addition, with active sampling, it is limited to study pollutants present in water at concentration lower than the limit of detection of analytical methods (Devillers, 2017).

Passive sampling is often used as an alternative to active sampling, as it is more representative of water quality over an exposure time of few days to few weeks (Allan et al., 2008). The integrative nature of passive sampling makes it possible not only to obtain data more representative of the actual contamination over time, but also with a lower detection and quantification limits than active sampling (e.g. DGT-LQ (Cd) 0.5 ngCd/L, while, ICP-MS-LQ (Cd) 30 ngCd/L (Buzier et al., 2014)). However, this sampling method is influenced by environmental conditions (temperature, speed of water flow, water composition, algal and bacterial development and deposition of suspended materials...) and calibration parameters. These factors can increase measurement uncertainty and lead to possible interpretation errors (Devillers, 2017).

Thus, compared with other monitoring methods, the use of aquatic macrophytes is simple, inexpensive and can provide an overall information of the state of the aquatic environment due to their ability to accumulate contaminants in their tissues, reflecting changes or alterations in the aquatic environment. Aquatic macrophytes interact directly with contaminants; they can adsorb and absorb contaminants and are thus able to detect their presence in water (Krayem et al., 2016; Lewis, 1995; Melzer, 1999).

The metals and metalloids released by urban (WWTP effluents) and industrial activities (metallurgy, surface treatments, electroplating, etc.) are distributed in the water between the dissolved, colloidal and particular fractions. The speciation and the bioavailability of contaminants in water are influenced by several factors such as pH, DOC, competition with other cations. These factors may increase or decrease the bioavailability of contaminants in water (de Paiva Magalhães et al., 2015; Namieśnik and Rabajczyk, 2010). The dissolved fraction is the most bioavailable and toxic form to plants.

In addition, analysis of the levels of contaminants accumulated in macrophytes over time can give an integrative idea about the presence of contaminants in the water. Most research studies on aquatic macrophytes were in the context of contaminant accumulation capacity in vitro for a low duration of exposure (less than seven days). For that, it is interesting to study the contaminant accumulation evolution in situ for a long duration of exposure for the detection of contaminants in water. Moreover, the accumulation of bioavailable contaminants by aquatic macrophytes is influenced by numerous biotic (species, age) and abiotic factors (duration of exposure, temperature, nutrients, season, salinity, pH, concentration of contaminants) (Bonanno and Giudice, 2010; Wang, 1987).

One of the aquatic macrophytes, *Myriophyllum alterniflorum*, collected from the Vienne River in France has been studied and used in ecological studies as the one in situ bioindicator of water quality due to its ability to detect pollutants and to accumulate contaminants in its tissues (Krayem et al., 2018; Krayem et al., 2016; Ngayila et al., 2007).

The aim of this work is to seek the interest of monitoring the accumulation of metals and metalloids over time in *M. alterniflorum* in situ for the assessment of the water quality.

In the present work considering the spatial and annual distribution of contaminant in water, associated to urban and industrial activities, the contaminant's accumulation by *Myriophyllum alterniflorum* and the relationship with their concentration in the water is studied. The influence of exposure time on the accumulation of contaminants in this aquatic macrophyte is also considered. Nutrient concentrations need also to be considered to obtain a reliable indication of water contamination status regarding contaminant accumulation in plants.

III.1.2.2. Materials and methods

III.1.2.2.1. Plant material, growth conditions and reintroduction *in situ*.

After 30 days of proliferation of *M. alterniflorum* in a Murashige and Skoog (1962) medium, the plants were acclimatized for 21 days in an oligotrophic synthetic medium. The concentrations of nitrates, ammonium and phosphates were all set according to the surface water quality evaluation system (French Ministry of the Environment, Energy and Maritime Affairs (MEDD, 2003)). The final concentrations of NO_3^- , NH_4^+ and PO_4^{3-} were respectively: 2 mg/L (32 $\mu\text{mol/L}$), 0.1 mg/L (5.5 $\mu\text{mol/L}$), and 0.1 mg/L (1.05 $\mu\text{mol/L}$).







The plants were subcultured into a culture box (Steri Vent High Model 80 x 100 x 100 mm, KALYS SA) containing 400 ml of sterilized medium (20 min, 121°C in an autoclave (DB-90, Systec)). Afterwards, they were maintained in a growth cabinet set at $26 \pm 2^\circ\text{C}$, with a 16 h photoperiod and a light intensity of $13.1 \pm 0.6 \text{ W cm}^2$ (referred to the natural light intensity) (Supra'Lux, Actizoo, 30 W).

After 15 days of acclimation in the oligotrophic synthetic medium, *Myriophyllum alterniflorum* plants were introduced *in situ*. *M. alterniflorum* were placed in a batch of 9 plastic culture boxes (grown in the laboratory in the oligotrophic synthetic medium) in wire cages, designed specifically for field experiments. Then, the cages were positioned in five sites in the river. To remain stable, they were connected with metal wire to the immersed stones. These plants were arranged for a period of 28 days in spring 2015 and spring 2016.

III.1.2.2.2. Studied area

The five studied sites are chosen regarding their degree of pollution on the Vienne and Valoine Rivers in Haute Vienne department in the center of France. From a site with none remarkable anthropogenic activities to sites with remarkable urban and industrial activities (Fig. 29). The Vienne basin is characterized by impervious magmatic gneiss and rock soils.

The Site (S1) is located on the Combade River, located in the South East of Haute Vienne (45.785470, 1.553173). It is a tributary of the Vienne, 40.8 km long. Permanent and temporary grasslands, as well as some wheat and grain crops occupy the watershed. This site was considered a reference site in the present study, with low disturbances related to human activities.

Coniferous forests	
Hardwood forests	
Grasslands and other areas still budding for agriculture	
Industrial and commercial areas	
Urbanized areas	
Waterways and streams	

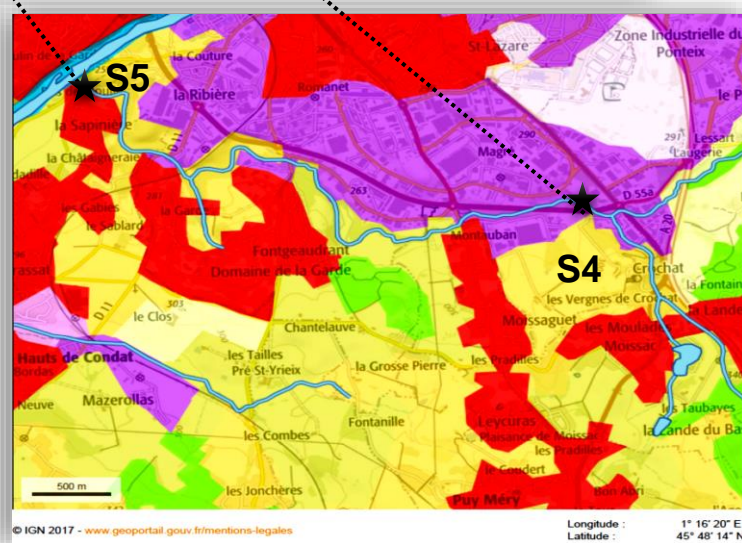
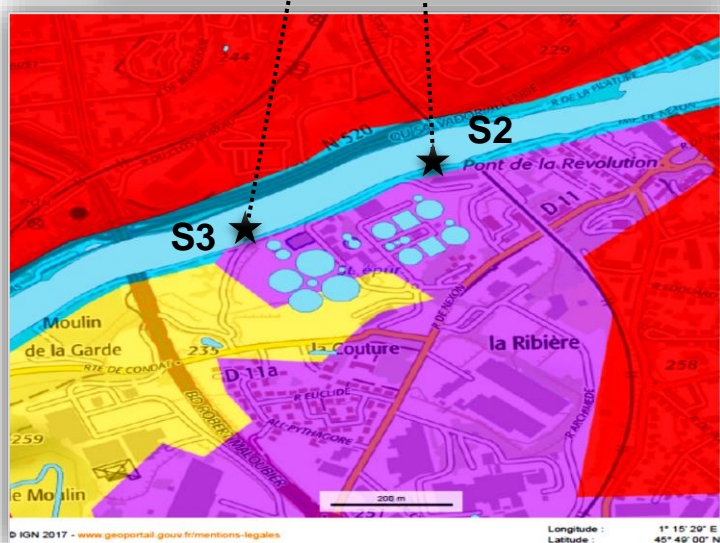
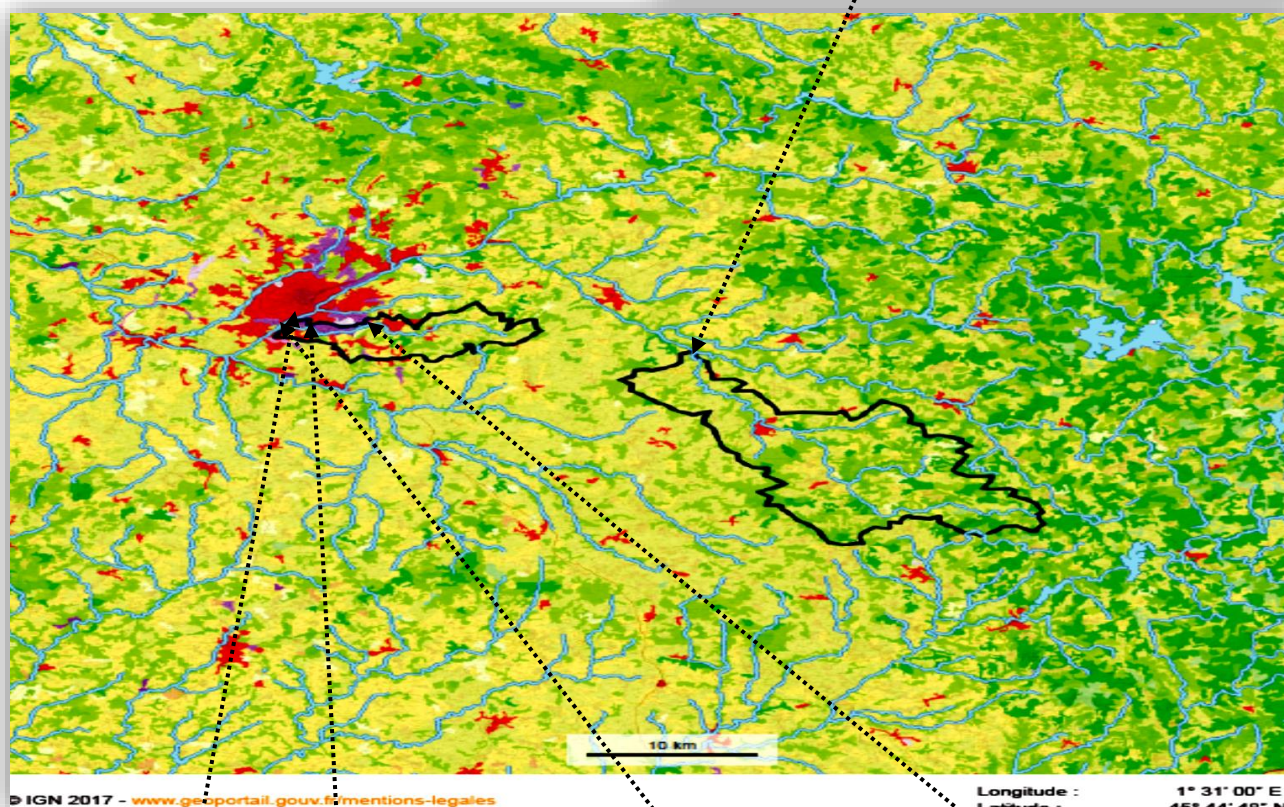


Figure 29. Map of land occupation of the five studied sites (S1 "Saint-Denis", S2 "Vienne upstream", S3 "Vienne downstream", S4 "Valoine upstream", S5 "Valoine downstream") (géoportail).

Then, the S2 sampling site is on the Vienne River in an urban area (45.818801, 1.259659); at the upstream of the wastewater treatment plant (WWTP). Diffuse discharges could result in an alteration of the water quality at this point. Industrial discharges are not important and agricultural activities are limited to a few areas (cultivation and pastures). Downstream of the WWTP, at Site 3 (45.817552, 1.256487), the quality of the water might be affected, as sampling point is near the point of discharge of the WWTP. It should be noted that the Limoges WWTP removes nitrogen and phosphorus extensively (outflow regulatory contents less than $1\text{mgPO}_4^{3-}/\text{L}$), Vienne River being classified as sensitive to eutrophication.

The Valoine is a tributary of the Vienne river on the left bank, with a length of 19.4 km. Upstream Valoine sampling point (45.803208, 1.291386) (S4), surface water is of medium quality due to agricultural activities. Downstream (S5; 45.812427, 1.247920), the pollution is greater because of industrial activities, which cause contaminant discharges.

The selected sampling points, located upstream and downstream of the WWTP and industrial discharges should allow us to highlight the capacity of the *M. alterniflorum* to absorb and indicate the water contamination over time exposure.

III.1.2.2.3. Physicochemical parameters

Physico-chemical parameters (pH, Temperature and Dissolved Oxygen) were measured *in situ* using a WTW Multi-Parameter Field Meters « MULTI 3430 SET F (WTW) »; the Multi 3430 SET F features a SenTix®940 IDS pH sensor (± 0.004), FDO®925 oxygen optical probe ($\pm 0.5\%$), IDS TetraCon®925 conductivity measuring cell ($\pm 0.5\%$). Determination of dissolved organic carbon (DOC) (mg/L) was used to evaluate the amount of organic matter present in the samples. The DOC was measured using a SHIMADZU® TOC-L TOC (accuracy $\pm 2\%$, detection limit $50 \mu\text{gC.L}^{-1}$).

Calibration step was performed using standardized solutions specific to the parameters to be measured. Buffer solutions used for pH were seven and four. Storage containers for WTW oxygen sensors (FDO * Control) are also suitable for calibration with air saturated with water vapor.

III.1.2.2.4. Sample preparation for water analysis

Two spring studies has been done, the first from 19th of May 2015 to 16th of June 2015; and the second from 7th of June 2016 to 5th of July 2016. Five field campaigns have been done, one per week.

The rivers are shallow; the sampling was thus done by filling the tubes manually, in the middle of the river, but facing the current. After at least three rinses with the water to be collected, the vials were filled (without air), and then the samples were kept in a cooler $4\pm 3^\circ\text{C}$, in the dark.

Samples were filtered for analysis of the major elements ($0.2 \mu\text{m}$ cellulose acetate syringe filter; Minisart Sartorius stedim VWR), $500 \mu\text{L}$ of the sample were analyzed by ionic chromatography (Dionex Dx 120) (table 4).

Table 4. Limits of quantification of anions and major cations analyzed by ion chromatography (Dionex dx. 20)

	Anions				Cations		
	Cl^-	NO_2^-	NO_3^-	SO_4^{2-}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	NH_4^+
QL (mg/L)	0.25	0.075	0.45	0.075	0.25	0.25	0.4

Phosphate concentrations were analyzed by colorimetry using the standard method (NFT 90-023) of Murphy and Riley (1962). The limit of quantification was 10µg/L.

The contaminant content “AF” in the sample was obtained by acidifying 10 mL of the crude sample with 200 µL of HNO₃ (69%, Suprapur for trace element analysis). Subsequently, filtration via a 0.2 µm cellulose acetate syringe filter was performed prior to analysis by ICP-MS (7700, Agilent Technology). To determine the contaminant content in the dissolved fraction, another 10-mL volume was filtered through a 0.2 µm cellulose acetate syringe filter, and then the acidification was applied with 200 µL of HNO₃ (69%, Suprapur for trace element analysis) and followed by analysis by ICP-MS (7700, Agilent Technology) (table 5).

Table 5. Limit of quantification of minor elements analyzed by ICP-MS (7700, Agilent Technology).

	Ni	Cu	Cd	As
QL(µg/L)	0.03	0.04	0.03	0,03

III.1.2.2.5. Sample preparation for plant analysis

Plant mineralization was performed to measure the metal concentrations accumulated by the plant. For each sample, 0.5 g of fresh watermilfoil was dried for 48 hours in an oven at 60°C. Once dried, 4 ml HNO₃ 69% (Xilab, for trace element analysis), and 2 ml H₂O₂ 30% (Prolabo, 30%) were added to the sample; the mixture was left under the hood during the night, then a mineralization was carried out in an oven with a temperature 60 °C for 48h. Then, the volume of the sample was adjusted to 10 ml with ultrapure water. Samples were filtered and stored at 4°C for analysis by ICP-MS (7700, Agilent Technology).

To evaluate the bio-accumulation potential of watermilfoil, bio-concentration factor (BCF) was calculated. The BCF is the ratio of metal/metalloid concentrations in the plants (DW) to those in water (µg/L). All these calculations were performed on three replicates of plants and water samples at each site and time lapse.

III.1.2.2.6. Data analysis

One-way ANOVA, followed by a post-hoc comparison Tuckey test, in the PAST 3.17 program (Hammer *et al.*, 2001), was used for evaluation of univariate data. Pearson correlation test, Principal component analysis (PCA), Canonical Correspondence Analysis (CCA) and Co-inertia analyses were performed using Past 3.17 and R v. 3.1.2 (Hammer *et al.*, 2001; R Development Core Team, 2015) (fig. 30).

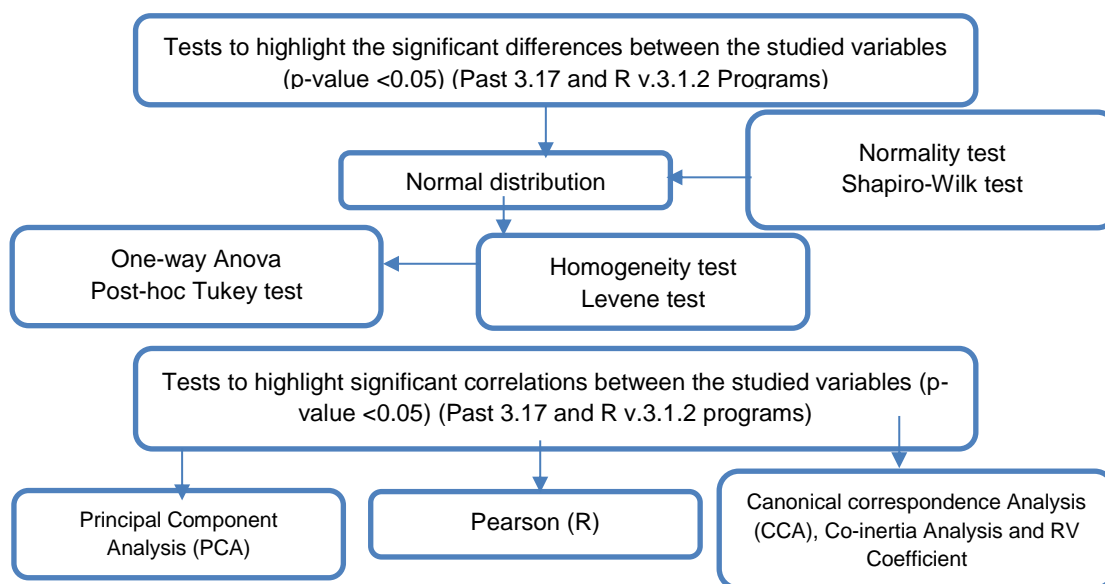


Figure 30. Representative schema of statistical analysis.

III.1.2.3. Results and discussion

III.1.2.3.1. Physicochemical characterization of studied sites

Two Field campaigns (P2015 and P2016) have been done in order to monitor water quality of the five studied sites. Table 6 presents results concerning physic-chemical parameters and major ion levels in the two campaigns P2015 and P2016.

Table 6. Water quality level for the five studied sites (blue level: very good state; green level: good state) N.M.: Not measured.

Average in P2015 (n=5)		S1	S2	S3	S4	S5
Physico-chemical parameters	Pluviometry (mm/day)	3 (max 10mm)				
	pH	7.5±0.2	7.6±0.1	7.5±0.1	7.7±0.1	7.9±0.4
	Temperature (°C)	15±2	19±3	20±2	17±1	17±2
	Dissolved oxygen(mg/L)	9.0±0.5	9.7±0.4	8.8±0.3	9.0±0.4	9.9±0.5
DOC(mg/L)	DOC (mg/L)	3.0±0.8	5.0±0.5	6.0±1.2	5.0±1.4	5.0±0.5
Major elements (mg/L)	Chlorides	4.0±0.7	4.0±0.2	25±7	6±2	6±1
	Sulfates	2.0±0.4	2.0±0.5	9±4	6±2	8±2
	Magnesium	1.0±0.3	1.0±0.1	1.0±0.4	1.0±0.4	1.0±0.2
	Calcium	5±2	2.0±0.3	10±4	6±2	7.0±0.5
	Phosphates (µg/L)	<10	<10	180	60	90
	Ammonium	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M
	Nitrates	6±1	5±2	10±3	4±1	5±1
	Nitrites	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M
Average in P2016 (n=5)		S1	S2	S3	S4	S5
Physico-chemical parameters	Pluviometry (mm/day)	7 (max 30mm)				
	pH	7.2±0.2	7.3±0.2	7.3±0.2	7.4±0.1	7.6±0.1
	Temperature (°C)	15±1	17±2	17±1	18±1	17±1
	Dissolved oxygen(mg/L)	9.6±0.1	9.2±0.1	9.0±0.3	9.1±0.1	9.4±0.1
DOC(mg/L)	DOC (mg/L)	4±1	5.5±0.9	6.0±1.4	7±1	4.0±0.8
Major elements (mg/L)	Chlorides	5.0±0.5	5.0±0.4	37±11	10±1	12±3
	Sulfates	2.0±0.2	3.0±0.2	17±4	11±1	15±6
	Magnesium	2.0±0.2	1.4±0.1	3.0±0.5	3.0±0.3	3.0±0.5
	Calcium	4.0±0.3	4.0±0.2	20±4	14±2	17±4
	Phosphates (µg/L)	<10	<10	160	20	60
	Ammonium	0.04±0.03	0.06±0.01	0.1±0.05	0.05±0.03	0.07±0.04
	Nitrates	6±1	4±0.3	9±2	4±1	5±2
	Nitrites	0.02±0.01	0.03±0.009	0.13±0.04	0.09±0.01	0.07±0.03

Between the two years, the heaviest rainy period was P2016 compared to P2015 (“Limoges-Bellegarde (Haute-Vienne - France) | Relevés météo en temps réel - Infoclimat,”). On reaching the ground, the rainwater washes the surfaces on which it flows and on the other hand erode the surface materials (Mikkelsen *et al.*, 1996). All these substances are driven to water by the first flow of rain. The polluting elements then scatter in the body of water. Precipitations increase can therefore increase particulate pollution fluxes, and ion concentrations. Precipitations, mainly when they last, could also induce dilution phenomenon.

During P2016, higher precipitation level could explain the observed slight increase in concentrations of some ions (Cl^- , SO_4^{2-} and Ca^{2+}). Indeed, during periods without rain, deposits of various substances accumulate on surfaces.

In S1, the control site, the physico-chemical parameters indicated very good quality level for both seasons.

The temperature of the waters did not exceed 25 °C, whereas ambient temperature rose up to 35°C during the two sampling campaigns. The sampling points of Vienne River were less shaded than sampling sites of Valoine and Combade rivers.

The dissolved O_2 content was higher than 9 mg/L excluding at S3 (corresponding to WWTP discharge downstream, with organic carbon substrate discharge). Major element levels were lower in S1 and S2 (the sites the less affected by anthropogenic activities), compared to other sites, especially S3.

The pH varied between 7 and 8.3; it was controlled by the geology of the watershed (acidic) and water effluents due to anthropogenic activities. pH did not show any significant difference between stations, except at S5, because of the industrial impact (it could be due to basic treatments applied for metal removal in industrial plants). The dissolved metal concentrations tend to increase with decreasing pH (Elder, 1988). Dissolved metals/metalloids are commonly the most toxic form to aquatic plants (Salomons, 1995). Based on the influence of pH, dissolved metals and metalloids may be more available at S1, S2, S3 and S4 than at S5.

Water hardness was low (from 1.66 to 2.91 °F) for all sites, due to geological watershed. The alkalinity is low in the studied area and the buffer capacity of water is thus very limited.

The lowest DOC was observed at S1 compared to other sites specially S3. Organic matter plays a very important role with regard to mobility and bioavailability of metals, because metals have a strong affinity for organic matter (Yang *et al.*, 2010). At S3 site, metals were thus probably less bioavailable than into other sites.

Conductivity varies greatly, ranging from 60 to 70 $\mu\text{S}/\text{cm}$ at S1 and S2 and 490 $\mu\text{S}/\text{cm}$ at S3. Both anthropic activities in watershed and river flow (highest flow of Vienne River) affect conductivity results.

Nitrate was the main form of nitrogen in the studied waters. The low concentration of ammonium observed at S3 are due to the performing nitrification process in the reactors of the WWTP. The high phosphate levels recorded at S3 and S5 compared to S1 can be attributed respectively to the P discharge from wastewater and to industrial activities.

Water at S3 can be classified as mesotrophic, regarding P levels (Order July 27, 2015, NOR: DEVL1513989A). For both sampling periods, and according to the results observed in the five sites, we can classify the sites S1, S2, S4 and S5 as sites of very good physical and chemical state, while the S3 site as a good physico-chemical state (Order July 27, 2015, NOR: DEVL1513989A).

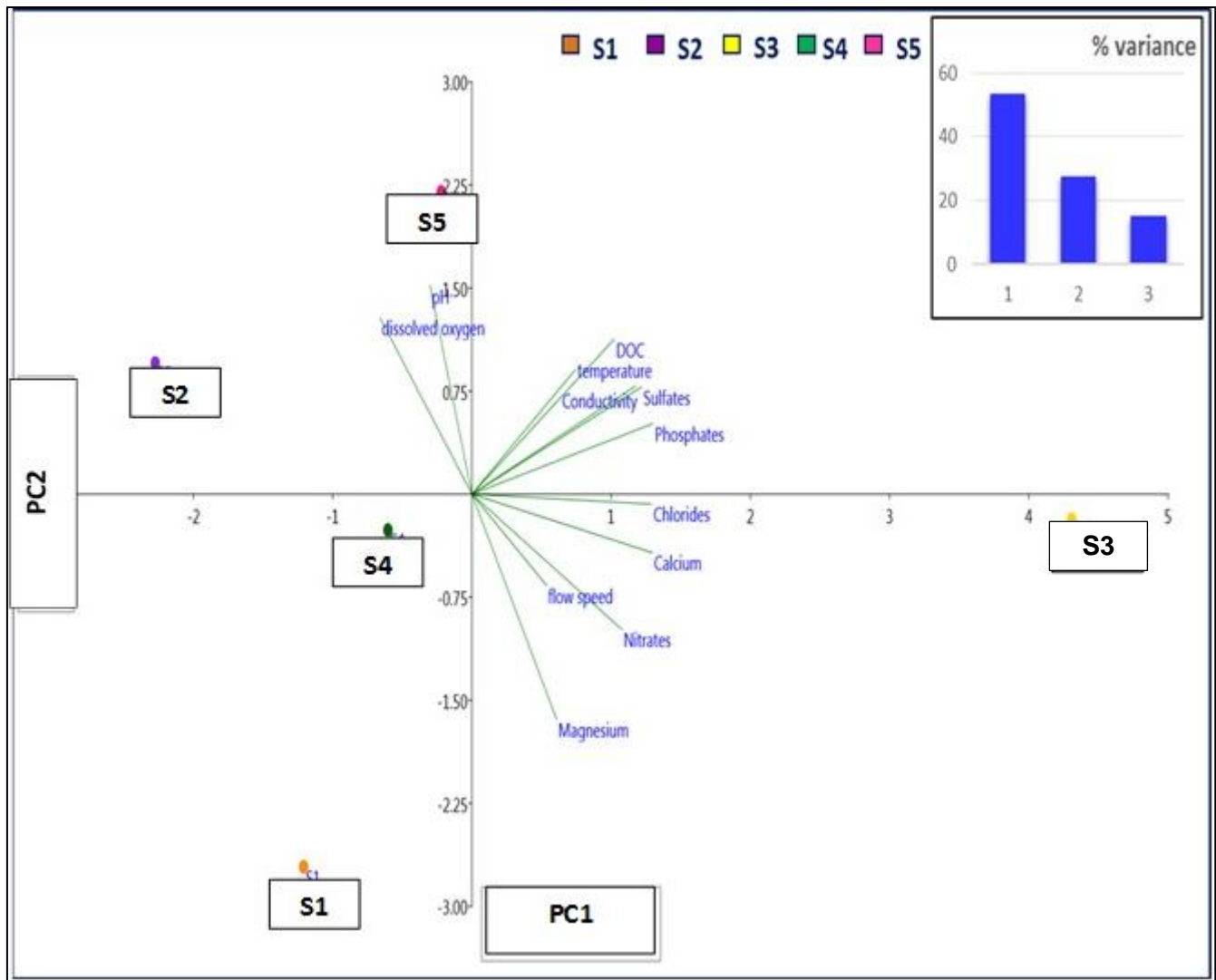


Figure 31. Principal Component analysis (PCA) of water composition related to anthropogenic site's impact in P2015.

Considering dataset of P2015, in the PCA, the first two principal components (PCs) accounted for 80% of total variance (respectively 53% and 27%) (Fig. 31).

Considering Figure 31, three groups emerged from the PCA analysis of water composition (i) S1, S2 and S4, (ii) S3 and (iii) S5.

S2 site did not show significant difference from S1, while S3 was distinguished from S2 according to PC1 (i.e. showing higher values at S3, for DOC, conductivity and major elements like Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- , Ca^{2+} ...), this was related to the WWTP discharges at S3.

S5 were distinguished from S1 according to PC2 (i.e. showing higher values at S5 for DOC, pH, Conductivity, SO_4^{2-} , PO_4^{3-} ...). These results obtained by the PCA analysis showed that urban and industrial discharges at S3 and S5 respectively, influence the physicochemical and chemical water composition in these study sites.

III.1.2.3.2. Contaminant levels in water

Figure 32 presents the contaminant levels (dissolved concentrations) for the five sites (S1, S2, S3, S4, S5) in two campaigns 2015 and 2016. The data correspond to average values from the five field campaigns (t0, t7, t14, t21, t28). The scale has been changed for Valoine downstream site (S5) because the contaminant concentration at this place was far higher than in other sites.

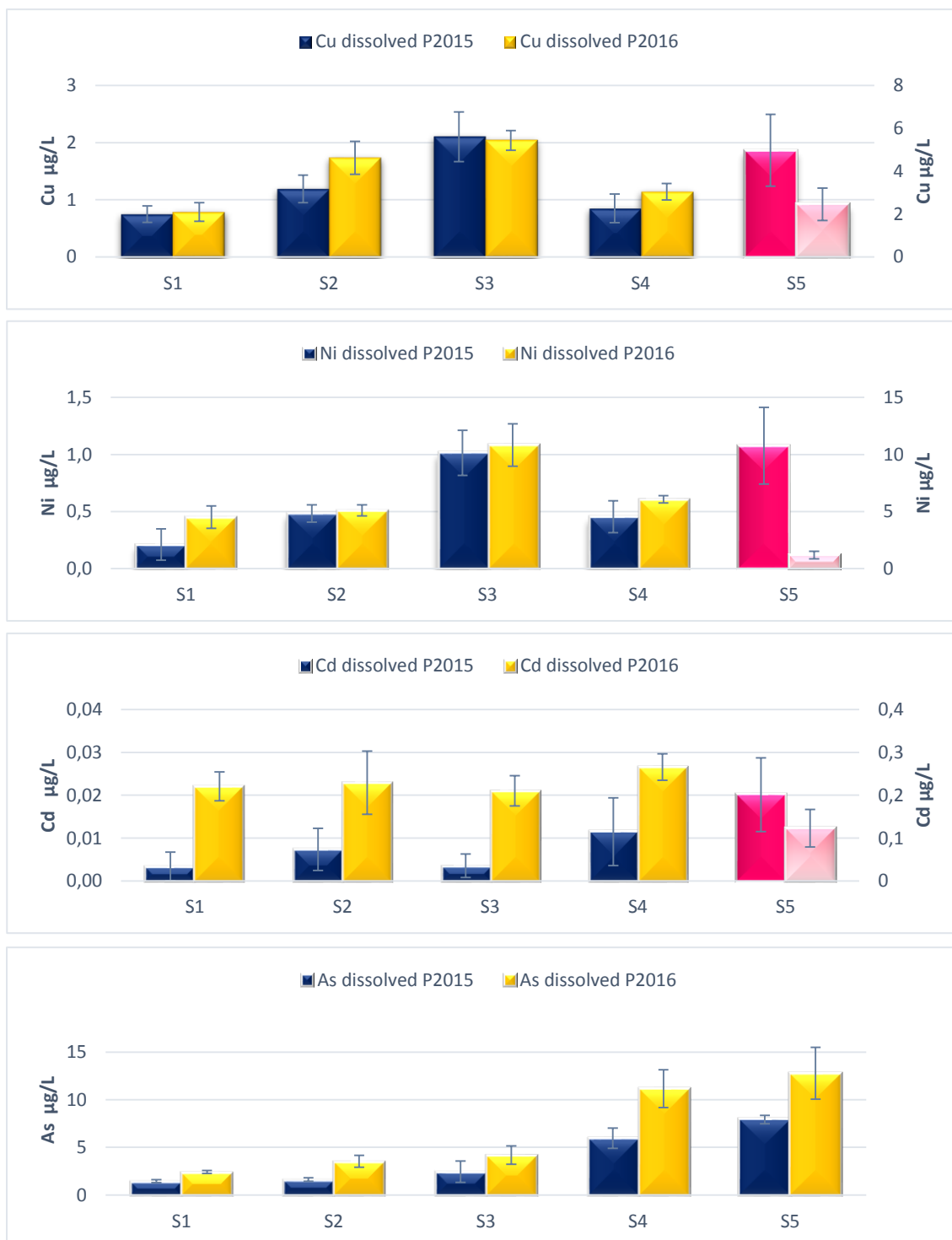


Figure 32. Dissolved concentrations of Cu, Ni, Cd and As in water surface in five sites of P2015-2016 period study ($\mu\text{g/L}$) (mean of five measures).

We considered high and low concentration of contaminant in water by comparing the observed concentration at the different sites and the EQS of contaminant in water.

At S1, for both seasons, concentrations of dissolved Cu, Ni, Cd and As were low compared to EQS norms in water. A difference observed between P2015 and P2016 for Ni, Cd and As, can be related to effect of precipitations at P2016.

The dissolved copper (Cu) concentrations at S3 were higher compared to S2 for the two campaigns periods, probably due to copper enrichment from copper pipes in houses.

As expected, significant higher amount of Ni and Cd ($p < 0.05$) were pointed out at S5, due to the impact of industrial discharge. For Ni and Cd, at the other sites no significant differences ($p > 0.05$) existed.

In water, arsenic occurs mainly as arsenate (H_2AsO_4^-). The dissolved arsenic (As) levels were higher at S4 and S5 ($p < 0.05$) compared to other sites for both campaigns P2015 and P2016. The dissolving arsenic levels were higher at S5 than at S4 ($7.9 \pm 0.45 \mu\text{g/L}$ and $6 \pm 1 \mu\text{g/L}$ respectively at P2015 and $12.8 \pm 2.7 \mu\text{g/L}$ and $11.2 \pm 2 \mu\text{g/L}$ respectively at P2016). Arsenic can be found because of its natural occurrence in soil in this area.

Precipitation (higher at P2016 than P2015) leads to increased soil leaching, which induces an increase in metals/metalloids level in water body. In contrast, when precipitation lasts, it induces a dilution phenomenon, leading to a decrease contaminants in the water. Except at S5 (enriched by heavy metals from industrial activities), rainwater at P2016 increase the dissolved contaminant concentrations in water at S1, S2, S3 and S4.

Although copper and nickel are essential trace elements, they become toxic beyond threshold concentrations in surface waters. Cadmium and arsenic are not essential, and their toxicity appears at low concentrations. These contaminants can therefore affect the aquatic organisms in the river involved.

For the PCA analysis of metals and metalloids distribution related to anthropogenic sites, three groups were also observed (fig. 33). The first group concerned the reference site S1 and the two upstream sites S2 and S4. The second group concerned downstream sites S3 impacted by urban discharges. Finally, the third group corresponded to S5 site, impacted by industrial discharges.

S2 did not show significant differences from S1 for the presence of metals and metalloids in water. S3 was clearly distinguished from S1/S2 according to PC2 (i.e. showing higher values for Zn and Co).

S5 was distinguished from S1 and to lesser extent S4 according to PC1, (i.e. showing higher values at S5 for As, Cd, Ni and Pb). From these results, we observed that Cu, As, Ni, Cd and Pb characterized the industrial impact (S5). Zn, Co and Cu characterized the urban impact at S3.

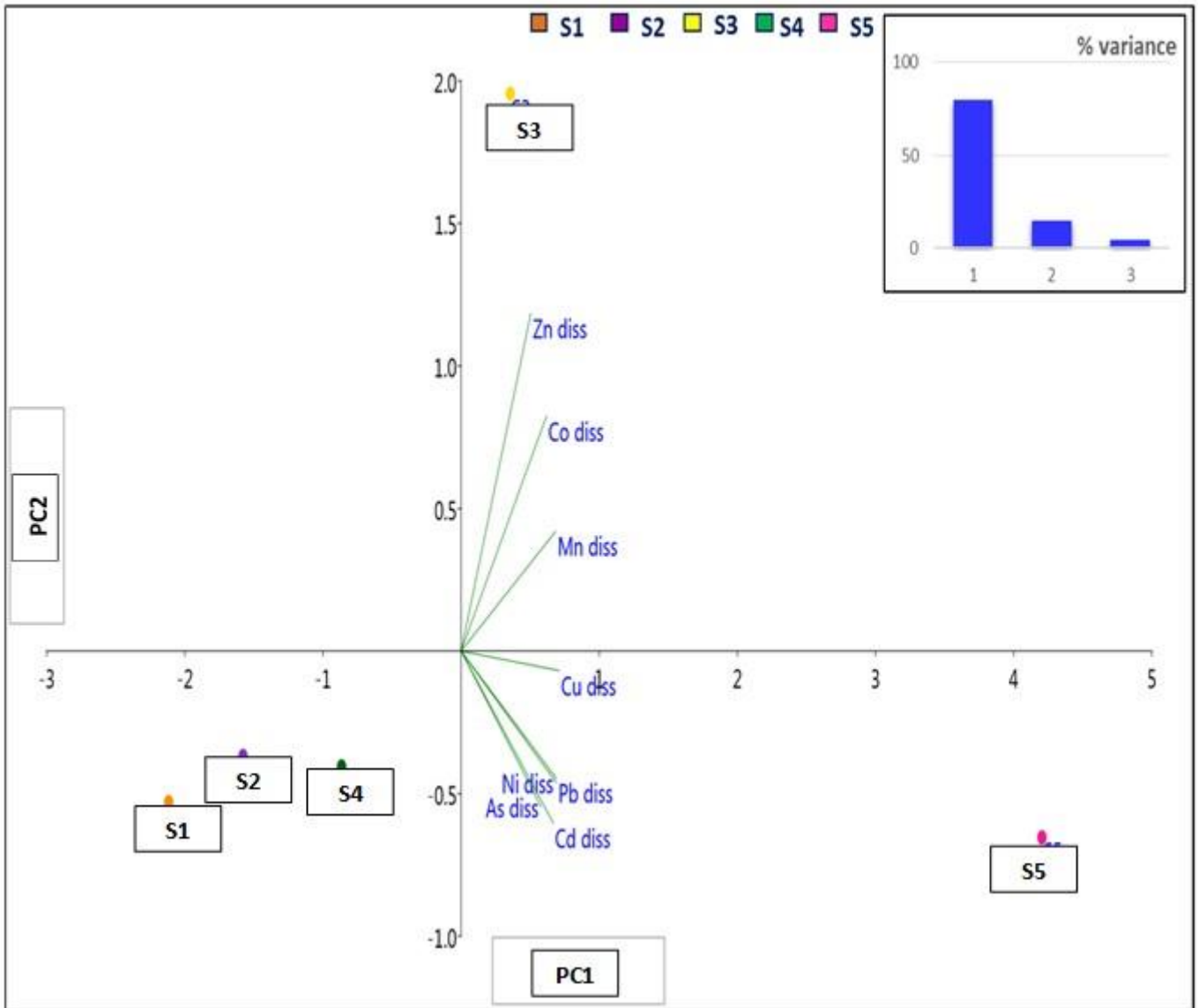


Figure 33. Principal Component analysis (PCA) of metals and metalloids related to anthropogenic site's impact at P2015.

III.1.2.3.3. Contaminants accumulation in *M. alterniflorum*

Figure 34 presents Cu and Ni content in *M. alterniflorum* ($\mu\text{g/g DW}$) in five sites at different exposure times (t7, t14, t21 and t28) for the two campaign periods P2015-P2016.

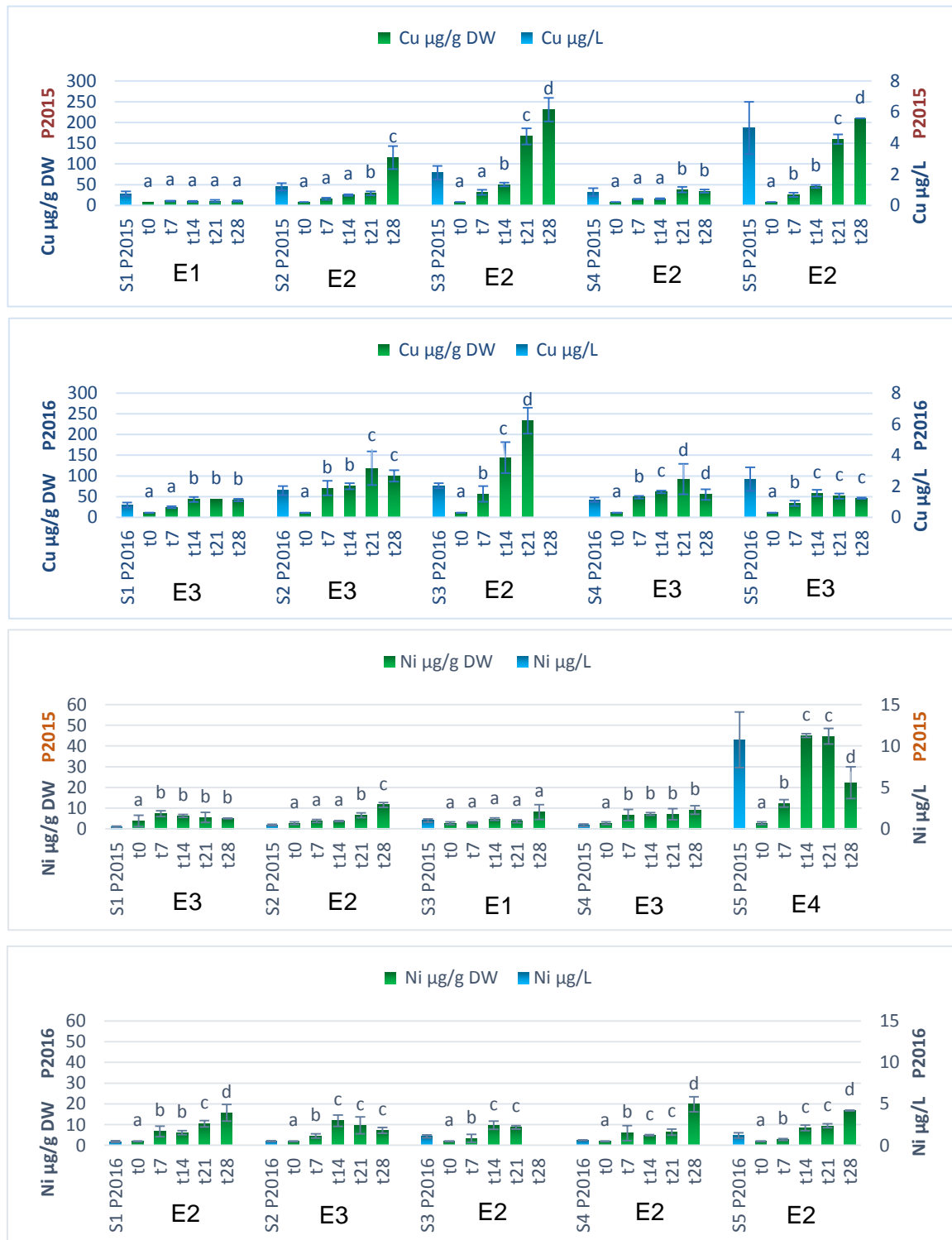


Figure 34. Cu and Ni content in water (mean of five measures) and in *M. alterniflorum* ($\mu\text{g/g DW}$) in five sites at different exposure times (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to 7, 14, 21 and 28 exposure times) (mean of three measures). Different letters mean a significant difference at $p < 0.05$. Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis. (E1, E2, E3 and E4): different evolution of contaminant accumulation pattern during time.

At S1 and S4, copper levels in the plant increased only slightly over the 28 days of exposure (factor one to five). For the S2 site, copper enrichment was greater, with an increase in the copper content in the plant by a factor of ten, for both campaigns.

At S3 and S5, the Cu accumulation in *M. alterniflorum* was still higher, Cu concentration in plant was 20 times higher at t28 than at t0. The Cu level was significantly higher at downstream sites compared to the upstream sites and to the control site ($p < 0.05$). These high levels of Cu in the watermilfoil confirm its capacity of accumulation and the bio-indication of urban and industrial pollution (Harguinteguy *et al.*, 2016, 2013; Krayem *et al.*, 2016; Ngayila *et al.*, 2007). At S5 the higher copper accumulation at P2015 ($210 \pm 5 \mu\text{g/g DW}$) than at P2016 ($47 \pm 2 \mu\text{g/g DW}$) can be explained by the change in concentration of dissolved copper in water ($5 \mu\text{g/L}$ at P2015 and $2.5 \mu\text{g/L}$ at P2016).

Results from the literature with other macrophytes highlight similar behavior. For an exposure duration of 126 days, *M. aquaticum* exposed to Cu ($8\text{-}43 \mu\text{g/L}$) accumulated higher levels in the anthropogenic site ($15 \mu\text{g/g DW}$) than in the control site ($2.5 \mu\text{g/g DW}$) (Harguinteguy *et al.*, 2013). High levels of Cu accumulation in *P. pectinatus* (806 to $921 \mu\text{g/g DW}$) were also in rivers impacted by industrial activities (Samecka-Cymerman and Kempers, 2004). These results were similar to the higher Cu accumulation in *M. alterniflorum* at urban site (S3) and industrial site (S5) compared to control site (S1). *M. alterniflorum* compared to similar studied species in literature such as *M. aquaticum* indicate the importance of this macrophyte as an accumulator of Cu and indicator of urban and industrial impact.

High levels of Cu accumulated in *M. alterniflorum* were observed compared to typical levels in plants ($10 \mu\text{gCu/g DW}$) (van der Ent *et al.*, 2013). This reference copper concentration in plant was only observed at S1 in P2015.

This indicates that in S2, S3, S4 and S5, metabolism of *M. alterniflorum* could be affected.

A nutrient effect (in particular nitrates) on copper accumulation can be observed between S3 (rich in nutrients) and S2; while both sites contain similar Cu concentrations in the water. Cu accumulation in *M. alterniflorum* was higher in S3 than in S2 for the two study periods P2015 and P2016 (fig. 34).

Ni is also considered an essential trace element, but for a very low amount; typical content is $1.5 \mu\text{gNi/g DW}$ (van der Ent *et al.*, 2013). In this study, at t21, Ni levels (Fig. 34) were significantly higher in *M. alterniflorum* at S5 ($45 \pm 3 \mu\text{g/g DW}$ at P2015) compared to S4, S3, S2 and S1 (4 to $11 \mu\text{g/g DW}$), while no remarkable difference was observed between studied sites at P2016. The high level of Ni at P2015 in the water milfoil implanted at S5 was attributed to its high concentration in the water at this sampling point. These high levels of Ni in the watermilfoil indicate that a phenomenon of toxicity in *M. alterniflorum* may occur specially at S5, and confirm its capacity of accumulation of Ni and the bio-indication of industrial pollution.

In aquatic plant *T. domingensis*, Bonanno (2013) showed a high accumulation of Ni ($49 \mu\text{g/g DW}$) for Ni levels in water of $1.2 \mu\text{g/L}$, this result is similar to those obtained in our study at S5 site. Harguinteguy *et al.* (2014) studied Ni accumulations in *S. filiformis in situ*; they also observed high levels of Ni accumulation in plants ($0.81\text{-}19.66 \mu\text{g/g DW}$) in sites with high levels of Ni in water ($3.17\text{-}26.93 \mu\text{g/L}$). *M. aquaticum* exposed to Ni for a 126-day exposure period accumulated higher Ni levels at the anthropogenic site ($6\text{-}33 \mu\text{g/g DW}$) than in the control site, corresponding to a non-anthropized mountain area ($5\text{-}25 \mu\text{g/g DW}$) (Harguinteguy *et al.*, 2013).

Figure 35 presents Cd and As content in water and in *M. alterniflorum* ($\mu\text{g/g DW}$) in five sites at different exposure times (t7, t14, t21 and t28) for the two campaign periods P2015-P2016.

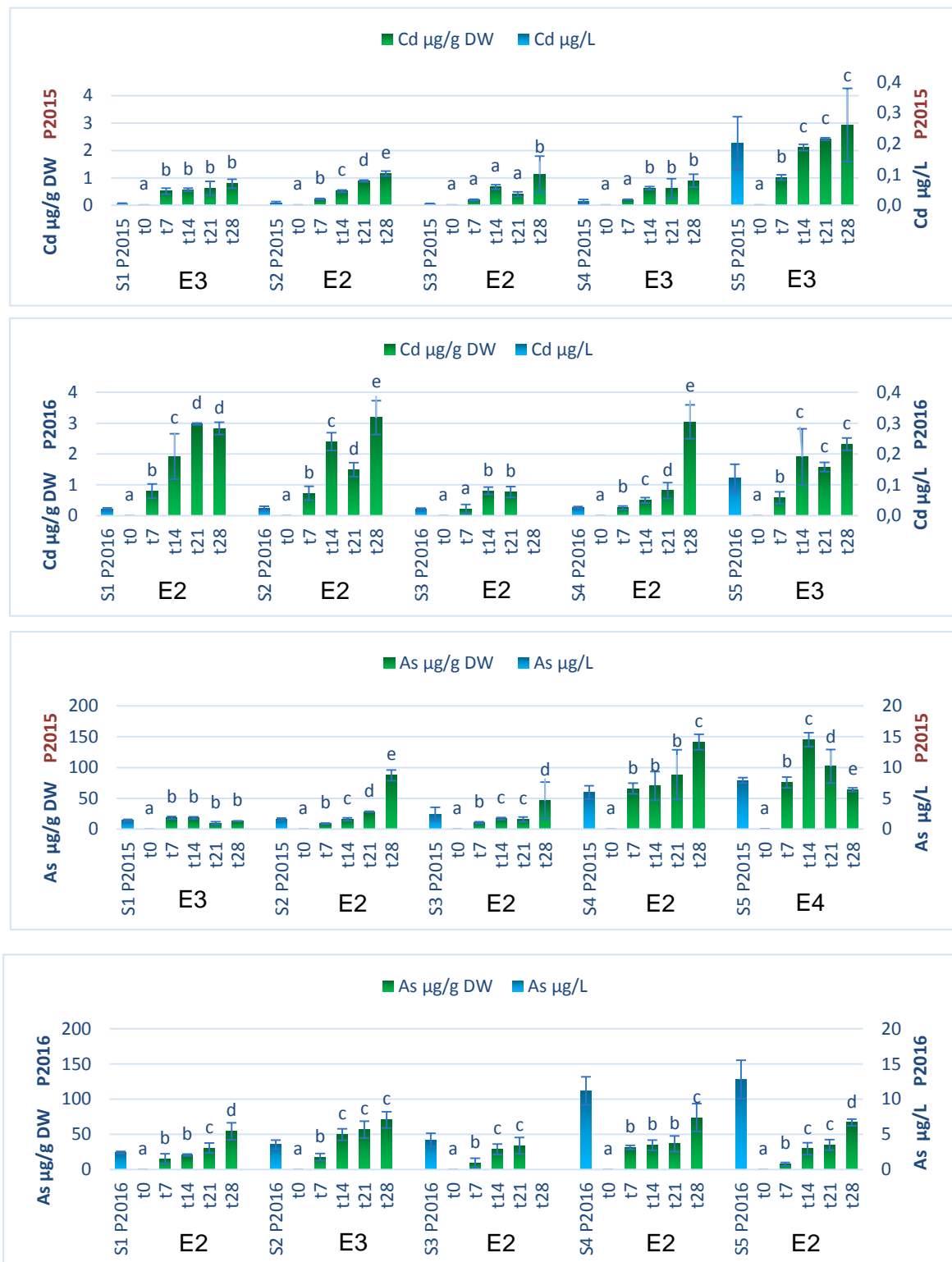


Figure 35. Cd and As content in water (mean of five measures) and in *M. alterniflorum* ($\mu\text{g/g DW}$) (mean of three measures) in five sites at different exposure times (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to seven, 14, 21 and 28 exposure times). Different letters mean a significant difference at $p < 0.05$. Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis. (E1, E2, E3 and E4): different evolutions of contaminant accumulation pattern during time.

Cadmium is a highly toxic, non-essential element. Generally, Cd concentration in plants is 0.05 µg/g DW (van der Ent *et al.*, 2013). At P2015, the maximum accumulation ($p < 0.05$) levels in Cd (Fig. 35) was found at S5 (2.9 ± 1.3 µg/g DW), a site affected by industrial wastewater discharges, in comparison with other studied sites and particularly the control site (1.17 ± 0.2 µg/g DW) ($p < 0.05$). No significant difference ($p > 0.05$) was found in Cd accumulation between the other studied sites, indicating the ability of *M. alterniflorum* to bioaccumulate Cd and to bioindicate industrial pollution.

At P2016, the cadmium accumulation was higher than in P2015 for all sites except in S3. This was attributed to the higher concentration of dissolved Cd in water at P2016 than at P2015. At P2016, Cd concentrations in water were similar between S1, S2 and S3 (0.02 µg/L), while Cd accumulation was lower at S3 (0.7 µg/g DW) compared to other sites (1.5-3 µg/g DW). This can be related to some factors such as DOC and the competition with other metals or major cations (high levels at S3), that can reduce the accumulation of Cd at S3.

Cardwell *et al.* (2002) reported Cd levels of 0.11 to 0.85 µg/g DW in the leaves of 13 aquatic plants in streams impacted by urban areas, thus similar result as those obtained at S3 in the present study. Higher Cd accumulation amounts were observed in other studies. Fawzy *et al.* (2012) showed the highest accumulation of Cd (3-11 µg/g DW) was reached in *M. spicatum* leaves *in situ* for exposition levels ranging from 1 to 70 µg/L in waters impacted by industrial activities. In addition, Samecka-Cymerman and Kempers (2004) found a Cd storage capacity ranging from 0.002 to 5.2 µg/g DW in 18 aquatic plants, including *P. pectinatus*, in streams impacted by industrial activities.

At S5, Cd concentrations observed in water was three times greater than other sites (fig. 35), while Cd accumulation in *M. alterniflorum* was similar between all sites. This was probably related to the defense mechanism in plant that reduced the accumulation of cadmium in plant tissues, when the concentration of toxic contaminant became higher than the threshold (limit of toxicity). Cadmium concentrations were higher in water at S5 than other sites was due to industrial releases in this site.

Arsenic level in plant ranges from 0.2-0.4 µg/g DW. At P2015, *M. alterniflorum* showed higher levels of As in both S4 and S5 sites (141 ± 12 and 145 ± 11 µg/g DW, respectively) compared to the other studied sites (9- 87 µg/g DW) ($p < 0.05$). In P2016, higher concentrations of dissolved arsenic were recorded in water, but the accumulation decreased compared to P2015. As seen with Cd, this was probably related to the defense mechanism in plant that reduced the accumulation of arsenic in plant tissues. Arsenic accumulation was high because of its natural abundance in the watershed of Valoine River.

Moreover, phosphate levels in water at S3 could limit arsenic uptake by *M. alterniflorum* due to the similarity of the transport system across the plant (Mkandawire and Dudel, 2005; Rahman *et al.*, 2008). This was observed by comparing results obtained at S2 and S3, in P2015 and P2016, where both sites contain similar As concentrations in the water; while the accumulation was lower in S3 than in S2 for the two studied periods P2015 and P2016 (fig.35).

The dissolved contaminant concentration in water is not the only factor governing contaminant accumulation in plant tissues, other factors like the bioavailability of metals to absorption by the plant (controlled by the physicochemical and chemical water composition), and the competition between the metals themselves and between the metals and the major cations, might come into play.

Present results evidenced the higher accumulation of essential elements such as Cu than the accumulation of non-essential elements such as Cd and As. An accumulation classification was proposed by Bonanno (2013), who showed that the accumulation of essential elements Mn (168 µg/g DW), Cu (11 µg/g DW), Ni (48 µg/g DW), Zn (126 µg/g DW), in plants was greater

compared to non-essential elements, such as, As (0.1 µg/g DW), Cd (0.1 µg/g DW), Cr (5.4 µg/g DW), Pb (1.15 µg/g DW). Similarly, Harguinteguy *et al.* (2014), showed a greater accumulation of essential metals (Co, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni) relative to the non-essential metal studied (Pb) in *S. filiformis*. Therefore, in the five study sites, contaminant accumulation in *M. alterniflorum* was greater in downstream areas (S3 and S5) than at upstream sites (S2 and S4) for Cu and for Ni and Cd in Valoine River (S5 in comparison with S4).

III.1.2.3.4. Bio-concentration factor (BCF) variation in *M. alterniflorum*

Cu and Ni BCF values of different exposure times (days) in different sites are shown in Figure 36.

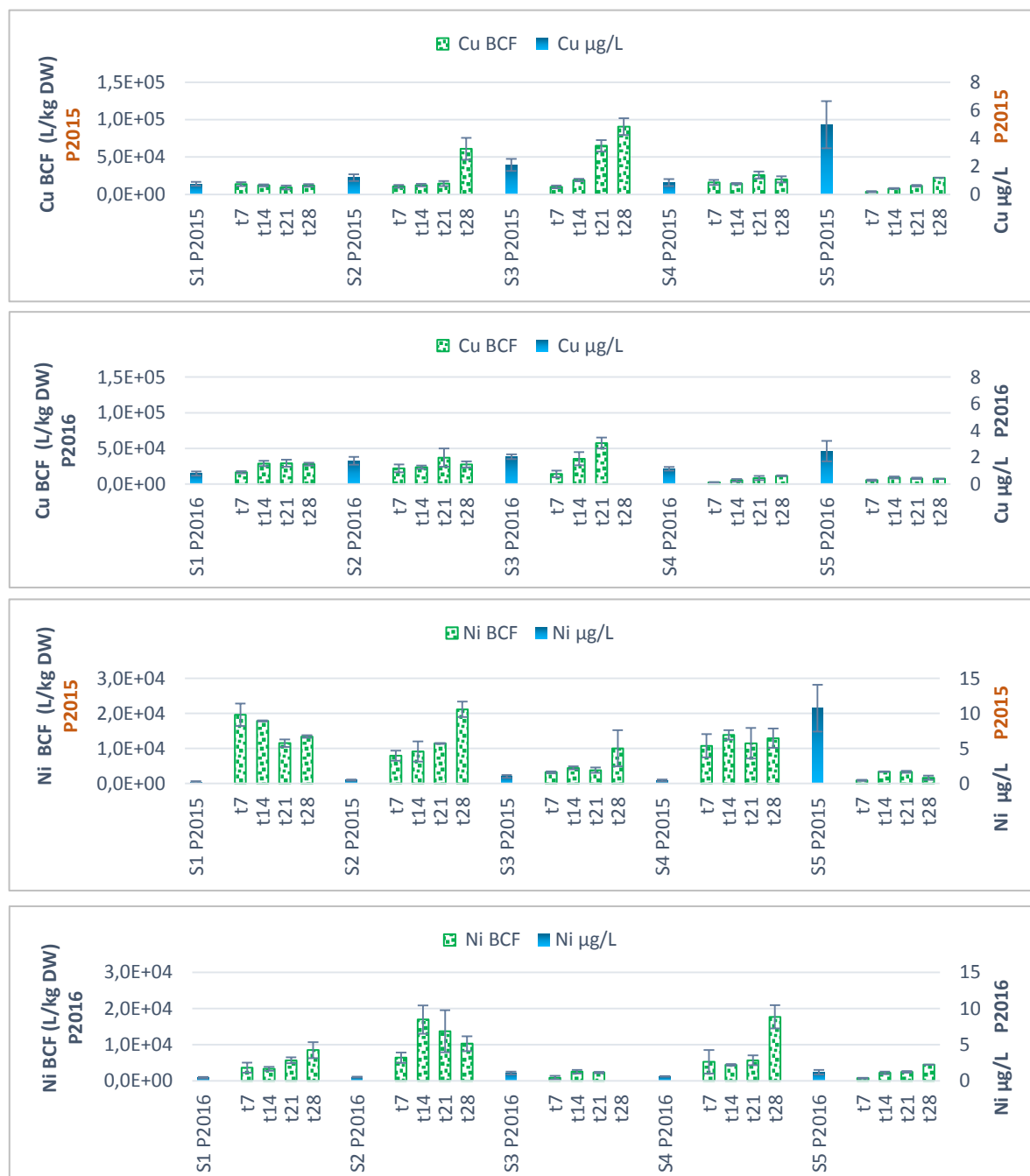


Figure 36. Cu and Ni content in water (mean of five measures) and BCF in *M. alterniflorum* (mean of three measures) in five sites. (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to 7, 14, 21 and 28 exposure times). Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis.

Bio-concentration factor (BCF) is the ability of the plant to accumulate contaminant relative to the concentration of the contaminant in the aquatic environment (Zayed *et al.*, 1998).

The highest BCF was 90000 ± 11000 L/kg for Cu at t28 at S3 (downstream WWTP discharge). The BCF should have a value greater than 1000 in order to consider a plant as a good accumulator of contaminants (Zayed *et al.*, 1998). In this study, *M. alterniflorum* showed BCF levels in tissues greater than 1000 L/kg for all studied contaminants. The absorption of contaminants depends on their content in water and on the physicochemical and chemical composition of the water because these parameters affect contaminant speciation and therefore their bioavailability.

The control site did not show significant evolution of Cu BCF over time for both campaigns. Cu showed an increase in BCF during 28 days of exposure in sites impacted by urban activities (S2 and S3). Cu showed a maximum BCF at S3 site (90000 ± 11000 L/kg) at P2015 whereas the concentration of dissolved Cu was only 2.1 µg/L, lower than S4 and S5 sampling sites. Indeed, at P2015, highest dissolved Cu concentration (5 µg /L) was observed at S5, whereas its Cu BCF (22500 L/kg) was like that obtained at the control site. This could be attributed to the fact that BCF is inversely proportional to the concentration of contaminants in water; when water is enriched by high levels of contaminants, the plant reduces the absorption of contaminants by its defense and tolerance system, leading to a decrease in BCF (McGeer *et al.*, 2003).

Considering the results from each site, no remarkable differences in Cu BCF were observed between results from P2015 and P2016 (fig. 36) related to the similar Cu concentrations in water between both periods, except at S5, where a decreased BCF was observed at P2016 due to the lower Cu concentration in water compared to P2015.

BCF values for Ni in *M. alterniflorum* varied between different sites. As for Cu, Ni showed high BCFs for water from sites containing low Ni contents, and lowest BCFs for sampling sites impacted by urban or industrial activities. The maximum BCF value was observed at S2 (21192 ± 2175 L/kg) at t28 at P2015, while the lowest BCF value was observed at S5 at t7 (750 ± 121 L/kg) at P2016. These results also confirm the inversely proportional relationship between Ni uptake and its content in water at S5, a site with high contaminants levels (in reference to EQS).

Cd and As BCF values of different exposure times (days) in different sites are shown in Figure 37.

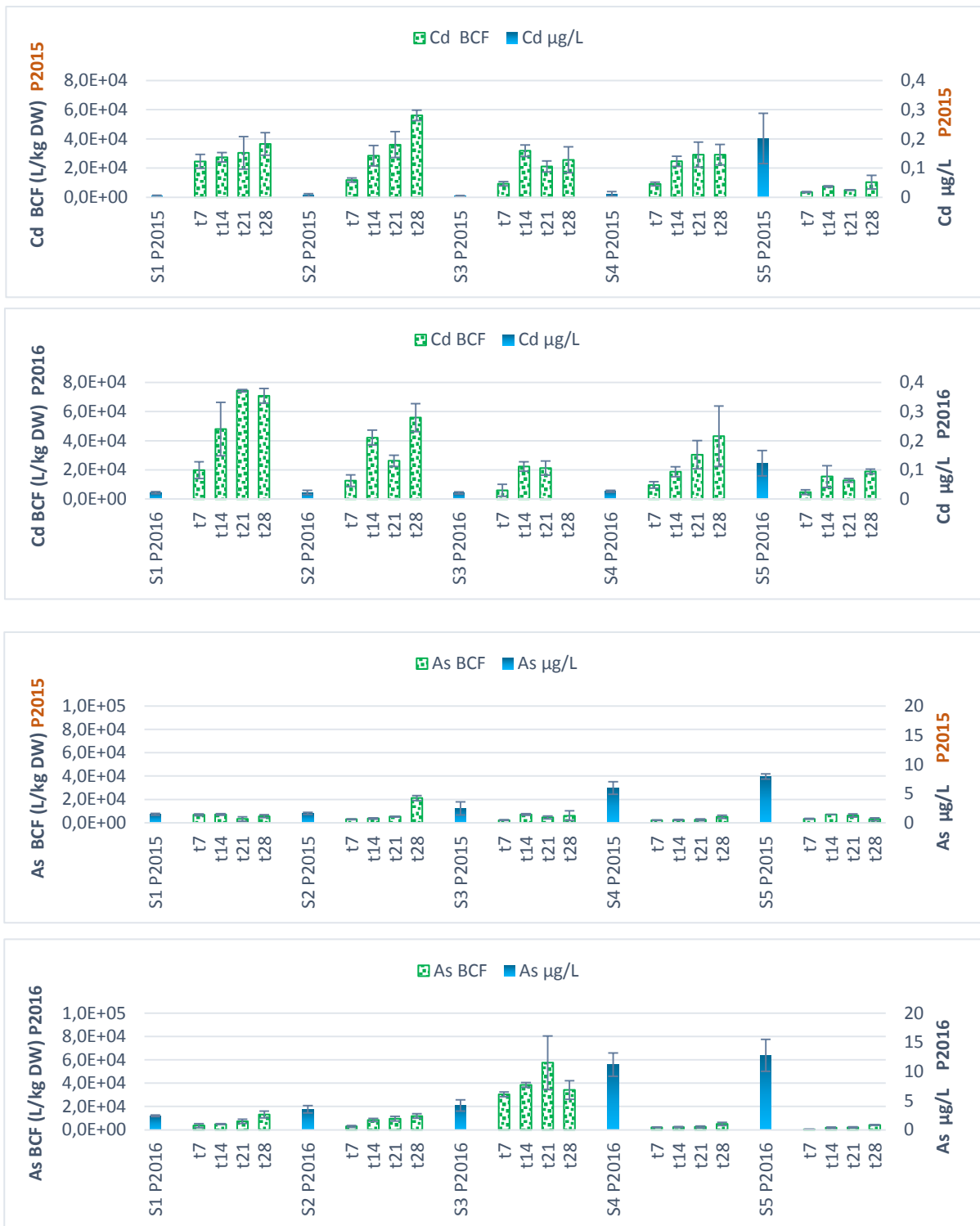


Figure 37. Cd and As content in water (mean of five measures) and BCF in *M. alterniflorum* (mean of three measures) in five sites. (t7, t14, t21 and t28 corresponding respectively to 7, 14, 21 and 28 exposure times). Dissolved concentration in water are given in blue and on the secondary axis.

The results obtained from BCF in *M. alterniflorum* for Cu and Ni, essential elements, were also observed for non-essential elements, Cd and As. For Cd, the higher BCFs were observed in sites with waters containing low Cd concentration (all sites except S5), with a maximum observed at t28 in S2 (56000 ± 3500 L/kg and 70000 ± 5000 L/kg at P2015 and P2016 respectively).

In S5 at t28, a weak BCF was observed for Cd (10000 ± 4600 L/kg and 19000 ± 1600 L/kg at P2015 and P2016 respectively). The BCF value at S5 at P2016 was higher than at P2015, which was attributed to the lower concentration of dissolved Cd in water ($0.12 \mu\text{g/L}$ and $0.2 \mu\text{g/L}$ at P2016 and P2015 respectively). As previously observed, the BCF was inversely proportional to cadmium concentration in water (McGeer *et al.*, 2003).

The arsenic BCF reached its maximum at S2 (t28) at P2015 and at S3 (t21) at P2016, due to the moderate content of As in the water at these sites. The lower As BCF were observed at S4 and S5 (with the highest concentrations in water) for both periods. This confirmed that the BCF is inversely proportional to the concentration of contaminants in water. Indeed, when water is enriched by high levels of As, the plant reduces the absorption of As by its defense and tolerance system, leading to a decrease in BCF.

Arán *et al.* (2017) showed that when metal concentrations were high in the water, a decrease in absorption was observed in *L. laevigatum*, even with the essential metals (Ni and Zn); this indicated a mechanism of reduction of the absorption by the plant in response to the metallic stress involved. Maleva *et al.* (2009) investigated the nickel accumulation in leaves of *E. canadensis* exposed to different levels of Ni (59- 590- 2950 $\mu\text{g/L}$) for five days. *E. canadensis* has effectively accumulated the metal in its leaves. They observed a nickel-dependent increase in leaves with increasing concentrations of Ni in the medium. While, at higher concentrations of Ni, the observed values of the BCF were lower 40% at 590 $\mu\text{g/L}$ and 30% at 2950 $\mu\text{g/L}$.

This highlights the plant's ability to reduce contaminant absorption, by regulating the activity of the transporters or the production of molecules involved in the metal complexation in the cells (eg PC) or metal trap systems before entering the cell (eg cell wall).

Usually, the absorption of contaminants increases over time. On the contrary, when contaminant levels in plant are higher than their threshold level, there is a reduction in the absorption of contaminants from the water, or a decrease in contaminant levels in the plant tissues by efflux. The threshold concerns the critical concentration of essential and non-essential elements in plant to grow normally; above this limit, the growth and metabolism are altered.

III.1.2.3.5. Effect of exposure time on contaminant absorption by *M. alterniflorum*

The exposure time of aquatic plants to contaminant, influence their level of accumulation. Thus, it is important to consider the effect of this parameter, to be able to define a range of optimal exposure time to evaluate the quality of a studied aquatic environment.

The Cu, Ni, Cd, and As contents in *M. alterniflorum* showed significant variation between sites with respect to the 28-day exposure duration. The evolution of the levels of these contaminants in *M. alterniflorum* (Fig. 34-35) throughout the 28 days of exposure evidenced different mechanisms. We proposed a global vision of these different ways of evolution of accumulation over time, E1 to E4.

In a first case (E1), contaminant concentration in *M. alterniflorum* does not depend on the duration of exposure, it stays stable and weak. This happens when contaminant levels are low in the water (lower than EQS). In our study, this is the case for Cu at S1 ($p > 0.05$) and Ni at S3 ($p > 0.05$) at P2015. Similar results were observed for *L. laevigatum*, exposed *in vitro* to Cr ($4 \mu\text{g/L}$) for 28 days (Arán *et al.*, 2017), and in *L. minor* implemented in urban wastewater discharges (Cd and Cu) for a period of 31 days (Bokhari *et al.*, 2016).

Another pattern can be considered (E2), the accumulation increases gradually over time; this was observed in most of cases for all metals/metalloids, all sites and for both periods P2015 and P2016 for 28 days (fig. 34-35). These observations were related to several factors include the character of metal/metalloid (essential or not essential for plant), the concentration of contaminants in water and in plant. This pattern was observed for both essential (Cu and Ni)

and non-essential (Cd and As) elements. In addition, the concentrations of these metals/metalloids in water was moderate, except certain elements such as Cd and As at S5. In some situation, contaminant concentration in water was high (such as As in S4 and S5 in P2016) but an E2 pattern was observed with a limited As accumulation, this could be explained by the reaction of the plant, it prevented the metal/metalloid to diffuse into the plant (above the EQS).

In the literature, this case is the most encountered. In *L. laevigatum* exposed to Ni at 70 µg/L, Arán *et al.* (2017) showed an increase of Ni accumulation linearly over the 28-day exposure period. Likewise, Bokhari *et al.* (2016) showed increased Cu accumulation throughout exposure time in *L. minor* placed in industrial wastewater discharges. Harguinteguy *et al.* (2013) also investigated the accumulation of different contaminants in *M. aquaticum* for an exposure duration of 126 days. They observed an increase in the accumulation of Ni, Cu and Mn during the first 30 days of exposure.

In some cases (E3) ($p < 0.05$), the significant increase in accumulation is followed by a stabilization over time; it was observed for Cu, Ni, Cd and As in all sites and for both periods (fig. 34-35). This pattern was related to the defense system of the plant, that reduced the accumulation of metals and metalloids (essential and not essential; higher concentrations in water above the EQS and higher concentrations in plant above the threshold). This system can prevent the metals and metalloids to accumulate in plants by adsorption on the cell wall or by chelating in plant cells, which reduce its accumulation.

This evolution pattern has been found in *L. laevigatum* for Cu, (1-1000 µg/L), Cr (70 and 1000 µg/L) and Ni (500 µg/L) (Arán *et al.*, 2017). Pb maximum accumulation was obtained after an exposure duration of 14 days and then it stabilized; while the exposure time to reach maximum accumulation for Cr and Ni was 21 days, followed by stabilization up to 28 days (Arán *et al.*, 2017). Bokhari *et al.* (2016) observed the same behavior of *L. minor* exposed to Ni and Cd, resulting from the urban and industrial discharges. The maximum Pb level in *C. demersum* L. was reached after 14 days, followed by stabilization until the end of the 21-day exposure period at 1000 µg/L (Chen *et al.*, 2015). In *M. aquaticum*, for an exposure duration of 126 days, Harguinteguy *et al.* (2013) observed an increase in Mn accumulation (58 µg/L) during the first 30 days of exposure and then Mn level in the plant stayed stable.

Finally, a last situation (E4) was encountered, the accumulation of contaminants in plants increased over time and after a certain duration, it decreased. The phenomenon of efflux of the contaminants from the plant in the water could explain this contaminant level decrease in plant tissues. This was observed for Ni and As at S5 (P2015) (change after t14) ($p < 0.05$) (Fig.34-35). Decreases in contaminant levels in *M. alterniflorum* was thus observed only at S5, the site with the highest contaminant level in water.

In the literature efflux phenomenon also observed for high exposure levels. Chen *et al.* (2015) also observed this phenomenon of efflux in *C. demersum* L. at a concentration of 2000 µg/L Pb. The maximum accumulation was noted after 14 days (1510 µg/g DW), followed by a significant decrease at day 21 (1311 µg/g DW). Similarly, with even higher exposure concentrations (4000, 8000 and 16000 µg/L), Pb content in the leaves reached a maximum after 7 days (2277, 3423 and 4016 µg/g DW respectively); then a significant decrease in Pb accumulation in the plants was observed until the end of the 21-day exposure period (1429, 1566, 1772 µg/g DW, respectively).

The efflux phenomena appears for different periods. Harguinteguy *et al.* (2013) observed an increase in Cu levels in *M. aquaticum* up to 28 days, followed by stability up to the 70th day and then a decrease was observed until the 126th day. Likewise, Bokhari *et al.* (2016) observed this phenomenon in *L. laevigatum* exposed to Pb from industrial releases, with a maximum period of accumulation of 24 days (325 µg/g DM). Then, the accumulation of Pb decreased until the end of exposure, 31 days (260 µg/g DM).

The E1 pattern was observed only with essential heavy metals Cu and Ni (with low levels in water). The E2 pattern was observed similarly for all contaminants; while E3 (reduction of absorption) was observed for high levels of contaminant in water (especially Cd, a non-essential element) to reduce the toxicity produced by these metals and metalloids. In addition, the efflux phenomenon was also observed for Ni and As at S5 where very high concentrations in water and in plant at S5, induced the defense system, which triggered the phenomenon of efflux.

The typical accumulation of contaminant in the plant is generally observed with essential or non-essential elements and rather low or moderate level in water (referring to EQS) for 28 days of exposition, corresponding respectively to accumulation evolution E1 and E2. These studies showed that for high levels of contaminants in the water, the time to reach maximum accumulation in plants decreased, the accumulation evolution corresponded in these cases to E3 or E4 pattern. The duration to reach maximum accumulation level was generally greater with the essential elements such as Cu (28 days), than non-essential elements such as As (21 days). The reduction of absorption (E3) and the efflux (E4) of contaminants are major mechanisms for controlling the contaminant levels in plants, thanks to the cellular defense system against metallic stress.

Efflux pumps of metal ions are in the plasma membrane (Mehes-Smith *et al.*, 2013). The most common carriers in metal efflux are P1B-ATPases and CDF families. P1B type ATPases belong to the P-type ATPase super-family and use the energy of ATP hydrolysis for the transfer of various metals across cell membranes (Axelsen and Palmgren, 2001; Clemens, 2006). P1B-ATPases exclude metal ions out of the cytoplasm against the electro-chemical gradient in the apoplast. P1B type ATPases in plants have been renamed ATPases of metals (HMA) (Baxter *et al.*, 2003).

HMA are divided into two classes, one involved in monovalent cation transport and the second in divalent cation transport (Baxter *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2016). HMAs are more selective than carriers involved in metal uptake, e.g. HMA2, HMA3 and HMA4 export Zn and Cd exclusively (Krämer *et al.*, 2007). ABC transporters are also involved in the efflux of metal ions by the plasma membrane. AtPDR8 is induced in the presence of Cd and Pb (Kim *et al.*, 2007). AtPDR8 is localized in the plasma membrane conferring tolerance to metals and efflux of Cd and Pb outside the cell (Kim *et al.*, 2007).

According to these results, the exposure time affects significantly the contaminant accumulation level. According to the contaminant (essential or not), to its concentration, the influence of exposure duration onto contaminant accumulation changes. For essential elements such as Cu, Ni, increasing accumulation levels were observed for the whole duration of the study (28 days) for all studied sites excluding Ni at S5. In this latter case, where Ni concentration was higher than required levels to plant metabolism (threshold), efflux phenomenon were observed.

The evolution of the As accumulation into *M. alterniflorum* was similar to that obtained for Ni, with an efflux phenomena at S5. In the case of Cd, accumulation into *M. alterniflorum* was increasing (E2) or increasing and then stabilizing (E3) during the experiments in all sites. The absence of efflux of this non-essential element can be due to the low Cd levels observed in water.

The duration to reach the maximum accumulation level is conditioned by the establishment of the defense mechanisms and / or efflux mechanisms in the plant. This phenomenon of reduction of absorption and efflux can affect the water quality evaluation based on contaminant accumulation in macrophytes. The exposure time to consider should thus not be too long in systems with high contaminant levels.

III.1.2.3.6. Correlation study between contaminants content in *Myriophyllum alterniflorum* and dissolved contaminant levels in water.

In this study, principal component analysis (PCA) and Pearson (r) correlation analysis on $p < 0.05$ by R and PAST software were performed between levels of dissolved contaminants in surface waters of the studied sites and contaminant level into *M. alterniflorum* at t21 at P2015 (Fig. 38).

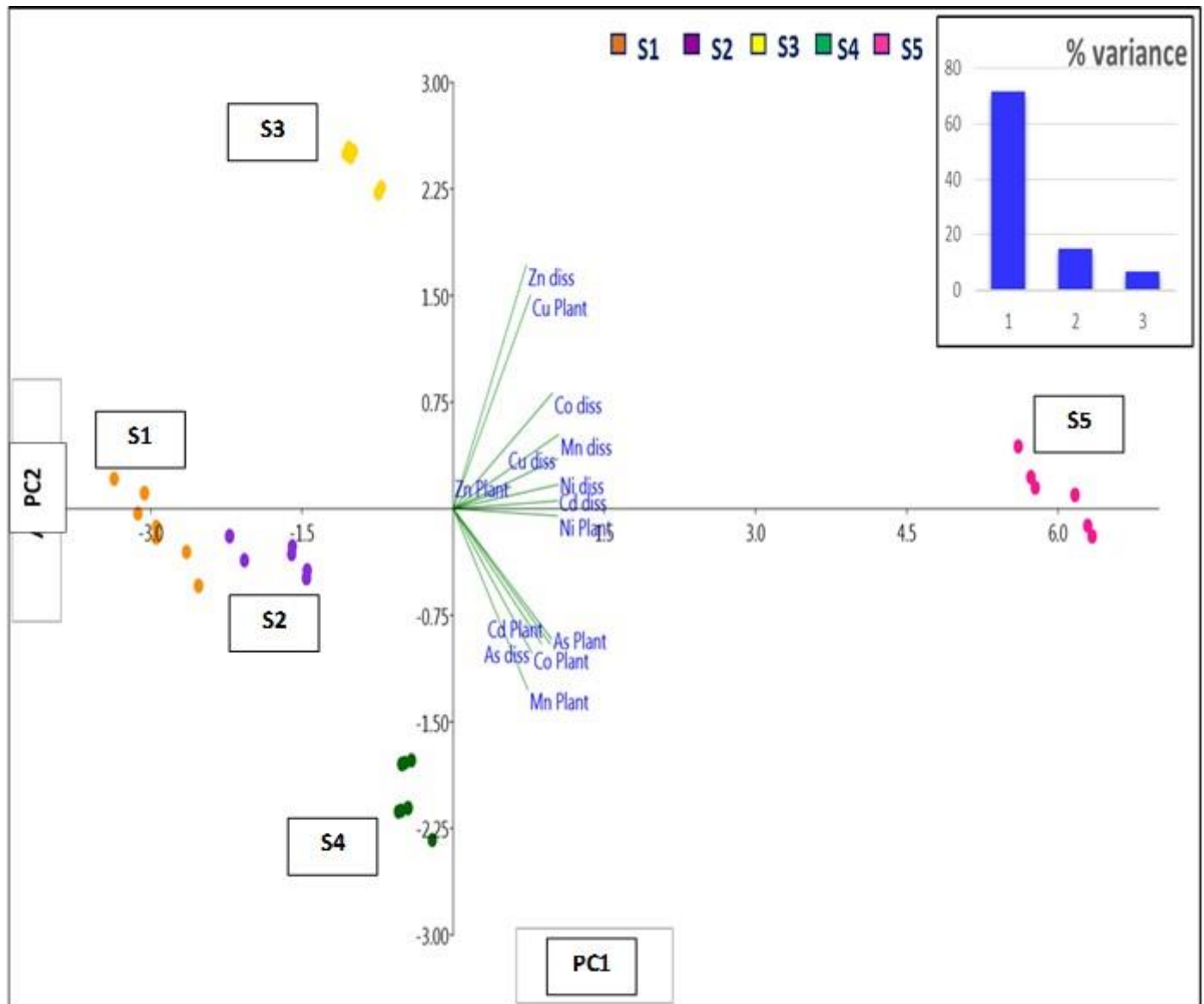


Figure 38. Principal component analysis (PCA), to evaluate the relationship between contaminants content in plants ($\mu\text{g/g DW}$) with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t21 days at P2015 ($n=30/\text{contaminant}$) ($p < 0.05$).

According to the PCA analysis, metals/metalloids in water and plant are grouped indicating a good correlation between them. *M. alterniflorum* may reflect the water quality status of each studied sites in an effective manner by detecting contaminants presence in the waters

impacted by the urban (such as Cu) and industrial (such as Cu, Ni, Cd and As) activities by high and significant ($p < 0.05$) correlations.

The Pearson table highlighted strong and positive correlations between the contents of dissolved Cu ($R = 0.7$), Ni ($R = 0.98$), Cd ($r = 0.7$) and As ($R = 0.8$) in water, and those in *M. alterniflorum* after 21 days ; however average and poor correlations were observed at t14 and t28 (table 7).

This result observed at t14 could be because the plant did not have enough time to accumulate and reflect contaminant concentrations in water. At t28, contaminant accumulation may fluctuate because of defense system that comes into play (reduction of absorption and efflux phenomena); it can reduce the accumulation and produce poor correlations between contaminant contents in plant and in water.

Correlation between contaminants levels in water and those in plant was therefore dependent of the duration of exposure, and the exposure duration of 21 days can be considered as optimal for further investigations in this study.

Table 7. Pearson “R” correlation test used for the relationship between contaminants content in plants ($\mu\text{g/g DW}$) with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t14, T21, t28 at P2015 ($n=30/\text{contaminant}$) ($p < 0.05$).

Pearson “R”	$\text{Cu}_{\text{plant}} * \text{Cu}_{\text{water}}$	$\text{Ni}_{\text{plant}} * \text{Ni}_{\text{water}}$	$\text{Cd}_{\text{plant}} * \text{Cd}_{\text{water}}$	$\text{As}_{\text{plant}} * \text{As}_{\text{water}}$
T14	0.3	0.9	0.5	0.3
T21	0.7	0.98	0.7	0.8
T28	0.5	0.6	0.2	0.4

Peng *et al.* (2008) found also positive and significant correlations between Cd ($R = 0.81$), Mn ($R = 0.98$), Zn ($R = 0.98$) and Cu ($R = 0.79$) concentrations in the leaves of two aquatic plant species of *Potamogeton* (*P. pectinatus* and *P. malaianus*) with concentrations of dissolved metals-in water. These results indicate that macrophytes reflect the spatial variations of metals in surface water (Supplementary Index).

We considered dissolved contaminant concentrations, as they may be more representative of bioavailable contaminant levels; moreover, better correlations were obtained in comparison with those obtained considering total contaminant levels. However, in the literature, most of the authors consider total (or acidified-filtered) contaminant concentration.

These positive and significant correlations have been shown in previous studies. Arán *et al.* (2017) showed that the accumulation of Pb, Cr, Ni, and Zn in the leaves of *L. laevigatum* increased significantly with the increase in total metal concentrations in water during 28 days of exposure. A significant decrease in Cu levels in *M. spicatum* ($p < 0.05$) was reported with increasing distance from the point of discharge of industrial and urban wastewater (Galal and Shehata, 2014). In *M. aquaticum*, disposed in sites impacted by anthropogenic activities; significant positive correlations between total metal concentrations in surface waters Co ($r = 0.69$), Cu ($r = 0.56$), Fe ($R = 0.50$), Mn ($R = 0.49$), Zn ($R = 0.40$) and in *M. aquaticum* ($p < 0.05$) were obtained (Harguinteguy *et al.*, 2013) (Supplementary information).

Demirezen and Aksoy (2006) found also that aquatic plants reflect the contaminant content in their environment. Harguinteguy *et al.* (2014) studied the ability of the indication of metal

pollution by *S. filiformis*. Significant and positive correlations were found for Cu (R = 0.65), Ni (R = 0.48), Pb (R = 0.68) and Zn (R = 0.82) between the total metal concentration in water and pollutant levels in leaves of *S. filiformis* (Supplementary Index). Harguinteguy *et al.* (2016) showed positive and significant correlations between the levels of Co (R= 0.46), Cu (R = 0.45), Mn (R = 0.55) and Zn (R = 0.63) in the leaves of *M. aquaticum*, and those in the water (Supplementary Index). Fawzy *et al.* (2012) also showed positive and significant correlations between Pb, Cd, Cu, and Zn metal levels in several aquatic plants and the levels of these metals in water, especially *C. demersum*, *M. spicatum* and *E. crassipes* ($p < 0.01$). The correlation found between the levels of metals in the aquatic plants analyzed with those in the water, suggests the direct absorption of these metals by the leaves (Supplementary Index).

Therefore, these results show the crucial role of aquatic macrophytes including *M. alterniflorum* in the aquatic ecosystem biomonitoring. *M. alterniflorum* could be proposed as an appropriate bioindicator for the detection of contaminants in sites impacted by urban or industrial activities.

III.1.2.4. Conclusion

Obtained results showed that urban and industrial discharges at S3 and S5 respectively, influence the physicochemical and chemical water composition in the studied sites. In all sites, precipitations at P2016 increased the dissolved contaminant concentrations in water, except at S5 where metal concentrations were governed by industrial discharge. Dissolved metals and metalloids may be less available at S3 regarding the influence of DOC, and at S5 regarding the influence of pH. In addition, PCA analysis pointed out that Cu, As, Ni, Cd and Pb characterized the industrial impact (S5), while Zn, Co and Cu characterized the urban impact at S3.

High accumulation of Cu, Ni, Cd and As in *M. alterniflorum* indicated that in S2, S3, S4 and S5, metabolism of *M. alterniflorum* could be affected.

Nutrient, in particular nitrate and phosphate, influenced copper and arsenic accumulation, as shown comparing results obtained at S3 (rich in nutrients) and S2. In addition, some factors such as bioavailable contaminant concentrations, competition with other metals /or major cations and defense mechanism can reduce the accumulation of metals and metalloids in *M. alterniflorum*.

The contaminant accumulation in plants reveals the relationship with the concentrations of these contaminants in the water on the site impacted by anthropogenic activities. The results obtained in our study and compared with the literature, show the interest of this aquatic macrophyte "*Myriophyllum alterniflorum*" for the assessment of the impact of human activities on aquatic environments (Bonanno and Giudice 2010, Miretzky *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2008, Klumpp *et al.*, 2002, Peng *et al.*, 2008, Kastratović *et al.*, 2015).

The BCF was inversely proportional to the concentration of contaminants in water (when water is enriched by high levels of contaminants (above the EQS)). When the concentration of contaminant in plant became above the critical concentration, the plant reduces the absorption of contaminants by regulating (i) the activity of the transporters, (ii) the production of molecules involved in the metal complexation in the cells (eg PC) or (iii) metal trap systems before entering the cell (eg cell wall), leading to a decrease in BCF.

The duration of exposure influences the accumulation of contaminants associated with anthropogenic activities by *Myriophyllum alterniflorum*. To compare the results obtained and to make a diagnosis of a system, it is necessary to base oneself on similar duration of exposure.

The evolution of the levels of Cu, Ni, Cd and As in *M. alterniflorum* throughout the 28 days of exposure, evidenced different mechanisms. A weak and stable evolution (E1) observed only with essential heavy metals Cu and Ni (with low levels in water). Considering all results, two main evolutions of contaminant accumulation over time were observed, a progressive increase (E2) or an increase followed by a stabilization (E3). This latter was observed for high levels of contaminant in water (especially Cd, a non-essential element) to reduce the toxicity produced by these metals and metalloids. In addition, the efflux phenomenon (E4) was also observed for Ni and As at S5 where their very high concentrations in water, induced the defense system of the plant.

In the context of water quality assessment using accumulation of contaminants by *M. alterniflorum*, given the establishment of defense phenomena of plants, with the mechanism of efflux: we could recommend, a high duration of exposure (above one month) in the case of sites with little anthropic activities but in the case of urban or industrial sites, the duration of exposure should be reduced to less than one month (a duration of 21 days seems more suitable).

Supplementary index

Table 8. Examples of correlation studies between levels of contaminants in water and plants in the literature.

References	Plant	Contaminants	Doses (µmol/L)	Exposure time	Correlation R (p <0.05) (Metal in water- Metal in plant)
Fawzy et al., 2012	<i>C. demersum</i>	Cd	0.001-0.07	<i>In situ</i> Native plants	0.6
		Cu	0.01-0.025		0.6
		Pb	0.005-0.02		0.65
		Zn	0.02-0.12		0.65
	<i>E. pyramidalis</i>	Cd	0.001-0.07	<i>In situ</i> Native plants	0.6
		Cu	0.01-0.025		0.01
		Pb	0.005-0.02		0.83
		Zn	0.02-0.12		0.35
	<i>E. crassipes</i>	Cd	0.001-0.07	<i>In situ</i> Native plants	0.44
		Cu	0.01-0.025		0.47
		Pb	0.005-0.02		0.57
		Zn	0.02-0.12		0.36
	<i>M. spicatum</i>	Cd	0.001-0.07	<i>In situ</i> Native plants	0.71
		Cu	0.01-0.025		0.58
		Pb	0.005-0.02		0.59
		Zn	0.02-0.12		0.7
	<i>P. australis</i>	Cd	0.001-0.07	<i>In situ</i> Native plants	0.06
		Cu	0.01-0.025		0.23
		Pb	0.005-0.02		0.52
		Zn	0.02-0.12		0.04
<i>T. domingensis</i>	Cd	0.001-0.07	<i>In situ</i> Native plants	0.9	
	Cu	0.01-0.025		0.36	
	Pb	0.005-0.02		1	
	Zn	0.02-0.12		0.08	

Table 9. Examples of correlation studies between levels of contaminants in water and plants in the literature.

References	Plant	Contaminants	Doses (µg/L)	Exposure time	Correlation R (p <0.05) (Metal in water- Metal in plant)
Peng <i>et al.</i> , 2008	<i>P. pectinatus</i>	Cd	0,66- 74,6	<i>In situ</i> Dissolved/ Native plants	0.58
		Cu	14,4-25,3		0.73
		Mn	0,13-1560		0.67
		Pb	2,91-29,6		0.42
		Zn	54,2-1290		0.90
	<i>P. malaianus</i>	Cd	0,66- 74,6	<i>In situ</i> Dissolved/ Native plants	0.81
		Cu	14,4-25,3		0.79
		Mn	0,13-1560		0.98
		Pb	2,91-29,6		0.34
		Zn	54,2-1290		0.98
Harguinteguy <i>et al.</i> , 2013	<i>M. aquaticum</i>	Co	2,1- 7,6	<i>In situ</i> Total/ 126 days	0,69
		Cu	4,5- 19,7		0,56
		Fe	25- 290		0,50
		Mn	3- 58		0,49
		Ni	12,1- 31,4		-0,17
		Pb	3,2- 17,7		0,09
		Zn	5,1- 15,4		0,40
Harguinteguy <i>et al.</i> , 2014	<i>S. filiformis</i>	Co	2 ,76-13,5	<i>In situ</i> Native plants	-0.16
		Cu	0,59-27,8		0.65
		Fe	85-1259		-0.07
		Mn	7,5-128,5		-0.33
		Ni	3,17-26,93		0.48
		Pb	4,99-33,47		0.68
		Zn	2,3-30,9		0.82
Harguinteguy <i>et al.</i> , 2016	<i>M. aquaticum</i>	Co	0,72- 1,93	<i>In situ</i> Native plants	0.46
		Cu	2,21-5		0.45
		Fe	35- 167,6		-0.02
		Mn	11,2- 51		0.55
		Ni	1,63-5,72		0.21
		Pb	1,39-12,13		0.02
		Zn	2,2- 18,93		0.63
	<i>P. pusillus</i>	Co	0,72- 1,93	<i>In situ</i> Native plants	0.56
		Cu	2,21-5		0.20
		Fe	35- 167,6		0.23
		Mn	11,2- 51		0.25
		Ni	1,63-5,72		-0.23
		Pb	1,39-12,13		-0.01
		Zn	2,2- 18,93		0.64

Les travaux présentés ont porté sur le potentiel de surveillance des métaux / métalloïdes dans l'eau par rapport à l'évolution de l'accumulation de ces métaux / métalloïdes dans la plante au printemps, en considérant l'influence des paramètres environnementaux.

Un niveau de précipitation plus élevé au printemps 2016 pourrait expliquer la légère augmentation des concentrations observée pour certains éléments majeurs et une augmentation des concentrations de métaux et de métalloïdes dans l'eau.

Les résultats obtenus ont montré que les rejets urbains et industriels à S3 et S5 influencent les paramètres physicochimiques et chimiques de l'eau dans les sites étudiés. Certains de ces paramètres influencent la spéciation et la biodisponibilité des métaux et des métalloïdes dans l'eau. Ainsi, les métaux/métalloïdes dissous peuvent être moins biodisponibles en S3 et en S5 du fait de l'influence du COD et du pH respectivement.

Ainsi, parmi les contaminants étudiés, les rejets d'eaux usées urbaines traitées ont conduit à un enrichissement des eaux en Zn, en Co et en Cu, alors que les rejets industriels, ont enrichi les eaux en Cd, Ni et Cu (en plus de la présence de l'arsenic dans les eaux, reliées au fond géochimique).

Alors, après avoir sélectionné les métaux et métalloïdes associés aux activités urbaines et industrielles, ainsi que les facteurs qui peuvent agir sur leur spéciation et biodisponibilité ; l'évolution de leur teneur dans la plante est présentée en considérant l'influence de la durée d'exposition.

Des teneurs élevées des métaux et métalloïdes ont été observées sur les différents sites, sauf en S1, site de référence, ce qui indique la capacité de *M. alterniflorum* à accumuler les contaminants et à détecter leur présence dans les sites étudiés. L'accumulation des contaminants dans les quatre autres sites, pourrait conduire à une altération du métabolisme de *M. alterniflorum*. Des facteurs tels que la biodisponibilité des métaux et métalloïdes, la compétition avec d'autres métaux ou des cations majeurs, les teneurs en nitrates et phosphates et les mécanismes de défense cellulaire peuvent contrôler l'accumulation des métaux et métalloïdes (en particulier en S3 et S5). Il a été montré que le niveau d'anthropisation affecte la bioaccumulation ; des valeurs de BCF plus faibles ont été relevées dans les sites présentant les teneurs les plus élevées en contaminants métalliques, comme à l'aval des rejets industriels en S5.

L'accumulation de contaminants dans les plantes est corrélée significativement avec les concentrations de ces contaminants dans l'eau ($R > 7$ avec $p < 0,05$). Ces corrélations sont différentes en fonction des durées d'exposition (t14, t21 et t28).

La définition d'une durée optimale d'exposition des myriophylles pour l'évaluation de la qualité de l'eau, en fonction du contexte (type de pression anthropique) a été étudiée.

Suivant les résultats obtenus et compte tenu de la mise en place de phénomènes de défense des plantes (phénomène d'efflux), nous pourrions recommander, dans le cas de sites peu impactés : une durée d'exposition élevée (supérieure à un mois), mais dans le cas de sites situés dans des zones subissant des pressions anthropiques, l'exposition devrait être réduite à moins d'un mois (une durée de 21 jours semble plus appropriée).

Pour avoir une information plus précise de l'effet des pressions anthropiques sur le Myriophylle, l'étude de ses biomarqueurs a été réalisée.

III.2. Optimisation des conditions de déploiement de *Myriophyllum alterniflorum* pour la détection de contaminants

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence l'intérêt du suivi de l'accumulation des contaminants dans *Myriophyllum alterniflorum* au cours du temps *in situ*, pour évaluer l'impact des rejets urbains et industriels dans un système aquatique.

Des teneurs élevées en métaux et métalloïdes dans *M. alterniflorum* ont été observées sur les sites S2, S3, S4, S5 par rapport au site S1, montrant la capacité de *M. alterniflorum* à accumuler les contaminants et à détecter leur présence dans les sites étudiés. Cette accumulation pourrait ainsi conduire à une altération du métabolisme de *M. alterniflorum* et par suite une induction de la réponse des biomarqueurs.

De plus, suivant les résultats obtenus et compte tenu de la mise en place de phénomènes de défense des plantes, la durée d'exposition de 21 jours était plus appropriée pour l'évaluation de la qualité des eaux en utilisant le suivi de l'accumulation des métaux et métalloïdes dans *M. alterniflorum*.

Une étude de la réponse des biomarqueurs est intéressante afin d'avoir une vision plus globale et précise de l'effet des pressions anthropiques sur *M. alterniflorum*.

Généralement, les biomarqueurs (au niveau cellulaire, moléculaire et tissulaire) sont des bioindicateurs à l'échelle sub-organismique, et consistent en des changements physiologiques ou biochimiques observables ou mesurables dans la plante. Ainsi, ces biomarqueurs peuvent refléter une altération du métabolisme de la plante induite par les contaminants présents dans l'environnement.

Dans ce contexte, deux biomarqueurs ont été sélectionnés pour suivre cette altération et détecter ces contaminants dans l'environnement : (i) Le MDA, (biomarqueur le plus étudié dans la littérature) un biomarqueur biochimique de peroxydation des lipides membranaires provoqué par la production des ROS lors du stress métallique, et (ii) l'activité de nitrate réductase (NR), un biomarqueur biochimique du métabolisme de l'azote et au niveau physiologique sensible à une diminution de l'activité photosynthétique, provoquée notamment par le stress métallique.

Le présent chapitre a pour objectif de montrer si la réponse de ces biomarqueurs apporte des informations complémentaires pour l'évaluation de la qualité des eaux, par rapport au suivi de l'accumulation des contaminants dans la plante. Ainsi, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour évaluer le phénomène d'accumulation des contaminants dans *M. alterniflorum*, la réponse des biomarqueurs MDA et activité NR sera étudiée dans les cinq sites subissant des pressions anthropiques différentes.

Etant donné l'influence de la durée d'exposition sur l'accumulation des contaminants dans *M. alterniflorum* et la mise en place des mécanismes de défense ; il est intéressant de voir si cette influence est similaire sur la réponse des biomarqueurs.

Par ailleurs, l'effet de saisons (période de croissance et température) va être pris en compte sur les deux modes de suivis dans *M. alterniflorum*.

Ce chapitre est présenté sous forme d'article.

Optimization of macrophyte deployment conditions for contaminant detection, via biomarkers of *Myriophyllum alterniflorum*

III.2.1. Introduction

The geochemical background, runoff, and discharges from urban, agricultural, and industrial activities can lead to enrichment of water by contaminants with adverse effects on the aquatic ecosystem (Ghorab, 2018). Although their enrichment in water may be due to geochemical background, the greatest contamination by metals and metalloids comes from anthropogenic releases generally. These contaminants often accumulate in living organisms in water, such as aquatic macrophytes, used in turn in recent years as tools for biomonitoring of aquatic environment (Krems *et al.*, 2013; Lichtfouse *et al.*, 2013).

Two types of water quality biomonitoring can be carried out with aquatic macrophytes. On the one hand, by monitoring the accumulation of contaminant levels in their tissues according to the levels of these contaminants in the water (Bonanno and Giudice, 2010; Boudet *et al.*, 2011; Krupnova *et al.*, 2018). On the other hand, by monitoring the responses of biomarkers such as metabolic or physiological biomarkers, to produce a relevant image of the effect of these contaminants on the aquatic ecosystem over time (Dazy *et al.*, 2009; Dewez *et al.*, 2005; Ferrat *et al.*, 2003; Harguinteguy *et al.*, 2013; Nichols *et al.*, 2000).

Changes in abiotic factors such as temperature and duration of exposure, are able to directly influence the bioaccumulation of contaminants and influence metabolic and physiological responses of the plant (Arán *et al.*, 2017; Bokhari *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Fritioff *et al.*, 2005; Harguinteguy *et al.*, 2013).

At the time of spring plant growth, aquatic macrophytes are characterized by rapid uptake of nutrients and trace elements (Duman *et al.*, 2006). The most well known explanation of the effect of temperature on the absorption of metals is that the increasing temperature will stimulate the metabolism and the production of biomass and consequently an increase of the absorption surface and of the accumulation of metals in the plant. In addition, the increase of the temperature and consequently the permeability of the membrane facilitates the passive and active transport of the metals through the membrane. Increased temperature increases protein synthesis, and this can lead to higher uptake of metals by the plant (Orcutt, 2000; Lynch and Steponkus, 1987).

The influence of duration of exposure is not the same for all plants; it depends both on the species and on the concentration of metals and metalloids. Usually, the absorption of contaminants increases with their contents in the water (Bokhari *et al.*, 2016). On the contrary, when contaminant levels become very high in water (above the EQS) and above the critical concentration in plant, reduction in the absorption of contaminants, or decreasing their contents in the tissues of the plant by efflux mechanisms, may come into play (Arán *et al.*, 2017; Bokhari *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Harguinteguy *et al.*, 2013).

The influence of all these factors on the bioaccumulation of contaminants in plants can skew the water quality evaluation over time and between different seasons (Arán *et al.*, 2017; Bokhari *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Harguinteguy *et al.*, 2013).

Besides, accumulation of metals and metalloids in *M. alterniflorum* can generate oxidative stress leading in particular to induce biomarker responses in *M. alterniflorum*. Given the impact of contaminants on biomarkers, the response of these latter may be interesting for water quality assessment.

In the present paper, two biomarkers were selected to monitor this alteration and thus detect the effects of contaminants on *M. alterniflorum*. The MDA is one of the most studied biomarker

in the literature; it is a biochemical biomarker of membrane lipid peroxidation caused by the production of ROS during metallic stress (Dazy *et al.*, 2009; Harguinteguy *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2005; Verma and Dubey, 2003; Zhang *et al.*, 2007). In addition, the nitrate reductase (NR) activity was selected as a biochemical biomarker of nitrogen metabolism and sensitive to a decrease in photosynthetic activity (physiological level) caused in particular by metallic stress (Francko *et al.*, 1993; Gouia *et al.*, 2000b; Rai *et al.*, 2004; Vajpayee *et al.*, 2000).

Biomarker responses of *M. alterniflorum* could give as a global vision of the anthropogenic effects of contaminants on aquatic system.

In this work, five sites were chosen according to their degree of urban or industrial pollution, as well as two seasons, spring 2015/2016 and autumn 2015, to study the spatial, temporal and seasonal variation in biomarker responses, levels of contaminants in water and in *M. alterniflorum* and associated factors.

Given the observed influence of duration of exposure on the accumulation of contaminants in *M. alterniflorum* and the establishment of defense mechanisms, it is interesting to see if this influence is similar on the response of biomarkers. In addition, the effect of seasons (growth period and temperature) will be taken into account in this study.

The aim of this work is to show whether the response of these biomarkers provides additional information for the assessment of water quality, as compared to the monitoring of the accumulation of contaminants in the plant.

III.2.2. Materials and methods

III.2.2.1. Plant material, growth conditions and reintroduction *in situ*.

The plants were proliferated for 30 days in a Murashige and Skoog (1962) medium, then, plant clones were acclimatized for 21 days in an oligotrophic synthetic medium.

The concentrations of nitrate, ammonium and phosphate were all set according to the French Ministry of the Environment, Energy and Maritime Affairs (MEDD, 2003). In a culture box containing 400 mL of sterilized medium, the plants were sub-cultured (Steri Vent High Model 80 x 100 x 100 mm, KALYS SA) (20 min, 121°C in an autoclave (DB-90, Systec)). Afterwards, they were maintained in a growth cabinet set at 26°±2°C, with a 16 h photoperiod and a light intensity of 13.1 ± 0.6 W cm² (referred to the natural light intensity) (Supra'Lux, Actizoo, 30 W).

After 15 days of acclimation in the oligotrophic synthetic medium, *Myriophyllum alterniflorum* plants were introduced *in situ*. *M. alterniflorum* were placed in a batch of 9 plastic culture dishes (Steri Vent High Model 80 x 100 x 100 mm, KALYS SA) in wire cages, and were positioned in five sites in the river. These plants were arranged for a period of 28 days in spring 2015, autumn 2015 and spring 2016.

III.2.2.2. Studied area

The five studied sites (cf. III.1.2.2.2) are chosen regarding to their degree of pollution on the Vienne and Valoine Rivers in Haute Vienne department in the center of France. From a site with none remarkable anthropogenic activities to sites with remarkable urban and industrial activities. The Vienne basin is characterized by impervious magmatic gneiss and rock soils.

The Site (S1) is located on the Combade River, located in the South East of Haute Vienne (45.785470, 1.553173). This site was considered as a reference site in the present study, with low disturbances related to human activities.

Then, the S2 sampling site is on the Vienne River (45.818801, 1.259659); at the upstream of the wastewater treatment plant (WWTP).

Downstream of the WWTP, at Site 3 (45.817552, 1.256487), the quality of the water might be affected, as sampling point is near the point of discharge of the WWTP.

Upstream Valoine sampling point (45.803208, 1.291386) (S4), surface water is of medium quality due to agricultural activities. Downstream (S5; 45.812427, 1.247920), the pollution is greater because of industrial activities, which cause contaminant discharges. The selected sampling points, located upstream and downstream of the WWTP and industrial discharges should allow us to highlight the capacity of the *M. alterniflorum* to absorb and indicate the water contamination over time exposure.

III.2.2.3. Physicochemical parameters

Physico-chemical parameters (pH, Temperature, Conductivity and Dissolved Oxygen) were measured *in situ* using a WTW Multi-Parameter Field Meters « MULTI 3430 SET F (WTW) »; the Multi 3430 SET F features a SenTix®940 IDS pH sensor (±0.004), FDO®925 oxygen optical probe (±0.5%), IDS TetraCon®925 conductivity measuring cell (± 0.5%).

Calibration step was performed using standardized solutions specific to the parameters to be measured. Determination of dissolved organic carbon (DOC) (mg/L) was used to evaluate the amount of organic matter present in the samples. The DOC was measured using a SHIMADZU® TOC-L TOC (accuracy ± 2%, detection limit 50 µgC.L-1).

III.2.2.4. Sample preparation for water analysis

The spring 2015 study has been done from 19th of May 2015 to 16th of June 2015; while autumn 2015 study has been done from 28th of September 2015 to 26th of October 2015; and finally the spring 2016 study has been done from seventh of June 2016 to fifth of July 2016. Five field campaigns have been done, one per week (t0, t7, t14, t21, t28).

Rainfall data were taken from the Limoges weather station database (climate info / Limoges-Bellegarde station).

The rivers are shallow; the sampling was thus done by filling the tubes manually, in the middle of the river, but facing the current. The vials were filled, and then the samples were kept in a cooler 4+/-3° C, in the dark.

Samples were filtered for analysis of the major elements (0.2µm cellulose acetate syringe filter; Minisart Sartorius stedim VWR), 500µL of the sample were analyzed by ionic chromatography (Dionex Dx 120) (table 10).

Table 10. Limits of quantification of anions and cations analyzed by ion chromatography (Dionex dx.20)

	Anions				Cations		
	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Mg ²⁺	Ca ²⁺	NH ₄ ⁺
QL (mg/L)	0.25	0.075	0.45	0.075	0.25	0.25	0.4

Phosphate concentrations were analyzed by colorimetry using the standard method (NFT 90-023) of Murphy and Riley (1962). The limit of quantification was 10µg/L.

To determine the water contaminant content in the dissolved fraction, 10-mL volume of the sample was filtered through a 0.2µm cellulose acetate syringe filter, and then the acidification was applied with 200µL of HNO₃ (69%, Suprapur for trace element analysis) and followed by analysis by ICP-MS (7700, Agilent Technology) (table 11).

Table 11. Limit of quantification of contaminants analyzed by ICP-MS (7700, Agilent Technology).

	Ni	Cu	Cd	As
QL (µg/L)	0.03	0.04	0.03	0,03

III.2.2.5. Sample preparation for plant analysis

Plant mineralization was performed to measure the metal concentrations accumulated by the plant. For each sample, 0.5 g of fresh watermilfoil was dried for 48 hours in an oven at 60°C. Once dried, 4 ml HNO₃ 69% (Xilab, for trace element analysis), and 2 ml H₂O₂ 30% (Prolabo, 30%) were added to the sample; the mixture was left under the hood during the night, then a mineralization was carried out in an oven with a temperature 60 °C for 48h. Then, the volume of the sample was adjusted to 10 ml with ultrapure water. Samples were filtered and stored at 4°C for analysis by ICP-MS (7700, Agilent Technology).

All analyzes were done for all campaigns (spring and autumn 2015, and spring 2016).

III.2.2.6. Biomarkers analysis

III.2.2.6.1. Analysis of the Malondialdehyde content (MDA)

Malondialdehyde (MDA) analysis was based on the method adopted by Delmail *et al.* (2011). 250 mg of fresh plant was ground with trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Aldrich, 98%) at 1%, using Fontainebleau sand (Prolabo, 150-200 μ m). Then, the mixture was centrifuged at 5000rpm for 10min at 4°C in a centrifuge (3-18 K, Sigma). For 1 mL of the supernatant, 1mL of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) was added.

Then, the mixture is heated for 30 min at 100 ° C in a water bath. After a second centrifugation (5000rpm, 10min, 4°C), the absorbance was read at 532 nm. The amount of MDA was calculated from the extinction coefficient 155 mM / cm and expressed in mmol / g MF according to the following equation:

$$[\text{MDA} = \frac{\text{Abs}_{532} \times 1000}{\epsilon \times \text{lopt} \times \text{Me}}] \quad \text{Equation (1)}$$

With: Abs₅₃₂, the absorbance of the sample at 532; ϵ , molar extinction coefficient (1.55E-03cm²/mmol); lopt, optical path length (1cm); Me, mass of the sample (0.25g).

III.2.2.6.2. Analysis of nitrate reductase activity

This activity was determined by the method of Srivastava (1974). 0.3 g of fresh plant was cut into small pieces and placed in 5 ml tubes filled with the incubation medium (phosphate buffer solution of 0.1M 7.5 pH, 200mm KNO₃ and 0.5% n-propoanol), and left in the dark for two hours at 30°C. Then, at the 1ml aliquot, 1ml sulfanilamide (1% in 3HCL) and 1ml 0.02% naphthyl ethylenediamine hydrochloride were added and shaken thoroughly. After being stored for 25 minutes for color development, the absorbance of the sample was read at 540nm. The activity of NR was calculated using the standard curve of nitrite and expressed in μ mole/h/g MF.

III.2.2.6.3. Data analysis

One-way ANOVA, followed by a post-hoc comparison Tuckey test, in the PAST 3.17 program (Hammer *et al.*, 2001), was used for evaluation of univariate data. Pearson correlation test, Principal component analysis (PCA), Canonical Correspondence Analysis (CCA) and Co-inertia analyses were performed using Past 3.17 and R v. 3.1.2 (Hammer *et al.*, 2001; R Development Core Team, 2015) (fig.39).

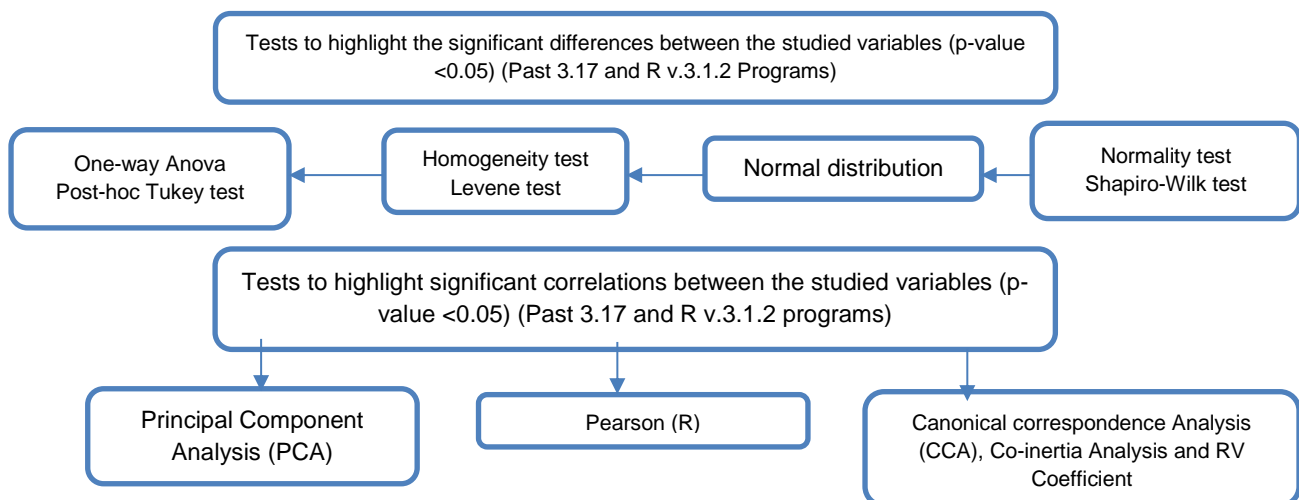


Figure 39. Representative schema of statistical analysis.

III.2.3. Results and discussion

III.2.3.1. Water quality and Seasonal variation in study sites

Table 12 show the physicochemical and major elements characterization of water in the three studied periods (mean of five measures). N.M.: Not Measured.

Table 12. Physicochemical parameters and major elements level for the three campaigns study.

Average in Spring 2015		S1	S2	S3	S4	S5
Physico-chemical parameters	Pluviometry (mm/j)	3 (max 10mm)				
	pH	7.5±0.2	7.6±0.1	7.5±0.1	7.7±0.1	7.9±0.4
	Temperature (°C)	15±2	19±3	20±2	17±1	17±2
	Dissolved oxygen(mg/L)	9.0±0.5	9.7±0.4	8.8±0.3	9.0±0.4	9.9±0.5
	Conductivity (µS/cm)	70±5	63±3	478±47	181±21	326±33
DOC(mg/L)	DOC (mg/L)	3.0±0.8	5.0±0.5	6.0±1.2	5.0±1.4	5.0±0.5
Major elements (mg/L)	Chlorides	4.0±0.7	4.0±0.2	25±7	6±2	6±1
	Sulfates	2.0±0.4	2.0±0.5	9±4	6±2	8±2
	Magnesium	1.0±0.3	1.0±0.1	1.0±0.4	1.0±0.4	1.0±0.2
	Calcium	5±2	2.0±0.3	10±4	6±2	7.0±0.5
	Phosphates (µg/L)	<10	<10	180	60	90
	Ammonium	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M
	Nitrates	6±1	5±2	10±3	4±1	5±1
	Nitrites	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M
Average in Autumn 2015		S1	S2	S3	S4	S5
Physico-chemical parameters	Pluviometry (mm/j)	2 (max 9mm)				
	pH	7.6±0.3	7.4±0.4	7.6±0.3	7.5±0.1	8.0±0.4
	Temperature (°C)	9±2	14±2	15±3	12±2	13±3
	Dissolved oxygen(mg/L)	10.7±0.3	9.9±0.5	9.5±1.0	9.9±1.0	10.5±1.0
	Conductivity (µS/cm)	78±4	66±9	420±51	267±23	330±37
DOC (mg/L)	DOC (mg/L)	3±1	3.6±0.8	6.0±0.8	4.0±0.7	3.6±1.0
Major elements (mg/L)	Chlorides	6.0±0.4	7.0±1.4	57±6	20±2	25±3
	Sulfates	2.0±0.1	3.0±0.5	23±2	21±1	27±3
	Magnesium	2.0±0.2	1.5±0.4	3.0±0.3	5.0±0.6	6.0±0.6
	Calcium	5.4±0.3	4±1	32±2	31±4	38±4
	Phosphates (µg/L)	10	20	120	9	40
	Ammonium	0.08±0.02	0.07±0.02	0.37±0.09	0.070±0.008	0.070±0.027
	Nitrates	7±2	4±1	12±3	8±5	9±3
	Nitrites	0.020±0.006	0.020±0.004	0.020±0.005	0.04±0.02	0.06±0.02
Average in Spring 2016		S1	S2	S3	S4	S5
Physico-chemical parameters	Pluviometry (mm/j)	7 (max 30mm)				
	pH	7.2±0.2	7.3±0.2	7.3±0.2	7.4±0.1	7.6±0.1
	Temperature (°C)	15±1	17±2	17±1	18±1	17±1
	Dissolved oxygen(mg/L)	9.6±0.1	9.2±0.1	9.0±0.3	9.1±0.1	9.4±0.1
	Conductivity (µS/cm)	63±7	59±3	293±93	142±18	189±32
DOC(mg/L)	DOC (mg/L)	4±1	5.5±0.9	6.0±1.4	7±1	4.0±0.8
Major elements (mg/L)	Chlorides	5.0±0.5	5.0±0.4	37±11	10±1	12±3
	Sulfates	2.0±0.2	3.0±0.2	17±4	11±1	15±6
	Magnesium	2.0±0.2	1.4±0.1	3±0.5	3±0.3	3.0±0.5
	Calcium	4.0±0.3	4.0±0.2	20±4	14±2	17±4
	Phosphates (µg/L)	<10	<10	160	20	60
	Ammonium	0.04±0.03	0.06±0.01	0.1±0.05	0.05±0.03	0.07±0.04
	Nitrates	6±1	4.0±0.3	9±2	4±1	5±2
	Nitrites	0.02±0.01	0.03±0.009	0.13±0.04	0.09±0.01	0.07±0.03

Precipitations in spring period increase soil leaching, which leads to increase particulate pollution fluxes, and to increase nutrient or contaminant levels. However, when precipitation lasts, they can induce dilution phenomenon. While in autumn period, precipitations was low, the increase in certain physicochemical parameters, major elements or metals/metalloids was due to the low level of water in this period.

At the S1 station, the average temperature was 7 °C in autumn 2015 and 17 °C for both P2015-2016 campaigns. The observed values are in line with the expected results for the Limousin Rivers (Touchart, 1999); they change between 10 °C and 15 °C in autumn and 15 °C and 20 °C in spring on average. The temperature of the water was also influenced by the precipitation (decrease of the temperature).

In all studied periods, dissolved oxygen levels were high (average of nine except in S3 due to the discharge of oxidizable materials from the WWTP). During periods of high temperature, due to link between temperature and oxygen solubility, dissolved oxygen content decreases (Walczyńska and Sobczyk, 2017).

The pH is stable during the study, with averages between 7 and 8.4 during three periods P2015, A2015, and P2016. This corresponds to a level of very good chemical status according to the order of 27th of July 2015 (between 6.5 and 8.2) (JORF No. 0198 of 28 August 2015 page 15032). These pH values in the granitic context of watershed (acidic to neutral water (Reuter *et al.*, 2008)) higher than 7, indicated anthropic impact in all sites.

Concentration of dissolved organic carbon (DOC) was the highest at S3 (due to wastewater discharge) and in the P2016 at S4 (Valoine Upstream, natural organic matter due to leaching of agriculture soils from the watershed) (7.4 mg/L). DOC can reduce the amount of bioavailable contaminant in the water, due to its complexation capacity.

Conductivity, as well as calcium, sulfate and chloride levels were also maximum at S3.

The temporal evolution is marked by a slight lowering during P2015-2016 compared to autumn, resulting from the effect low level of water surface, that increase concentrations of different parameters. For the three field campaigns, chloride and sulfate recorded grades that did not exceed ESA quality standards. This makes it possible to classify these waters in the very good (S1, S2, S4, S5) to good (S3) grid of the surface waters.

The present study shows that the highest recorded value of phosphates was at the S3 site (180 $\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{L}$) ($p < 0.05$), and to a lesser extent of the S5 site. No significant variations in phosphate concentrations between seasons were observed except at S2 and S4 ($p < 0.05$). For S4, this can be due to the impact of runoff water on the agricultural watershed.

Figure 40 presents the contaminant concentrations in the waters of the different sites (The data corresponds to average values from the five field campaigns). The scale has been changed for Valoine Downstream site (S5) because the contaminant concentration at this place was far higher than the contaminant level in other places.

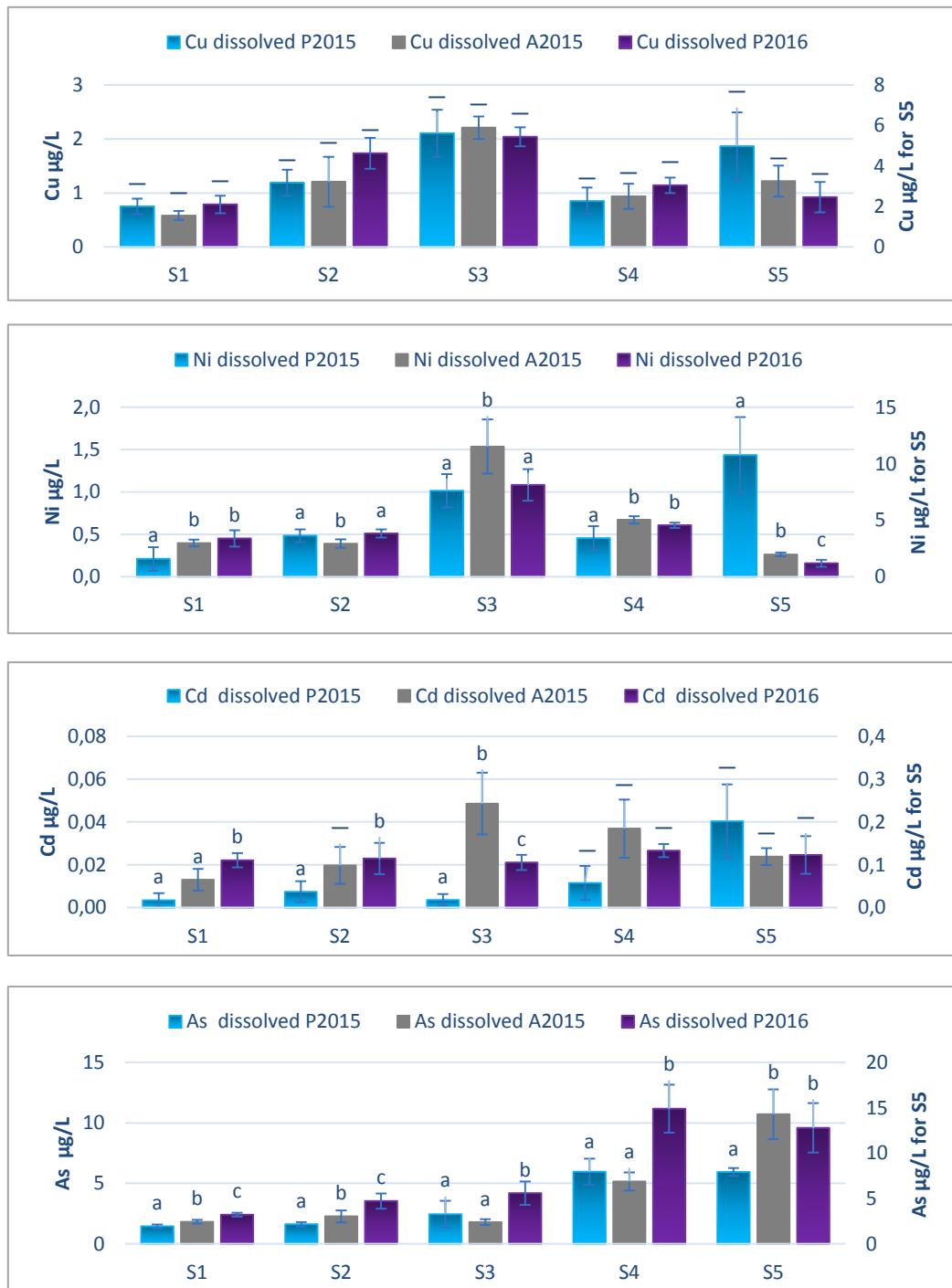


Figure 40. Dissolved Cu, Ni, Cd and As in water surface in five sites in P2015, A2015 and P2016 (µg/L) (mean of five measures). Different letters mean significant differences at $p < 0.05$. (—) means no significant difference with other campaigns.

Figure 40 shows that dissolved concentrations of Cu in water did not show any remarkable differences between the three periods in P2015, A2015 and P2016 for S1, S2, S3 and S4. At site S5, dissolved contents in Cu (5 µg/L) in P2015 was higher than levels of two other campaigns (2-3 µgCu/L).

Likewise, in S5 dissolved contents in Ni (10 µg / L) and Cd (0.2 µg / L) in P2015 were higher than levels of other campaigns (Ni 1-2 µg / L; Cd (0.1 µg / L).

The Ni level in waters showed significant differences between the P2015-2016 and A2015 at all the studied sites, whereas only the S1, S2 and S3 sites showed significant seasonal differences for Cd contents (Fig. 40). The levels of dissolved As in water, as for Ni, showed remarkable differences between spring and autumn with a greater value for P2016 for all sites except for S5, where there was increasing levels of As in water in A2015 (10 µg/L) compared to other periods (P2015 (6 µg/L), P2016 (8 µg/L)).

During the P2016 period, the high contaminant levels in waters may be related to soil leaching by precipitations. In autumn, corresponding to the low water level period, the dilution effect is limited and contaminant concentrations are therefore higher than during high water level periods. At S5 (for Cu and Ni especially), contaminant level are mainly governed by the impact of industrial discharges, and not by season effect.

pH, hardness and DOC influence the speciation of contaminants and therefore affect their bioavailability in the different studied sites.

Based on the influence of pH (higher at S5 for all periods), dissolved metals and metalloids may be more available at S1, S2, S3 and S4 than at S5.

The highest DOC levels (6 mg/L) were found in S3 for the three studied periods, which is related to WWTP releases, while sites S2, S4 and S5 showed similar DOC contents. Thus, DOC may contribute to the reduction of bioavailable metal levels in water, especially at the S3 site. At P2015-2016, the DOC levels recorded are high for all sites, this may be due to the phytoplankton activity during the summer period, which increases the production of biomass and thus of the degraded organic matter (Biermann *et al.*, 2014).

The PCA (fig. 41) shows that according to the PC2, the results obtained from merged data of P2015 and P2016 differ significantly from the autumn of 2015.

About physicochemical and chemical parameters, a higher temperature was observed in P2015 and 2016 than in A2015, and a consequent negative correlation with dissolved oxygen concentration ($R = -0.5$; $p < 0.05$) which was higher at A2015. An increase in the flow speed, DOC and phosphate contents was observed, related to precipitations at P2016. Nutrients and major element concentrations (such as nitrate, ammonium, sulfate, chloride ions....) were higher in autumn, due to the low level of water effect at this period. No difference in pH and conductivity between the two seasons was notable.

The levels of metals and metalloids (Cu, Ni, Cd and As) in water were higher at P2015-2016 than autumn, this may be principally due to soil leaching increased by precipitations at P2015-2016 period.

During the three campaigns, physicochemical parameters obtained from the different sites were not as much different to affect the concentration and the bioavailability of metals and metalloids in water. Indeed, the main parameter governing metals and metalloids (Cu, Ni, Cd) concentration in water was due to anthropogenic activities and due to both anthropogenic activity and natural contamination (soil geochemistry) for arsenic.

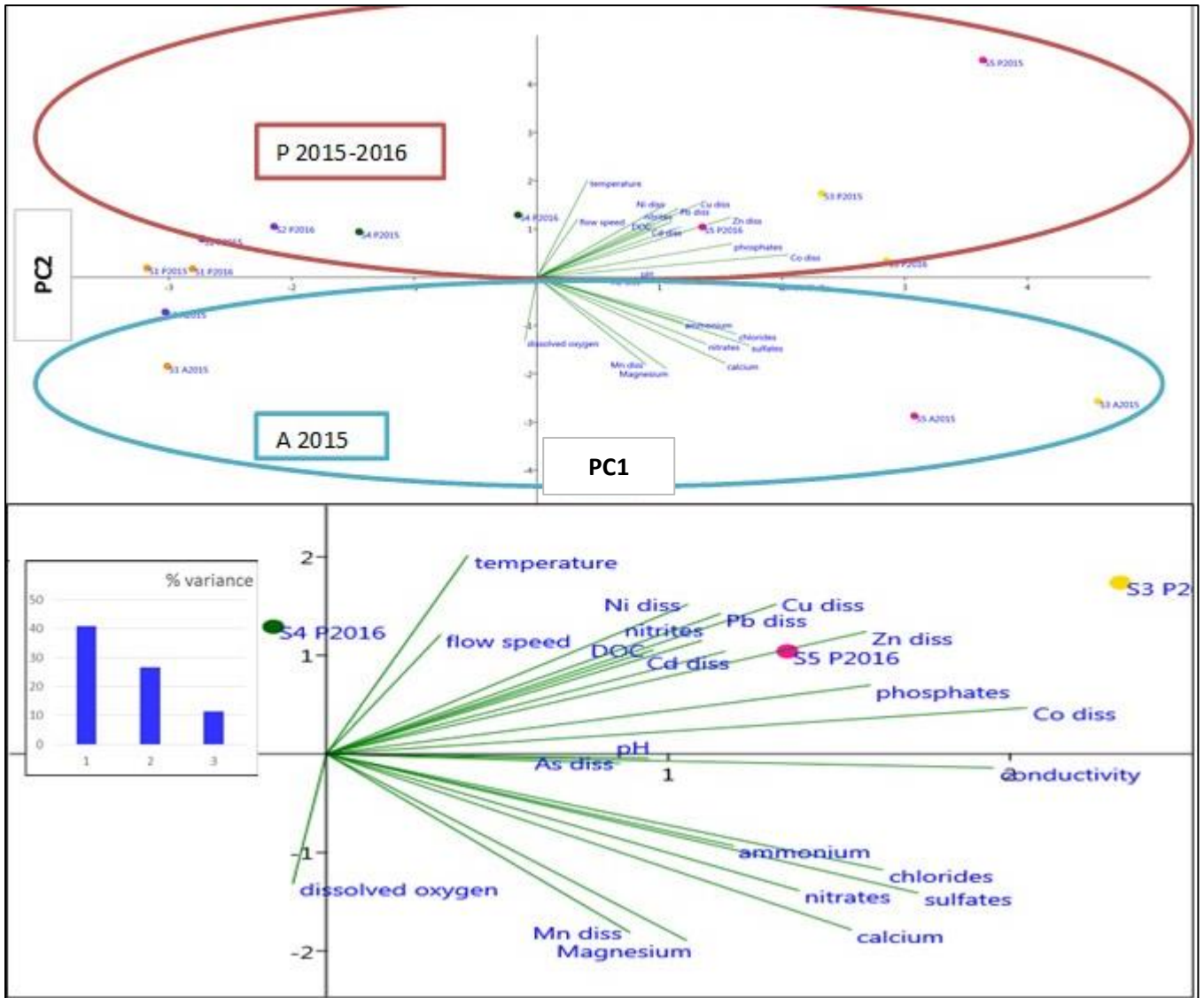


Figure 41. Seasonal distribution of physicochemical parameters and contaminants according to plan D1x D2.

III.2.3.2. Seasonal variation of contaminant accumulation in plant

Figure 42 shows the seasonal variations of Cu, Ni, Cd and As levels in *M. alterniflorum* in the studied sites and during spring (2015 and 2016) and autumn 2015 periods, after 21 days of exposition (T21 chosen like exposure duration for the maximum accumulation of contaminant in *M. alterniflorum*, cf. III.1.2.2.5).



Figure 42. Seasonal variation of contaminant (Cu, Ni, Cd and As) accumulation in plant at t21 in five studied sites in spring (P2015), autumn 2015 (A2015) and spring 2016 (P2016) (n=three measures). Different letters mean significant differences ($p < 0.05$). (—) means no significant differences.

On the S1 site, *M. alterniflorum* showed a significantly higher accumulation of Cu, Ni, Cd and As in the spring 2016 compared to the spring and autumn 2015.

At the S2 site, upstream of WWTP releases, Cu level in the plant in spring 2016 was higher in comparison to other seasons (P2015 and A2015). Levels in Ni, Cd and As were higher in spring 2015-2016 compared to autumn 2015.

Downstream of WWTP, at S3 site, the levels of Cu in the plant was far lower at A2015 in comparison with P2015 and P2016. Ni, Cd and As levels in plant were higher in spring 2016 in comparison with results at P2015 and A2015.

M. alterniflorum at S4 site showed seasonal differences for Cu, Ni, and Cd between spring 2015-2016 and autumn 2015, whereas As did not show significant differences between the three seasons at the S4 site.

In S1, S2, S3, S4 sites, a seasonal effect, due to temperature and growth period (spring period), is pointed out concerning the accumulation of contaminants. Their levels in *Myriophyllum alterniflorum* were lower at autumn, whereas contaminant levels in water were not minimum.

During the growth period, Catsiki and Papathanassiou (1993) found elevated levels of contaminants in *Ulva sp.*, which was explained by higher rates of photosynthesis and respiration, favoring assimilation of contaminants like observed in our study at spring period.

Grudnik and Germ (2010) found similar results to our study, the concentrations of pollutants, such as Cr, As and Pb in *M. spicatum* were greater in spring than any other season. Higher water temperatures influence plant metabolism (Duman *et al.*, 2006; Fritioff *et al.*, 2005; Lynch and Steponkus, 1987) and protein synthesis (Nilsen and Orcutt, 1996), as well as growth rate, and absorption of nutrients and contaminants.

Thus, higher water temperatures induce an increased production of biomass in submerged macrophytes (Ekvall and Greger, 2003; Rooney and Kalff, 2000), and increased uptake of contaminants. Contaminant concentrations in *Elodea* plant tissues increased with increasing temperature (11 and 20°C) for Cu (345-444µg/g DW), Zn (1168-1919µg/g DW), Cd (259-269µg/g DW) and Pb (1447-1771 µg/g DW) (Fritioff *et al.*, 2005). In addition, this result was observed in *Potamogeton* for Cu (133-193µg/g DW), Zn (1297-1679µg/g DW), Cd (108-151µg/g DW) and Pb (88-151µg/g DW) (Fritioff *et al.*, 2005).

The monitoring of water quality considering contaminant accumulation in plant must therefore take into account the effect of season and temperature.

At S5 site, affected by industrial effluent release, the levels of contaminants in the plant showed significant differences between the three campaigns. On the one hand, in spring 2016, levels of Cu and Ni in plants were lower than in spring and autumn of 2015. On the other hand, in autumn 2015, the levels of Cd and As in plants were higher compared to spring 2015 and 2016. Ni accumulation level in *Myriophyllum alterniflorum* followed the levels of contaminants in the water (Fig. 42), and no major seasonal effect on the levels of this contaminant was noted. A similar tendency was observed for Cu.

At S5, Cd and As levels in *M. alterniflorum* were higher in autumn 2015 than in spring 2016, while in the water, there was no significant difference in contaminant level. Different factors may come into play in this situation such as (i) the Interaction between the arsenic ions and the phosphate ions (high levels in spring, fig. 41), which can limit the absorption of arsenic by the plant in the spring season. In addition, (ii) the high affinity of metals and metalloids on organic matter (high in spring season) could also decrease the bioavailability of

metals/metalloids in water; and (iii) the competition with other metals/metalloids or major cations, which can limit the contaminant absorption by the plant.

Lower contaminant level in plant observed in spring, could be explained by dilution effect due to higher biomass production in spring/summer season. Indeed, Villares *et al.* (2002) showed that contaminant accumulation (Cr, Cu, Mn, Ni, Zn) in both studied aquatic plants *Ulva rigida* and *Enteromorpha intestinalis* was lower in summer than in autumn (lower temperature). They suggested that it was due to a dilution effect due to the growth plant during favorable period. This dilution effect is a process in which the concentration of contaminant decreases subsequent to its distribution in the higher biomass quantity (Audet and Charest, 2007).

Finally, there may be various reasons for the different accumulation levels observed at the various seasons, including: (1) changes in contaminant levels in water (Fig. 42), (2) interactions between metals/metalloids themselves and with other parameters (pH, COD, major ions...); (3) metabolic factors affected by temperature or nutrient levels.

A statistical analyze of the data is necessary to confirm or not the impact of these various parameters.

III.2.3.3. Correlation study between contaminant content in water and in *M. alterniflorum*

The Pearson correlation between contaminant levels in water of the studied sites and in the plant was determined (Table 13). The relationship between the contaminant content in *M. alterniflorum* dataset and the dissolved contaminant levels in water dataset was provided by the Co-inertia and canonical analysis (percentage).

Table 13. Correlation of Pearson (R), CCA and Co-inertia analysis, for the relationship between contaminants content content in plants ($\mu\text{g/g DW}$) with dissolved contaminants content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at 21 days of P2015, A2015 and P2016 (n=15/contaminant) ($p<0,05$).

Contaminant content in plant T21 P2015	Pearson correlation R ($p<0,05$)	Dissolved contaminant in water T21 P2015
CCA 92%- RV: 0.79		
Cu	0.7	Cu
Ni	1	Ni
Cd	0.8	Cd
As	0.8	As
T21 A015		T21 A2015
CCA 91%- RV= 0.5		
Cu	0,9	Cu
Ni	0.8	Ni
Cd	0.9	Cd
As	1	As
T21 P2016		T21 P2016
CCA 77%- RV= 0.37		
Cu	0,7	Cu
Ni	0,6	Ni
Cd	0,5	Cd
As	0,9	As

A permutation test was determined to study the strength of the relationship between the two datasets, i.e. the significance of the RV coefficient ($p < 0.05$). This test was used to measure the closeness between the contaminant content in plants and dissolved contaminant levels in water. This coefficient is a multivariate generalization of the Pearson correlation coefficient.

A relationship was observed during the exposure of watermilfoils after 21 days of exposure *in situ*. Positive and significant correlations were observed between contaminant levels (Cu, Ni, Cd and As) in water and in the plant (R between 0.5 and 1 with $p < 0.05$) (Table 13). The order of correlation was different between seasons after 21 days of exposure.

The Co-inertia tests (Monte-Carlo test for 1000 replication $p = 0.001$) and the Canonical Correspondence analysis (Table 13) during the three periods indicated that the inertia of the data set of dissolved contaminants in water was expressed by the data set of contaminant contents accumulated in the plant.

According to the canonical corresponding analysis in table 9 for the three periods, it was found that the data set of contaminants in the water of the different sites is best expressed by the dataset of the levels of contaminant levels in the plant at spring 2015 (CCA 92% - RV = 0.71), followed by autumn 2015 (Co-inertia 91% - RV = 0.5) and spring 2016 (CCA 77% - RV = 0.37).

From the results of Pearson analysis, copper correlations were higher at autumn (R= 0.9) than at spring 2015 and 2016 (R=0.7), which may be related to the nitrate concentration (high levels at autumn). The accumulation in autumn was higher than in spring period at t21, which could increase the coefficient of correlation between Cu content in water and in *M. alterniflorum* in autumn. Likewise for As, high correlation was observed at autumn period (R=1) while at spring 2015 and 2016, correlations were lower (R=0.8-0.9). This result could also be explained by nutrient levels (higher at spring). Phosphate concentrations were higher at spring 2015 and 2016 than at autumn 2015, which could reduce accumulation in the plant by the competition effect between phosphate and arsenic ions.

For Ni and Cd, correlations were lower at P2016 than at P2015 and A2015. This could be due to several factors controlling the bioavailability in water (organic matter level, pH...) and the absorption of metals/metalloids by the plant (bioavailability, competition with other cations or metals, nutrients, temperature...), and thus to affect the correlation between the contents of metals in water and in the plant.

The following variations of the metal content in *M. alterniflorum* compared to metal content in water and its correlations showed that these macrophytes can give a qualitative evaluation of the quality of the environment, in agreement with Demirezen and Aksoy (2006), who postulated that aquatic plants reflect the contaminant content of their environment. In addition, these results indicated that these macrophytes reflected the spatial contaminant levels in the water.

However, environmental factors, water composition and fluctuating levels of contaminants in the plant over time may skew the results for long exposure periods (cf. III.1.2.2.5). The evaluation of the water quality by measuring contaminant levels in the plant and its correlations with contaminant levels in water surface is not highly accurate for biomonitoring. For this, the use of biomarkers of *M. alterniflorum* could be a pertinent tool for water quality biomonitoring over time.

III.2.3.4. Evolution of biomarkers responses in different seasons

III.2.3.4.1. MDA content

MDA is one of the most widely used biomarkers for detecting the oxidative stress generated by the presence of metals and metalloids. Several studies have shown that the exposure of different plants to metals and metalloids leads to an increase in the concentration of MDA in aquatic plants (Banu Doğanlar, 2013 ; Dazy *et al.*, 2009 ; Krayem *et al.*, 2016 ; Singh *et al.*, 2006 ; Sinha *et al.*, 2005; Verma and Dubey, 2003 ; Zhang *et al.*, 2007).

The analysis of MDA concentration in *M. alterniflorum* tissues are presented in the figure 43 during 28 days in spring 2015, 2016 and autumn 2015. The data correspond to values from the five field campaigns (t0, t7, t14, t21 and t28), for each season (at P2016 at t28, we do not have data (technical problem at this site)).

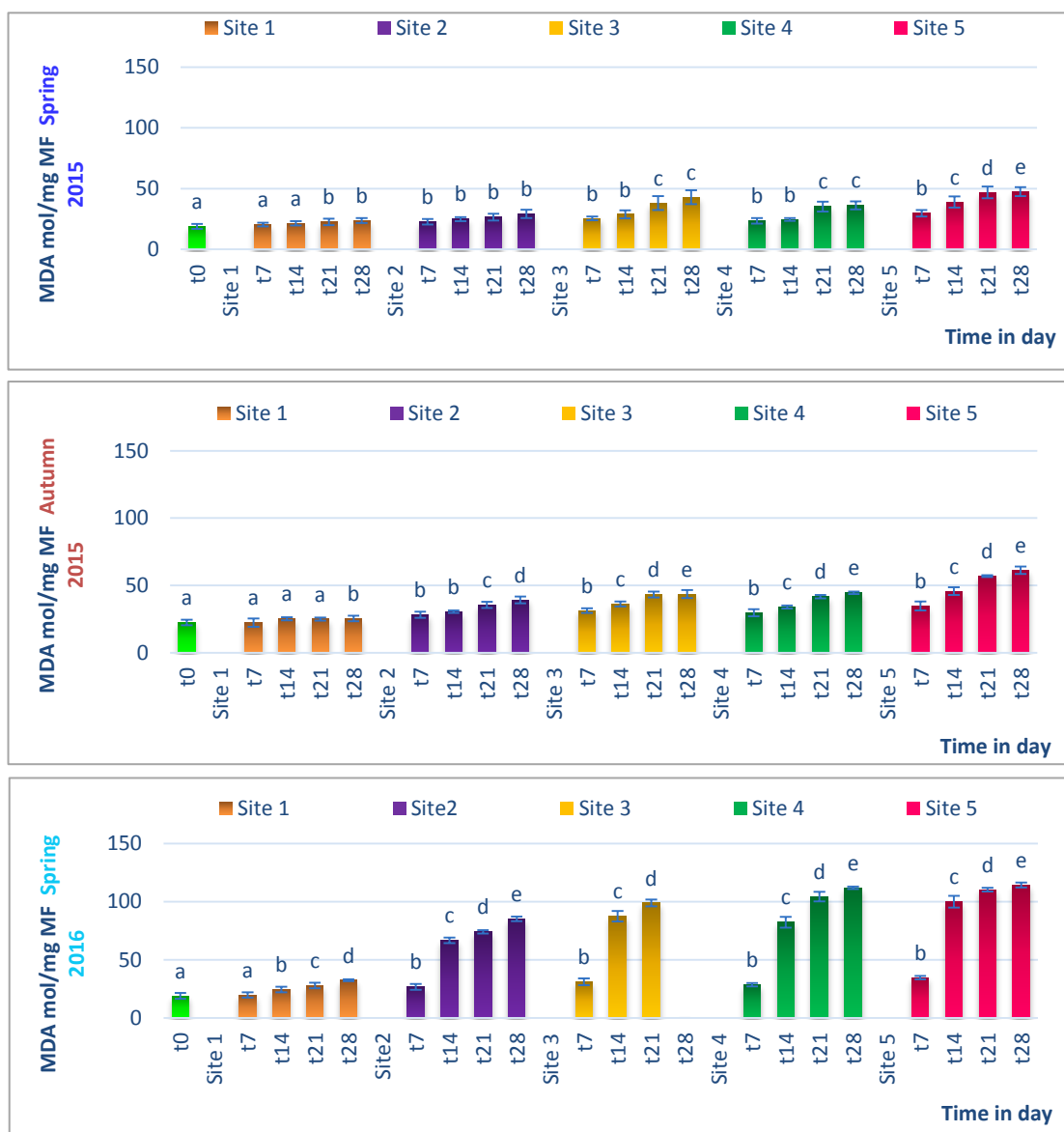


Figure 43. MDA variations in '*Myriophyllum alterniflorum*' during P2015, A2015, and A2016 exposure for 28 days (n=nine measures). Different letters indicate significant difference (p<0.05).

Malondialdehyde (MDA) is the decomposition product of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in membranes, and the increase in its content in plant tissues indicates that there is an increase in lipid peroxidation of membranes showing that plants are subject to antioxidant stress (Hou *et al.*, 2007).

As expected, at S1 (reference site without noticeable impact of anthropogenic activities), the concentration of MDA in *M. alterniflorum* was low compared to other sites.

MDA level in *M. alterniflorum* was higher in anthropological sites, indicating the presence of contaminants, responsible of lipoperoxidation.

The MDA amount increased to a rate of approximately 17 % in spring 2015, 44% in autumn 2015, and 164% in P2016 at site S2, and 52% in spring 2015, 68% in autumn 2015, and 271% in P2016 at site S4. These results pointed out an impact of diffuse releases in the S2 (upstream of the WWTP with diffuse urban discharges) and S4 (upstream of industrial discharges with diffuse agricultural discharges) sites on the MDA biomarker.

The concentration in MDA in *M. alterniflorum* at S3 (WWTP) was higher than in site S2 with a tendency to increase from t0 to t28. The gap between the S2 and S3 sites was 41% in spring 2015, 20% in autumn 2015, and 34% in P2016. Thus, this parameter makes it possible to highlight an alteration of the environment by urban discharges.

At S5, the concentration of MDA in plants was higher by 34% in spring 2015, 36 % in autumn 2015, and 6% in P2016 compared to site S4. Both sites showed an increasing trend throughout the study. MDA biomarker could thus also be useful to evidence industrial release.

MDA is the decomposition product of polyunsaturated fatty acids biomembranes and its increase shows that plants are under oxidative stress (Hou *et al.*, 2007). The concentration of MDA increases significantly when *M. alterniflorum* is subjected to contaminant and particularly metallic stress. This is mainly attributed to the increase of ROS levels and the stimulation of the lipoxygenase (Wang *et al.*, 2009).

MDA concentration shows the same trend during the exhibition of plants in all campaigns, with higher levels in P2016. At this period, the contaminant levels were higher and above the EQS for various contaminated sites (supplementary information). Pb and Co were also present at higher concentrations in P2016 in comparison with spring 2015 and autumn 2015; these metals could also have induce an increase in MDA level (fig. 43). The contaminant enrichment could be explained by the high precipitations at this season, generating more polluted runoff waters.

III.2.3.4.2. Nitrate reductase activity (NR)

Nitrate reductase (NR) is a key enzyme in the metabolism of nitrogen; it allows the reduction of nitrates to nitrites (Tischner, 2000). NR activity in plants exposed to metals / metalloids can be inhibited (Rai *et al.*, 2004; Vajpayee *et al.*, 2000)

Figure 44 presents nitrate reductase activity in *M. alterniflorum* tissues for 28 days in each field campaign (P2015, A2015 and P2016). The data correspond to values from the five field campaigns (at P2016 at t28, we do not have data (technical problem in the field)).

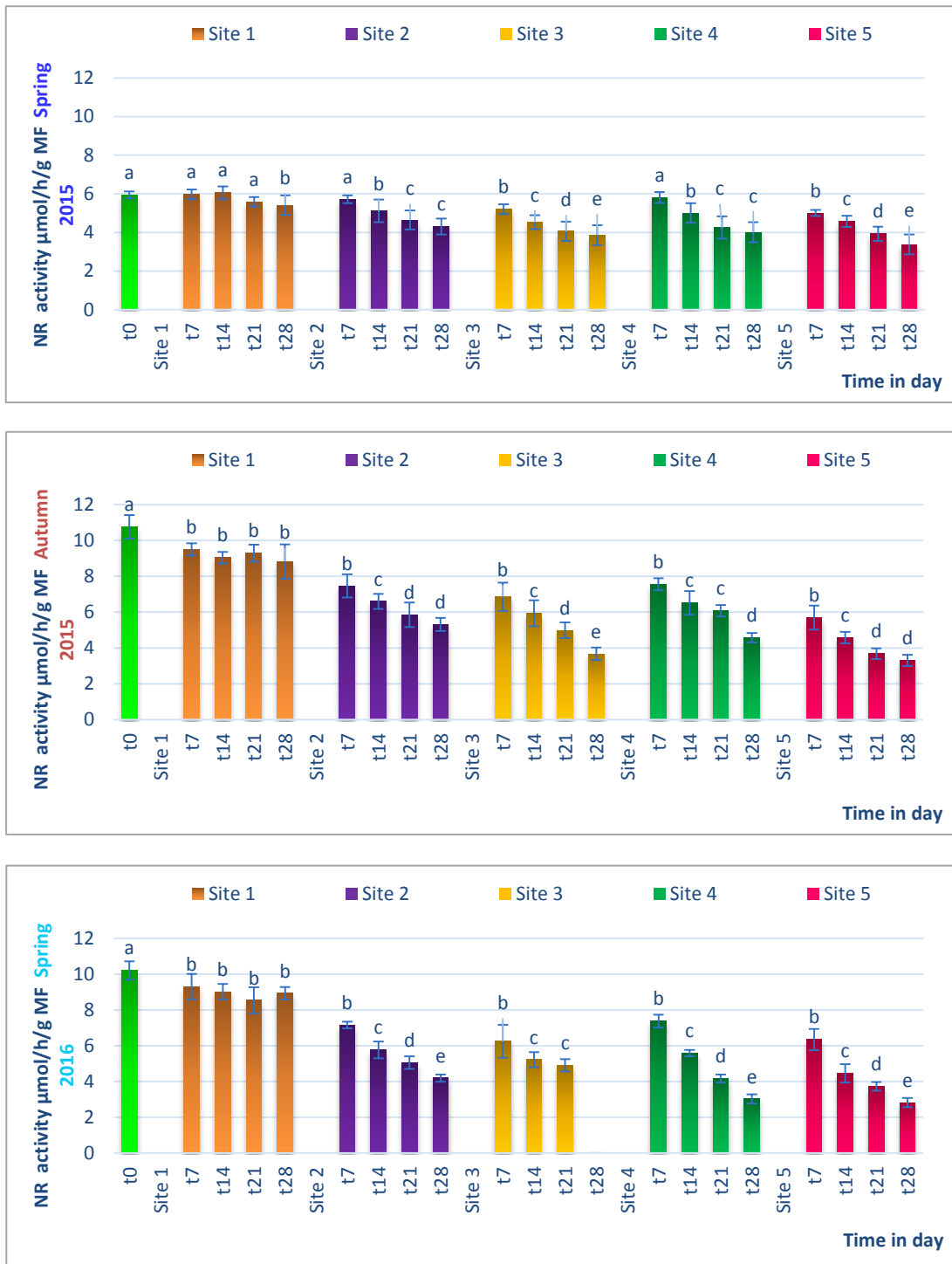


Figure 44. NR activity variation in *Myriophyllum alterniflorum* during P2015, A2015 and P2016 for 28 days exposure (n=nine measures). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

At S1, the activity of NR during the 28 days was close to initial value (t0). The comparison of NR activity between t0 and t28, indicated a decrease at sites S2 and S4, about -17% in spring 2015, -33% in autumn 2015, and -44% in P2016 at site S2, and -30% in spring 2015, -33% in autumn 2015, and -54% in P2016 at site S4.

This can point out that diffuse pollution induce contaminant release in the S2 (urban) and S4 (agricultural) sites because of the NR biomarker decrease.

The NR activity in the watermilfoil at S3 (WWTP) was lower than in the S2 site with a decreasing trend from t0 to t28. The gap between sites S2 and S3 was -20% in spring 2015, -17% in autumn and -2% in spring 2016. Thus, NR activity was also able to highlight an alteration of water quality due to wastewater discharges.

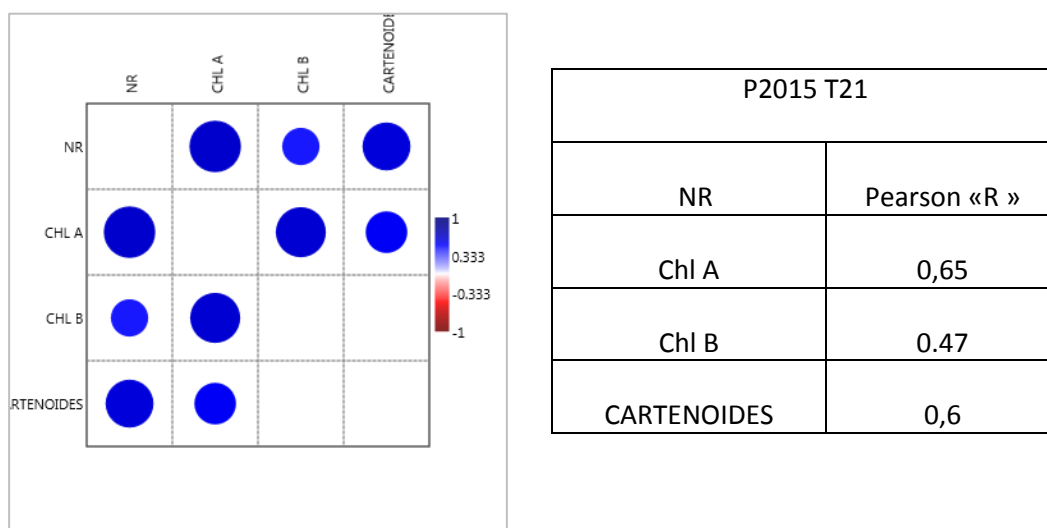
At S5, NR activity in plants was lower compared to S4 (-7% in spring 2015, -38% in autumn, and -10% in P2016). Thus, NR activity could evidence an alteration of the environment due to industrial effluents, with metallic contamination.

The NR activity between sites is different, and reflects the observed results of the chemical signature of the water, as well as the levels of contaminants in the plant, but also experimental condition parameters as, temperature or nutrient levels.

Nitrate reductase (NR) is a key enzyme in the metabolism of nitrogen. NR catalyzes the first stage of nitrate reduction to nitrite. NR, nitrogen metabolism enzyme is sensitive to the decrease in photosynthetic activity caused by metallic stress. Contaminants have an adverse effect on nitrate uptake and transport to the leaves by reducing nitrate reductase activity (Balestrasse *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 1996). Therefore, it is interesting to see the relationship between the nitrate reductase activity and the content of chlorophyll pigments (table 14). Table 14 highlights good correlation between NR activity and chlorophyll pigments in the present study.

Chlorophyll pigments analysis at spring 2015 was made according to the protocol adopted by Delmail (2011).

Table 14. Pearson “R” correlation analysis between nitrate reductase activity and the chlorophyll pigments at t21 at spring 2015 (n=45)



Previously, Garg *et al.* (1997) also observed a reduction in nitrate reductase activity with increasing Cd (0-25 µM) in vitro in *Hydrilla verticillata*. Cadmium is accumulated primarily in the cytosol, which inhibits NR activity due to its high affinity for -SH groups (Garg *et al.*, 1997).

III.2.3.5. Effect of duration of exposure on biomarkers responses

The response of the studied biomarkers during the three seasons was consistent with the chemical signature of the water and the levels of contaminants in the plant (significant difference between upstream/downstream sites, and in comparison with the control site S1). The evolution of biomarker responses over 28 days showed in most cases a tendency to increase for the MDA biomarker and to decrease for the NR activity.

Conversely, fluctuations (c.f. III.1.2.3.3) were observed in the evolution of contaminant accumulation in plants. The accumulation of contaminants does not take a linear evolution over time like biomarkers responses. These fluctuations observed over time were related to the defense mechanisms (especially efflux mechanism) of the plant, who control the contaminant content in the plant. This mechanism was not found in the evolution of biomarkers response over time, which can be more pertinent than the evolution of contaminant content in plants.

Therefore, tracking the response of biomarkers can be more relevant than contaminant bioaccumulation to evaluate impact of urban or industrial activities in the water. The response of the biomarker was similar between t21 and t28; hence, the consideration of the 21-day duration of exposure was relevant to evaluate response of biomarkers in comparison with contaminant accumulation.

III.2.3.6. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in water

The analysis of the correlations between the response of the studied biomarkers and the contaminant levels in water at t21 during the three periods is shown in Table 15.

Significant correlations were observed between MDA levels and NR activity with copper, nickel, cadmium and arsenic during the three periods.

Significant correlations of the response of these two biomarkers studied with the contaminants in water, are produced either in relation to the increase of lipoperoxidation linked to the oxidative stress, and generated by the contaminants in the water, which increases the MDA levels (biochemical biomarker). Alternatively, in relation to the decrease of the nitrate reductase activity (biochemical and physiological biomarker) essentially related to the photosynthetic activity and the nitrate metabolism in the plant.

MDA gave high significant correlations with contaminant content in water (R between 0.4 and 0.9) while with NR activity anti-correlations were obtained (R between -0.4 and -0.8). This could be related to the photosynthetic activity that is higher at spring period than at autumn; the increase in photosynthetic activity may reduce the decrease in NR activity (in response to metallic stress) at this period. For that, MDA biomarker reflected better the impact of these four contaminants Cu, Ni, Cd and As, related to urban and industrial release (table 15).

In addition, these correlations were controlled by the bioavailable metals/metalloids concentrations in water.

As observed in table 15, lower correlations were observed between the two biomarkers and dissolved metals and metalloids concentrations in water at spring 2015 and 2016 than autumn 2015. This could be due to the influence of physicochemical and chemical parameters such as COD and pH (high at spring period), that may decrease the bioavailability of metals and metalloids in water at spring period, thus, correlations may be lower in this season than in autumn 2015.

Table 15. Correlation of Pearson (R) for the relationship between biomarkers responses in *M. alterniflorum* with dissolved contaminants content in water in five sites at 21 days of spring, autumn 2015 and P2016 ($\mu\text{g/L}$) ($n=45/\text{contaminant}$) ($p<0,05$).

Biomarker responses T21 P2015	Pearson correlation R ($p<0,05$)	Dissolved contaminant in water T21 P2015
MDA	0.7	Cu
	0.7	Ni
	0.7	Cd
	0.7	As
NR activity	-0.4	Cu
	-0.4	Ni
	-0.4	Cd
	-0.5	As
T21 A015		T21 A2015
MDA	0.9	Cu
	0.9	Ni
	0.9	Cd
	0.8	As
NR activity	-0.8	Cu
	-0.8	Ni
	-0.8	Cd
	-0.6	As
T21 P2016		T21 P2016
MDA	0.6	Cu
	0.7	Ni
	0.4	Cd
	0.7	As
NR activity	-0.6	Cu
	-0.6	Ni
	-0.4	Cd
	-0.7	As

III.2.3.7. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in plant

The Pearson correlation between biomarkers responses and contaminant levels in *M. alterniflorum* was applied (Table 16).

Table 16. Correlation of Pearson (R), for the relationship between biomarkers responses with contaminants levels in *M. alterniflorum* at 21 days of spring, autumn 2015 and P2016 ($\mu\text{g/L}$) ($n=45/\text{contaminant}$) ($p<0,05$).

Biomarker responses T21 P2015	Pearson correlation R ($p<0,05$)	Contaminant in plant T21 P2015
MDA	0.8	Cu
	0.5	Ni
	0.7	Cd
	0.6	As
NR activity	-0.6	Cu
	-0.3	Ni
	-0.4	Cd
	-0.4	As
T21 A015		T21 A2015
MDA	0.8	Cu
	0.8	Ni
	0.7	Cd
	0.8	As
NR activity	-0.7	Cu
	-0.6	Ni
	-0.6	Cd
	-0.6	As
T21 P2016		T21 P2016
MDA	0.3	Cu
	-0.3	Ni
	-0.8	Cd
	0.3	As
NR activity	-0.2	Cu
	0.2	Ni
	0.8	Cd
	-0.4	As

Positive correlations ($p < 0.05$) were observed between MDA and contaminant levels in *M. alterniflorum* at spring 2015 and autumn 2015, while, these correlations are not significant in P2016.

High correlations ($R > 0.7$) were observed for Cu at P2015 and for all contaminants (except Cd) at A2015.

Contaminants induce the production of reactive oxygen species (ROS) and directly or indirectly cause oxidative damage by inhibiting antioxidant activity (Ali and Alqurainy, 2006). The increase in oxidative stress increases the lipid peroxidation and consequently the levels of MDA in plants.

Several factors could affect the correlation between biomarkers and metals/metalloids concentrations in plant such parameter that influence plant metabolism (nutrient concentration, temperature), evolution of accumulation over time (cf. III.1.2.2.3), and other pollutants not analyzed, such as organic compounds.

Negative correlations ($p < 0.05$) were observed between nitrate reductase activity and contaminant levels in the plant in spring 2015 and in autumn 2015. In P2016, as observed with MDA, the nitrate reductase activity did not show good correlations with the levels of

contaminants studied in the plant. As described before, the decrease in nitrate reductase activity is due to the alteration of photosynthetic activity and nitrate metabolism in the plant.

Correlation between NR activity and Cu was better than that obtained with other contaminants.

Correlations between nitrate reductase activity and contaminant levels in the plant were better in A2015 than in the P2015 and P2016. This may be related to photosynthetic activity that is higher in spring, which may reduce the alteration of nitrate reductase activity. In addition, fluctuations of some contaminant accumulation in plant over time and influence of other pollutant not analyzed, can also explain poor correlations (Supplementary index).

MDA showed higher significant correlations with contaminant level in plants (R between 0.3 and 0.8) compared to NR activity (R between -0.2 and -0.7), which confirms that MDA more closely reflects the effects of contaminants (Cu, Ni, Cd and As) associated with urban and industrial activities (Table 16).

III.2.4. Conclusion

Contaminant accumulation was influenced by different factors between seasons: (1) changes in contaminant levels in water, (2) interactions between metals/metalloids themselves and with other parameters (pH, COD, major ions...) and (3) metabolic factors affected by growth period, temperature or nutrient levels.

Good correlations were observed between contaminant concentrations in water and contaminant concentrations in *M. alterniflorum* as well as with biomarker responses. This indicates that the use of contaminant accumulation or biomarkers responses can be useful for the detection of metals and metalloids but some limiting factors may come into play.

Fluctuations in contaminant concentrations in *M. alterniflorum* over time limit the interest of use of contaminant accumulation in *M. alterniflorum* for the evaluation of water quality. This could explain correlation coefficient decrease obtained between biomarker responses and contaminant concentrations in *M. alterniflorum* compared to the correlations obtained between biomarker responses and contaminant concentrations in water. Thus, the use of biomarker responses can be more appropriate for the evaluation of the water quality over time.

Studied biomarkers (MDA and NR activity, no specific for metallic stress) reflect the stress generated by all the contaminants present in the water. In the context of this limited metal contaminant monitoring, correlation levels are sometimes low because we do not have all the parameters, such as organic contaminants, that also may influence the response of biomarkers. Biomarker responses show a higher correlation for MDA than NR activity, which indicates that MDA is more relevant than NR activity as a biomarker for the water quality evaluation.

The use of biomarker responses for the water quality evaluation is simpler since it requires only an analysis for the overall assessment of the water body rather than the analysis of all contaminants. These results confirm that the use of biochemical biomarkers of *M. alterniflorum* for the biomonitoring of the water quality can be more relevant and effective, differently to the monitoring of contaminant levels in the plant, which can fluctuate over time that can skew the results.

Supplementary information

Table 17. Analysis of contaminants in water compared to the EQS. (In red > at the EQS).

Contaminants Spring 2015					
	S1	S2	S3	S4	S5
Arsenic					
Copper					
Cadmium					
Nickel					
Contaminants Autumn 2015					
	S1	S2	S3	S4	S5
Arsenic					
Copper					
Cadmium					
Nickel					
Contaminants Spring 2016					
	S1	S2	S3	S4	S5
Arsenic					
Copper					
Cadmium					
Nickel					

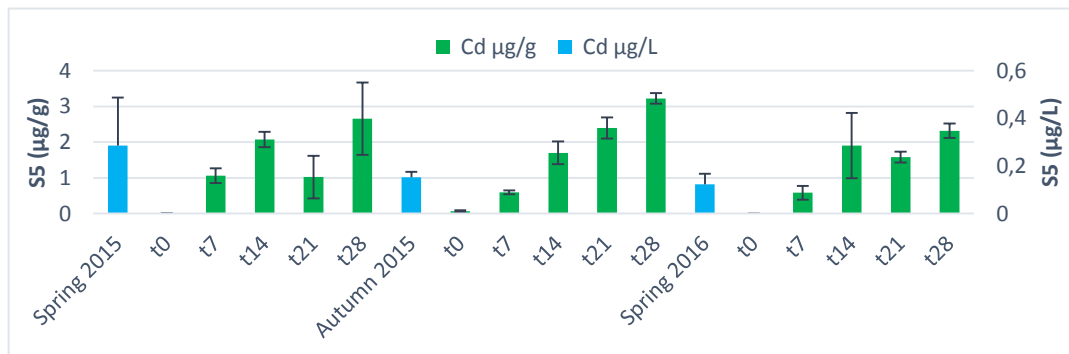


Figure 45. Contaminates accumulation over time (28 days) for five field campaigns at S5, in the three study periods (spring and autumn 2015, and spring of 2016) (n=three measures).

La réponse des deux biomarqueurs MDA et activité NR a été étudiée afin de définir si elle pouvait apporter des informations complémentaires pour l'évaluation de la qualité des eaux, par rapport au suivi de l'accumulation des contaminants dans la plante.

Les ACP des paramètres physicochimiques et chimiques ainsi que les concentrations en métaux et métalloïdes dans l'eau, ont montré que, les deux printemps 2015 et 2016 sont différents significativement de l'automne 2015, ce qui a montré un effet saisonnier sur ces paramètres.

Outre l'effet saisonnier relevé au niveau des paramètres dans l'eau, la surveillance de la qualité de l'eau compte tenu de l'accumulation de contaminants dans *M. alterniflorum* doit prendre en compte l'effet de la saison et de la température. Cet effet a été signalé en ce qui concerne l'accumulation de Cu, Ni, Cd et As dans *M. alterniflorum* sur les sites S1, S2, S3, S4. En S5, site affecté par le rejet d'effluents industriels, aucun effet saisonnier important sur les concentrations n'a été noté pour les éléments Cu et Ni, les teneurs dans les eaux contrôlent les teneurs dans la plante pour ces deux métaux. Pour le cadmium et l'arsenic une accumulation plus faible a été observée au printemps par rapport à l'automne. Cette faible accumulation au printemps peut être due à plusieurs facteurs, tels que (i) l'affinité des métaux/métalloïdes pour la matière organique, (ii) la compétition avec d'autres métaux/métalloïdes ou éléments majeurs et (iii) le facteur de dilution dans la plante induit par l'augmentation de la quantité de biomasse dans *M. alterniflorum* au printemps.

Des corrélations variables ont été obtenues entre les concentrations en contaminants dans l'eau et les concentrations de contaminants dans *M. alterniflorum* ainsi qu'avec les réponses des biomarqueurs. Les facteurs environnementaux, la composition de l'eau et la fluctuation des niveaux de contaminants dans *M. alterniflorum* au cours du temps peuvent altérer ces corrélations. Ainsi, le suivi des teneurs en contaminants dans *M. alterniflorum* ne permet pas une évaluation directe de la qualité de l'eau, les conditions environnementales doivent être prises en compte.

L'utilisation de biomarqueurs de *M. alterniflorum* pourrait constituer un outil complémentaire et pertinent pour la biosurveillance de la qualité de l'eau au fil du temps. Avec les deux biomarqueurs étudiés (MDA et activité NR), non spécifiques du stress métallique, les niveaux de corrélation sont parfois faibles car d'autres paramètres, tels que les contaminants organiques, peuvent influencer leur réponse. Les réponses des biomarqueurs montrent une corrélation plus élevée pour le MDA que l'activité NR, ce qui indique que l'utilisation du MDA serait plus pertinente pour l'évaluation de la qualité de l'eau.

Ainsi, pour avoir une vision plus pertinente et globale de l'intérêt des biomarqueurs de *M. alterniflorum* dans l'évaluation de la qualité des eaux, un panel plus large des biomarqueurs physiologiques et biochimiques chez *M. alterniflorum* doit être étudié.

III.3. Identification des biomarqueurs de *Myriophyllum alterniflorum* les plus sensibles pour la détection des contaminants dans des sites anthropiques

Dans les deux chapitres précédents, ont été mis en évidence l'influence des paramètres suivants sur l'accumulation des contaminants dans les plantes :

- (a) La biodisponibilité des contaminants dans l'eau (influencée en particulier par le pH et la teneur en COD).
- (b) Le niveau trophique et plus particulièrement les teneurs en nitrates et en phosphates respectivement pour les deux contaminants cuivre et arsenic.
- (c) L'effet des saisons (période de croissance) et de la température.
- (d) La durée d'exposition.

Les travaux présentés ont montré l'intérêt du suivi de l'évolution de l'accumulation des métaux/métalloïdes dans *M. alterniflorum* pour la surveillance de la qualité des eaux *in situ*, en considérant l'influence des paramètres environnementaux.

Suivant les résultats obtenus et compte tenu de la mise en place de phénomènes de défense dans *M. alterniflorum*, la durée d'exposition de 21 jours était plus appropriée pour l'évaluation de la qualité des eaux en utilisant le suivi de l'accumulation des métaux et métalloïdes dans *M. alterniflorum*.

Une altération du métabolisme de *M. alterniflorum* est induite par l'accumulation des métaux et métalloïdes dans *M. alterniflorum*, ainsi une réponse des biomarqueurs MDA et NR a été observée. Néanmoins, pour ces deux biomarqueurs non spécifiques du stress métallique, les niveaux de corrélation sont parfois altérés, parce que d'autres paramètres, tels que les contaminants organiques, peuvent influencer la réponse de ces biomarqueurs.

Ainsi, l'identification de biomarqueurs doit tenir compte de l'ensemble de ces paramètres, ce qui nous a amené à ne considérer qu'une saison, à savoir des conditions printanières au cours desquelles l'activité métabolique est maximale. L'influence de la durée d'exposition sera à nouveau étudiée afin de définir les biomarqueurs les plus fiables pour évaluer la qualité de l'eau.

Ce chapitre a pour but d'étudier le potentiel d'utilisation de *Myriophyllum alterniflorum* dans la détection des contaminants dans les eaux impactées par des rejets d'eaux usées urbaines ou industrielles, en considérant un panel de biomarqueurs physiologiques et biochimiques beaucoup plus large que dans le chapitre précédent, et choisis suivant la réponse aux contaminants : (1) système oxydant, (2) système de défense, et (3) spécifique du stress métallique. Cet outil devrait permettre de refléter l'effet global des rejets anthropiques, ainsi que l'effet des contaminants spécifiquement associés aux activités urbaines et industrielles.

Ce chapitre est présenté sous forme d'article.

Identification of the most sensitive biomarkers in *Myriophyllum alterniflorum* for the early detection of contaminants at sites affected by anthropological activities.

III.3.1. Introduction

Aquatic environments suffer the consequences of urban and industrial activities, which increase emissions of contaminants such as metals and metalloids, which decrease the water quality significantly as well as on human health (Jan *et al.*, 2015). Recently, in parallel with physico-chemical analyses of water quality that do not provide either the threshold of sensitivity or the level of response of organisms to contamination, researchers proposed the use of aquatic organisms such as aquatic plants to evaluate the water quality (Amiard *et al.*, 1998; Blandin *et al.*, 1986; Ferrat *et al.*, 2003).

The use of aquatic macrophytes as bioindicator of contaminants in the environment makes it possible to characterize the bioavailability of contaminants in water (Ferrat *et al.*, 2003). These species make it possible to determine the impact and progression of anthropic activities on the water quality. The aquatic macrophytic species of the genus *Myriophyllum alterniflorum* has been used for biomonitoring studies of anthropogenic impact on water quality, through biomarker responses, and/or through the accumulation in the plant tissues (Delmail, 2011; Krayem *et al.*, 2016 ; Ngayila *et al.*, 2007). However, few studies of contaminant detection and water quality evaluation were conducted *in situ* and for a long exposure time using biomarker responses (Delmail, 2011).

Studied sites were selected regarding their degree of pollution in the Vienne watershed in Limoges-France, to identify the impact of urban and industrial activities on the aquatic ecosystem. In fact, Combade River in the Vienne watershed does not have remarkable human activities, while high density of urban and industrial activities observed at the Vienne and Valoine Rivers respectively in the Vienne watershed.

Measuring of contaminant accumulation and biomarker responses in *M. alterniflorum* over time can provide time integrated information about the presence of toxic contaminants in the aquatic ecosystem. *M. alterniflorum* could be a good investigative tool of water quality evaluation, but the influence of environmental factors, water composition and fluctuating levels of contaminants in *M. alterniflorum* over time must be taken into account. For this, the use of physiological and biochemical biomarkers can be interesting for the *in situ* detection of contaminants, such as metals and metalloids.

Only one type of biomarker cannot constitute itself a valuable monitoring parameter to evaluate water quality, and a multiparametric approach, including biomarkers of oxidative stress (e.g. NR activity, pigments content, MDA and osmotic potential), of defense system (e.g. free proline and G6DPH activity) and specific biomarker to metallic stress (e.g. γ -GCS activity) is required.

Lagadic (1997) highlighted the interest in studying several biomarkers at the same time in the same organism, which allows a good illustration of the multiplicity of the mechanisms involved and confirms the importance and the interest of a multiparametric approach in contaminant detection and evaluation of the water quality.

Correlations between biomarker responses and contaminant concentrations in water and plant are studied. In addition, the influence of duration of exposure on the evolution of biomarkers response was considered. This tool should reflect the overall effect of anthropogenic releases, as well as the effect of contaminants specifically associated with urban and industrial activities.

The objective will be to identify the most relevant biomarkers in response to urban and industrial impacts, to be an effective tool for water quality evaluation.

III.3.2. Materials and methods

III.3.2.1. Plant material, growth conditions and reintroduction *in situ*.

The plants were proliferated for 30 days in a Murashige and Skoog (1962) medium, then, the plants were acclimatized for 21 days in an oligotrophic synthetic medium. The concentrations of nitrates, ammonium and phosphates were all set according to the surface water quality evaluation system. In a culture box containing, 400 mL of sterilized medium, the plants were sub-cultured. Afterwards, they were maintained in a growth cabinet set at $26 \pm 2^\circ\text{C}$, with a 16h photoperiod and a light intensity of $13.1 \pm 0.6 \text{ W cm}^2$ (referred to the natural light intensity) (SupraLux, Actizoo, 30 W).

After 15 days of acclimation in the oligotrophic synthetic medium, *Myriophyllum alterniflorum* plants were introduced *in situ*. *M. alterniflorum* were placed in a batch of 9 plastic culture boxes in wire cages, and were positioned in five sites in the river. These plants were arranged for a period of 28 days in spring 2015.

III.3.2.2. Studied area

The five studied sites were chosen regarding to their degree of pollution on the Vienne and Valoine Rivers in Haute Vienne department in the center of France (cf. III.1.2.2.2). The Vienne basin is characterized by impervious magmatic gneiss and rock soils.

The Site (S1) was located on the Combade River, located in the South East of Haute Vienne (45.785470, 1.553173). This site was considered as a reference site in the present study, with low disturbances related to human activities. No contaminant concentration above the EQS was observed at this site.

Then, the S2 sampling site was on the Vienne River (45.818801, 1.259659); at the upstream of the wastewater treatment plant (WWTP).

Downstream of the WWTP, at Site 3 (45.817552, 1.256487), the quality of the water might be affected, as sampling point was near the point of discharge of the WWTP. At this site, concentrations of metals and metalloids such as Zn, Co and Cu were above the EQS in water due to the urban impact.

Upstream Valoine sampling point (45.803208, 1.291386) (S4), surface water was of medium quality due to agricultural activities. Downstream (S5; 45.812427, 1.247920), industrial activities may cause contaminant discharges such as Cu, Zn, Ni, Cr, Cd and Pb, whose concentrations were sometimes higher than EQS. In addition, As concentration was higher at both sites S4 and S5 due principally to the soil geochemistry of the Vienne watershed.

The selected sampling points, located upstream and downstream of the WWTP and industrial discharges should allow us to highlight the capacity of the *M. alterniflorum* to absorb and indicate the water contamination over time exposure.

III.3.2.3. Biomarkers analysis

III.3.2.3.1. Analysis of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity

The enzymatic activity of G6PDH is analyzed by a methodology inspired by the protocol of Delmail (2011) measuring the ability of this protein to catalyze the first reaction of pentose

phosphates by oxidizing G6P (glucose 6-phosphate) to 6PG (6-phosphogluconolactone) and reducing NADP to NADPH. NADPH is also essential for the destruction of highly toxic hydrogen peroxide for the cell. The rate of NADPH formation is proportional to the activity of G6PDH and its concentration was determined by its absorbance at 340nm in UV spectrophotometry.

A reaction mixture of 3mL was made in a spectrophotometer tank with a reaction mixture composed of: 0.15M Tris-HCL (pH 8.0), 0.1mM NADP, 1mM PMSF to reduce the protein activity of the cell proteases, 3mM β -mercaptoethanol and 2% protein extract (v/v). The increase in absorbance is measured for 3min. The G6PDH activity is expressed in μ kat/mg protein by the following equation (one μ katal corresponding to the amount of protein required to increase the absorbance from 1.66×10^{-4} to 340nm per minute):

$$\text{Activity} = \frac{\Delta\text{Abs}_{340}}{(1,66\text{E}-04 \times \text{mprot})} \quad \text{Equation (1)}$$

With: ΔAbs_{340} , the absorbance difference of the sample per minute measured at 340nm.
mprot: total protein mass of the sample (mg) (Delmail, 2011).

III.3.2.3.2. Analysis of γ -glutamylcysteine synthetase activity

The reagent used (800 μ L) is composed of 100 mM N- [2-Hydroxyethyl] piperazine-N '- [2-ethanesulfonic acid] (HEPES) at pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM NaCl. MgCl₂, 5 mM ATP, 2 mM phosphoenol pyruvate, 10 mM cysteine, 20 mM glutamate, 0.2 mM NADH, 5 units rabbit muscle pyruvate kinase and 10 units lactate dehydrogenase type II rabbit muscle (Jez *et al.*, 2004). The reaction starts with the addition at room temperature of 75 μ g of protein in an extraction mixture (200 μ l).

The absorbance (DO) is read spectrophotometer at 340nm at T=0min and T=5min. The decrease in DO corresponds to the consumption of NADH (nicotinamide-adenine dinucleotide) to generate the ATP required for the activity of the enzyme tested. It is therefore proportional to the amount of γ -glutamylcysteine formed. A standard range was carried out with NADH from zero to 2 μ M. The specific enzymatic activity was expressed in nmoles of γ -glutamylcysteine formed per minute and per mg of protein.

III.3.2.3.3. Analysis of the malondialdehyde content (MDA)

Malondialdehyde (MDA) analysis was based on Delmail *et al.* (2011). 250mg of fresh plant were ground trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Aldrich, 98%) at 1%, using Fontainebleau sand (Prolabo, 150-200 μ m). Then, the mixture was centrifuged at 5000rpm for 10min at 4°C in centrifugation (3-18K, Sigma). For 1mL of the supernatant, 1mL of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) was added.

Then, the mixture was heated for 30min at 100°C in a water bath. After a second centrifugation (5000rpm, 10min, 4°C), the absorbance was read at 532 nm. The amount of MDA was calculated from the extinction coefficient 155mM/cm and expressed in mmol/g according to the following equation:

$$[\text{MDA} = \frac{\text{Abs}_{532} \times 1000}{(\epsilon \times \text{lopt} \times \text{Me})}] \quad \text{Equation (2)}$$

With: Abs_{532} , the absorbance of the sample at 532; ϵ , molar extinction coefficient (1.55E-03cm² /mmol); lopt, optical path length (1 cm); Me, mass of the sample (0.25g).

III.3.2.3.4. Analysis of free proline concentration

The concentration of free proline was measured using a methodology adapted from the Bates *et al.* (1973). 200 mg from the fresh studied plant were used. The plant material was ground at 4°C with a pestle in a mortar surrounded by crushed ice, and containing 1g of fountain sand and 2mL of 3% (v/v) sulfosalicylic acid. The crushed material was centrifuged at 10000rpm for 10 min at 4°C (3-18K, Sigma Aldrich).

The supernatant (1ml) was placed in a test tube containing previously 2ml of 10% (w/v) ninhydrin (aromatic compound complexed with free proline by forming an imine bond characterized by a carbon nitrogen double bond, and allowing the formation of a chromophore) in pure glacial acetic acid. The tubes were wrapped in aluminum foil to limit the photo-degradation of the amino acid studied, then they were placed in a water bath at 100 ° C for one hour. The reaction was then rapidly stopped by immersing the tube in a crushed ice bath at 4°C.

Finally, 4 mL of toluene were added to the reaction mixture to separate the chromophore from the aqueous phase. The whole is vortexed for 30 seconds and the absorbance of the chromophore present in the organic phase was measured at 520nm in UV-visible spectrophotometry (Heliosβ Thermo Spectronic). This value was then plotted on a standard curve established from a solution of pure L-proline of known concentration and measured at 520nm, thus making it possible to determine the proline concentration of the sample studied.

III.3.2.3.5. Osmotic potential analysis

The osmotic potential (Ψ_s) was determined using a vapor pressure osmometer (13 DR Automatic, Roebing) at each time from 100 mg of fresh *M. alterniflorum* were ground with 500 μ L of distilled water in a mortar with a pestle, and then centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 4°C in a centrifuge (3-18). K, Sigma). 100 μ L of the supernatant was used for the analysis. The data obtained in mosmol/kg was converted into MPa (-2.5 MPa corresponding to 1000mosmol/kg) (Krayem, 2015).

III.3.2.3.6. Analysis of nitrate reductase activity

This activity was determined by the method of Srivastava (1974). 0.3 g of fresh plant was cut into small pieces and placed in 5 ml tubes filled with the incubation medium (phosphate buffer solution of 0.1 M 7.5 pH, 200 mM KNO₃ and 0.5% n-propoanols), and left in the dark for two hours at 30°C. Then, at the 1 ml aliquots, 1 ml sulfanilamide (1% in 3HCL) and 1 ml 0.02% naphthyl ethylenediamine hydrochloride was added and shaken thoroughly. After being stored for 25 minutes for color development, the absorbance of the sample is read at 540nm. The activity of NR was calculated using the standard curve of nitrite and expressed in micromole/h/g MF.

III.3.2.3.7. Analysis of chlorophyll a, b and carotenoid concentrations

Measurements of the chlorophyll concentration were made according to the protocol adopted by Delmail (2011). 250 mg of the plant is ground at 4°C, in a mortar with 0.4 g of Fontainebleau sand (Normapur Prolabo, 150-200 μ m), and 5mg of magnesium carbonate MgCO₃ (Merck, 99%) to eliminate the acidity of the tissues. Then, 20mL of 100% pure acetone (Fisher Chemical, 99.98%) is added to the mixture with a mass of 1.25 g of Na₂SO₄ sodium sulfate (Normapur Prolabo, 99%), then mixed together, until the mixture is dissolved. Complete homogenization of the solution. The solution was then centrifuged at 5000rpm for 10min at 4°C in a centrifuge (3-18 K, Sigma).

Part of the supernatant (6 mL) was recovered and added to distilled water (1.5mL) to obtain an 80% acetone extract. The absorbance of the solution was measured by a UV-Visible spectrophotometer (Heliosβ Thermo Spectronic) at three wavelengths: 470, 646.6 and 663.6nm. The concentrations of chlorophylls a and b (Chla and Chlb) were calculated according to the formulas of Porra (2002) and according to Lichtenthaller and Wellburn (1983) for carotenoids (CAR).

$$[\text{Chl a}] = \frac{1000 \times V \times E \times (12,25 \times \text{Abs}_{663,6} - 2,55 \times \text{Abs}_{646,6})}{(\text{Me} \times S)} \quad \text{Equation (3)}$$

$$[\text{Chl b}] = \frac{1000 \times V \times E \times (12,25 \times \text{Abs}_{646,6} - 2,55 \times \text{Abs}_{663,6})}{(\text{Me} \times S)} \quad \text{Equation (4)}$$

$$[\text{Cart}] = \frac{1000 \times V \times E \times (\text{Abs}_{470} - 3,27 \times [\text{Chl a}] - 104 \times [\text{Chl b}])}{(227 \times \text{Me} \times S)} \quad \text{Equation (5)}$$

With: [Chl a], chlorophyll concentration in (µg/g FW); [Chl b] chlorophyll concentration b (µg/g FW); [Cart] Carotenoid concentration (µg/g FW); V, volume of pure acetone used; E, volume of the 80% acetone extract, Abs_x, the absorbance of the sample measured at length X nm; Me, mass of the sample; S, volume of recovered supernatant.

III.3.2.4. Data analysis

One-way ANOVA, followed by a post-hoc comparison Tukey test, in the PAST 3.17 program (Hammer *et al.*, 2001), was used for evaluation of univariate data. Pearson correlation test, Principal component analysis (PCA), Canonical Correspondence Analysis (CCA) and Co-inertia analyses were performed using Past 3.17 and R v. 3.1.2 (Hammer *et al.*, 2001; R Development Core Team, 2015) (fig. 46).

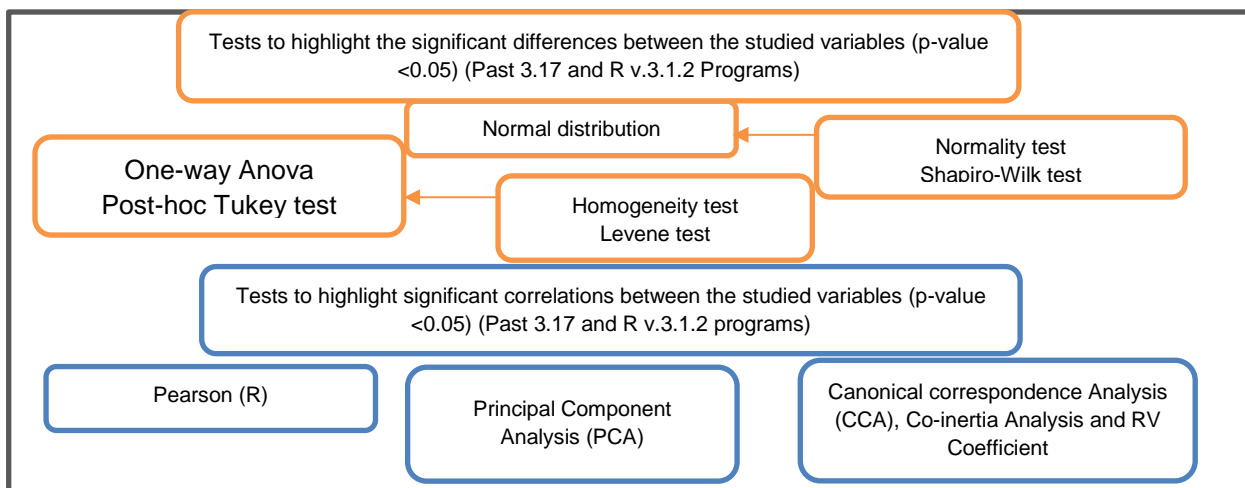


Figure 46. Representative schema of statistical analysis.

III.3.3. Results and discussion

Results of biomarker are presented according to their response to contaminants; (1) nitrogen metabolism and physiological biomarkers (nitrate reductase activity and chlorophyll pigments), (2) biomarker of oxidative stress (MDA concentration) and defense biomarker (free proline accumulation) with the osmotic potential. (3) And finally, a biomarker specific of metallic stress (γ -GCS activity).

III.3.3.1. Evolution of biomarker responses

The response of various biomarkers of *M. alterniflorum* are presented, considering spatio-temporal evolution, with the five different sites and the four different exposure times.

The NR activity and the pigment concentration, Chla, Chlb, as well as the levels of carotenoids in *M. alterniflorum* tissues at five sites studied for 28 days in spring 2015 are presented in Figure 47-48. (The data correspond to values from the five field campaigns).

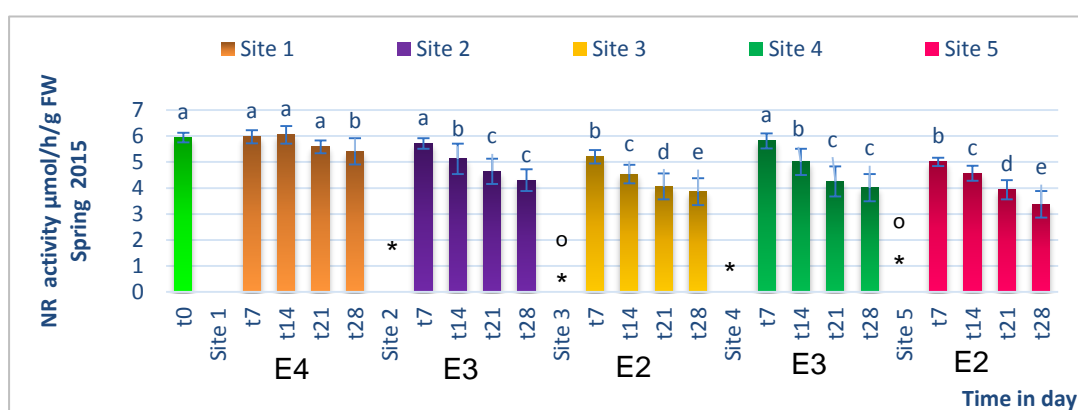


Figure 47. Nitrate reductase activity in different sites in spring 2015 for 28 days ($n = 9/\text{field campaign}$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). (o) indicates that the downstream differ from upstream ($p < 0.05$). (*) Indicates that the site is different from the control site ($p < 0.05$). (E) Represent different evolution pattern.

At S1, the NR activity during the 28 days was close to initial value (t0). Pigments levels were lower than at t0 but stayed also stable from t7 to t28 for Carotenoids, from t14 to t28 for the Chla and from t21 to 28 for Chlb.

The NR activity and pigment levels were higher at S1 than at all the four other studied sites, impacted by human activities. At S1, no significant alteration of these two biomarkers was observed, due to low contaminants levels in water (under the EQS).

Inversely, downstream of WWTP (S3) which was impacted by several contaminants such as Zn, Co and Cu, the NR activity and pigment levels were lower than at S2 with a tendency to decrease from t0 to t28. The gap between the upstream (S2) and downstream (S3) sites was -20% of NR activity, -26% for Chla, -65% for Chlb and -16% for carotenoid levels. Decreased pigment content and NR activity (the gap between S3 and S2 ($p < 0.05$)) indicate that it is possible to perform evidence of environmental alteration by urban discharges (especially WWTP effluents) that induced an effect on these biomarkers.

Likewise, at S5 where water were enriched by several metals and metalloids (Cu, Ni, Zn, Mn, Pb, Cd and As), the NR activity and pigment levels were lower by -7%, -10%, -17%, and -8% for NR activity, Chla, Chlb and for carotenoids levels respectively compared to the S4. Both

sites showed a decreasing trend of the responses of these biomarkers throughout the study, but referring to the gap of response between S4 and S5 ($p < 0.05$) (fig. 48), these biomarkers could permit detection of industrial pollution.

By significant comparison between upstream and downstream studied sites (S2/S3 and S4/S5), NR activity and pigment levels, can reflect the impact of urban and industrial activities.

Correlation analysis between biomarkers responses and metals/metalloids levels observed at urban site (such as Zn, Co and Cu) and at industrial site (such as Cu, Cd, Ni and As...) may clarify these observations.



Figure 48. Physiological biomarkers responses (Chl a, Chl b and carotenoids) in different sites in spring 2015 for 28 days ($n = \text{nine/field campaign}$). Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$). (o) indicates that the downstream differ from upstream ($p < 0.05$). (*) Indicates that the site is different from the control site ($p < 0.05$). (E) Represent different evolution pattern.

Nitrate reductase (NR) is a key enzyme in the metabolism of nitrogen. NR catalyzes the first stage of nitrate reduction to nitrite. In this study, NR decreased in contaminated sites. Contaminants have an adverse effect on nitrate uptake and transport to the leaves by reducing nitrate reductase activity (Hernandez *et al.*, 1996; Balestrasse *et al.*, 2003). The nitrate reductase activity is related to the decrease in the content of chlorophyll pigments and subsequently affect the photosynthetic activity.

Garg *et al.* (1996) observed a reduction in nitrate reductase activity with increasing Cd (0-25 μM) in vitro in *Hydrilla verticillata*. Cadmium is accumulated primarily in the cytosol, which inhibits NR activity due to its high affinity for -SH groups (Garg *et al.*, 1996).

While it was observed that, the evolution in carotenoids in the study are less marked. It can be attributed to the role of carotenoids in defense mechanisms against metallic stress (Krayem *et al.*, 2016). Increasing carotenoid level can (i) protect the photosynthetic membrane against photo-oxidation by quenching the triplet states of chlorophyll molecules, (ii) effectively scavenging ROS, thus protecting pigments and unsaturated fatty acids of lipids from oxidative damage generated by metals and metalloids (Zn, Cu, Cd, Ni, As...) (Ahmad *et al.*, 2015; Ramel *et al.*, 2012; Strzalka *et al.*, 2003).

The levels of chlorophyll a and b, and to lesser extent carotenoids, decrease significantly depending on the contaminated sites. Decreases in pigments indicate that chlorophyll synthesis and chlorophyllase activity were affected (Assche and Clijsters, 1990). Alterations in membrane permeability and chloroplast ultrastructure may also contribute to the decrease in pigment content due to lipid peroxidation (Dietz *et al.*, 1999). Decreasing pigment levels result in a reduction in photosynthetic activity and therefore affect carbon fixation (Ayeni *et al.*, 2010).

The decrease in the pigment content in the plants exposed to contaminants may also be due to the inhibition of enzymes such as δ -aminolevulinic acid dehydratase and protochlorophyllide reductase (Assche and Clijsters, 1990; Padmaja *et al.*, 1990). The inhibition of these enzymes associated with the biosynthesis of chlorophyll, as well as the impaired delivery of Mg^{2+} , Fe^{2+} and Zn^{2+} ions (Assche and Clijsters, 1990; Das *et al.*, 1997; Küpper *et al.*, 1996; Stobart *et al.*, 1985).

The significant decrease in pigment content was observed in many studies. The decrease in pigment content in plants exposed to Ni was also demonstrated in *Elodea canadensis* (Maleva *et al.*, 2009) and *L. minor* (Appenroth *et al.*, 2010).

The largest decrease in Chl b was observed in our study (Fig. 48) compared to other pigments may be due to the efficiency of Photosystem II energy trapping and the reduction of electron transport (Falkowski and Raven, 2013). Chlorophyll b biomarker was thus more sensitive to evidence anthropogenic activities impact than other pigments, as previously observed by Delmail *et al.* (2011) and Krayem *et al.* (2016).

MDA and Free proline concentration, as well as the osmotic potential in *M. alterniflorum* tissues at five sites for 28 days are presented in the figure 49. (The data correspond to values from the five field campaigns).

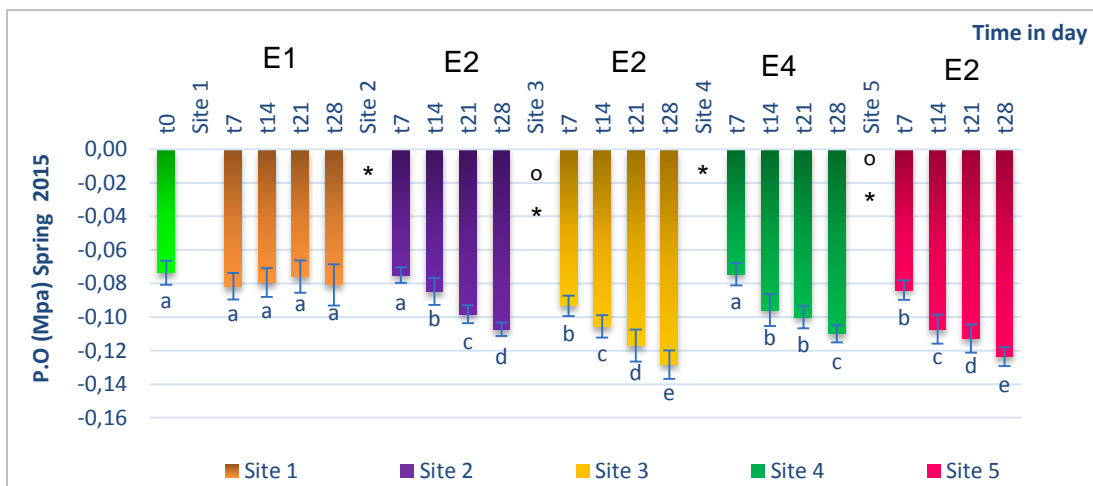
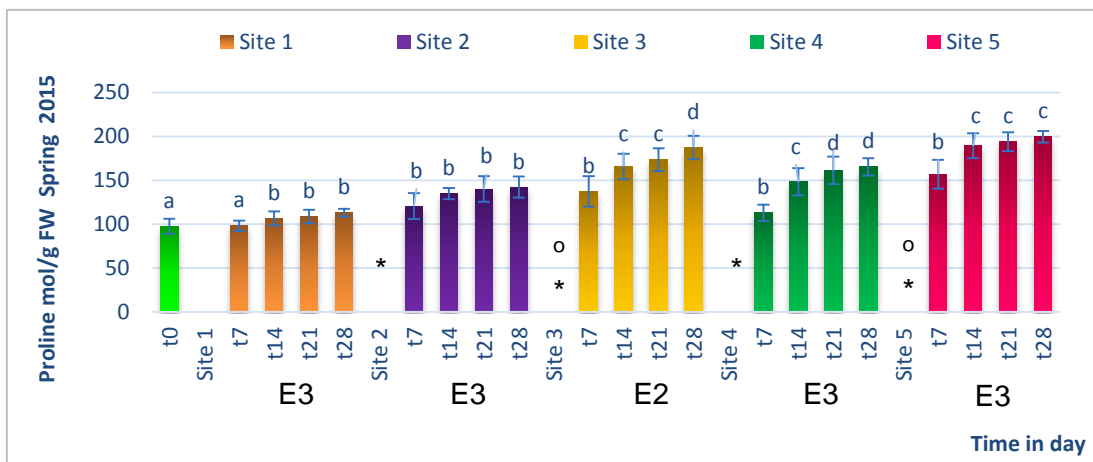
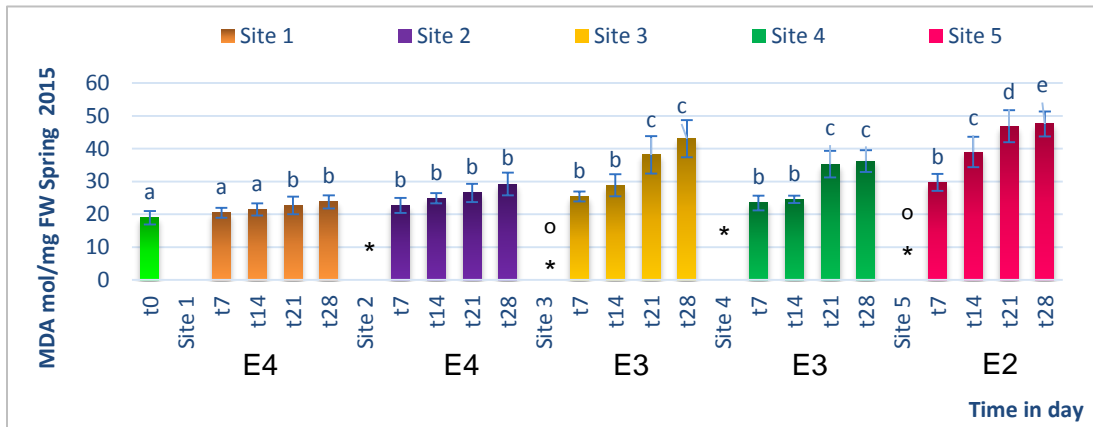


Figure 49. Biochemical and physiological biomarkers responses (MDA, Free proline and O.P.) in different sites in spring 2015 for 28 days (n = nine/field campaign). Different letters indicate significant differences (p < 0.05). (°) indicates that the downstream differ from upstream (p < 0.05). (*) Indicates that the site is different from the control site (p < 0.05).

At site S1, osmotic potential did not change during the 28 days of exposure; while free proline showed a slight increase over time with stability acquired between t14 and t28. MDA levels were a little higher than at t0 but stayed also stable from t7 to t28.

The responses of these three biomarkers were lower at S1 than at all the four other studied sites ($p < 0.05$), impacted by anthropological activities.

The free proline concentration and the osmotic potential at S3 (Downstream of WWTP) were significantly different from S2 with a tendency to increase for MDA and free proline, and to decrease for osmotic potential from t_0 to t_{28} . The gap between the upstream (S2) and downstream (S3) sites was 41%, 40% and 30% for MDA, free proline and osmotic potential respectively. Thus, these variations in biomarkers responses between the S2 and S3 (the gap between the two sites was significant ($p < 0.05$)) make it possible to highlight an alteration of the environment by urban discharges that induced an effect on these biomarkers.

At S5, MDA levels and the free proline concentration were higher by 34% and 31%, respectively, while the osmotic potential was lower by 17% compared to the S4. These biomarkers showed a relevant response to industrial activities release and could be useful for demonstrating industrial spread.

The plant reacts with contaminants whose factors responsible for lipoperoxidation increase the concentration of MDA (Krayem *et al.*, 2016). MDA is the decomposition product of polyunsaturated fatty acids in membranes and its increase shows that plants are under oxidative stress (Hou *et al.*, 2007). In this study, the concentration of MDA increased significantly when *M. alterniflorum*; this is mainly attributed to increased levels of ROS and stimulation of the enzyme lipoxygenase (Wang *et al.*, 2009). Referring to the significant gap between sites (S2/S3 and S4/S5) (fig. 49), the increase in MDA at S3 and S5 could be attributed to pollution release by these anthropic activities. Metals and metalloids enriched in water by urban and industrial activities.

Similarly to other studied biomarkers, correlation analysis between biomarkers responses and metals/metalloids observed at urban pollution site (such as Zn, Co and Cu) and at industrial pollution site (such as Cu, Cd, Ni and As...) is necessary to appreciate the interest of this biomarker for metals/metalloids detection in surface waters.

ROS can rapidly attack all types of biomolecules such as nucleic acids, proteins, lipids and amino acids, which leads to metabolic and physiological alterations (Zhang *et al.*, 2007). The increase in levels of MDA was shown in *M. alterniflorum* exposed to contaminants associated with the anthropological sites, which was observed in other studies (AA, 2014; Kanoun-Boulé *et al.*, 2009; Radić *et al.*, 2010; Wahsha *et al.*, 2017).

Proline, an amino acid, accumulates in plants exposed to contaminants (Saradhi, 1991; Sharmila and Saradhi, 2002). The free proline concentration under contaminant stress was seen in several studies (Bassi and Sharma, 1993; John *et al.*, 2012; Saradhi, 1991). It is due to the decreased activity of the electron transport system (AliaSaradhi, 1993) leading to the accumulation of NADH and H^+ . The increase in NADH may affect metabolic reactions that require NAD^+ (Venekamp *et al.*, 1989).

The accumulation of proline (presumably by synthesis from glutamic acid) could be an adaptive mechanism to reduce the level of accumulated NADH and / or reduce the acidity generated by organic acids (citrate, malate, lactate...), where $2NADH + 2H^+$ are used to synthesize each proline molecule from glutamic acid (Saradhi, 1991).

Many studies highlight the relationship between the accumulation of free proline and osmotic potential. This accumulation may contribute to osmotic adjustment at the cellular level and enzyme protection stabilizing the structure of macromolecules and organelles (Hayat *et al.*, 2012). In addition, proline acts as a metal chelator (Farago and Mullen, 1979), a lipid

peroxidation inhibitor (Mehta and Gaur, 1999), a free radical scavenger (Smirnof and Cumbes, 1989).

Dhir *et al.* (2004) observed proline accumulation in *B. juncea*, *Triticum aestivum* and *Vigna radiata* in response to Cd exposure. Khatamipour *et al.* (2011) and Zengin and Munzuroglu (2006), observed similar results, with increased proline content, in response to Cd exposure in *Silybum marianum* and the sunflower respectively.

O.P in *M. alterniflorum* was lower ($p < 0.05$) in anthropological sites, indicating that contaminants act either on osmotic regulation or on the accumulation of molecules (MDA, free proline...) that disrupt the osmotic potential of plant cells.

The osmotic potential (MPa) represents the excess of the hydrostatic pressure with respect to the atmospheric pressure, and depends on the solute content in the solution in which the plant is located. Increasing the concentration of solutes in the cytoplasm (such as free proline, MDA, etc.) results in a decrease in osmotic potential (Matysik *et al.*, 2002; Stoeva *et al.*, 2005; Delmail *et al.*, 2011).

Several studies have observed a decrease in osmotic potential in response to exposure to contaminants by increasing solute levels in the cytosol. Delmail *et al.* (2011) observed a decrease in osmotic potential in *M. Alterniflorum* exposed to copper at 100 $\mu\text{g/L}$ at the same time as an increase in free proline concentration.

The activity of G6-PDH and γ -GCS in *M. alterniflorum* tissues at five sites for 28 days, are presented in the figure 50. (The data correspond to values from the five field campaigns).

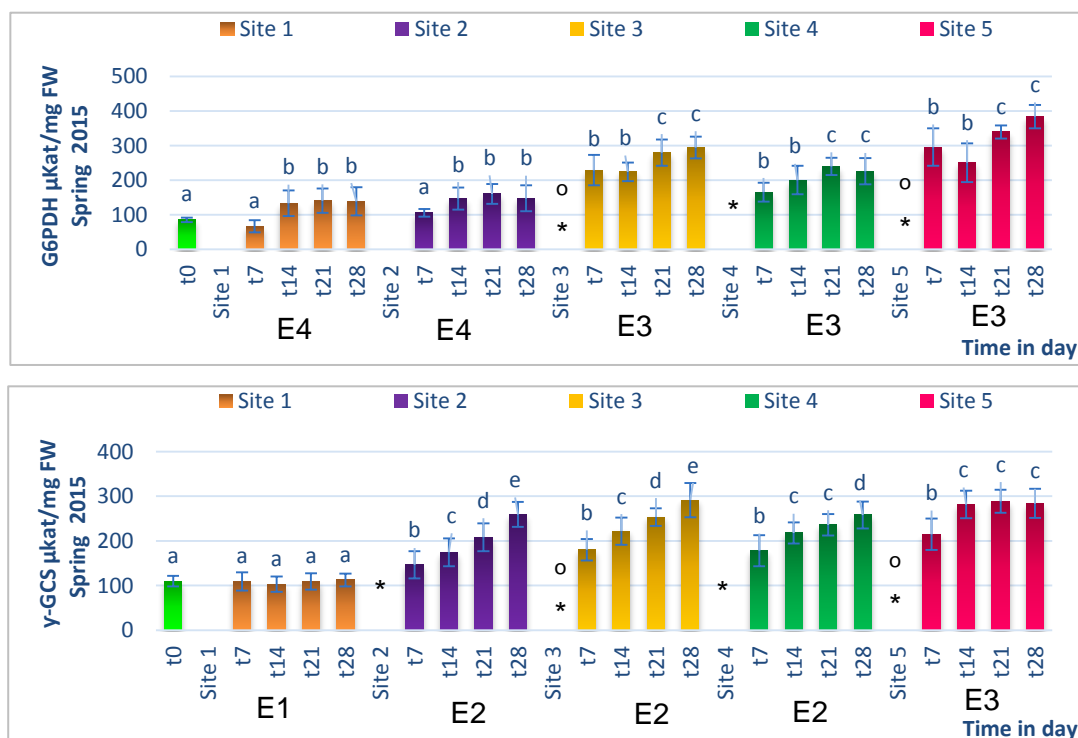


Figure 50. Biochemical biomarkers responses (G6PDH, γ -GCS) in different sites in spring 2015 for 28 days ($n = \text{nine/field campaign}$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). (o) indicates that the downstream differ from upstream ($p < 0.05$). (*) Indicates that the site is different from the control site ($p < 0.05$). (E) Represent different evolution pattern. (E) Represent different evolution pattern.

At site S1, γ -GCS activity stayed stable during the whole experiment. G6PDH activity increased from t0 to t14 and stayed stable from t14 to t28.

The responses of these two biomarkers were lower at S1 than at all the four other studied sites, impacted by anthropological activities, except for G6PDH at S2.

The G6-PDH, γ -GCS activities at S3 (Downstream of WWTP) were higher than at S2 with a tendency to increase from t0 to t28. The gap between the upstream (S2) and downstream (S3) of WWTP was 74% and 22% for G6PDH, γ -GCS activities respectively. Thus, these parameters make it possible to implement evidence of environmental alteration by urban discharges (especially WWTP effluents) (the gap between S3 and S2 ($p < 0.05$)) that induced an effect on these biomarkers.

At S5, G6PDH and γ -GCS activities in *M. alterniflorum* were higher by 42% and 23% compared to S4. Although both sites showed an increasing trend throughout, but the gap of response between S4 and S5 was significantly different ($p < 0.05$), which showed it could be good for detection of industrial pollution.

γ -GCS activity allowed to evidence the difference between sites affected or not by metal release better than G6PDH (comparison between S1 and four other sites ($p < 0.05$)), however these latter biomarker better highlights impacts of urban and industrial activities (difference between upstream and downstream ($p < 0.05$)).

The increase in G6PDH was due first to the reduction of photosynthetic activity, which affects the carbohydrate metabolism of the plant. The reduction in electron transport in chloroplasts induce this initiating enzyme of the pentose phosphate pathway to compensate the decrease in ATP and NADPH (Vanlerberghe, 2013).

Figure 50 showed that the G6PDH activity is greater at S5, the industrial site enriched by metals/metalloids (Cd, As, Pb, Ni, Cu...). Generally, G6PDH plays a role in maintaining a sufficient level of NADPH for the synthesis of glutathione, which is a precursor for the synthesis of phytochelatins. Thus, an increase in the synthesis of phytochelatins, chelators of metals and metalloids especially for Cd (highest levels at S5) can explain this sensitivity of this biomarker to industrial pollution (S5) compared to urban pollution (S3).

In several plant species, induction of G6PDH activity has been demonstrated for Zn (Mathys, 1975), Cd (Mattioni *et al.*, 1997) and Cu (Karmous *et al.*, 2017). Mattioni *et al.* (1997) studied *in vitro* the effects of Ni^{2+} and Cd^{2+} on G6PDH activity in *S. Italic* (0.5, 2.5, 7.5, 15 $\mu\text{mol/L}$). These two contaminants induced an increase in G6PDH activity of about 250 and 320% respectively, compared to the control after 10 days of exposure.

γ -GCS (nmol/m/mg P) combines Glutamyl and Cysteine to form γ -GluCys. This major step controls glutathione synthesis (Meister and Anderson, 1983). Glutathione synthetize allows the combination of Glycine (Gly) with γ -GluCys to produce glutathione (GSH). In plants, PC synthesis uses GSH as a substrate and catalyzed by a dipeptidyl γ -GluCys, termed PC synthase (Grill *et al.*, 1985). In the tissues of *M. alterniflorum*, the increase of the γ -GCS activity, specific for heavy metals, which is the first enzyme in the synthesis of phytochelatins, makes it possible to highlight the exposure of the *M. alterniflorum* to metallic stress.

GSH, being a cellular antioxidant, plays an active role in protecting membranes against free radical damage. It is also a precursor of phytochelatins, a class of binding of peptide metals,

widely reported in plants; γ -GCS is the rate-limiting enzyme in GSH synthesis. Overexpression of γ -GCS leads to GSH level increase rather than glutathione synthetize (GSHS). In plants exposed to Cd, γ -GCS mRNA showed a higher increase compared to GSHS showing that γ -GCS was overexpressed in response to Cd exposure (Nagalakshmi and Prasad, 2001). Treatment of plants with BSO (L-Buthionine Sulfoximine), an inhibitor of γ -GCS activity, prevents PC synthesis and reduces Cd tolerance (Steffens *et al.*, 1986).

III.3.3.2. Global effect of studied sites on biomarkers responses *in situ*.

Figure 51 shows the spatial distribution of biomarkers responses in spring 2015 on the factorial plane.

The aim of the principal component analysis presented in figure 51 is to highlight global correlation between biomarker responses and studied sites.

Considering dataset of spring 2015, the first principal component (PC1) represents the total variance. S1, considered as a reference site and to lesser extent, S2 (upstream of WWTP), were distinguished from other studied sites (S3, S4, and S5), which indicated the low alteration of biomarker responses in these two sites.

According to PC1, γ -GCS and G6PDH activities, MDA and the free proline concentrations, responded in a positive manner to the anthropogenic impact, while the osmotic potential, the nitrate reductase activity, and the pigment content responded negatively.

These results are consistent with other research in the same context. Harguinteguy *et al.* (2013) showed, that *Myriophyllum aquaticum*, through chlorophyll and MDA levels, could be used for water biomonitoring, as they observed chlorophyll (a and b) higher levels at the control site, while MDA level was significantly higher at the polluted site enriched with Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn.

The aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense* exposed in different polluted sites *in situ* showed increases in enzymatic activities (glutathione-S-transferases, glutathione reductase (GR) and peroxidase (POD)) in response to contaminant occurrence in polluted water (Nimptsch *et al.*, 2005).

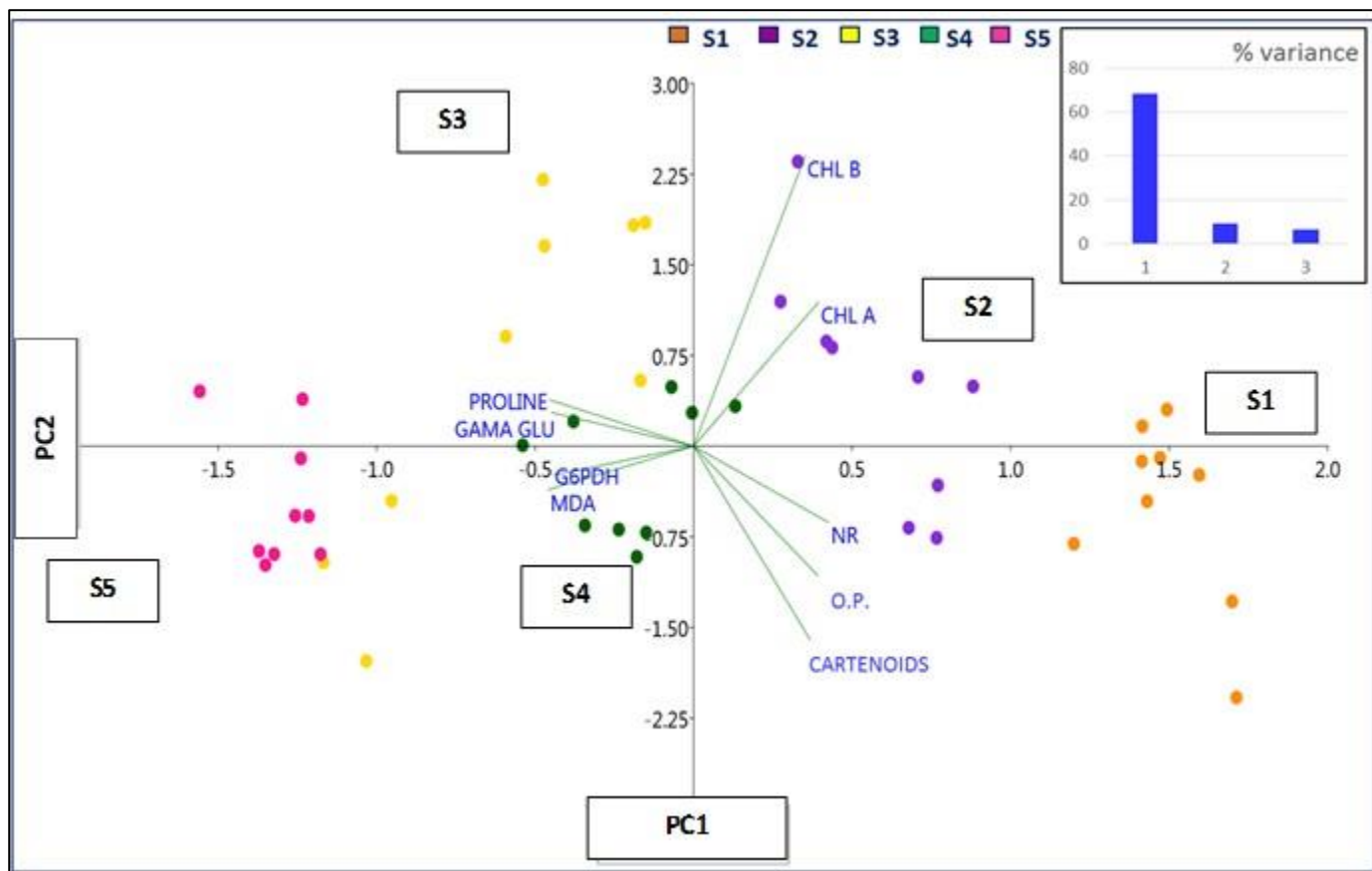


Figure 51. Principal Component analysis (PCA) of biomarkers response distribution in five sites at t21

III.3.3.3. Effect of duration of exposure on biomarkers response

The exposure time of aquatic plants to contaminants, influence the responses of their biomarkers. Thus, it is important to consider the effect of this parameter, to be able to define a range of optimal exposure time to evaluate the quality of a studied aquatic system.

The biomarker responses in *M. alterniflorum* showed significant variation between sites with respect to the 28-day exposure duration. The observations of the evolution of the responses of biomarkers to contaminants in *M. alterniflorum* (fig. 47-50) throughout the 28 days of exposure evidenced different mechanisms over time, E1 to E4.

This impact depends on the species, the nature of the contaminants and their content in the water. The evolution of the response of each biomarker over time shows the relevance of these biomarkers for their use to the biomonitoring of the water quality.

In the first case (E1) (fig. 49-50), the biomarker level may not change over time, in the case where the duration of exposure has no significant influence on the response of certain biomarkers, which was observed at S1 for biomarkers γ -GCS and O.P.

In the literature, Chen *et al.* (2015) observed this situation in the study of the activity of the antioxidant enzyme POD in *C. Demersum L* exposed *in vitro* to high levels of Pb (40 and 80 μ M) for 21 days. John *et al.* (2008) studied the evolution of biochemical and physiological biomarkers (pigment content and free proline concentration) in *L. polyrrhiza L.* exposed to Cd

and Pb at different concentrations (from 4.8 to 357 μM) *in vitro* for a duration of 30 days. Exposure to Pb at 48 μM showed no significant evolution for Chla and total Chlorophyll content and at 4.8 μM free proline content throughout the duration of exposure.

In the second high observed case (E2) ($p < 0.05$) (fig. 47-50), a linear increase or decrease in the response of some biomarkers can be observed with increasing exposure time. The evolution of biomarkers responses increase/or decrease over 28 days indicated that the plant still responded to the continued impact of urban and industrial activities at the studied sites. This case was observed for all sites.

Similar cases were observed in literature such as an increase in MDA levels in *C. Demersum L* exposed *in vitro* to Pb levels of 5 and 10 μM for 21 days. This increase was correlated with the activity of antioxidant enzymes, in response to the production of ROS for Pb at 5 μM for SOD and at 20 μM for CAT (Chen *et al.*, 2015).

In addition, Harguinteguy *et al.* (2013), observed an increase in MDA content over the duration of exposure (126 days) in *Myriophyllum aquaticum*, exposed to a mixture of metals (Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn) *in situ*.

In contrast, a 50% decrease in chlorophylls and 13% of carotenoids in *S. minima* was observed compared to control, after being exposed for seven days to 19 μM of Cr (Nichols *et al.*, 2000). In *E. canadensis*, chlorophyll and carotenoid levels decreased by more than 30% after 5 days of 49.9 μM Ni exposure (Maleva *et al.*, 2009). In *Egeria densa* and *Myriophyllum aquaticum* after exposure for seven days to 2.3 μM Zn, significant decreases in chlorophyll content compared to control were recorded (Harguinteguy *et al.*, 2015).

Duman *et al.* (2010) made similar observations in *Lemna minor L.* exposed to As (III) or As (V) for six days *in vitro*, where the "two way anova" test showed a linear decrease in levels of chlorophyll pigments over time by the significant effect of the duration of exposure on the response of this biomarker ($p < 0.001$).

Likewise, Hadad *et al.* (2011) showed a progressive decrease in chlorophyll pigment levels of *E. crassipes* exposed to Cr, Ni and Zn metals *in vitro* for 30 days. *Myriophyllum alterniflorum* exposed to Cd (10 μM) *in vitro*, showed a linear decrease in this physiological biomarker over the entire 27-day exposure duration (Delmail *et al.*, 2011).

During a 30 day exposure period, *Lemna polyrrhiza L.* was exposed to Cd contents of 8.9, 89, 178, 267 and 357 μM , and Pb of 4.8, 48, 145 and 193 μM *in vitro* (John *et al.*, 2008). The contents of Chla, Chlb and total Chl showed decreases during the 30-day exposure period. In contrast, the biochemical biomarker, free proline, showed a linear increase throughout the duration of exposure for Cd at 89 μM and for Pb at 48, 96 and 145 μM (John *et al.*, 2008).

Then, the most encountered case (E3) in the present study (fig. 47-50), corresponded an increase /or decrease in the response of the biomarkers; followed by a stabilization stage. This stabilization stage is maybe due to the adaptation of the plant by reducing the oxidative stress generated by metals and metalloids, which may stabilize biomarker responses.

This case was observed in the literature; in the case of Pb at 145 μM and Cd at 357 μM in *Lemna polyrrhiza L.* *in vitro*, the levels of Chla gradually decreased in response to metal stress until the 18th day for Cd and the 24th day for Pb. A stabilization of the Chla content was

observed until the end of the 30-day exposure period, thus indicating an adaptation of the plant to metal stress by improving the production of chlorophyll pigments (John *et al.*, 2008).

Similarly, this situation was observed with the free proline content for Cd at 267 μM , where proline increased until 24th day, then stabilized until the end of the 30-day exposure period. The production of free proline is related to the production of ROS generated by oxidative stress, and its reduction indicates that the plant was able to reduce the production of ROS by the cellular defense system against metallic stress (John *et al.*, 2008).

The monitoring of the free proline content was the subject of a study *in Myriophyllum alterniflorum in vitro* by Delmail *et al.* (2011), a progressive increase was noted during exposure to Cd (10 μM) until 21 days of exposure, then stabilization is observed until the end of the 27-day exposure. With Chen *et al.* (2015), the activity of the antioxidant enzyme (SOD) showed a gradual increase until the 14th day, then a stabilization until the end of the duration of exposure to 21 days for Pb contents of 10 and 20 μM in *C. Demersum L* exposed *in vitro*.

Finally, the last case (E4), where no significant change in the biomarker response was noted in the first stage of exposure, but later, an increase or decrease in the response was observed (fig. 47-50). In the literature, *L. laevigatum* exposed to metals at low concentrations (Pb, Cr, Ni and Zn) (1-1000 $\mu\text{g/L}$) *in vitro* for 28 days tolerated this mixture of metals without showing changes in its photosynthetic pigment content in the first 14 days of exposure, then a decrease was observed between the 14th and the 28th day (Arán *et al.*, 2017).

Sinha and Pandey (2003) showed that the inhibition of MDA production in the early stages of metal exposure might be due to an increase in the content of sulfhydryl groups, which protect the membrane against free radical attack.

Thus, depending on the site, the influence of the duration of exposure on biomarker response changes.

Stabilization that preceded or followed the increase or decrease in biomarker responses was observed for all contaminated sites, except for S5, which did not show any stabilization prior to the evolution of biomarker responses.

The duration of exposure to reach the maximal biomarker responses is conditioned by the establishment of defense mechanisms to reduce the damage caused by the contaminants associated with the sites impacted, which leads to the stabilization before or after the evolution of certain biomarkers responses, or to a progressive increase/or decrease in the evolution of other biomarkers responses.

Note that in the literature, most of the studies are for a duration of exposure of a few days (less than seven days), and do not allow to point out such phenomena.

However, considering the interest of macrophyte as an integrative tool for water monitoring, it is important to define optimal exposure time. In most cases, results indicate a stabilization of biomarker response after 21 days of exposure. Thus, taking into account the establishment of defense mechanisms, we will further consider the 21-day exposure time as a reference to identify relevant biomarkers.

III.3.3.4. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in water

In this study, Co-inertia analysis, CCA analysis, principal component analysis (PCA) and Pearson (R) correlation analysis on $p < 0.05$ by R and PAST software, were performed between levels of dissolved contaminants in surface water of the studied sites and biomarkers responses by *M. alterniflorum* at t21 (Fig. 52) (Table 18).

The relationship between the biomarker responses in *M. alterniflorum* dataset and the dissolved contaminant levels in water dataset was provided by the Co-inertia and CCA analysis.

We had performed a permutation test to study the strength of the relationship between the two datasets, i.e. the significativity of the RV coefficient ($p < 0.05$). This test was used to measure the closeness between the biomarkers responses in *M. alterniflorum* and dissolved contaminant levels in water. This coefficient was a multivariate generalization of the Pearson correlation coefficient. The Co-inertia analysis and the canonical analysis of the results obtained showed the dataset of the biomarker responses at t21 were expressed by 45% with an $RV = 0.71$ ($p < 0.05$) the dataset of contaminant levels in the water.

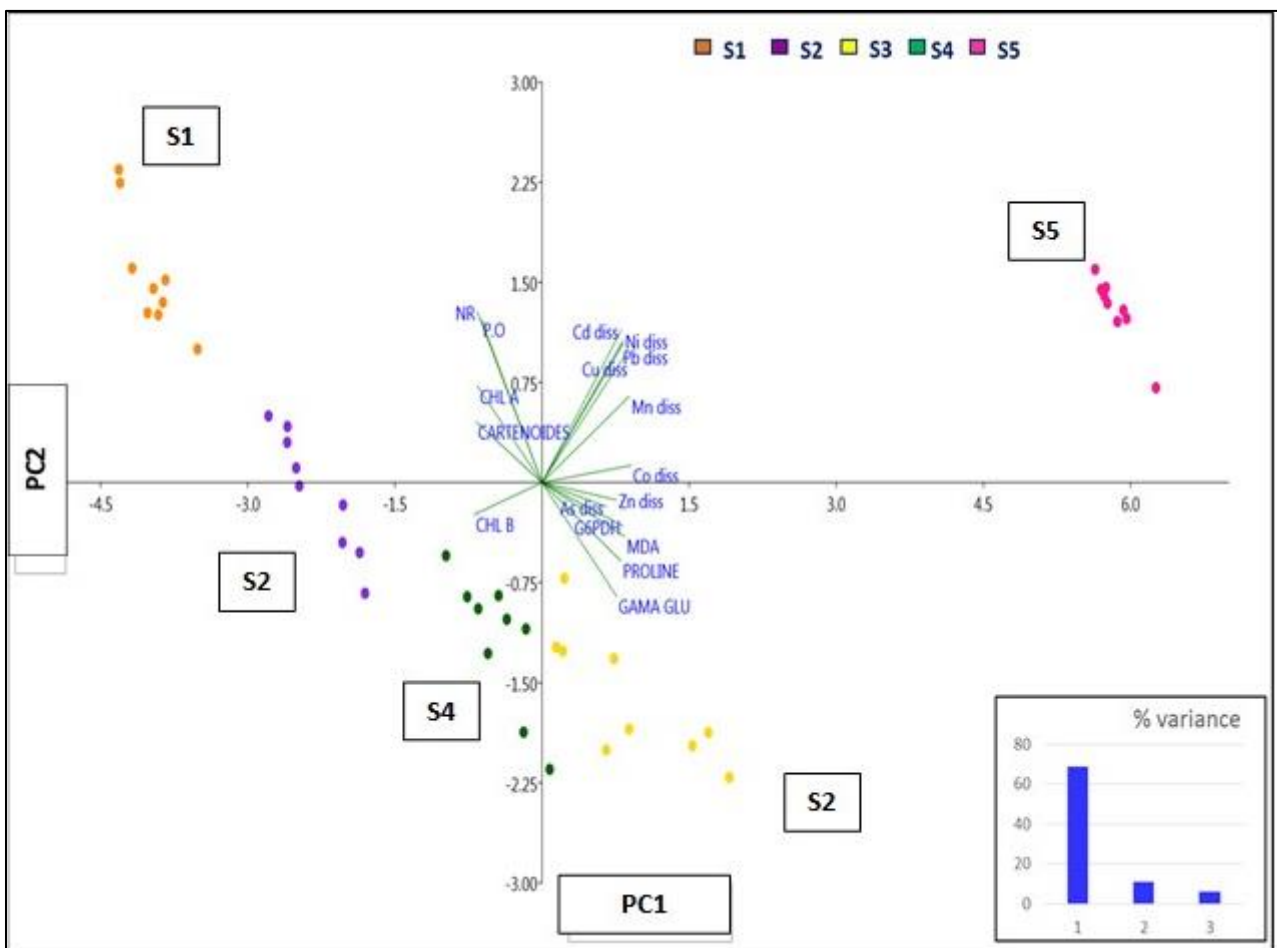


Figure 52. Principal component analysis (PCA), used to evaluate the relationship between biomarkers responses in *M. alterniflorum* with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t21 ($p < 0.05$).

From Pearson correlation test (table 18), significant correlations were observed for most studied biomarkers with a higher coefficient of correlation (R between 0.5 and 0.9) for biochemical biomarkers compared to physiological biomarkers (R between -0.3 and -0.8).

G6PDH activity and MDA content gave the highest positive and significant correlations (R between 0.7 and 0.9), while osmotic potential and NR activity gave the lowest (R between -0.3 and -0.8), which showed that G6PDH activity and MDA content better reflected the impact of contaminants related to impacted sites (table 18).

Table 18. Pearson (R) correlation test used to evaluate the relationship between biomarkers responses in *M. alterniflorum* with dissolved contaminant content in water ($\mu\text{g/L}$) in five sites at t21 (n=45/contaminant) ($p<0,05$).

Correlation test by Pearson test at T21 (R) ($p<0,05$)	Co ($\mu\text{g/L}$)	Zn ($\mu\text{g/L}$)	Cu ($\mu\text{g/L}$)	Mn ($\mu\text{g/L}$)	Ni ($\mu\text{g/L}$)	As ($\mu\text{g/L}$)	Cd ($\mu\text{g/L}$)	Cr ($\mu\text{g/L}$)	Pb ($\mu\text{g/L}$)
G6PDH	0,9	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,9	0,7
Y-GCS	0,8	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,9	0,6
MDA	0,9	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,9	0,7
Free proline	0,8	0,7	0,7	0,8	0,6	0,6	0,6	0,9	0,6
Osmotic potential	-0,6	-0,7	-0,4	-0,5	-0,4	-0,3	-0,3	-0,7	-0,4
NR activity	-0,6	-0,5	-0,4	-0,5	-0,4	-0,5	-0,4	-0,8	-0,4
CHL A	-0,6	-0,5	-0,5	-0,6	-0,5	-0,6	-0,5	-0,7	-0,5
CHL B	-0,7	-0,5	-0,7	-0,7	-0,7	-0,6	-0,7	-0,6	-0,7
Carotenoids	-0,7	-0,6	-0,6	-0,6	-0,6	-0,5	-0,5	-0,7	-0,6

For physiological biomarkers, Chlb showed the highest sensitivity to the impact of urban and industrial activities on plant physiology (table 18) (fig. 52)

For WWTP impact at S3, where Cu, Zn and Co were more present, G6PDH activity was the most sensitive biochemical biomarker ($R=0.7-0.9$) followed by MDA content ($R=0.7-0.9$), free proline content ($R=0.7-0.8$), and γ -GCS activity ($R=0.6-0.8$). In addition, physiological biomarkers detected also this urban impact ($p<0.05$) (table 18) (fig. 52).

Likewise, for industrial impact, where Ni and Cd were in S5, G6PDH activity, and MDA content were the most sensitive biochemical biomarkers ($R=0.7$), and Chlb was the most sensitive physiological biomarker ($R=-0.7$) ($p<0.05$). For metallic stress, the specific biomarker γ -GCS activity will be considered ($R=0.7$). These four selected biomarkers are the most pertinent and sensitive for the detection an industrial contamination in water surface (table 18) (fig. 52).

M. alterniflorum may reflect the water quality status of each studied site in an effective manner by detecting contaminants present in the waters impacted by the urban and industrial activities by high and significant ($p<0.05$) correlations.

Considering present work and literature results, the most pertinent responses were for (i) "G6PDH activity", related to carbohydrate metabolism in plant (and indirectly related to the synthesizes of phytochelatins); (ii) γ -GCS activity, which is specific to detect metals and metalloids in water surface related to phytochelatins synthesis. Likewise, for (iii) "MDA content", which is the most studied biochemical biomarker in literature related to lipoperoxidation generated by the ROS production indicating an oxidative damage by contaminants. Finally, the physiological most sensitive biomarker was "Chlb" related to chloroplasts and photosynthetic activities in the plant.

Therefore, these results show the bioindicator role of *M. alterniflorum* in the aquatic ecosystem. *M. alterniflorum* could be proposed as an appropriate bioindicator for the early detection of contaminants in sites impacted by urban or industrial activities.

III.3.3.5. Correlation study between biomarkers responses and contaminant content in plant

Principal component analysis (PCA) and Pearson (R) correlation analysis on $p < 0.05$ by PAST software, were performed between biomarkers responses and contaminant level into *M. alterniflorum* at t21 (fig. 53) (table 19).

Table 19. Pearson (R) correlation test used to evaluate the relationship between biomarkers responses and contaminant level into *M. alterniflorum* in five sites at t21 ($n=45/\text{contaminant}$) ($p < 0.05$).

Correlation test by Pearson test at T21 (R) ($p < 0.05$)	Co ($\mu\text{g/g}$)	Zn ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	Mn ($\mu\text{g/g}$)	Ni ($\mu\text{g/g}$)	As ($\mu\text{g/g}$)	Cd ($\mu\text{g/g}$)	Cr ($\mu\text{g/g}$)	Pb ($\mu\text{g/g}$)
G6PDH	0,6	0,4	0,8	0,6	0,7	0,6	0,4	-0,3	0,2
Y-GCS	0,6	0,7	0,7	0,5	0,5	0,6	0,4	-0,4	0,3
MDA	0,6	0,5	0,8	0,6	0,7	0,6	0,5	-0,4	0,1
Free proline	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,6	0,4	-0,4	0,3
Osmotic potential	-0,3	-0,5	-0,7	-0,3	-0,3	-0,3	-0,1	0,3	-0,3
NR activity	-0,4	-0,7	-0,6	-0,5	-0,4	-0,4	-0,3	0,4	-0,3
CHL A	-0,5	-0,3	-0,6	-0,5	-0,5	-0,5	-0,3	0,4	-0,1
CHL B	-0,6	-0,5	-0,5	-0,6	-0,7	-0,6	-0,6	0,2	-0,2
Carotenoids	-0,5	-0,4	-0,6	-0,4	-0,5	-0,5	-0,4	0,3	-0,2

Positive and significant correlations ($p < 0.05$) were observed between G6-PDH activity, γ -GCS activity, MDA content, free proline content; and contaminant levels in *M. alterniflorum* (R between 0.4 and 0.8) except Cr and Pb ($p > 0.05$, low concentrations in water and in plant).

Negative and significant correlations ($p < 0.05$) were observed between O.P., NR activity, Chla, Chla, carotenoids; and contaminant levels in *M. alterniflorum* (R between -0.3 and -0.7) except Cr and Pb ($p > 0.05$).

Likewise, comparison between contaminant level in water and biomarker responses, G6PDH activity and MDA content were the most sensitive biomarkers to contaminants accumulated in *M. alterniflorum* (R between 0.4 and 0.8) followed by other biomarkers like γ -GCS activity (R=0.4-0.7), free proline content (R =0.4-0.8), Chlb content (R = -0.5- -0.7) (table 19) (fig. 53).

Essential contaminants were the most correlated (Cu (R<0.8); Co (R<0.6); Zn (R<0.7); Mn (R<0.6); Ni (R<0.7)) while non-essentials contaminants showed poor correlations (Cd (R<0.4); As (R<0.6); Cr and Pb ($p > 0.05$)). The lower accumulation of non-essential contaminants by the plants and the evolution of the contaminant level in plants over time can also explain poor correlations with biomarkers.

These factors that influence contaminant accumulation in plants induce poor correlations between biomarkers and contaminants concentrations in plant, compared to the correlations observed between biomarkers responses and contaminants concentrations in water. This confirm that the use of contaminant accumulation in *M. alterniflorum* is not sufficient and need to be completed with biomarker responses for the contaminant detection in water.

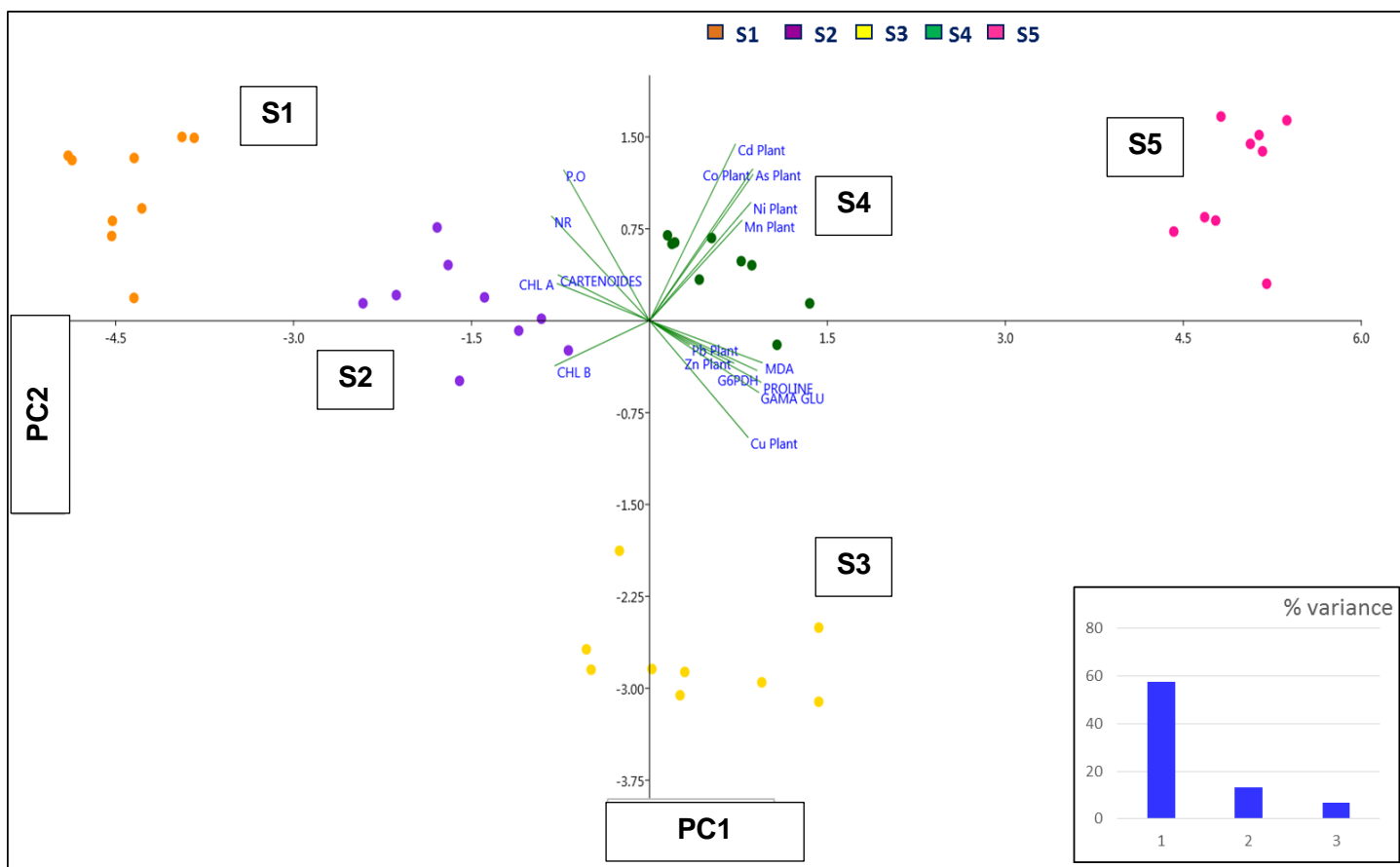


Figure 53. Principal component analysis (PCA), used to evaluate the relationship between biomarkers responses and contaminant level into *M. alterniflorum* in five sites at t21 ($p < 0.05$).

As observed for correlations between these biomarkers and contaminant concentrations in water, G6PDH activity and MDA content showed the highest sensitivity to contaminant effects in plants followed by free proline content, Chlb content, and γ -GCS activity like a specific biomarker for the metallic stress in water.

These results confirm that the use of selected biochemical or physiological biomarkers for the biomonitoring of the water quality can be more relevant and effective than the monitoring of contaminant levels in the plant, which can fluctuate over time, which can skew the results (c.f. III.1.2.3.3).

III.3.4. Conclusion

The contaminants associated with anthropogenic activities generated oxidative stress, lipid peroxidation, enzymatic inhibition, degradation of chlorophyll pigments, and alteration of the osmotic potential. Simultaneously, an induction of the cellular defense system was observed by the accumulation of free proline, and the increase of enzyme activities involved in protection mechanisms such as γ -GCS and G6PDH activities.

According to these results, the exposure time affects the responses of the biomarkers differently than the level of accumulation of contaminants. This influence was generally less pronounced on biomarker responses than the evolution of contaminant accumulation. For that

reason, it can be more interesting to use these biomarkers as a long-term method of contaminant detection in the environment.

Several biomarkers (physiological, biochemical, and specific to metal stress) can be an effective tool for monitoring contaminant occurrence in the environment, which was observed by the remarkable and significant difference between S2 and S3 for urban pollution and between S4 and S5 for industrial pollution. In addition, the significant difference between S1, the reference site, and the four contaminated sites indicated that studied biomarkers were sensitive to different impacts on environment.

For overall effect, biochemical and physiological biomarkers in *Myriophyllum alterniflorum* can reflect the impact of urban and industrial wastewater discharges. Indeed, we observed a significant difference between upstream and downstream sites (fig. 47-50):

According to PCA analysis (Fig. 52) the γ -GCS activity, the free proline concentration, the osmotic potential, the nitrate reductase activity and the carotenoid levels could highlight the impact of urban activities (S3). On the other hand, the G6PDH activity, the MDA concentration and the Chla, Chlb concentrations could reflect industrial impact (S5).

For a specific contaminant detection associated with urban and industrial activities, Chlb content (physiological biomarker), G6PDH activity (biochemical biomarker), MDA concentration (oxidative stress biomarker and the indicator of lipid peroxidation) and γ -GCS activity (the metal specific defense biomarker), appeared encouraging biomarkers.

Based on the results at the five sites, as well as the correlations with contaminant levels in water and plant, the following four biomarkers seem to be appropriate to reflect metal occurrence in urban and industrial activity in water: γ -GCS activity, G6PDH activity, MDA content and Chlb.

The assay of Chlb and MDA are simple and not expensive; they could be the first parameter to analyze in order to evaluate the quality of an aquatic system. When no evidence of anthropic impact is shown, no further analysis are required. In contrary, when response of Chlb or MDA indicate an alteration of water quality, further investigations are necessary, such as G6PDH and γ -GCS activities analysis. γ -GCS activity response is specific to metallic stress, its response should engage to perform metal analysis in plant.

Conclusion et perspectives

Le but de ce travail était d'étudier l'intérêt de *Myriophyllum alterniflorum*, pour la détection de contaminants inorganiques dans les eaux de surface.

Les activités anthropiques dans le bassin de la Vienne peuvent engendrer une dégradation de la qualité des eaux de surface. Notre étude a permis de mettre en évidence l'impact des rejets domestiques et de rejets industriels sur différents paramètres de la qualité des eaux, en utilisant *Myriophyllum alterniflorum* qui s'avère être un bioindicateur de la contamination des eaux.

La zone d'étude se composait de trois sites distincts. Le site témoin Saint Denis (S1), loin de toute perturbation humaine, les sites en amont et aval de la STEU de Limoges à la Vienne (S2 et S3), et les sites amont et aval des rejets des eaux usées industrielles à la Valoine (S4 / S5).

Les résultats ont montré une variation dans les paramètres physicochimiques et chimiques de l'eau, du fait des activités anthropiques dans les sites étudiés. Certains de ces paramètres influencent la spéciation et la biodisponibilité des métaux et des métalloïdes dans l'eau, ainsi les métaux/métalloïdes dissous devraient être moins biodisponibles en S3 et en S5 du fait de l'influence du COD et du pH respectivement.

Des différences significatives de concentrations de contaminants ont été relevées dans les cinq sites étudiés.

Une prédominance de zinc, de cuivre et de cobalt a été observée sur le site (S3) impacté par les rejets de la STEU, tandis que le site impacté par les rejets industriels (S5) présente des concentrations plus élevées en nickel, cadmium, cuivre et plomb. Le site amont Valoine (S4) est également impacté par la présence des contaminants liés probablement aux rejets agricoles diffus, tels que le manganèse, le zinc. L'arsenic était présent dans les eaux des sites S4 et S5 du fait de contexte géochimique du bassin versant étudié.

Excepté pour le site impacté par les activités industrielles, les concentrations en contaminants ont montré une variation saisonnière. En effet, ces concentrations étaient plus élevées au printemps, du fait des précipitations et du phénomène de lessivage.

L'étude des teneurs en contaminants (Cu, Co, Ni, Pb, Cd et As) dans *M. alterniflorum* montre que la bioaccumulation de ces contaminants varie en fonction de la saison (effet de la température et de la croissance printanière), des sites (biodisponibilité des métaux et métalloïdes, interaction entre les contaminants et les nutriments).

L'absorption des contaminants dans la plante était influencée par le niveau trophique qui avec son augmentation, induit une accumulation des contaminants dans la plante, même dans les sites où les teneurs en métaux/métalloïdes dans l'eau sont faibles (S3). Cependant, dans le cas de l'arsenic, les phosphates engendrent une inhibition de l'accumulation de ce contaminant, du fait de l'analogie des transporteurs des arsénates et des phosphates dans la plante.

Sur la base des résultats observés lors des trois campagnes, un effet d'interaction entre la température et la croissance printanière des plantes peut affecter l'accumulation des contaminants. Cependant, les teneurs en contaminants dans l'eau constituent le principal paramètre de contrôle de l'accumulation de contaminants dans la plante, car les analyses statistiques ont montré que les variations des teneurs de la plupart des contaminants dans la plante varient en fonction des teneurs des contaminants dans l'eau.

Dans cette étude, *M. alterniflorum* a montré des niveaux de BCF dans les tissus supérieurs à 1000 pour tous les contaminants étudiés. Le BCF des divers contaminants étudiés varie entre 475 et 90000 pendant 28 jours d'exposition. Le BCF le plus élevé était de 90000 ± 11000 pour Cu à t28 à S3 (rejet en aval de STEU) et le plus bas pour As était de 475 ± 134 à T7 à S5 (en aval du rejet industriel). L'absorption des contaminants dépend du besoin de la plante (élément essentiel ou non à la croissance et au métabolisme), ainsi que leur teneur dans l'eau et de la composition de l'eau, car ces paramètres affectent la spéciation des contaminants et donc leur biodisponibilité.

Dans cette étude, le classement des contaminants, suivant leur BCF dans *M. alterniflorum* est le suivant : Cu > Cd > As > Ni.

Ainsi, la capacité d'absorption est plus élevée pour les contaminants essentiels comme le cuivre ; alors que les autres contaminants non-essentiels (arsenic et cadmium) sont moins absorbés par la plante comme. Pour le nickel, qui est un élément essentiel pour la plante, mais au-delà du seuil de toxicité, la plante réduit son absorption afin d'éviter des effets délétères pour la plante (par des mécanismes de défense cellulaire définies par une absorption réduite ou par le mécanisme d'efflux).

Il y a parfois une relation inverse entre les teneurs des contaminants dans l'eau et le BCF. Les valeurs de BCF les plus élevées ont été relevées dans le cas de système avec des teneurs en contaminants modérées, elles diminuent lorsque les concentrations en contaminants dans l'eau sont élevées (supérieures aux NQE). Ceci peut être dû à l'homéostasie et la régulation réalisée par la plante, où le BCF diminue suite à l'augmentation des teneurs en contaminants dans l'eau.

Les corrélations entre les concentrations des contaminants dans l'eau et dans *Myriophyllum alterniflorum* soulignent l'intérêt de ce macrophyte pour de la détection de contaminants dans l'eau, en tant qu'outil intégratif de biomonitoring.

La durée de l'exposition influence l'accumulation des contaminants dans *Myriophyllum alterniflorum*. Pour comparer les résultats obtenus et faire le diagnostic d'un système, il est nécessaire de se baser sur des durées d'exposition similaires. Compte tenu de la mise en place de phénomènes de défense des plantes, avec le mécanisme d'efflux, nous pourrions recommander, dans le cas de sites peu impactés, une durée d'exposition supérieure à un mois, car les teneurs en contaminants accumulés dans la plante ne déclenchent pas de mécanismes de défense cellulaire, et alors l'accumulation évolue régulièrement au cours du temps. Au contraire, dans le cas de sites impactées par des activités urbaines ou industrielles, la durée d'exposition devrait être réduite à moins d'un mois (une durée de 21 jours semble plus appropriée), du fait qu'au cours du temps, les contaminants induisent un stress oxydatif dans la plante déclenchant des mécanismes de défense cellulaire avec une réduction

d'absorption ou des mécanismes d'efflux, ce qui génère des fluctuations des teneurs de contaminants accumulés dans la plante au cours du temps.

Contrairement aux teneurs en contaminant dans la plante, la réponse des biomarqueurs n'a pas montré d'évolution antagoniste (augmentation suivie d'une diminution au cours du temps) lors des périodes d'exposition de 28 jours.

L'utilisation de biomarqueurs de *M. alterniflorum* peut constituer un outil complémentaire et pertinent pour la biosurveillance de la qualité de l'eau au fil du temps. Avec les biomarqueurs non spécifiques du stress métallique, les niveaux de corrélation entre les teneurs en contaminants dans l'eau et la réponse de ces biomarqueurs sont parfois faibles car d'autres paramètres, tels que les contaminants organiques, peuvent influencer leur réponse.

Une approche multiparamétrique pourrait être importante pour évaluer la qualité des eaux. Ainsi, plusieurs biomarqueurs (physiologiques, biochimiques, et aussi spécifiques au stress métallique) peuvent être utilisés pour détecter la présence de contaminants dans l'environnement.

Les contaminants associés aux activités anthropiques peuvent générer un stress oxydatif, une peroxydation des lipides, une inhibition enzymatique, une dégradation des pigments chlorophylliens et une altération du potentiel osmotique. Simultanément, une induction du système de défense cellulaire a été observée par l'accumulation de proline libre, et l'augmentation des activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de protection tels que les activités γ -GCS et G6PDH.

Pour la mise en évidence d'un effet global, les biomarqueurs biochimiques et physiologiques de *Myriophyllum alterniflorum* peuvent refléter l'impact des rejets d'eaux usées urbaines et industrielles. Selon les résultats obtenus, l'activité γ -GCS, la concentration en proline libre, le potentiel osmotique, l'activité nitrate réductase et les taux de caroténoïdes semblent les plus pertinents pour mettre en évidence l'impact des rejets d'eaux usées urbaines (S3), alors que l'activité G6PDH, la concentration de MDA et les concentrations de Chla, Chlb ont mieux mis en lumière l'impact des rejets industriels (S5).

Sur la base des résultats statistiques, et pour une approche multiparamétrique de l'évaluation de la qualité des eaux, les biomarqueurs les plus sensibles pour diagnostiquer la présence des contaminants associés aux activités urbaines et industrielles seraient ;

- Parmi les biomarqueurs physiologiques, la concentration de pigments photosynthétiques, en particulier Chlb.
- Parmi les biomarqueurs indicateurs du stress oxydatif en relation avec la peroxydation lipidique, la concentration en MDA,
- Parmi les biomarqueurs de défense cellulaire, l'activité de G6PDH
- Parmi les biomarqueurs de défense spécifique du stress métalliques, l'activité de γ -GCS.

Le temps d'exposition influence la réponse de ces biomarqueurs mais de façon moins importante que l'accumulation de contaminants dans la plante. Ainsi, l'utilisation des biomarqueurs semble plus intéressante dans le cadre de suivi pour durées d'exposition longues (plus de trois semaines).

Le dosage de Chlb et MDA est simple et moins coûteux ; ils pourraient être le premier paramètre à analyser pour évaluer la qualité d'un système aquatique. Quand aucune preuve d'impact anthropique n'est montrée, aucune autre analyse n'est requise. En revanche, lorsque la réponse de Chlb ou MDA indique une altération de la qualité de l'eau, d'autres études s'avèreraient nécessaires, telles que l'analyse des activités G6PDH et γ -GCS. La réponse de l'activité γ -GCS est spécifique d'un stress métallique, ainsi la réponse de ce biomarqueur devrait amener à réaliser l'analyse des métaux/métalloïdes dans *M. alterniflorum* (fig. 54).

Cet outil semble donc particulièrement intéressant par rapport aux modes de suivi ponctuel ou passif pour refléter la qualité des eaux en tenant compte de la diversité des contaminants potentiellement présents.

Il serait également intéressant de tenir compte de l'impact des contaminants organiques qui peuvent avoir un effet sur les biomarqueurs de la plante.

Il serait important dans les futures expérimentations que les contaminants métalliques soient testés en mélange *in vitro*, mais aussi de considérer l'effet de mélange de contaminants organiques et inorganiques.

Pour approfondir l'étude relative à l'intérêt de *Myriophyllum alterniflorum* pour le suivi spatio/temporel des contaminants métalliques et de l'arsenic, il serait intéressant de travailler avec un panel de sites plus large : (i) avec des pressions anthropiques dans des contextes différents (taux de dilution avec le milieu récepteur différent, systèmes de traitement des eaux usées différents) afin de valider la réponse des biomarqueurs observés dans cette étude, (ii) avec des pressions anthropiques différentes (rejets agricoles, autres activités industrielles). Une attention particulière doit être portée à la définition du site amont et du site aval.

Par ailleurs, outre le suivi ponctuel des teneurs en contaminants dissous dans l'eau, il semblerait beaucoup plus intéressant de réaliser un échantillonnage passif. En effet, ce dernier serait plus représentatif, du fait de son caractère intégratif et de la détection de la fraction labile des contaminants. Ainsi, les corrélations de ces données avec l'accumulation des contaminants dans la plante et avec la réponse des biomarqueurs devraient être meilleures, ce qui permettrait d'affiner l'identification des biomarqueurs les plus pertinents en fonction des contaminants ou des pressions anthropiques.

D'autres biomarqueurs biochimiques et morphologiques, ainsi que physiologiques, pourraient être étudiés, pour avoir un diagnostic plus précis de l'état des masses d'eau.

En outre, des études concernant l'accumulation dans le système racinaire et le système foliaire seraient intéressantes, afin de pouvoir montrer la mobilité des contaminants dans la plante et les mécanismes de défense (phénomène de réduction d'absorption, translocation...).

• Proposition de protocole opératoire

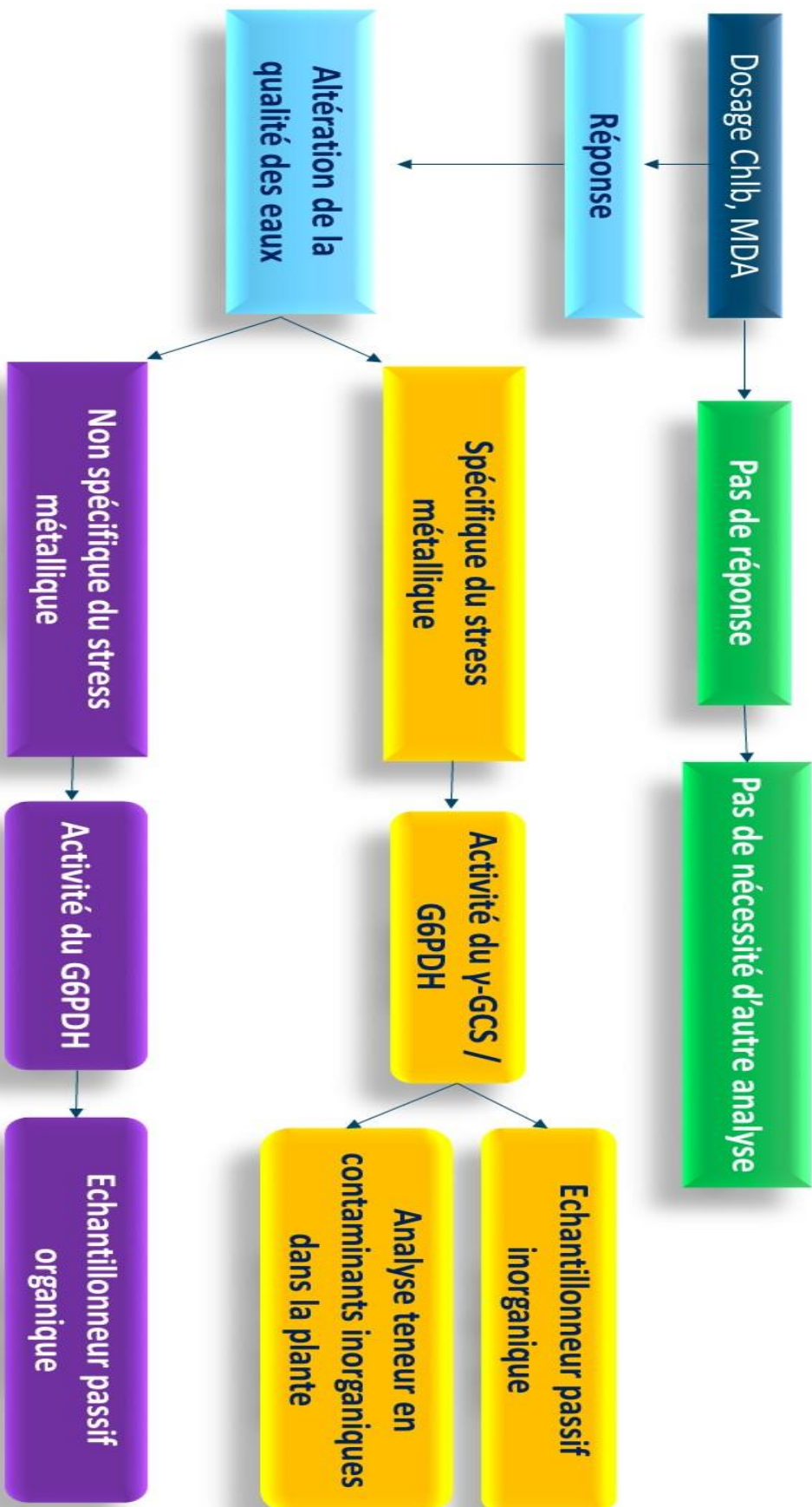


Figure 54. Protocole opératoire pour l'utilisation des biomarqueurs de *M. alterniflorum* pour la détection des contaminants dans l'environnement.

Références bibliographiques

- AA, G.M., 2014. Impacts of different water pollution sources on antioxidant defense ability in three aquatic macrophytes in Assiut Province, Egypt. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 10.
- Abou-Hamdan, H., Haury, J., Hebrard, J.-P., Dandelot, S., Cazaubon, A., 2005. Macrophytic communities inhabiting the Huveaune (South-East France), a river subject to natural and anthropic disturbances. *Hydrobiologia* 551, 161–170.
- Ahmad, P., 2016. *Plant metal interaction: emerging remediation techniques*. Elsevier.
- Ahmad, P., Sarwat, M., Bhat, N.A., Wani, M.R., Kazi, A.G., Tran, L.-S.P., 2015. Alleviation of Cadmium Toxicity in *Brassica juncea* L. (Czern. & Coss.) by Calcium Application Involves Various Physiological and Biochemical Strategies. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114571>
- Ahsan, N., Lee, D.-G., Lee, S.-H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.-S., Kim, J.-S., Lee, B.-H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67, 1182–1193.
- Alcántara, E., Romera, F.J., Cañete, M., De la Guardia, M.D., 1994. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1893–1898.
- Ali, A.A., Alqurainy, F., 2006. Activities of antioxidants in plants under environmental stress. The lutein-prevention and treatment for diseases 187–256.
- AliaSaradhi, P., 1993. Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress-induced proline accumulation. *Biochemical and biophysical research communications* 193, 54–58.
- Al-Juboury, A., 2009. Natural pollution by some heavy metals in the Tigris River, Northern Iraq. *International Journal of Environmental Research* 3, 189–198.
- Allan, I.J., Knutsson, J., Guigues, N., Mills, G.A., Fouillac, A.-M., Greenwood, R., 2008. Chemcatcher® and DGT passive sampling devices for regulatory monitoring of trace metals in surface water. *Journal of Environmental monitoring* 10, 821–829.
- Alloway, B.J., 2013. Sources of heavy metals and metalloids in soils, in: *Heavy Metals in Soils*. Springer, pp. 11–50.
- Amiard, J., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Publ., Tec & Doc, Paris 320.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.
- Anderson, I., Robertson, D., 1960. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. *Plant Physiology* 35, 531.
- Anderson, M.E., Meister, A., 1983. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst (e) ine for glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 707–711.
- Anjum, N.A., Ahmad, I., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Umar, S., Khan, N.A., 2012. *The Plant Family Brassicaceae: Contribution Towards Phytoremediation, Environmental Pollution*. Springer Netherlands.
- Appenroth, K.-J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W., Koloczek, H., 2010. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* 78, 216–223.

- Appenroth, K.-J., Stöckel, J., Srivastava, A., Strasser, R., 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environmental Pollution* 115, 49–64.
- Arán, D.S., Harguinteguy, C.A., Fernandez-Cirelli, A., Pignata, M.L., 2017. Phytoextraction of Pb, Cr, Ni, and Zn using the aquatic plant *Limnobium laevigatum* and its potential use in the treatment of wastewater. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 18295–18308.
- Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 391–397.
- Arrêté du 7 août 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement, n.d.
- Arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement - Article Annexe V, n.d.
- Assche, F.V., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* 13, 195–206.
- Audet, P., Charest, C., 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution* 147, 231–237.
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 126, 696–706.
- Ayeni, O., Ndakidemi, P., Snyman, R., Odendaal, J., 2010. Chemical, biological and physiological indicators of metal pollution in wetlands. *Scientific Research and Essays* 5, 1938–1949.
- Baker, A.J., Walker, P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* 2, 155–165.
- Balestrasse, K.B., Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2003. Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Functional plant biology* 30, 57–64.
- Banu Doğanlar, Z., 2013. Metal accumulation and physiological responses induced by copper and cadmium in *Lemna gibba*, *L. minor* and *Spirodela polyrhiza*. *Chemical Speciation & Bioavailability* 25, 79–88.
- Barbe, J., 1984. Les végétaux aquatiques. Données biologiques et écologiques. Clés de détermination des macrophytes de France. *Bulletin français de pisciculture* 1–42.
- Barbour, M.T., Gerritsen, J., Snyder, B.D., Stribling, J.B., 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. US Environmental Protection Agency, Office of Water Washington, DC.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C., Andreu, I., Gunse, B., 1986. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) I. Effects of Cd on water potential, relative water content, and cell wall elasticity. *Journal of plant physiology* 125, 17–25.
- Bashir, K., Rasheed, S., Kobayashi, T., Seki, M., Nishizawa, N.K., 2016. Regulating subcellular metal homeostasis: the key to crop improvement. *Frontiers in plant science* 7, 1192.
- Bassi, R., Sharma, S.S., 1993. Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochemistry* 33, 1339–1342.

- Bates, L., Waldren, R., Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39, 205–207.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F., Axelsen, K.B., 2003. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology* 132, 618–628.
- Bazzaz, F., Carlson, R.W., Rolfe, G., 1974. The effect of heavy metals on plants: Part I. Inhibition of gas exchange in sunflower by Pb, Cd, Ni and Tl. *Environmental Pollution* (1970) 7, 241–246.
- Bellinger, E.G., Sigeo, D.C., 2015. *Freshwater algae: identification and use as bioindicators*. John Wiley & Sons.
- Berdai, H., Soudi, B., Bellouti, A., 2004. Contribution à l'étude de la pollution nitrique des eaux souterraines en zones irriguées: Cas du Tadla. *Projet INCO-WADEMED, Actes du Séminaire, Modernisation de l'Agriculture Irriguée, Rabat, du 19, 28*.
- Bernal, M., Testillano, P.S., Alfonso, M., del Carmen Risueño, M., Picorel, R., Yruela, I., 2007. Identification and subcellular localization of the soybean copper P1B-ATPase GmHMA8 transporter. *Journal of structural biology* 158, 46–58.
- Berry, W.L., 1986. Plant factors influencing the use of plant analysis as a tool for biogeochemical prospecting. *Mineral exploration: Biological systems and organic matter* 5, 13–28.
- Biermann, A., Engel, A., Riebesell, U., 2014. Changes in organic matter cycling in a plankton community exposed to warming under different light intensities. *J Plankton Res* 36, 658–671. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbu005>
- Bjerregaard, P., Andersen, O., 2007. CHAPTER 13 - Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem, in: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)*. Academic Press, Burlington, pp. 251–280. <https://doi.org/10.1016/B978-012369413-3/50068-9>
- Blaby-Haas, C.E., Merchant, S.S., 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823, 1531–1552.
- Blandin, P., Mollon, A., Nataf, L., 1986. *Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques*.
- Bleuel, C., Wesenberg, D., Sutter, K., Miersch, J., Braha, B., Bärlocher, F., Krauss, G.-J., 2005. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals: 3. Cd²⁺ accumulation capacities and biochemical stress response of two *Fontinalis* species. *Science of the Total Environment* 345, 13–21.
- Boily, F., 2004. Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Bokhari, S.H., Ahmad, I., Mahmood-Ul-Hassan, M., Mohammad, A., 2016. Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. *International journal of phytoremediation* 18, 25–32.
- Bonanno, G., 2013. Comparative performance of trace element bioaccumulation and biomonitoring in the plant species *Typha domingensis*, *Phragmites australis* and *Arundo donax*. *Ecotoxicology and environmental safety* 97, 124–130.
- Bonanno, G., Giudice, R.L., 2010. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecological indicators* 10, 639–645.

- Bossy, A., 2010. Origines de l'arsenic dans les eaux, sols et sédiments du district aurifère de S t-Yrieix-la-Perche (Limousin, France): contribution du lessivage des phases porteuses d'arsenic.
- Boudet, L.C., Escalante, A., Von Haefen, G., Moreno, V., Gerpe, M., 2011. Assessment of heavy metal accumulation in two aquatic macrophytes: a field study. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 6.
- Boullemant, A., Lavoie, M., Fortin, C., Campbell, P.G., 2009. Uptake of hydrophobic metal complexes by three freshwater algae: unexpected influence of pH. *Environmental science & technology* 43, 3308–3314.
- Boutigny, S., Sautron, E., Finazzi, G., Rivasseau, C., Frelet-Barrand, A., Pilon, M., Rolland, N., Seigneurin-Berny, D., 2014. HMA1 and PAA1, two chloroplast-envelope PIB-ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis. *Journal of experimental botany* 65, 1529–1540.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.
- Bragato, C., Brix, H., Malagoli, M., 2006. Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel and *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. *Environmental pollution* 144, 967–975.
- Breard, G., 1990. La Vienne dans la région de Civaux. Perspectives qualitatives. *Norois* 148, 413–430. <https://doi.org/10.3406/noroi.1990.4484>
- Brunetti, P., Zanella, L., De Paolis, A., Di Litta, D., Cecchetti, V., Falasca, G., Barbieri, M., Altamura, M.M., Costantino, P., Cardarelli, M., 2015. Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter *AtABCC3* increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 66, 3815–3829.
- Bruns, I., Friese, K., Markert, B., Krauss, G.-J., 1997. The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the River Elbe. *Science of the Total Environment* 204, 161–176.
- Burger, J., 2006. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. *Environmental Bioindicators* 1, 22–39.
- Buzier, R., Charriau, A., Corona, D., Lenain, J.-F., Fondanèche, P., Joussein, E., Poulhier, G., Lissalde, S., Mazzella, N., Guibaud, G., 2014. DGT-labile As, Cd, Cu and Ni monitoring in freshwater: toward a framework for interpretation of in situ deployment. *Environmental pollution* 192, 52–58.
- Calow, P.P., 2009. *Handbook of Ecotoxicology*. Wiley.
- Calzoni, G.L., Antognoni, F., Pari, E., Fonti, P., Gnes, A., Speranza, A., 2007. Active biomonitoring of heavy metal pollution using *Rosa rugosa* plants. *Environmental Pollution* 149, 239–245.
- Campbell, P.G., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 189–206.
- Carballeira, A., López, J., 1997. Physiological and statistical methods to identify background levels of metals in aquatic bryophytes: dependence on lithology. *Journal of Environmental Quality* 26, 980–988.

- Carbiener, R., Trémolières, M., Mercier, J., Ortscheit, A., 1990. Aquatic macrophyte communities as bioindicators of eutrophication in calcareous oligosaprobe stream waters (Upper Rhine plain, Alsace). *Vegetatio* 86, 71–88.
- Cardwell, A., Hawker, D., Greenway, M., 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. *Chemosphere* 48, 653–663.
- Catsiki, V., Papathanassiou, E., 1993. The use of the chlorophyte *Ulva lactuca* (L) as indicator organism of metal pollution. *Macroalgae, Eutrophication and Trace Metal Cycling in Estuaries and Lagoons*. CEE publ, pp. 93Á/105.
- Ceschin, S., Zuccarello, V., Caneva, G., 2010. Role of macrophyte communities as bioindicators of water quality: Application on the Tiber River basin (Italy). *Plant biosystems* 144, 528–536.
- Chatenet, P., Botineau, M., Haury, J., Ghestem, A., 2000. Typologie de la végétation macrophytique des rivières et affluents de la Vienne et de la Gartempe (Limousin, France). *Acta botanica gallica* 147, 151–164.
- Chatenet, P., Froissard, D., Cook-Moreau, J., Hourdin, P., Ghestem, A., Botineau, M., Haury, J., 2006. Populations of *Myriophyllum alterniflorum* L. as bioindicators of pollution in acidic to neutral rivers in the Limousin region, in: *Macrophytes in Aquatic Ecosystems: From Biology to Management*. Springer, pp. 61–65.
- Chen, J., Goldsbrough, P.B., 1994. Increased activity of [gamma]-glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant physiology* 106, 233–239.
- Chen, M., Zhang, L.-L., Li, J., He, X.-J., Cai, J.-C., 2015. Bioaccumulation and tolerance characteristics of a submerged plant (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to toxic metal lead. *Ecotoxicology and environmental safety* 122, 313–321.
- Chmielewská, E., Medved, J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals by green algae *Cladophora glomerata* in a refinery sewage lagoon. *Croatica Chemica Acta* 74, 135–145.
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., Kunhikrishnan, A., Ashwath, N., Ok, Y.S., 2014. Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. *Critical reviews in plant sciences* 33, 374–391.
- Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J.-M., Durrieu, C., 2004. Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosensors and Bioelectronics* 19, 1089–1096.
- Chugh, L.K., Sawhney, S.K., 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 297–303.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science* 7, 309–315.
- Collén, J., Pedersén, M., 1996. Production, scavenging and toxicity of hydrogen peroxide in the green seaweed *Ulva rigida*. *European Journal of Phycology* 31, 265–271.
- Colzi, I., Doumett, S., Del Bubba, M., Fornaini, J., Arnetoli, M., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., 2011. On the role of the cell wall in the phenomenon of copper tolerance in *Silene paradoxa* L. *Environmental and experimental botany* 72, 77–83.
- Conseil canadien des ministres de l'environnement, 2004. *Recommandations canadiennes pour la protection de la vie aquatique : le phosphore : cadre canadien d'orientation pour la gestion des réseaux hydrographiques*. Dans : *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 2004*, CCME, Winnipeg.

- Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2018. Peroxisomal plant metabolism—an update on nitric oxide, Ca²⁺ and the NADPH recycling network. *J Cell Sci* 131, jcs202978.
- Cristina, M.S., Petersen, M., Mundy, J., 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology* 61, 621–649.
- Cuypers, A., Hendrix, S., Amaral dos Reis, R., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., Jozefczak, M., Loix, C., Vercampt, H., Vangronsveld, J., 2016. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in plant science* 7, 470.
- Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2, 53.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental pollution* 98, 29–36.
- Davis, W.S., Simon, T.P., 1995. *Biological Assessment and Criteria: Tools for Water Resource Planning and Decision Making*, Biological Assessment and Criteria: Tools for Water Resource Planning and Decision Making. Taylor & Francis.
- Dazy, M., Masfaraud, J.-F., Férard, J.-F., 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75, 297–302.
- De Filippis, L., 1979. The effect of heavy metals on the absorption spectra of *Chlorella* cells and chlorophyll solutions. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 93, 129–137.
- De Paiva Magalhães, D., da Costa Marques, M.R., Baptista, D.F., Buss, D.F., 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environmental chemistry letters* 13, 69–87.
- Delmail, D., 2011. Contribution de *Myriophyllum alterniflorum* et de son périphyton à la biosurveillance de la qualité des eaux face aux métaux lourds.
- Delmail, D., Labrousse, P., Hourdin, P., Larcher, L., Moesch, C., Botineau, M., 2011. Differential responses of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae) organs to copper: physiological and developmental approaches. *Hydrobiologia* 664, 95–105.
- Demirezen, D., Aksoy, A., 2006. Common hydrophytes as bioindicators of iron and manganese pollutions. *Ecological Indicators* 6, 388–393.
- Devillers, D., 2017. Fiabilisation de la quantification des éléments traces cationiques et anioniques par la technique d'échantillonnage DGT en milieu aquatique naturel 151.
- Devillers, D., Buzier, R., Grybos, M., Charriau, A., Guibaud, G., 2017. Key role of the sorption process in alteration of metal and metalloid quantification by fouling development on DGT passive samplers. *Environmental Pollution* 230, 523–529.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic toxicology* 74, 150–159.
- Dhir, B., 2013. *Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-Up*, SpringerLink : Bücher. Springer India.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P.P., 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 39, 754–781.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P.P., 2004. Hydrophytes lack potential to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline. *Aquatic Toxicology* 66, 141–147.

- Dibong, S.D., Ndjouondo, G.P., 2014. Inventaire floristique et écologie des macrophytes aquatiques de la rivière Kambo à Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences* 80, 7147–7160.
- Dietz, K.-J., Baier, M., Krämer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants, in: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, pp. 73–97.
- Directive n° 2000/60/CE du 23/10/00 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau | AIDA [WWW Document], n.d. URL https://aida.ineris.fr/consultation_document/995 (accessed 7.14.18).
- Dong, J., Mao, W., Zhang, G., Wu, F., Cai, Y., 2007. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity—a review. *Plant Soil and Environment* 53, 193.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* 17, 379–387.
- Dronnet, V., Renard, C., Axelos, M., Thibault, J.-F., 1996. Characterisation and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydrate polymers* 30, 253–263.
- Dufour, A.B., 2009. Fiche TD avec le logiciel : course6 ————— Coinertia Analysis 11.
- Duman, F., Obali, O., Demirezen, D., 2006. Seasonal changes of metal accumulation and distribution in shining pondweed (*Potamogeton lucens*). *Chemosphere* 65, 2145–2151.
- Duman, F., Ozturk, F., Aydin, Z., 2010. Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As (III) and As (V): effects of concentration and duration of exposure. *Ecotoxicology* 19, 983–993.
- Eapen, S., D'souza, S., 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology advances* 23, 97–114.
- Ekvall, L., Greger, M., 2003. Effects of environmental biomass-producing factors on Cd uptake in two Swedish ecotypes of *Pinus sylvestris*. *Environmental Pollution* 121, 401–411.
- Elaboration du SAGE Vienne - Etablissement Public Territorial du Bassin de la Vienne [WWW Document], n.d. URL <http://www.eptb-vienne.fr/Elaboration-du-SAGE-Vienne.html>.
- Elder, J.F., 1988. Metal biogeochemistry in surface-water systems: a review of principles and concepts. Department of the Interior, US Geological Survey.
- Elhassan, A., Belghyti, D., Elibaoui, H., Benabid, M., 2010. Ecological status of water ecosystem where live common trout in the central middle morocco: Sidi rachid river.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2013. *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.
- Farago, M.E., Mullen, W.A., 1979. Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *armeria maritima*. *Inorganica Chimica Acta* 32, L93–L94. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)91627-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)91627-X)
- Farid, M., Shakoor, M.B., Ehsan, S., Ali, S., Zubair, M., Hanif, M., 2013. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress. *Int J Chem Biochem Sci* 3, 53–60.
- Fauvelle, V., Mazzella, N., Delest, B., Delmas, F., Lissalde, S., Méchin, B., Budzinski, H., 2010. Etalonnage et déploiement in situ d'échantillonneurs passifs de type POCIS afin de quantifier les pesticides dans les cours d'eau. Presented at the 40ème Congrès du Groupe Français des Pesticides, pp. 4-p.
- Fawzy, M.A., Badr, N.E., El-Khatib, A., Abo-El-Kassem, A., 2012. Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. *Environmental monitoring and assessment* 184, 1753–1771.

- Fernandes, J., Henriques, F., 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The botanical review* 57, 246–273.
- Fernandes, J.C., García-Angulo, P., Goulao, L.F., Acebes, J.L., Amâncio, S., 2013. Mineral stress affects the cell wall composition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) callus. *Plant science* 205, 111–120.
- 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.
- Finazzi, G., Petroustos, D., Tomizioli, M., Flori, S., Sautron, E., Villanova, V., Rolland, N., Seigneurin-Berny, D., 2015. Ions channels/transporters and chloroplast regulation. *Cell calcium* 58, 86–97.
- Florence, T., Morrison, G., Stauber, J., 1992. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Science of the Total environment* 125, 1–13.
- Forces et faiblesses du bassin de la Vienne, conseil régional de Limousin - [WWW Document], n.d. URL http://www.gesteau.fr/sites/default/files/doc_SAGE04016-1227022852.pdf.
- Francko, D.A., Delay, L., Al-Hamdani, S., 1993. Effect of hexavalent chromium on photosynthetic rates and petiole growth in *Nelumbo lutea* seedlings. *Journal of Aquatic Plant Management* 31, 29–29.
- Fritioff, Å., Greger, M., 2006. Uptake and distribution of Zn, Cu, Cd, and Pb in an aquatic plant *Potamogeton natans*. *Chemosphere* 63, 220–227.
- Fritioff, Å., Kautsky, L., Greger, M., 2005. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. *Environmental Pollution* 133, 265–274.
- Gagnon, C., Vaillancourt, G., Pazdernik, L., 1999. L'accumulation et l'élimination de cadmium par deux mousses aquatiques, *Fontinalis dalecarlica* et *Platyphypnidium ripariodes*: Influence de la concentration de Cd, du temps d'exposition, de la dureté de l'eau et de l'espèce de mousses. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science* 12, 219–237.
- Galal, T.M., Shehata, H.S., 2014. Evaluation of the invasive macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. as a bioaccumulator for heavy metals in some watercourses of Egypt. *Ecological indicators* 41, 209–214.
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83, 33–46.
- Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., 2009. Arsenic pollution sources, in: *Reviews of Environmental Contamination Volume 197*. Springer, pp. 17–60.
- Garg, P., Tripathi, R., Rai, U., Sinha, S., Chandra, P., 1997. Cadmium accumulation and toxicity in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.) Royle. *Environmental monitoring and assessment* 47, 167–173.
- Garnczarska, M., Ratajczak, L., 2000. Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions II. Induction of antioxidant enzymes in roots. *Acta physiologiae plantarum* 22, 429–432.
- Garrec, J.-P., Haluwyn, C.D.-V., 2002. *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air: concepts, méthodes et applications*. Tec & Doc.
- George, M.P., 2014. The Role of Hydrogen Peroxide in Controlling Plant Cell-Signaling and Gene-Expression Patterns Related to Stress and Defense Responses. *Inquiries Journal* 6.

- Gerhardt, A., 2002. Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Environmental monitoring* 1, 77–123.
- Ghorab, M.A., 2018. Environmental Pollution by Heavy Metals in the Aquatic Ecosystems of Egypt. *Open Access Journal of Toxicology* 3. <https://doi.org/10.19080/OAJT.2018.03.555603>
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N., 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70, 204–212.
- Göthberg, A., Greger, M., Holm, K., Bengtsson, B.-E., 2004. Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium, and lead in water spinach. *Journal of environmental quality* 33, 1247–1255.
- Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C., 2000a. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 629–638.
- Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C., 2000b. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 629–638.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32, 481–494.
- Grill E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674–676.
- Grillet, L., Mari, S., Schmidt, W., 2014. Iron in seeds—loading pathways and subcellular localization. *Frontiers in plant science* 4, 535.
- Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C., Pomblum, V.J., Rocha, J.B.T., Farina, M., 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova* 32, 169–174.
- 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.
- Gupta, D.K., Vandenhove, H., Inouhe, M., 2013. Role of phytochelatins in heavy metal stress and detoxification mechanisms in plants, in: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, pp. 73–94.
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 106, 262–267.
- Hadad, H., Maine, M., Mufarrege, M., Del Sastre, M., Di Luca, G., 2011. Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *Journal of hazardous materials* 190, 1016–1022.
- Hall, J., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany* 53, 1–11.
- Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P., 2001. PAST-Palaeontological statistics.
- Harguinteguy, C.A., Cirelli, A.F., Pignata, M.L., 2014. Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquía river (Argentina). *Microchemical Journal* 114, 111–118.
- Harguinteguy, C.A., Cofré, M.N., Fernández-Cirelli, A., Pignata, M.L., 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.
- 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.
- 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.
- Hart, J.J., Welch, R.M., Norvell, W.A., Kochian, L.V., 2002. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* 116, 73–78.
- Hatano, A., Shoji, R., 2010. A new model for predicting time course toxicity of heavy metals based on Biotic Ligand Model (BLM). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151, 25–32.
- Haury, J., Peltre, M.-C., Trémolières, M., Barbe, J., Thiébaud, G., Bernez, I., Daniel, H., Chatenet, P., Haan-Archipof, G., Muller, S., 2006. A new method to assess water trophy and organic pollution—the Macrophyte Biological Index for Rivers (IBMR): its application to different types of river and pollution, in: *Macrophytes in Aquatic Ecosystems: From Biology to Management*. Springer, pp. 153–158.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1456–1466.
- Herawati, N., Suzuki, S., Hayashi, K., Rivai, I., Koyama, H., 2000. Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 64, 33–39.
- Hernandez, L., Carpena-Ruiz, R., Garate, A., 1996. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition* 19, 1581–1598.
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L., Wagner, G.J., 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant physiology* 124, 125–134.
- Honjoh, K., Mimura, A., Kuroiwa, E., Hagsako, T., Suga, K., Shimizu, H., Dubey, R.S., Miyamoto, T., Hatano, S., Iio, M., 2003. Purification and characterization of two isoforms of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) from *Chlorella vulgaris* C-27. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67, 1888–1896.
- Hopkins, W.G., Rambour, S., Evrard, C.M., 2003. *Physiologie végétale, Biologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C.C., 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant physiology and biochemistry* 45, 62–69.
- Huguet, S., Bert, V., Laboudigue, A., Barthès, V., Isaure, M.-P., Llorens, I., Schat, H., Sarret, G., 2012. Cd speciation and localization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Environmental and Experimental Botany* 82, 54–65.
- Humphrey, T.V., Bonetta, D.T., Goring, D.R., 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytologist* 176, 7–21.
- Hunting, E.R., Jong, S. de, Vijver, M.G., 2017. Assessment of monitoring tools and strategies safeguarding aquatic ecosystems within the European water framework directive. CML reports.

- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., Cobbett, C.S., 2004. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *The plant cell* 16, 1327–1339.
- Hussain, M.B., Ali, S., Azam, A., Hina, S., Farooq, M.A., Ali, B., Bharwana, S.A., Gill, M.B., 2013. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to nickel stress: a review. *African Journal of Agricultural Research* 8, 1596–1602.
- Iliopoulou-Georgudaki, J., Kantzaris, V., Katharios, P., Kaspiris, P., Georgiadis, T., Montesantou, B., 2003. An application of different bioindicators for assessing water quality: a case study in the rivers Alfeios and Pineios (Peloponnisos, Greece). *Ecological indicators* 2, 345–360.
- Jalmi, S.K., Bhagat, P.K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sharma, D., Sinha, A.K., 2018. Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>
- Jamnická, G., Hrivnák, R., Ořahel'ová, H., Skoršepa, M., Valachovič, M., n.d. Heavy metals content in aquatic plant species from some aquatic biotopes in Slovakia. *Citeseer*.
- Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., Haq, Q.M.R., 2015. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International journal of molecular sciences* 16, 29592–29630.
- Jeong, J., Guerinot, M.L., 2009. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in plant science* 14, 280–285.
- Jez, J.M., Cahoon, R.E., Chen, S., 2004. Arabidopsis thaliana Glutamate-Cysteine Ligase Functional properties, Kinetic mechanism, and regulation of activity. *J. Biol. Chem.* 279, 33463–33470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405127200>
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2012. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by Brassica juncea L. *International Journal of Plant Production* 3, 65–76.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in Lemna polyrrhiza L. *Plant Soil and Environment* 54, 262.
- Jonak, C., Nakagami, H., Hirt, H., 2004. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant physiology* 136, 3276–3283.
- Kaiser, J., 2001. *Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment*. Science Publishers.
- Kanoun-Boulé, M., Vicente, J.A., Nabais, C., Prasad, M., Freitas, H., 2009. Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. *Aquatic Toxicology* 91, 1–9.
- Karmous, I., Trevisan, R., El Ferjani, E., Chaoui, A., Sheehan, D., 2017. Redox biology response in germinating Phaseolus vulgaris seeds exposed to copper: Evidence for differential redox buffering in seedlings and cotyledon. *PLoS one* 12, e0184396.
- Kartel, M.T., Kupchik, L.A., Veisov, B.K., 1999. Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions. *Chemosphere* 38, 2591–2596.
- Kastori, R., Petrović, M., Petrović, N., 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* 15, 2427–2439.
- Kastratović, V., Jaćimović, Ž., Đurović, D., Bigović, M., Krivokapić, S., 2015. Lemna minor L.: As bioindicator of heavy metal pollution in Skadar lake: Montenegro. *Kragujevac Journal of Science* 123–134.

- Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T., Maeshima, M., 2008. Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *Journal of Biological Chemistry* 283, 8374–8383.
- Khatamipour, M., Piri, E., Esmailian, Y., Tavassoli, A., 2011. Toxic effect of cadmium on germination, seedling growth and proline content of Milk thistle (*Silybum marianum*). *Ann Biol Res* 2, 527–532.
- Kim, D., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y., 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *The Plant Journal* 50, 207–218.
- Kim, S., Lim, H., Lee, I., 2010. Enhanced heavy metal phytoextraction by *Echinochloa crus-galli* using root exudates. *Journal of bioscience and bioengineering* 109, 47–50.
- Klumpp, D., Huasheng, H., Humphrey, C., Xinhong, W., Codi, S., 2002. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China.: I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Marine pollution bulletin* 44, 752–760.
- Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Erlikh, N.T., Shevyreva, T.A., Andreev, I.M., Verweij, R., Schat, H., 2014. Histidine-mediated xylem loading of zinc is a species-wide character in *Noccaea caerulea*. *New Phytologist* 203, 508–519.
- Krämer, U., Talke, I.N., Hanikenne, M., 2007. Transition metal transport. *FEBS letters* 581, 2263–2272.
- Krayem, M., 2015. Etude des effets de l'arsenic et du cuivre sur un macrophyte aquatique, *Myriophyllum alterniflorum* D.C.: évaluation des biomarqueurs pour la détection précoce de pollution - Recherche Google.
- Krayem, M., Baydoun, M., Deluchat, V., Lenain, J.-F., Kazpard, V., Labrousse, P., 2016. Absorption and translocation of copper and arsenic in an aquatic macrophyte *Myriophyllum alterniflorum* DC. in oligotrophic and eutrophic conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 11129–11136.
- Krayem, M., Deluchat, V., Hourdin, P., Fondanèche, P., Des Etangs, F.L., Kazpard, V., Moesch, C., Labrousse, P., 2018. Combined effect of copper and hydrodynamic conditions on *Myriophyllum alterniflorum* biomarkers. *Chemosphere* 199, 427–434.
- Krayem, M., Deluchat, V., Rabiet, M., Cleries, K., Lenain, J., 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.
- Krems, P., Rajfur, M., Waclawek, M., Kłos, A., 2013. The use of water plants in biomonitoring and phytoremediation of waters polluted with heavy metals. *Ecological Chemistry and Engineering S* 20, 353–370.
- Krupnova, T.G., Mashkova, I.V., Kostryukova, A.M., Egorov, N.O., Gavrilkina, S.V., 2018. Bioconcentration of heavy metals in aquatic macrophytes of South Urals region lakes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 19, 296–302.
- Krzyszowska, M., 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 35–51.
- Krzyszowska, M., Lenartowska, M., Mellerowicz, E.J., Samardakiewicz, S., Woźny, A., 2009. Pectinous cell wall thickenings formation—a response of moss protonemata cells to lead. *Environmental and Experimental Botany* 65, 119–131.
- Krzyszowska, M., Lenartowska, M., Samardakiewicz, S., Bilski, H., Woźny, A., 2010. Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable—a remobilization can occur. *Environmental pollution* 158, 325–338.

- Kuo, M.C., Kao, C.H., 2004. Antioxidant enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant, rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Bot Bull Acad Sin* 45, 291–299.
- Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47, 259–266.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212, 75–84.
- Ladislav, S., El-Mufleh, A., Gérente, C., Chazarenc, F., Andrès, Y., Béchet, B., 2012. Potential of aquatic macrophytes as bioindicators of heavy metal pollution in urban stormwater runoff. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 877–888.
- Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent-Martini, C., Gonzalez, J.-L., 2007. Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species – Validation of the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere* 68, 2033–2039. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.039>
- Lagadic, L., 1997. *Biomarqueurs en écotoxicologie*.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J., 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and soil* 200, 241–250.
- Lamoreaux, R.J., Chaney, W.R., 1978. The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiologia Plantarum* 43, 231–236.
- Landres, P.B., Verner, J., Thomas, J.W., 1988. Ecological uses of vertebrate indicator species: a critique. *Conservation biology* 2, 316–328.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszka, A., Krämer, U., Thomine, S., 2010. Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant physiology* 152, 1986–1999.
- Lauret, M., Oheix, J., Derolez, V., Laugier, T., 2011. *Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes des lagunes du Languedoc-Roussillon*.
- Lavoie, M., 2010. L'utilisation du charançon pour le contrôle biologique du myriophylle à épis.
- Lavoie, M., Campbell, P., Fortin, C., 2016. Importance de mieux connaître les mécanismes de transport des métaux pour la prédiction de l'accumulation et de la toxicité des métaux dissous chez le phytoplancton: récentes avancées et défis pour le développement du modèle du ligand biotique. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science* 29, 119–147.
- Law, M.Y., Halliwell, B., 1986. Purification and properties of glutathione synthetase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant science* 43, 185–191.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.-S., Petros, D., Goldsbrough, P.B., Korban, S.S., 2003. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant physiology* 131, 656–663.
- Lee, W.-Y., Wang, W.-X., 2001. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonium and phosphate. *Science of the total environment* 278, 11–22.
- Leitenmaier, B., Küpper, H., 2013. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in plant science* 4, 374.

- León, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 813–820. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01444-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01444-4)
- Les elements chimiques- Propriétés - Abondances [WWW Document], n.d. URL <http://www.elementschimiques.fr/?fr/proprietes/abondances> (accessed 5.4.18).
- Lesage, E., Mundia, C., Rousseau, D., Van de Moortel, A., Du Laing, G., Meers, E., Tack, F., De Pauw, N., Verloo, M., 2007. Sorption of Co, Cu, Ni and Zn from industrial effluents by the submerged aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. *Ecological Engineering* 30, 320–325.
- Lévêque, C., Mounolou, J.C., 2008. Biodiversité - 2e éd.: Dynamique biologique et conservation, Sciences de la vie. Dunod.
- Lewis, M.A., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution* 87, 319–336.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
- Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D., 2013. Green Materials for Energy, Products and Depollution. Springer Netherlands.
- Liger, L., Carluer, N., Coquery, M., Gouy, V., Guillemain, C., Margoum, C., 2012. Analyse comparée de différentes méthodes d'échantillonnage actif pour le suivi de la contamination en produits phytosanitaires dans les eaux de surface, in: 42e Congrès Du Groupe Français Des Pesticides. Poitiers, France, p. 7 p.
- Limoges-Bellegarde (Haute-Vienne - France) | Relevés météo en temps réel - Infoclimat [WWW Document], n.d. URL <https://www.infoclimat.fr/observations-meteo/temps-reel/limoges-bellegarde/07434.html>.
- Liu, C.-W., Chen, Y.-Y., Kao, Y.-H., Maji, S.-K., 2014. Bioaccumulation and translocation of arsenic in the ecosystem of the Guandu Wetland, Taiwan. *Wetlands* 34, 129–140.
- Llamas, A., Ullrich, C.I., Sanz, A., 2008. Ni²⁺ toxicity in rice: Effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 905–910.
- Lobpreis, T., Vrana, B., Dominiak, E., Dercová, K., Mills, G.A., Greenwood, R., 2008. Effect of housing geometry on the performance of Chemcatcher™ passive sampler for the monitoring of hydrophobic organic pollutants in water. *Environmental pollution* 153, 706–710.
- Loi n° 64-1245 du 16 décembre 1964 relative au régime et à la répartition des eaux et à la lutte contre leur pollution | Legifrance [WWW Document], n.d. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000006068236> (accessed 7.14.18).
- Loi n° 92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau, 1992. , 92-3.
- Luo, Q., Sun, L., Hu, X., Zhou, R., 2014. The variation of root exudates from the hyperaccumulator *Sedum alfredii* under cadmium stress: metabonomics analysis. *PloS one* 9, e115581.
- Lynch, D.V., Steponkus, P.L., 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology* 83, 761–767.
- Maleva, M.G., Nekrasova, G.F., Malec, P., Prasad, M., Strzałka, K., 2009. Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere* 77, 392–398.

- Manjula Ramen, T., 2015. Depletion of Glutathione during Oxidative Stress and Efficacy of N-Acetyl Cysteine: An Old Drug with New Ap-proaches. *Med chem* 5, 037–039.
- Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., 2003. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment, in: *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment*. Elsevier, pp. 3–39.
- Marques, C.C.A., 2009. Small mammals as bioindicators in the assessment of toxicological effects resulting from the exposure to heavy metals.
- Mathys, W., 1975. Enzymes of Heavy-Metal-Resistant and Non-Resistant Populations of *Silene cucubalus* and Their Interaction with Some Heavy Metals in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum* 33, 161–165.
- Mattioni, C., Gabbrielli, R., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 1997. Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in nitolerant and non-tolerant populations of *Silene italica* Pers. *Journal of plant physiology* 150, 173–177.
- Mattioni, C., Lacerenza, N., Troccoli, A., Leonardis, A. de, Fonzo, N. di, 1997. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiologia Plantarum* 101, 787–792.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 525–532.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., Santoni, V., 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 595–624.
- Mazej, Z., Germ, M., 2009. Trace element accumulation and distribution in four aquatic macrophytes. *Chemosphere* 74, 642–647.
- McGeer, J.C., Brix, K.V., Skeaff, J.M., DeForest, D.K., Brigham, S.I., Adams, W.J., Green, A., 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1017–1037.
- Megateli, S., Semsari, S., Couderchet, M., 2009. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and environmental safety* 72, 1774–1780.
- Meharg, A.A., 2005. Mechanisms of Plant Resistance to Metal and Metalloid Ions and Potential Biotechnological Applications. *Plant and Soil* 274, 163–174. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0262-z>
- Mehes-Smith, M., Nkongolo, K., Cholewa, E., 2013. Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil, in: *Environmental Change and Sustainability*. InTech.
- Mehta, S., Gaur, J., 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *The New Phytologist* 143, 253–259.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52, 711–760.
- Melzer, A., 1999. Aquatic macrophytes as tools for lake management, in: *The Ecological Bases for Lake and Reservoir Management*. Springer, pp. 181–190.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M.M., Richaud, P., Thomine, S., Chalot, M., 2010. Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 3763–3784.
- Mikkelsen, P., Häfliger, M., Ochs, M., Tjell, J., Jacobsen, P., Boller, M., 1996. Experimental assessment of soil and groundwater contamination from two old infiltration systems for road run-off in Switzerland. *Science of the total environment* 189, 341–347.

- Mills, R.F., Francini, A., Ferreira da Rocha, P.S., Baccarini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C., Williams, L.E., 2005. The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *Febs Letters* 579, 783–791.
- Milner, M.J., Seamon, J., Craft, E., Kochian, L.V., 2013. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 64, 369–381.
- Miretzky, P., Saralegui, A., Cirelli, A.F., 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57, 997–1005.
- Mishra, V.K., Tripathi, B., 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource technology* 99, 7091–7097.
- Mishra, V.K., Tripathi, B., Kim, K.-H., 2009. Removal and accumulation of mercury by aquatic macrophytes from an open cast coal mine effluent. *Journal of Hazardous Materials* 172, 749–754.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7, 405–410.
- Mkandawire, M., Dudel, E.G., 2005. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L.(duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the Total Environment* 336, 81–89.
- Mohanty, P., Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino acids* 21, 195–200.
- Morin, S., 2006. Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. *Approches in situ et expérimentales*.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473–497.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27, 31–36.
- Nagajyoti, P., Lee, K., Sreekanth, T., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters* 8, 199–216.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M., 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* 160, 291–299.
- Namieśnik, J., Rabajczyk, A., 2010. The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments. *Chemical Speciation & Bioavailability* 22, 1–24. <https://doi.org/10.3184/095422910X12632119406391>
- Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Van Vleet, E., Salizzato, M., Sperti, L., Pavoni, B., 1999. Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 255–260.
- 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.
- 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.

- Niad, M., Rasoolzadeh, L., Zarei, F., 2014. Biosorption of copper (II) on *Sargassum angostifolium* C. Agardh phaeophyceae biomass. *Chemical Speciation & Bioavailability* 26, 176–183.
- Nichols, P.B., Couch, J.D., Al-Hamdani, S.H., 2000. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic Botany* 68, 313–319.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M., 1996. Physiology of plants under stress. Abiotic factors. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*.
- 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 Suquia River basin (Córdoba, Argentina). *Chemosphere* 61, 147–157.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J., Mizuno, T., 2011. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 52, 1433–1442.
- Niyogi, S., Wood, C.M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science & Technology* 38, 6177–6192.
- Nystrand, M.I., Österholm, P., Nyberg, M.E., Gustafsson, J.P., 2012. Metal speciation in rivers affected by enhanced soil erosion and acidity. *Applied geochemistry* 27, 906–916.
- Oomen, R.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G., Thomine, S., 2009. Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 181, 637–650.
- Opdenakker, K., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Mitogen-activated protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences* 13, 7828–7853.
- Orcutt, D.M., 2000. *The physiology of plants under stress: soil and biotic factors*. John Wiley & Sons.
- Ovečka, M., Takáč, T., 2014. Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnology advances* 32, 73–86.
- Padmaja, K., Prasad, D., Prasad, A., 1990. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* 24, 399–405.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environmental Science & Technology* 17, 342–347.
- Pal, R., Rai, J., 2010. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied biochemistry and biotechnology* 160, 945–963.
- Panda, S., 2008. Impact of copper on reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidants in *Lemna minor*. *Biologia Plantarum* 52, 561.
- Panda, S., Chaudhury, I., Khan, M., 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 46, 289–294.
- Panda, S.K., Choudhury, S., 2005. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 191–197.
- Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R., 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* 61, 40–47.

- Pant, P.P., Tripathi, A., Dwivedi, V., 2011. Effect of heavy metals on some biochemical parameters of sal (*Shorea robusta*) seedling at nursery level, Doon Valley, India. *Journal of Agricultural Sciences* 2, 45–51.
- Park, J., Song, W., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T.H., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E., Lee, Y., 2012. The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal* 69, 278–288.
- Parrotta, L., Guerriero, G., Sergeant, K., Cai, G., Hausman, J.-F., 2015. Target or barrier? The cell wall of early-and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers in plant science* 6, 133.
- Parveen, M., Asaeda, T., Rashid, M.H., 2017. Biochemical adaptations of four submerged macrophytes under combined exposure to hypoxia and hydrogen sulphide. *PloS one* 12, e0182691.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in plant science* 12, 267–277.
- Peng, K., Luo, C., Lou, L., Li, X., Shen, Z., 2008. Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Science of the total environment* 392, 22–29.
- Pentose Phosphate Pathway [WWW Document], n.d. URL <http://themedicalbiochemistrypage.org/pentose-phosphate-pathway.php> (accessed 6.12.18).
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32, 539–548.
- Peuke, A.D., Rennenberg, H., 2005. Phytoremediation: molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. *EMBO reports* 6, 497–501.
- Pitzschke, A., Hirt, H., 2006. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant physiology* 141, 351–356.
- Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73, 149–156.
- Poschenrieder, C., Barceló, J., 1999. Water relations in heavy metal stressed plants, in: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, pp. 207–229.
- Prasad, M., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M., Strzałka, K., 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L.(duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science* 161, 881–889.
- Radić, S., Pevalek-Kozlina, B., 2010. Effects of osmotic stress on antioxidative system of duckweed (*Lemna minor* L). *Periodicum biologorum* 112, 293–299.
- Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Mikelić, I.L., Rajčić, M.M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M., 2010. Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology* 19, 216.
- 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.

- Rai, P.K., 2008. Phytoremediation of Hg and Cd from industrial effluents using an aquatic free floating macrophyte *Azolla pinnata*. *International journal of phytoremediation* 10, 430–439.
- Rai, U., Sinha, S., Tripathi, R., Chandra, P., 1995. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: removal of heavy metals. *Ecological engineering* 5, 5–12.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S., 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant science* 167, 1159–1169.
- Ramel, F., Birtic, S., Cui n , S., Triantaphylid s, C., Ravanat, J.-L., Havaux, M., 2012. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology* 158, 1267–1278.
- Rau, S., Miersch, J., Neumann, D., Weber, E., Krauss, G.-J., 2007. Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environmental and Experimental Botany* 59, 299–306.
- Reid, M., Tibby, J., Penny, D., Gell, P., 1995. The use of diatoms to assess past and present water quality. *Australian Journal of Ecology* 20, 57–64.
- Reisinger, S., Schiavon, M., Terry, N., Pilon-Smits, E.A., 2008. Heavy metal tolerance and accumulation in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) expressing bacterial γ -glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase. *International Journal of Phytoremediation* 10, 440–454.
- Reuter, H.I., Lado, L.R., Hengl, T., Montanarella, L., 2008. Continental-scale digital soil mapping using European Soil profile data: soil pH 12.
- Revathi, S., Venugopal, S., 2013. Physiological and biochemical mechanisms of heavy metal tolerance. *International Journal of Environmental Sciences* 3, 1339.
- Richau, K.H., Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Vooijs, R., Koevoets, P.L., Smith, J.A.C., Ivanov, V.B., Schat, H., 2009. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 183, 106–116.
- Rodier, J., Bazin, J., Chambon, P., 1996. *L'analyse de l'eau*. Dunod.
- Rodriguez-Hernandez, M., Bonifas, I., Alfaro-De la Torre, M., Flores-Flores, J., Ba uelos-Hern ndez, B., Pati o-Rodr guez, O., 2015. Increased accumulation of cadmium and lead under Ca and Fe deficiency in *Typha latifolia*: A study of two pore channel (TPC1) gene responses. *Environmental and Experimental Botany* 115, 38–48.
- Rooney, N., Kalff, J., 2000. Inter-annual variation in submerged macrophyte community biomass and distribution: the influence of temperature and lake morphometry. *Aquatic Botany* 68, 321–335.
- Ruamrungsri, S., Kuankaew, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Ohyama, T., 2010. 22. Nitrogen assimilation in flower bulbs.
- Ruci niska-Sobkowiak, R., 2010. Oxidative stress in plants exposed to heavy metals. *Postepy biochemii* 56, 191–200.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D.L., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual review of plant biology* 52, 527–560.
- Salomons, W., 1995. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal of Geochemical exploration* 52, 5–23.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant physiology* 109, 1427–1433.

- Samecka-Cymerman, A., Kempers, A., 2004. Toxic metals in aquatic plants surviving in surface water polluted by copper mining industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 64–69.
- Samecka-Cymerman, A., Kempers, A., 2003. Biomonitoring of water pollution with *Elodea canadensis*. A case study of three small Polish rivers with different levels of pollution. *Water, Air, and Soil Pollution* 145, 139–153.
- Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J., Kolon, K., 2000. Concentrations of heavy metals in aquatic bryophytes used for biomonitoring in rhyolite and trachybasalt areas: a case study with *Platyhypnidium rusciforme* from the Sudety Mountains. Presented at the *Annales Botanici Fennici*, JSTOR, pp. 95–104.
- Samecka-Cymerman, A., Kolon, K., Kempers, A., 2005. A comparison of native and transplanted *Fontinalis antipyretica* Hedw. as biomonitors of water polluted with heavy metals. *Science of the Total Environment* 341, 97–107.
- Sammarco, P.W., Hallock, P., Lang, J.C., LeGore, R.S., 2007. Roundtable discussion groups summary papers: environmental bio-indicators in coral reef ecosystems: the need to align research, monitoring, and environmental Regulation.
- Sandalio, L., Dalurzo, H., Gomez, M., Romero-Puertas, M., Del Rio, L., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany* 52, 2115–2126.
- Saradhi, P.P., 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 138, 554–558.
- Satofuka, H., Fukui, T., Takagi, M., Atomi, H., Imanaka, T., 2001. Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *Journal of Inorganic biochemistry* 86, 595–602.
- Scandalios, J.G., 2002. The rise of ROS. *Trends in biochemical sciences* 27, 483–486.
- Schat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101, 477–482.
- Scherman, P., Muller, W., Palmer, C., 2003. Links between ecotoxicology, biomonitoring and water chemistry in the integration of water quality into environmental flow assessments. *River Research and Applications* 19, 483–493.
- Seigneurin-Berny, D., Gravot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., Grunwald, D., Rappaport, F., Vavasseur, A., Joyard, J., 2006. HMA1, a New Cu-ATPase of the Chloroplast Envelope, Is Essential for Growth under Adverse Light Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2882–2892.
- Shah, K., Dubey, R., 1997. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as a possible enzyme protectant. *Biologia Plantarum* 40, 121–130.
- Shahid, M., 2010. Induction de la phytotoxicité du Plomb chez *Vicia faba* L.: rôles de l'absorption et de la spéciation.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J., 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Science of the total environment* 209, 133–142.
- Sharma, S.S., Dietz, K.-J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of experimental botany* 57, 711–726.

- Sharmila, P., Saradhi, P.P., 2002. Proline accumulation in heavy metal stressed plants: an adaptive strategy, in: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer, pp. 179–199.
- Shukla, D., Kesari, R., Tiwari, M., Dwivedi, S., Tripathi, R.D., Nath, P., Trivedi, P.K., 2013. Expression of *Ceratophyllum demersum* phytochelatin synthase, CdPCS1, in *Escherichia coli* and *Arabidopsis* enhances heavy metal (loid) s accumulation. *Protoplasma* 250, 1263–1272.
- Siebert, A., Bruns, I., Krauss, G.-J., Miersch, J., Markert, B., 1996. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals: 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *Science of the total environment* 177, 137–144.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine* 91, S31–S38.
- Singh, K., Pandey, S., 2011. Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. *Journal of environmental biology* 32, 391.
- Singh, K.P., Malik, A., Sinha, S., Singh, V.K., Murthy, R.C., 2005. Estimation of source of heavy metal contamination in sediments of Gomti River (India) using principal component analysis. *Water, Air, and Soil Pollution* 166, 321–341.
- Singh, S., Eapen, S., D'souza, S., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 233–246.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in plant science* 6, 1143.
- Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B., Tuteja, N., 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior* 6, 196–203.
- Sinha, R.K., 2014. *Modern Plant Physiology*. Alpha Science International Limited.
- Sinha, S., Saxena, R., Singh, S., 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 58, 595–604.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell* 14, 2837–2847.
- 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.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060.
- Smith, C., Hopmans, P., Cook, F., 1996. Accumulation of Cr, Pb, Cu, Ni, Zn and Cd in soil following irrigation with treated urban effluent in Australia. *Environmental Pollution* 94, 317–323.
- Song, W., Mendoza-Cózatl, D.G., Lee, Y., Schroeder, J.I., Ahn, S., Lee, H., Wicker, T., Martinoia, E., 2014. Phytochelatin–metal (loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment* 37, 1192–1201.

- Song, W.-Y., Park, J., Mendoza-Cózatl, D.G., Suter-Grotemeyer, M., Shim, D., Hörtensteiner, S., Geisler, M., Weder, B., Rea, P.A., Rentsch, D., 2010. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 21187–21192.
- Souza, L.A., Piotto, F.A., Nogueirol, R.C., Azevedo, R.A., 2013. Use of non-hyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents. *Scientia Agricola* 70, 290–295.
- Srivastava, H., 1974. In vivo activity of nitrate reductase in maize seedlings. *Indian journal of biochemistry*.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Gupta, D.K., 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Aquatic Toxicology* 80, 405–415.
- Steffens, J., Hunt, D., Williams, B., 1986. Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl) n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* 261, 13879–13882.
- Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R.P., 1985. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum* 63, 293–298.
- Stoeva, N., Berova, M., Zlatev, Z., 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum* 49, 293–296.
- Strzalka, K., Kostecka-Gugala, A., Latowski, D., 2003. Carotenoids and Environmental Stress in Plants: Significance of Carotenoid-Mediated Modulation of Membrane Physical Properties 50, 5.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzalka, K., Prasad, M., 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum* 35, 985–999.
- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science* 15, 89–97.
- Szoszkiewicz, K., Karolewicz, K., Lawniczak, A., Dawson, F., 2002. An assessment of the MTR aquatic plant bioindication system for determining the trophic status of Polish rivers. *Polish Journal of Environmental Studies* 11, 421–428.
- Talke, I.N., Hanikenne, M., Krämer, U., 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* 142, 148–167.
- Tarzia, M., De Vivo, B., Somma, R., Ayuso, R., McGill, R., Parrish, R., 2002. Anthropogenic vs. natural pollution: an environmental study of an industrial site under remediation (Naples, Italy). *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis* 2, 45–56.
- Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant science* 153, 65–72.
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H.P., Lobinski, R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and applied chemistry* 72, 1453–1470.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., Bisht, S.S., 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* 162, 381–388.
- Tischner, R., 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment* 23, 1005–1024.

- Tiwari, S., Lata, C., 2018. Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Frontiers in plant science* 9, 452.
- Tomaszewska, B., 2002. Glutathione and thiol metabolism in metal exposed plants, in: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer, pp. 37–58.
- Touchat, L., 1999. La température de l'eau en Limousin. *Norois* 183, 441–451.
- Trémolières, M., Combroux, I., Thiébaud, G., Haury, J., 2008. Réponses des communautés végétales aux conditions environnementales: perturbations ou contraintes. *Plantes aquatiques d'eau douce: biologie, écologie et gestion*. CEMAGREF, Antony 63–77.
- Tu, S., Ma, L., Luongo, T., 2004. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. *Plant and soil* 258, 9–19.
- Tyler, G., 1990. Bryophytes and heavy metals: a literature review. *Botanical journal of the Linnean Society* 104, 231–253.
- Tyler, G., 1995. ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared 11.
- Uemura, M., Joseph, R.A., Steponkus, P.L., 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant physiology* 109, 15–30.
- Vajpayee, P., Tripathi, R., Rai, U., Ali, M., Singh, S., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075–1082.
- Valério, L., De Meyer, M., Penel, C., Dunand, C., 2004. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* 65, 1331–1342.
- Van Assche, F., Cardinaels, C., Clijsters, H., 1988. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: Dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium. *Environmental Pollution* 52, 103–115.
- Van Belleghem, F., Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., d'Haen, J., Valcke, R., 2007. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 173, 495–508.
- Van de Mortel, J.E., Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., van Themaat, E.V.L., Koornneef, M., Aarts, M.G., 2006. Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant physiology* 142, 1127–1147.
- Van der Ent, A., Baker, A.J., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant and Soil* 362, 319–334.
- Vanlerberghe, G.C., 2013. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6805–6847.
- Vardanyan, L.G., Ingole, B.S., 2006. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environment international* 32, 208–218.
- Vázquez, M., Barceló, J., Poschenrieder, C., Madico, J., Hatton, P., Baker, A., Cope, G., 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology* 140, 350–355.

- Venekamp, J., Lampe, J., Koot, J., 1989. Organic acids as sources for drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *Journal of plant physiology* 133, 654–659.
- Verma, S., Dubey, R., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164, 645–655.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavas seur, A., Richaud, P., 2004. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS letters* 576, 306–312.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., 2008. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in plant science* 13, 151–159.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental science & technology* 38, 4705–4712.
- Villares, R., Puente, X., Carballeira, A., 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environmental Pollution* 119, 79–90.
- Wahsha, M., Juhmani, A.-S., Buosi, A., Sfriso, Andrea, Sfriso, Adriano, 2017. Assess the environmental health status of macrophyte ecosystems using an oxidative stress biomarker. Case studies: The Gulf of Aqaba and the Lagoon of Venice. *Energy Procedia* 125, 19–26.
- Walczyńska, A., Sobczyk, Ł., 2017. The underestimated role of temperature–oxygen relationship in large-scale studies on size-to-temperature response. *Ecology and evolution* 7, 7434–7441.
- Wallace, I.S., Choi, W.-G., Roberts, D.M., 2006. The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1758, 1165–1175.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Qian, J., Hou, J., Zhang, W.J., Lu, J., 2009. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Chemosphere* 76, 938–945.
- Wang, W., 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms—overview. *Environment international* 13, 437–457.
- Wei, W., Chai, T., Zhang, Y., Han, L., Xu, J., Guan, Z., 2009. The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport. *Molecular biotechnology* 41, 15–21.
- Whitacre, D.M., 2014. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer International Publishing.
- Williams, L.E., Mills, R.F., 2005. P1B-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in plant science* 10, 491–502.
- Wojas, S., Ruszczyńska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., Antosiewicz, D., 2007. Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1. *Environmental Pollution* 147, 584–592.
- Wong, C.K.E., Cobbett, C.S., 2009. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New phytologist* 181, 71–78.
- Xiong, Z.-T., Liu, C., Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 273–280.

- Yadav, S., 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76, 167–179.
- Yang, X., Xiong, B., Yang, M., 2010. Relationships among Heavy Metals and Organic Matter in Sediment Cores from Lake Nanhu, an Urban Lake in Wuhan, China. *Journal of Freshwater Ecology* 25, 243–249. <https://doi.org/10.1080/02705060.2010.9665074>
- Yang, Z., Chu, C., 2011. Towards understanding plant response to heavy metal stress, in: *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*. InTech.
- Yeh, C.-M., Hsiao, L.-J., Huang, H.-J., 2004. Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant and Cell Physiology* 45, 1306–1312.
- Zantopoulos, N., Antoniou, V., Nikolaidis, E., 1999. Copper, zinc, cadmium, and lead in sheep grazing in North Greece. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 62, 691–699.
- Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N., 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of environmental quality* 27, 715–721.
- Zengin, F.K., Munzuroglu, O., 2006. Toxic effects of cadmium (Cd⁺⁺) on metabolism of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 56, 224–229.
- Zhang, F.-Q., Wang, Y.-S., Lou, Z.-P., Dong, J.-D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67, 44–50.
- Zhao, F., Hamon, R., McLaughlin, M.J., 2001. Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytologist* 151, 613–620.
- Zhao, F., Jiang, R., Dunham, S., McGrath, S., 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* 172, 646–654.
- Zhao, F.-J., McGrath, S.P., Meharg, A.A., 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual review of plant biology* 61, 535–559.
- 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.

Annexes

Annexe 1. Evaluation de la qualité des eaux.....	200
Annexe 2. Composition du milieu Murashige and Skoog (MS).....	203
Annexe 3. Conditions environnementales et analyses des eaux.....	204
Annexe 4. Mécanismes d'absorption et de bioaccumulation	213
Annexe 5. Influence de la durée d'exposition sur l'accumulation.....	217
Annexe 6. Les biomarqueurs	218

Annexe 1. Evaluation de la qualité des eaux

Tableau 20. Gamme de concentrations de contaminants métalliques (mg/kg) dans les roches ignées et sédimentaires (Cannon *et al.*, 1978)

Contaminants métalliques	Basalte ignée	Granite ignée	Shales et argiles	Schistes noirs	Grès
As	0,2–10	0,2–13,8	–	–	0,6–9,7
Cd	0,006–0,6	0,003–0,18	0,0–11	<0,3–8,4	–
Cr	40–600	2–90	30–590	26–1000	–
Pb	2–18	6–30	16–50	7–150	<1–31
Ni	45–410	2–20	20–250	10–500	–
Co	24–90	1–15	5–25	7–100	–
Cu	30–160	4–30	18–120	20–200	–
Zn	48–240	5–140	18–180	34–1500	2–41

Tableau 21. Présence de contaminants métalliques dans les effluents de diverses industries (Nagajyoti *et al.*, 2010).

Activités industrielles	As	Cd	Cr	Pb	Ni	Co	Cu	Zn	Mn
Activités minières	x	x		x					x
Métallurgie et galvanoplastie	x	x	x	x	x		x	x	
Industries chimiques	x	x	x	x			x	x	
Colorants et pigments	x	x		x			x		
Fabrication d'encre					x	x	x		
Poterie et porcelaine	x		x						
Alliages		x							
Impression			x	x				x	
La photographie		x	x						x
Verre	x				x	x			
Papeteries			x				x		
Médicaments							x		
Textiles	x	x			x		x		
Les engrais		x	x		x		x	x	
Raffinement pétrolier		x	x	x	x			x	

Tableau 22. Normes et concentrations des contaminants métalliques dans l'eau et dans la plante.

	Contaminants non essentiels-toxiques				Contaminants essentiels- oligoéléments				
	As	Cd	Cr	Pb	Ni	Co	Cu	Zn	Mn
Abondance terrestre ⁽¹⁾ µg/g MS ; (%)	1,8 (0,55%)	0,15 (3x10 ⁻⁵ %)	102 (0,019%)	14 (0,0018%)	84 (0,015%)	25 (0,0037%)	60 (0,01%)	70 (0,012%)	950 (0,085%)
EC 50 mg/L (IRSN, 2004)	N.D	0,01	N.D	0,5	N.D	N.D	N.D	0,14	1,5
EC 10 mg/L (IRSN, 2004)	0,01	0,00085	N.D	0,01	0,01	0,33	0,01	0,02	N.D
NQE µg/L (INERIS, 2015)	4,2	0,08	3,4	1,2	4	0,3	1,4	3,1	50
[contaminants] Typique dans la plante µg/g MS van der Ent et <i>al.</i> , 2013	0,1	0,05	1,5	1	1,5	0,2	10	50	200

(1). ("LES ELEMENTS CHIMIQUES - Propriétés - Abondances,")

Tableau 23. Normes d'état de la qualité des eaux (Arrêté du 27 juillet 2015).

Paramètres par élément de qualité	Limites des classes d'état			
	Très bon / Bon	Bon / Moyen	Moyen / Médiocre	Médiocre / Mauvais
Bilan de l'oxygène				
Oxygène dissous (mg O ₂ /l)	8	6	4	3
Taux de saturation en O ₂ dissous (%)	90	70	50	30
DBO ₅ (mg O ₂ /l)	3	6	10	25
Carbone organique dissous (mg C/l)	5	7	10	15
Température				
Eaux salmonicoles	20	21,5	25	28
Eaux cyprinicoles	24	25,5	27	28
Nutriments				
PO ₄ ³⁻ (mg PO ₄ ³⁻ /l)	0,1	0,5	1	2
Phosphore total (mg P/l)	0,05	0,2	0,5	1
NH ₄ ⁺ (mg NH ₄ ⁺ /l)	0,1	0,5	2	5
NO ₂ ⁻ (mg NO ₂ ⁻ /l)	0,1	0,3	0,5	1
NO ₃ ⁻ (mg NO ₃ ⁻ /l)	10	50	*	*
Acidification¹				
pH minimum	6,5	6	5,5	4,5
pH maximum	8,2	9	9,5	10
Salinité				
Conductivité	*	*	*	*
Chlorures	*	*	*	*
Sulfates	*	*	*	*
¹ acidification : en d'autres termes, à titre d'exemple, pour la classe bon état, le pH min est compris entre 6,0 et 6,5 ; le pH max entre 9,0 et 8,2.				
* : les connaissances actuelles ne permettent pas de fixer des seuils fiables pour cette limite.				

Annexe 2. Composition du milieu Murashige and Skoog (MS)

Tableau 24. Concentrations des macro-, oligo-éléments, des vitamines et du sucre utilisés pour concevoir le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)

Réactifs	Solution finale en g/L
<i>Macroéléments</i>	Solution finale en g/L
<i>MgSO₄, 7H₂O,</i>	0,3
<i>KH₂PO₄</i>	0,17
<i>KNO₃</i>	1,9
<i>CaCl₂, 2H₂O</i>	0,44
<i>NH₄NO₃</i>	1,65
<i>Fe-EDTA</i>	0,02785
<i>Microéléments</i>	
<i>H₃BO₃</i>	0,0062
<i>Na₂MoO₄</i>	0,00025
<i>CuSO₄, 5H₂O</i>	0,000025
<i>MnSO₄, 4H₂O</i>	0,223
<i>ZnSO₄, 7H₂O</i>	0,01058
<i>KI</i>	0,00083
<i>CoCl₂, 6H₂O</i>	0.000025
<i>Vitamines</i>	
<i>Glycine</i>	2 mg/L
<i>Myo-inositol</i>	100 mg/L
<i>Acide nicotinique</i>	0,5 mg/L
<i>Pyridoxine-HCl</i>	0,5 mg/L
<i>Thiamine-HCl</i>	
<i>Saccharose</i>	30 g/L

Annexe 3. Conditions environnementales et analyses des eaux

Dans le cadre de notre étude, les données de pluviométrie ont été tirées de la base de données de la station météo de Limoges (info climat/station de Limoges-Bellegarde) (figure 55).

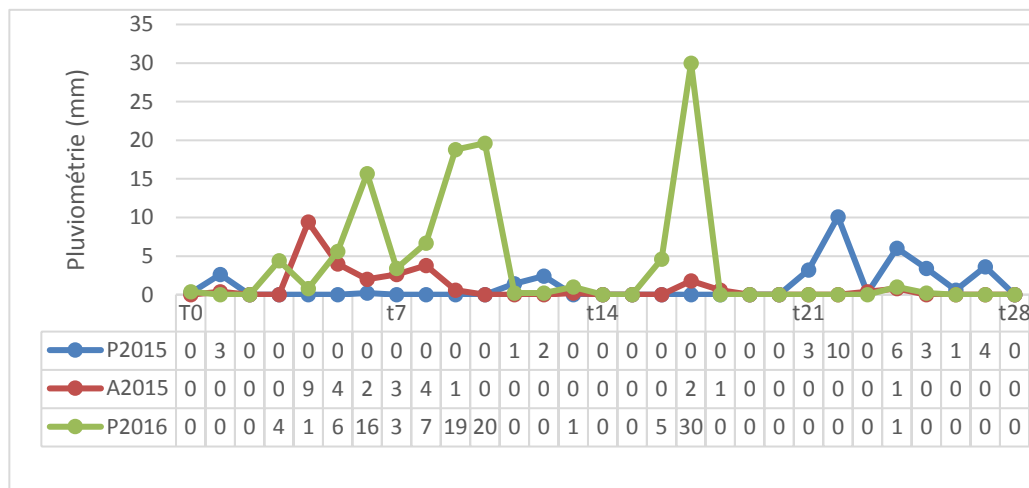


Figure 55. Variations de la pluviométrie dans les cinq sites d'étude en printemps 2015 (p2015), automne 2015 (A2015), printemps 2016 (P2016) pendant 28 jours. L'axe des (Y) représente les valeurs de la pluviométrie en mm, L'axe des (X) représente le temps en jours des cinq sites (référence : infoclimat/ station de Limoges-Bellegrade).

La figure 56 représente la variation de la vitesse de courant dans les cinq sites d'étude durant les cinq durées d'exposition des trois campagnes, à l'échelle spatiale et temporelle.

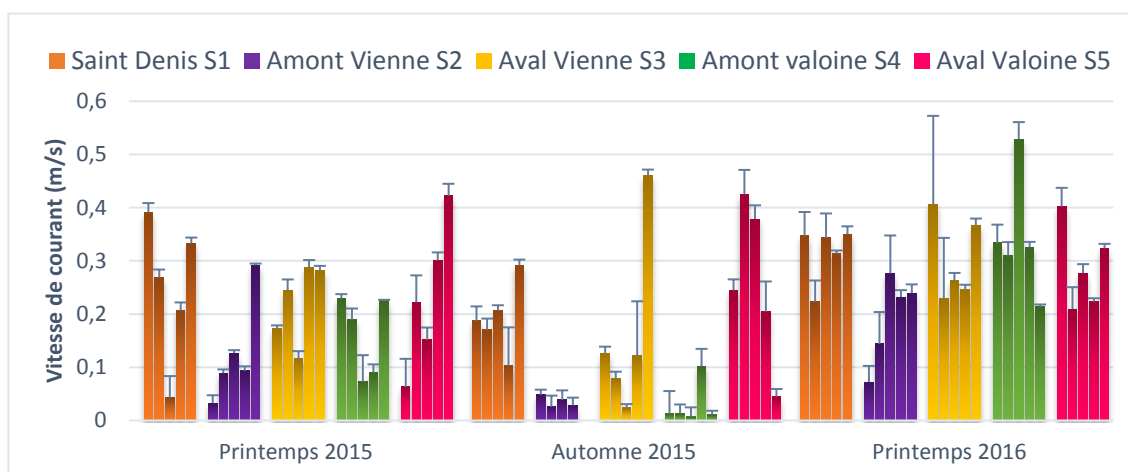


Figure 56. Variations temporelles de la vitesse de courant dans l'eau en m/s (n=trois/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

Le graphique 57 présente la teneur en oxygène dissous dans les cinq sites d'étude durant les cinq durées d'exposition des trois campagnes, à l'échelle spatiale et temporelle.

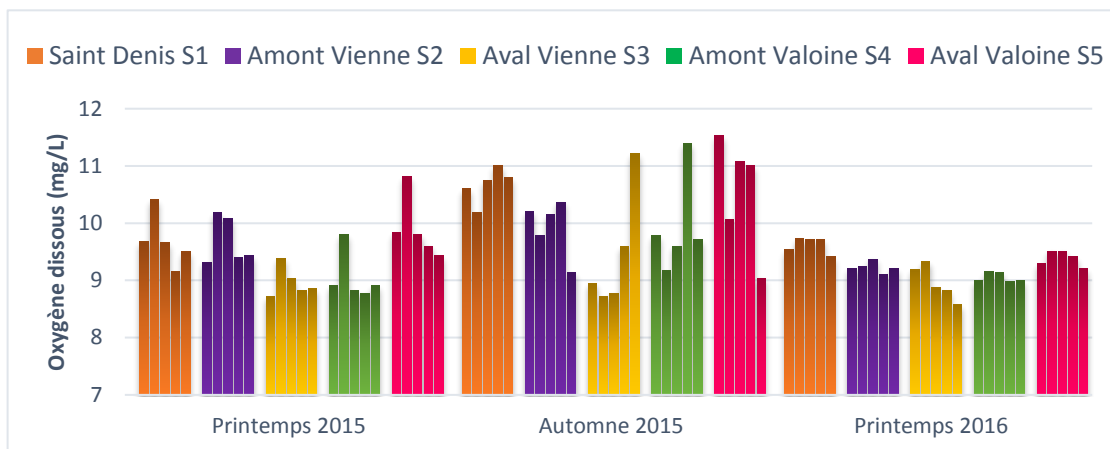


Figure 57. Variations temporelles de l'oxygène dissous en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

Le graphique 58 présente les valeurs du pH dans les cinq sites d'étude durant les cinq durées d'exposition des trois campagnes, à l'échelle spatiale et temporelle.

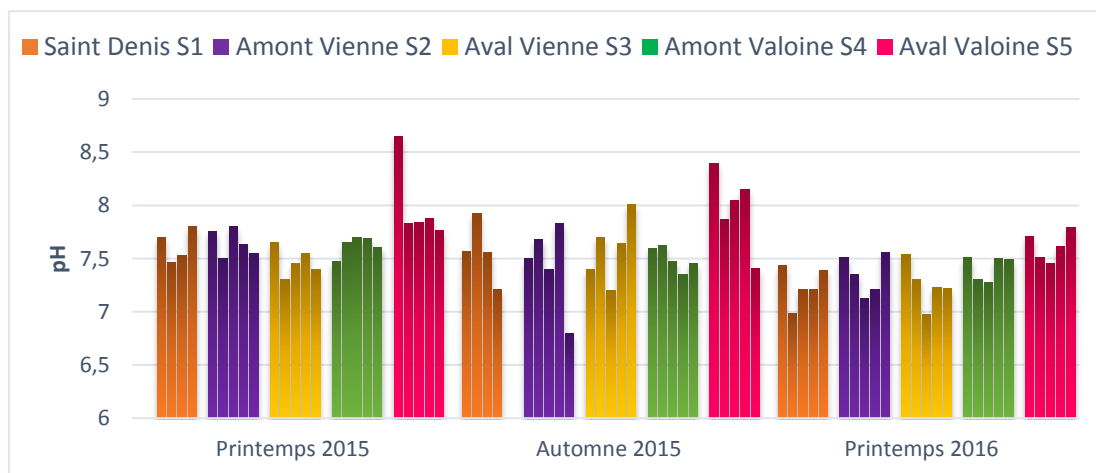


Figure 58. Variations temporelles du pH (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

Le graphique 59 représente la variation de la conductivité dans les cinq sites d'étude durant les cinq durées d'exposition des trois campagnes, à l'échelle spatiale et temporelle.

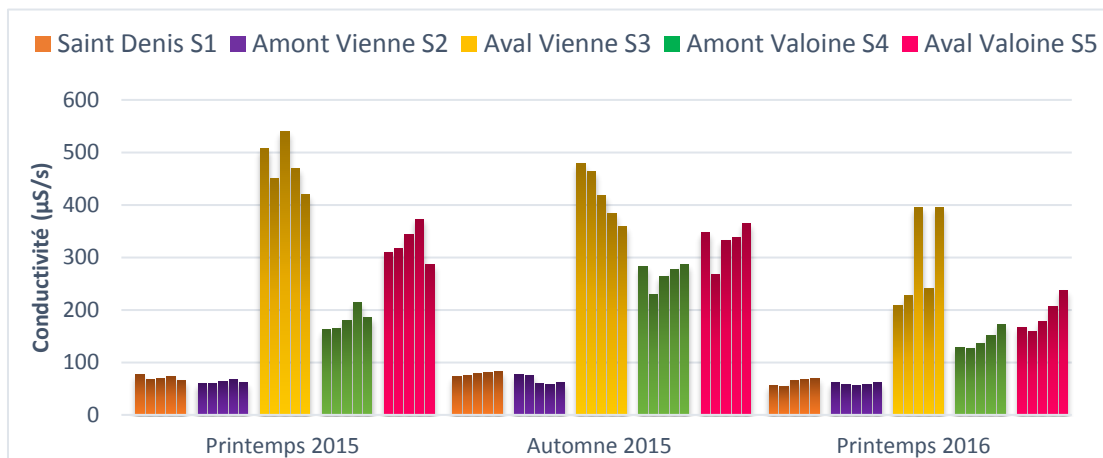


Figure 59. Variations temporelles de la conductivité en $\mu\text{S/s}$ ($n=\text{un}/\text{durée d'exposition}$) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

La figure 60 représente la variation de la teneur en COD dans les cinq sites d'étude durant les trois campagnes, à l'échelle spatiale et temporelle.

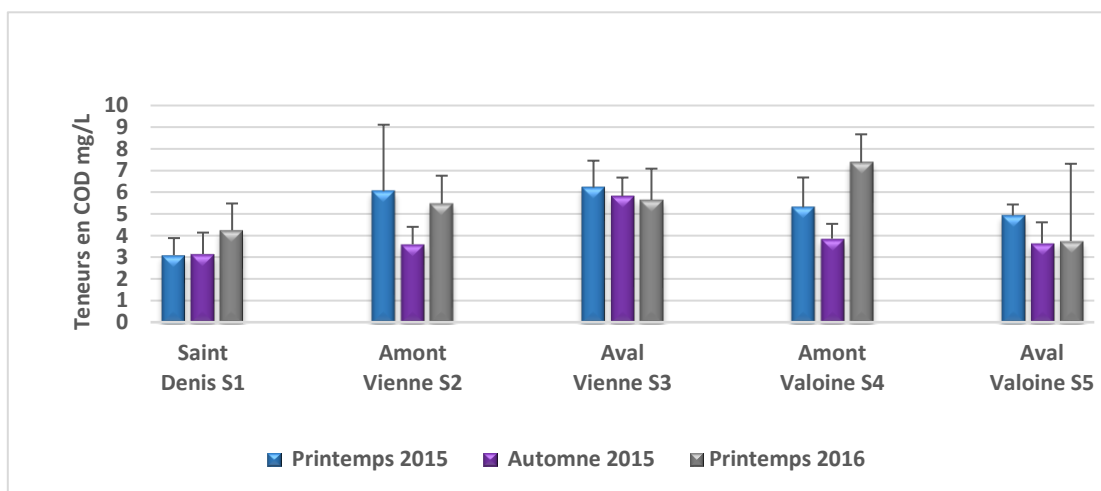


Figure 60. Teneurs moyennes ($n= \text{cinq}$) en COD (mg/L) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

La figure 61 présente les concentrations en chlorures dans les cinq sites et pendant les trois périodes d'étude.

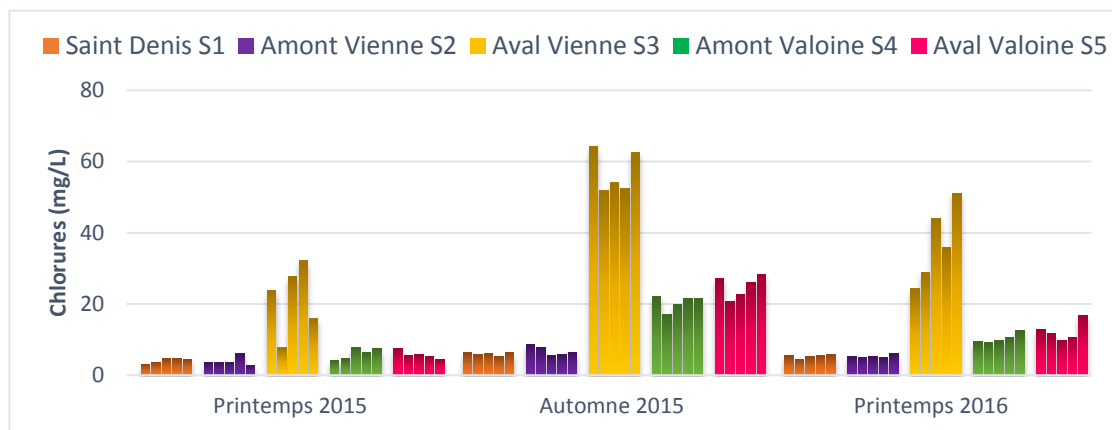


Figure 61. Variations temporelles des teneurs en chlorures en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

La figure 62 présente les concentrations en sulfates dans les cinq sites et pendant les trois périodes d'étude.

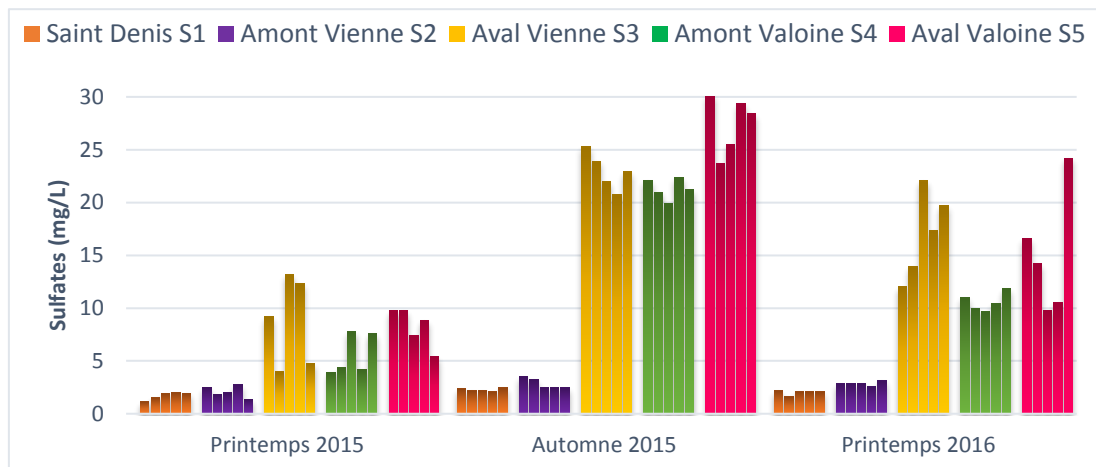


Figure 62. Variations temporelles des teneurs en sulfates en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

La figure 63 présente les concentrations en calcium dans les cinq sites et pendant les trois périodes d'étude.

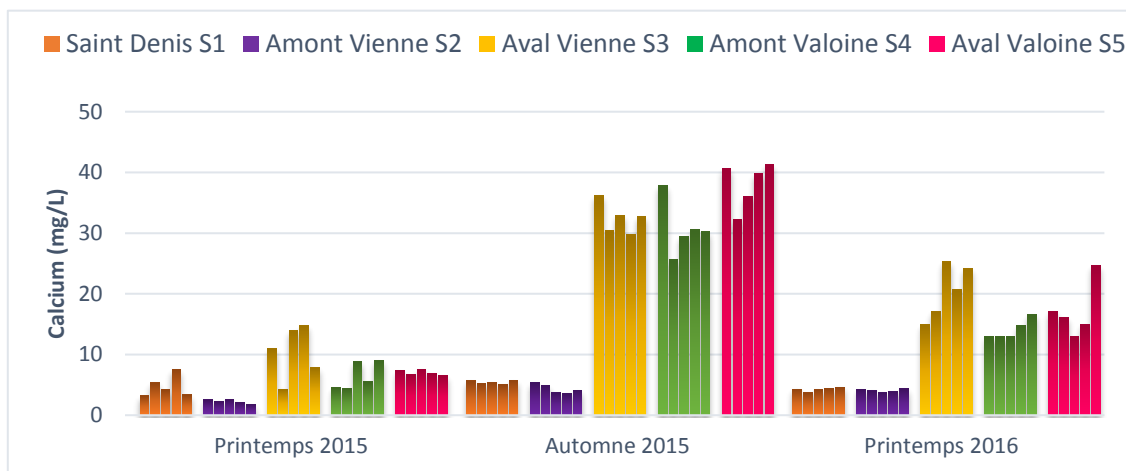


Figure 63. Variations temporelles des teneurs en calcium en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

La figure 64 présente les concentrations en phosphates dans les cinq sites et pendant les trois périodes d'étude.

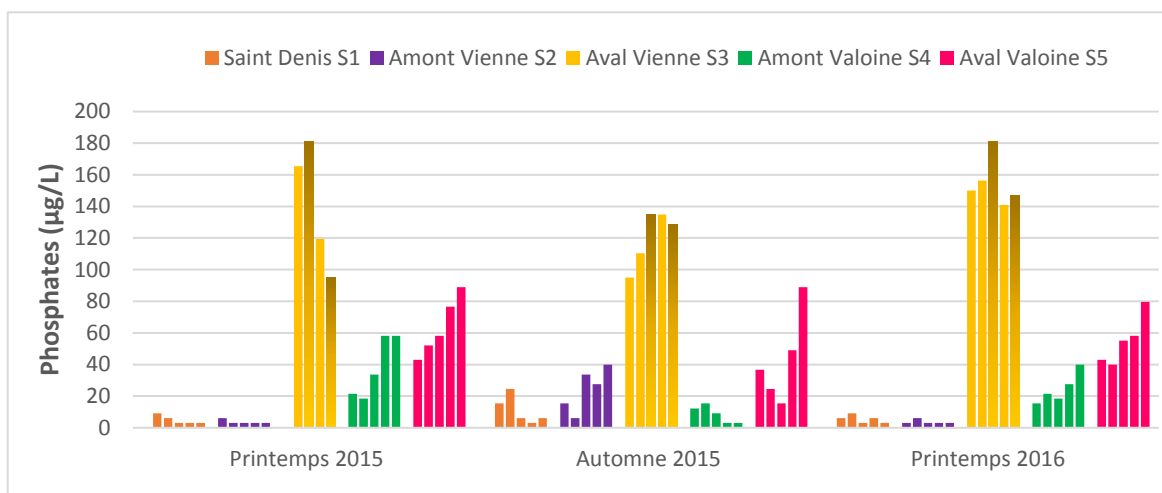


Figure 64. Variations temporelles des teneurs en phosphates en µg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

La figure 65 présente les concentrations en nitrates dans les cinq sites et pendant les trois périodes d'étude.

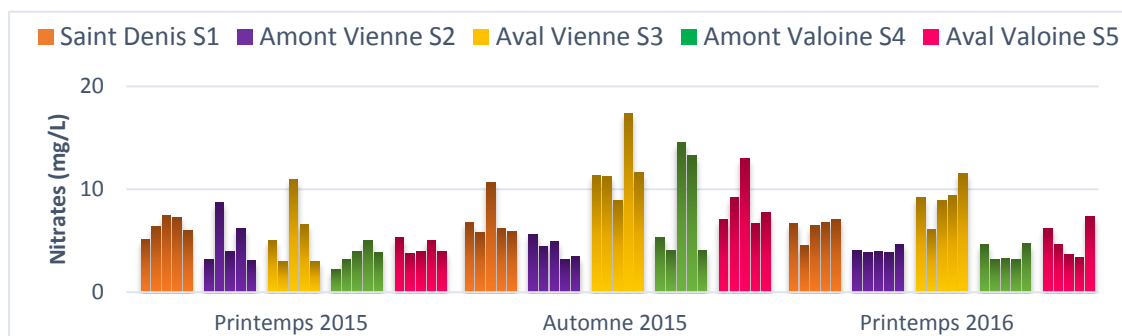


Figure 65. Variations temporelles des teneurs en nitrates en mg/L (n=un/durée d'exposition) dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

Tableau 25. Comparaison entre les contaminants dans les échantillons (AF) avec les valeurs NQE (en rouges les teneurs qui sont supérieures aux valeurs de références NQE pour les différents métaux et métalloïdes étudiés).

Contaminants étudiés	Saint Denis	Amont Vienne	Aval Vienne	Amont Valoine	Aval Valoine
Printemps 2015					
Arsenic					
Cuivre					
Cobalt					
Plomb					
Cadmium					
Chrome					
Nickel					
Zinc					
Manganèse					
Automne 2015					
Arsenic					
Cuivre					
Cobalt					
Plomb					
Cadmium					
Chrome					
Nickel					
Zinc					
Manganèse					
Printemps 2016					
Arsenic					
Cuivre					
Cobalt					
Plomb					
Cadmium					
Chrome					
Nickel					
Zinc					
Manganèse					

Ces résultats (figure 66-71) concernent les teneurs des contaminants dissous, choisis suivant leur teneurs au-dessus de la NQE dans l'eau ($\mu\text{g/L}$), et leur toxicité ; il s'agit de Cu, Co, Ni, Pb, Cd et As dans les cinq sites d'études pendant 28 jours de déploiement en printemps 2015, automne 2015 et en printemps 2016.

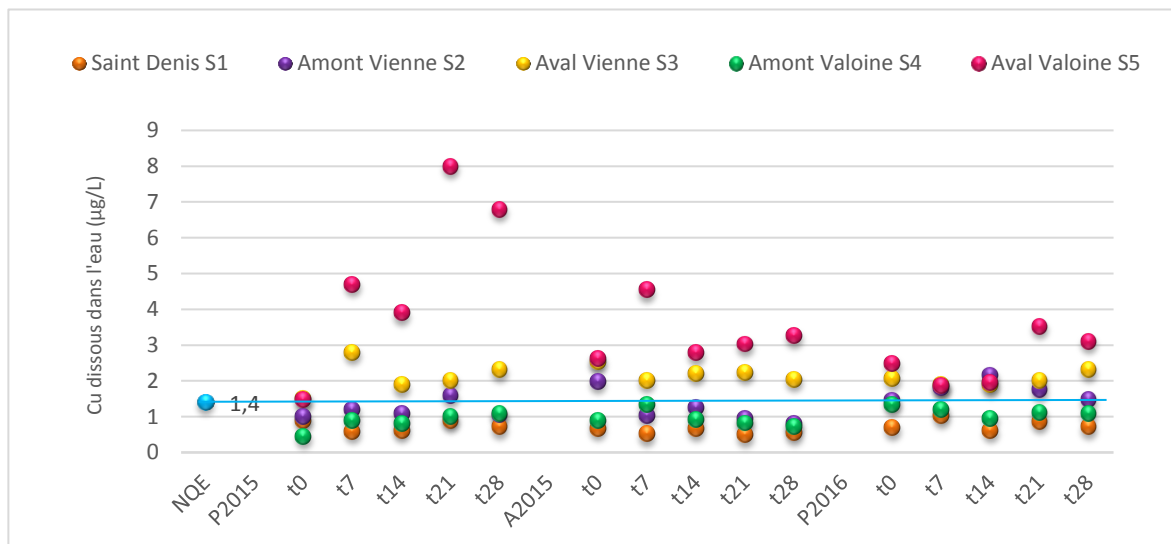


Figure 66. Variations temporelles des teneurs en Cu dissous dans l'eau en $\mu\text{g/L}$ dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

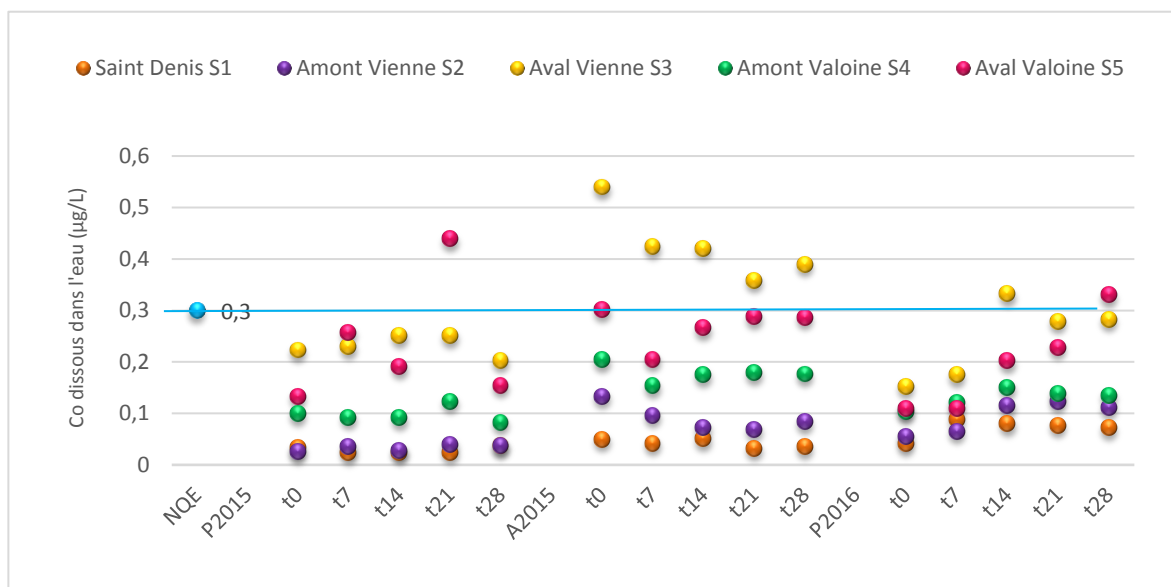


Figure 67. Variations temporelles des teneurs en Co dissous dans l'eau en $\mu\text{g/L}$ dans les cinq sites d'études et pendant les trois périodes 2015-2016.

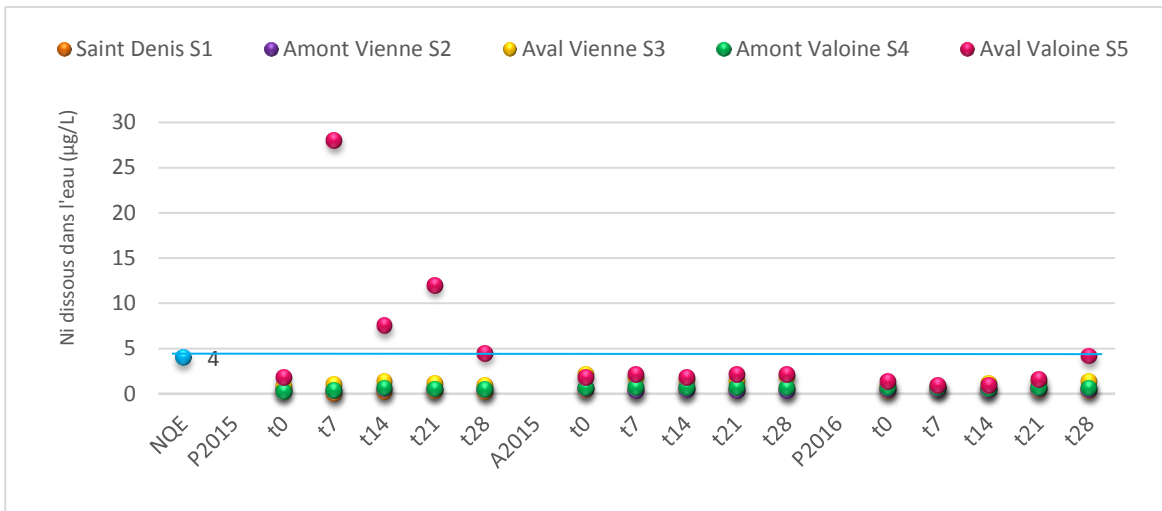


Figure 68. Variations temporelles des teneurs en Ni dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes de 2015-2016.

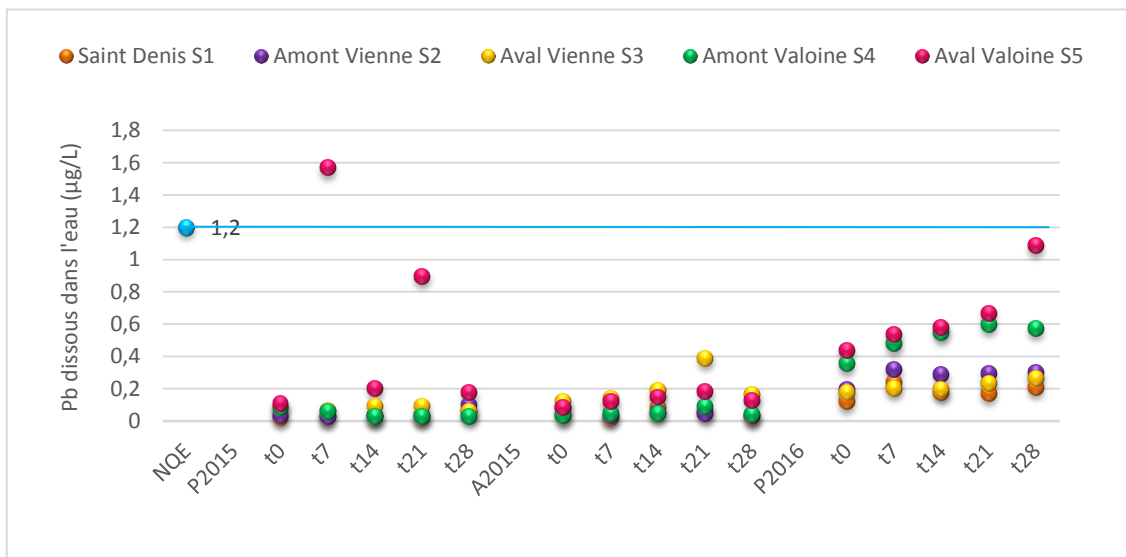


Figure 69. Variations temporelles des teneurs en Pb dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes 2015-2016.

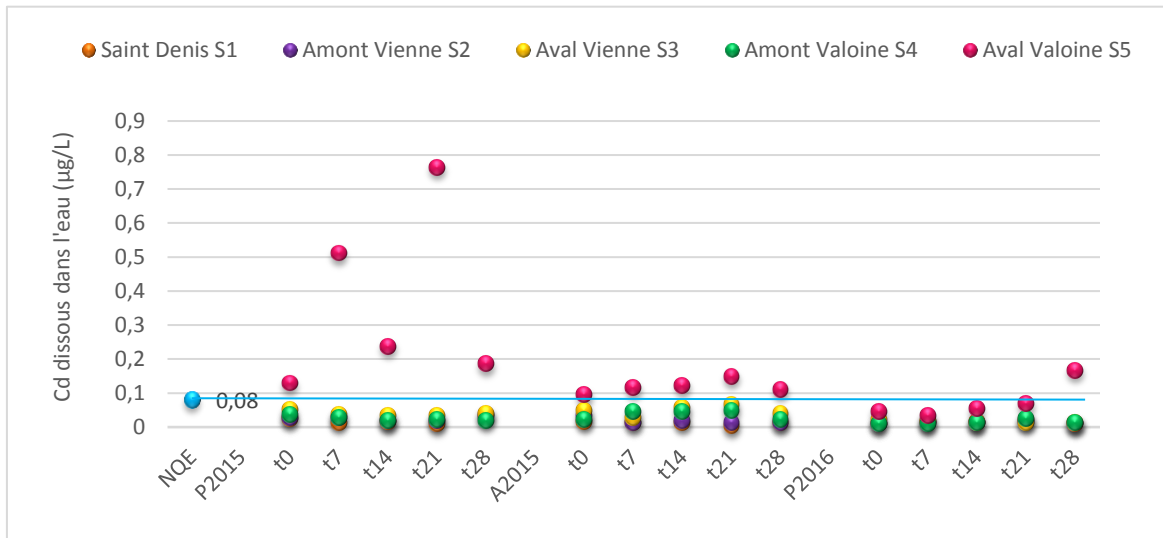


Figure 70. Variations temporelles des teneurs en Cd dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes 2015-2016.

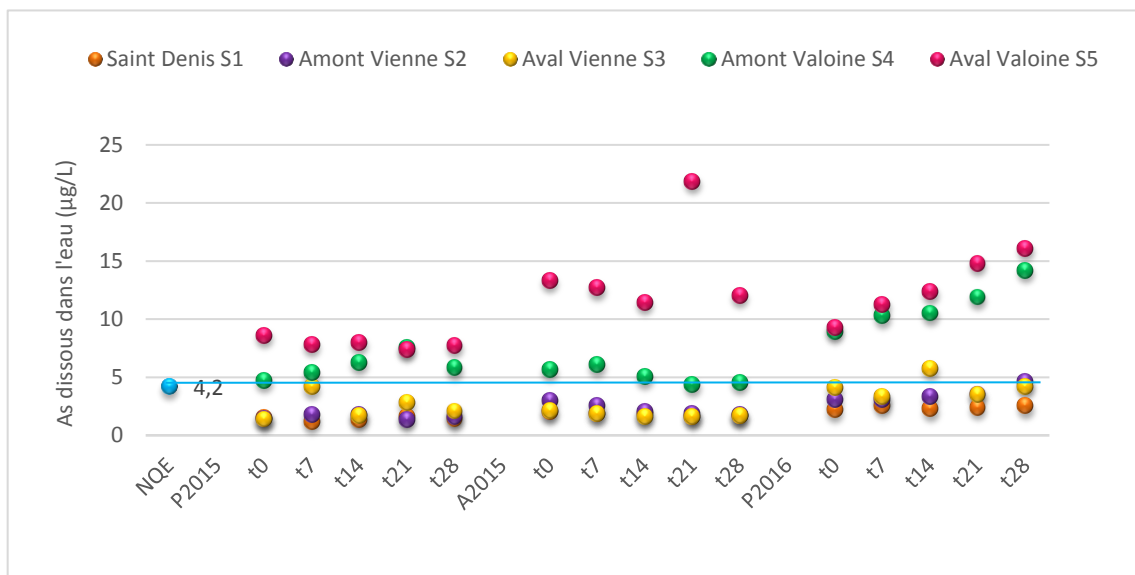


Figure 71. Variations temporelles des teneurs en As dissous dans l'eau en µg/L dans les cinq sites d'études et pendant les trois campagnes 2015-2016.

Annexe 4. Mécanismes d'absorption et de bioaccumulation

Tableau 26. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Doses (µmol/L)	Durée d'exposition	Accumulation (µg/g)	Accumulation (µmol/g)
Bonanno , 2013	<i>T. domingensis</i>	As	5,62	0,07	<i>In situ</i> Plantes indigènes	<0,10	0,001
		Cd	<0,50	0,001		<0,10	0,001
		Cr	<0,50	0,01		5,44	0,1
		Cu	22,7	0,35		10,4	0,16
		Mn	<0,50	0,01		37,4	0,68
		Ni	1,19	0,02		48,4	0,82
		Pb	<1,00	0,001		<0,10	0,001
		Zn	1,68	0,03		126	1,9
	<i>P. australis</i>	As	5,62	0,07		<0,10	0,001
		Cd	<0,50	0,001		<0,10	0,001
		Cr	<0,50	0,01		1,12	0,02
		Cu	22,7	0,35		6,23	0,1
		Mn	<0,50	0,01		168	3,05
		Ni	1,19	0,02		2,21	0,04
		Pb	<1,00	0,001		1,15	0,01
		Zn	1,68	0,03		24,8	0,38
	<i>A. donax</i>	As	5,62	0,07		<0,10	0,001
		Cd	<0,50	0,001		<0,10	0,001
		Cr	<0,50	0,01		1,13	0,02
		Cu	22,7	0,35		3,06	0,05
		Mn	<0,50	0,01		10,2	0,19
		Ni	1,19	0,02		1,89	0,03
		Pb	<1,00	0,001		<0,10	0,001
		Zn	1,68	0,03		2,69	0,04
Harguinteguy et al., 2014	<i>S. filiformis</i>	Co	2,76-13,5	0,05-0,23	<i>In situ</i> Plantes indigènes	1,06-3,53	0,02-0,06
		Cu	0,59-27,8	0,43-1,52		4,56-19,72	0,07-0,31
		Fe	85-1259	1,52-22,48		1327-8896	23,7-159
		Mn	7,5-128,5	0,14-2,34		91-2607	165-48
		Ni	3,17-26,93	0,05-0,46		0,81-19,66	0,01-0,33
		Pb	4,99-33,47	0,02-0,16		3,58-17,62	0,02-0,09
		Zn	2,3-30,9	0,04-0,48		16,5-148,3	0,25-2,28
Harguinteguy et al., 2016	<i>M. aquaticum</i>	Co	0,72- 1,93	0,01-0,03	<i>In situ</i> Plantes indigènes	0,58-3,45	0,01-0,06
		Cu	2,21-5	0,03-0,08		1,3-6,16	0,02-0,1
		Fe	35- 167,6	0,63-2,99		377,7-2591	6,8-46
		Mn	11,2- 51	0,2-0,93		632,1-1684,3	11,5-31
		Ni	1,63-5,72	0,03-0,1		3,86-9,65	0,07-0,16
		Pb	1,39-12,13	0,01-0,06		0,35-5,45	0,001-0,03
		Zn	2,2- 18,93	0,03-0,29		7,81-266,61	0,12-4,1
	<i>P. pusillus</i>	Co	0,72- 1,93	0,01-0,03	<i>In situ</i> Plantes indigènes	3,12-8,21	0,05-0,14
		Cu	2,21-5	0,03-0,08		3,68-28,85	0,06-0,45
		Fe	35- 167,6	0,63-2,99		201,8-2479,9	3,6-44,3
		Mn	11,2- 51	0,2-0,93		137,9-1914,5	2,5-35
		Ni	1,63-5,72	0,03-0,1		4,45-10,89	0,08-0,2
		Pb	1,39-12,13	0,01-0,06		4,56-9,15	0,02-0,04
		Zn	2,2- 18,93	0,03-0,29		11,56-279,03	0,18-4,3

Tableau 27. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Doses (µmol/L)	Durée d'exposition	Accumulation (µg/g)	Accumulation (µmol/g)
Fawzy <i>et al.</i> , 2012	<i>C. demersum</i>	Cd	1-70	0,009-0,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	2-3	0.02-0.03
		Cu	10-25	0,16-0,4		9-10	0.14-0.16
		Pb	5-20	0,02-0,1		9-15	0.04-0.07
		Zn	20-120	0,3-1,9		37-70	0.6-0.77
	<i>E. pyramidalis</i>	Cd	1-70	0,009-0,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	2	0.02
		Cu	10-25	0,16-0,4		9-20	0.14-0.31
		Pb	5-20	0,02-0,1		5-7	0.02-0.03
		Zn	20-120	0,3-1,9		35-55	0.54-0.85
	<i>E. crassipes</i>	Cd	1-70	0,009-0,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	2-3	0.02-0.03
		Cu	10-25	0,16-0,4		10-12	0.16-0.19
		Pb	5-20	0,02-0,1		5-12	0.02-0.06
		Zn	20-120	0,3-1,9		20-40	0.31-0.62
	<i>M. spicatum</i>	Cd	1-70	0,009-0,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	3-11	0.03-0.1
		Cu	10-25	0,16-0,4		7-10	0.11-0.16
		Pb	5-20	0,02-0,1		7-15	0.03-0.07
		Zn	20-120	0,3-1,9		30-35	0.46-0.54
	<i>P. australis</i>	Cd	1-70	0,009-0,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	2-3	0.02-0.03
		Cu	10-25	0,16-0,4		8-10	0.13-0.16
		Pb	5-20	0,02-0,1		7-9	0.03-0.04
		Zn	20-120	0,3-1,9		30	0.46
<i>T. domingensis</i>	Cd	1-70	0,009-0,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	2-3	0.02-0.03	
	Cu	10-25	0,16-0,4		7-10	0.11-0.16	
	Pb	5-20	0,02-0,1		4-12	0.02-0.06	
	Zn	20-120	0,3-1,9		20-30	0.31-0.46	
Peng <i>et al.</i> , 2008	<i>P. pectinatus</i>	Cd	0,66- 74,6	0,66-74,6	<i>In situ</i> dissous Plantes indigènes	1,68- 596	0.02-5.32
		Cu	14,4-25,3	14,4-25		11,5-62,4	0.18-0.98
		Mn	0,13-1560	0,13-1560		305-16000	5.6-291
		Pb	2,91-29,6	2,9-30		7,03-318	0.03-1.54
		Zn	54,2-1290	54-1290		71,9-6590	1.11-101
	<i>P. malaianus</i>	Cd	0,66- 74,6	0,66-74,6	<i>In situ</i> Plantes indigènes	1,85-362	0.02-3.32
		Cu	14,4-25,3	14,4-25		11,7-92,9	0.2-1.5
		Mn	0,13-1560	0,13-1560		401-18900	7.3-343.6
		Pb	2,91-29,6	2,9-30		2,52-604	0.01-2.9
		Zn	54,2-1290	54-1290		106-7180	1.6-110
Yabanlı <i>et al.</i> , 2014	<i>M. spicatum</i>	As dissous	0,87	0,9	<i>In situ</i> Plantes indigènes	1,13	0.02
		Cd dissous	0,38	0,4		0,06	0.001
		Cr dissous	1,19	1,2		4,59	0.09
		Pb dissous	2,25	2,3		6,25	0.03

Tableau 28. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Doses (µmol/L)	Durée d'exposition	Accumulation (µg/g)	Accumulation (µmol/g)
Arán <i>et al.</i> , 2017	<i>L. laevigatum</i>	Cr	4	0,08	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	5	0.1
		Ni	25	0,4		50	0.85
		Pb	1	0,005		5	0.02
		Zn	30	0,5		180	2.7
		Cr	70	1,4	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	30	0.58
		Ni	70	1,2		35	0.59
		Pb	70	0,4		200	0.1
		Zn	70	1		200	3
		Cr	1000	19	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	300	5.8
		Ni	500	8,5		870	14.75
		Pb	1000	5		900	4.4
		Zn	100	1,5		200	3
Hadad <i>et al.</i> , 2011	<i>E. crassipes</i>	Cr	1	0,019	<i>In vitro</i> (Aquariums) 2, 8, 24 h 2, 7, 10, 15 et 30 jours	75 % R / 6% F	----
		Ni	1	0,017		73% R/ 23% F	----
		Zn	1	0,015		55% R/ 10% F	----
Chen <i>et al.</i> , 2015	<i>C. demersum</i>	Pb	5	0,02	<i>In vitro</i> 7, 14, 21 jours	677,3	3.3
			10	0,05		1311,3	6.3
			20	0,1		1429,2	7
			40	0,2		1566,3	7.6
			80	0,4		1772,8	8.6
Duman <i>et al.</i> , 2010	<i>L. minor</i>	As (III)	0	0	<i>In vitro</i> 1, 2, 4 et 6 jours	1,81	0.02
			1	0,01		9,09	0.12
			4	0,05		17,52	0.2
			16	0,2		13703	182.7
			64	0,85		17408	232
		As (V)	0	0	<i>In vitro</i> 1, 2, 4 et 6 jours	1,81	0.02
			1	0,01		1,83	0.02
			4	0,05		4,10	0.05
			16	0,2		2376	31.7
			64	0,85		8674	115.6
Harguinteguy <i>et al.</i> , 2015	<i>M. aquaticum</i>	Ni	0,05–10	0,001-0,16	<i>In vitro</i> 7 jours	4800	81.4
		Pb	0,05–15	0-0,07		16000	77.3
		Zn	0,15–20	0,002-0,3		5200	80
	<i>E. densa</i>	Ni	0,05–10	0,001-0,16		5000	85
		Pb	0,05–15	0-0,07		7700	37
		Zn	0,15–20	0,002-0,3		2700	42
Delmail <i>et al.</i> , 2011	<i>M.alterniflorm</i>	Cd	10	0,09	<i>In vitro</i> 27 jours	300	2.7
Maleva <i>et al.</i> , 2009	<i>E. canadensis</i>	Ni	1	0,02	<i>In vitro</i> 5 jours	102	1.7
			10	0,17		600	10.2
			50	0,85		3800	65

Tableau 29. Capacité de bioaccumulation des contaminants par les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Doses (µmol/L)	Durée d'exposition		Accumulation (µg/g)	Accumulation (µmol/g)
Fritioff <i>et al.</i> , 2005	<i>E. canadensis</i>	Cd	112	1	<i>In vitro</i> 48 h	5-20 °C	145-269	1,3-2,4
		Cu	95	1,5			340-444	5,3-7
		Pb	836	4			1732-1771	8,4-8,6
		Zn	1307	20,1			1165-2193	18-33,7
	<i>P. natans</i>	Cd	112	1	<i>In vitro</i> 48 h	5-20 °C	94-151	0,8-1,3
		Cu	95	1,5			145-193	2,3-3
		Pb	836	4			127-151	0,6-0,7
		Zn	1307	20			1381-1679	21-26
Bokhari <i>et al.</i> , 2005	<i>L. minor</i>	Cd	0,038	0,0003	<i>In vitro</i> dissous 3, 10, 17, 24, 31 jours		5,8-24	0,1-0,2
		Cu	0,062	0,001			7,13-34,6	0,1-0,5
		Ni	0,059	0,001			19,6	0,3
		Pb	0,608	0,0029			5,8-318	0,03-1,5

Annexe 5. Influence de la durée d'exposition sur l'accumulation

Tableau 30. Les durées d'exposition observées pour une accumulation maximale dans les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Durée d'exposition	Durée maximale
Harguinteguy <i>et al.</i> , 2013	<i>M. aquaticum</i>	Co	2,1- 7,6	In situ 126 jours	N.D
		Cu	4,5- 19,7		70 jours
		Fe	25- 290		70 jours
		Mn	3- 58		N.D
		Ni	12,1- 31,4		N.D
		Pb	3,2- 17,7		56 jours
		Zn	5,1- 15,4		56 jours
Arán <i>et al.</i> , 2017	<i>L. laevigatum</i>	Cr	4	In vitro 7, 14, 21, 28 jours	N.D
		Ni	25		14 jours
		Pb	1		14 jours
		Zn	30		N.D
		Cr	70		14 jours
		Ni	70		28 jours
		Pb	70		14 jours
		Zn	70		N.D
		Cr	1000		21 jours
		Ni	500		21 jours
		Pb	1000		14 jours
		Zn	100		N.D
Chen <i>et al.</i> , 2015	<i>C. demersum</i>	Pb	5	In vitro 7, 14, 21 jours	21 jours
			10		14 jours
			20		7 jours
			40		7 jours
			80		7 jours
Delmail <i>et al.</i> , 2011	<i>M.alterniflorm</i>	Cd	10	In vitro 27 jours	23 jours
Bokhari <i>et al.</i> , 2005	<i>L. minor</i>	Cd	0,038	In vitro dissous 3, 10, 17, 24, 31 jours	3 jours
		Cu	0,062		31 jours
		Ni	0,059		10 jours
		Pb	0,608		24 jours

Annexe 6. Les biomarqueurs

Tableau 31. Réponses des différents biomarqueurs aux contaminants *in situ* et *in vitro* dans les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Durée d'exposition	MDA	
Radic´ et al., 2010	<i>L. minor</i>	Cu	14-29	<i>In situ</i> 90 jours	5%	135%*
		Cr	1-4		25%	160%*
		Fe	228-648		50%	165%*
		Ni	12-20		100%	175%*
		Pb	4			
		Zn	118-190			
Arán et al., 2017	<i>L. laevigatum</i>	Cr	4	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	50 nmol/g MS	
		Ni	25			
		Pb	1			
		Zn	30			
		Cr	70	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	55 nmol/g MS	
		Ni	70			
		Pb	70			
		Zn	70			
		Cr	1000	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	45 nmol/g MS	
		Ni	500			
		Pb	1000			
		Zn	100			
Maleva et al. 2009	<i>E. canadensis</i>	Ni	1	<i>In vitro</i> 5 jours	180 µmol/g MS	
			10		200 µmol/g MS	
			50		260 µmol/g MS	
Chen et al., 2015	<i>C. demersum</i>	Pb	5	<i>In vitro</i> 7, 14, 21 jours	4500 nmol/g	
			10		7000 nmol/g	
			20		6500 nmol/g	
			40		7000 nmol/g	
			80		7500 nmol/g	
			0		16 µ mol/g	
Duman et al., 2010	<i>L. minor</i>	As (III)	1	<i>In vitro</i> 1, 2, 4 et 6 jours	18 µ mol/g	
			4		20 µ mol/g	
			16		24 µ mol/g	
			64		26 µ mol/g	
			0		16 µ mol/g	
		As (V)	1	<i>In vitro</i> 1, 2, 4 et 6 jours	15,5 µ mol/g	
			4		16 µ mol/g	
			16		19 µ mol/g	
			64		23 µ mol/g	
			0		16 µ mol/g	
Harguinteguy et al., 2015	<i>M. aquaticum</i>	Ni	0,05–10	<i>In vitro</i> 7 jours	0.230 µ mol/g	
		Pb	0,05–15		0.187 µ mol/g	
		Zn	0,15–20		0.070 µ mol/g	
	<i>E. densa</i>	Ni	0,05–10	<i>In vitro</i> 7 jours	0.290 µ mol/g	
		Pb	0,05–15		0.159 µ mol/g	
		Zn	0,15–20		0.072 µ mol/g	
Delmail et al., 2011	<i>M.alterniflorm</i>	Cd	10	<i>In vitro</i> 27 jours	0,3 mol/L (19 %)	

Tableau 32. Réponses des différents biomarqueurs aux contaminants *in situ* et *in vitro* dans les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Durée d'exposition	Pigments chlorophylliens	
Radic' <i>et al.</i> , 2010	<i>L. minor</i>	Cu	14-29	<i>In situ</i> 90 jours	5%	99%
		Cr	1-4		25%	100%
		Fe	228-648			100%
		Ni	12-20			100%
		Pb	4			100%
		Zn	118-190			
Arán <i>et al.</i> , 2017	<i>L. laevigatum</i>	Cr	4	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	Chl a: 5 mg /g MS Caroténoïdes: 3 mg /g MS	
		Ni	25			
		Pb	1			
		Zn	30			
		Cr	70	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	Chl a: 4,5 mg /g MS Caroténoïdes: 3 mg /g MS	
		Ni	70			
		Pb	70			
		Zn	70			
		Cr	1000	<i>In vitro</i> 7, 14, 21, 28 jours	Chl a: 3 mg /g MS Caroténoïdes: 2,2 mg /g MS	
		Ni	500			
		Pb	1000			
		Zn	100			
Maleva <i>et al.</i> 2009	<i>E. canadensis</i>	Ni	1	<i>In vitro</i> 5 jours	(+) de 15–20%	
			10		Pas de diminution	
			50		(-) de 75 %	
Hadad <i>et al.</i> 2011	<i>E. crassipes</i>	Cr	1	<i>In vitro</i> (Aquariums) 2, 8, 24 h 2, 7, 10, 15 et 30 jours	(-) de 28 %	
		Ni	1		(-) de 23 %	
		Zn	1		(-) de 17 %	
Duman <i>et al.</i> , 2010	<i>L. minor</i>	As (III)	0	<i>In vitro</i> 1, 2, 4 et 6 jours	0,8 mg/g	
			1		0,6 mg/g	
			4		0,5 mg/g	
			16		0,45 mg/g	
			64		0,4 mg/g	
		As (V)	0	<i>In vitro</i> 1, 2, 4 et 6 jours	0,75 mg/g	
			1		0,7 mg/g	
			4		0,67 mg/g	
			16		0,53 mg/g	
			64		0,5 mg/g	
Harguinteguy <i>et al.</i> , 2015	<i>M. aquaticum</i>	Ni	0,05–10	<i>In vitro</i> 7 jours	6.96 mg/g	
		Pb	0,05–15		7.23 mg/g	
		Zn	0,15–20		1.03 mg/g	
	<i>E. densa</i>	Ni	0,05–10	<i>In vitro</i> 7 jours	7.21 mg/g	
		Pb	0,05–15		3.98 mg/g	
		Zn	0,15–20		1.55 mg/g	
Delmail <i>et al.</i> , 2011	<i>M.alterniflorm</i>	Cd	10	<i>In vitro</i> 27 jours	Chla : 1 µg/mL	
					Chlb : 0,5 µg/mL	
					Cart : 0,45 µg/mL	

Tableau 33. Réponses des différents biomarqueurs aux contaminants *in situ* et *in vitro* dans les plantes aquatiques.

Références	Plante	Contaminants	Doses (µg/L)	Durée d'exposition		Enzymes antioxydantes µM H ₂ O ₂ /mg protéine
Radic' et al., 2010	<i>L. minor</i>	Cu	14-29	<i>In situ</i> 90 jours	5%	POD 135%*
		Cr	1-4			POD 145%*
		Fe	228-648		25%	POD 165%*
		Ni	12-20			POD 225%*
		Pb	4		50%	
		Zn	118-190		100%	
Maleva et al. 2009	<i>E. canadensis</i>	Ni	1	<i>In vitro</i> 5 jours		CAT (+) de 20%*
			10			CAT (+) de 30%*
			50			CAT (-) de 43%*
			1			SOD (+) de 11%*
			10			SOD (+) de 13%*
			50			SOD (+) de 9 %*

Intérêt du macrophyte *Myriophyllum alterniflorum* pour la détection des contaminants dans l'environnement

Le but de ce travail de thèse est de démontrer l'intérêt d'un macrophyte aquatique submergé, *Myriophyllum alterniflorum* pour la détection de contaminants dans l'environnement. Des études *in situ* ont été réalisées pendant 28 jours sur cinq milieux aquatiques, affectés par différents types de pression anthropique, durant trois campagnes de terrain (printemps 2015, automne 2015 et printemps 2016), pour déterminer si l'accumulation des contaminants dans la plante et si des biomarqueurs du myriophylle peuvent être utilisés pour détecter la présence de contaminants dans les eaux. L'accumulation des contaminants au cours du temps était corrélée avec les teneurs des contaminants dans l'eau ; l'influence de la durée d'exposition a été étudiée. Au cours des trois campagnes, la réponse des biomarqueurs, teneur en MDA et activité de nitrate réductase était corrélée avec les teneurs en contaminants dans l'eau et dans la plante ; cependant l'influence de la durée d'exposition sur l'évolution de la réponse des biomarqueurs est moindre par rapport à celle de l'accumulation des contaminants. Ainsi, l'étude des biomarqueurs pourrait permettre une évaluation plus fiable de la qualité des masses d'eau que le suivi de l'accumulation dans la plante. Au cours de la campagne printemps 2015, un panel de biomarqueurs plus large a été étudié afin de définir les biomarqueurs les plus pertinents pour détecter spécifiquement les pressions liées aux activités urbaines ou industrielles. Une méthodologie d'évaluation de la qualité des eaux est proposée, en considérant un protocole d'analyse des biomarqueurs : un premier dosage de Chlb et MDA est simple et moins coûteux. Quand aucune preuve d'impact anthropique n'est montrée, aucune analyse complémentaire n'est requise. En revanche, lorsqu'une altération est mise en évidence, l'analyse d'autres biomarqueurs plus spécifiques tels que les activités G6PDH et γ -GCS sera nécessaire. La réponse de l'activité γ -GCS est spécifique du stress métallique, ainsi, la réponse de ce biomarqueur devrait amener à réaliser l'analyse des métaux/métalloïdes dans *M. alterniflorum*.

Mots-clés : Biomonitoring, *Myriophyllum alterniflorum*, Métaux, Arsenic, Biomarqueurs

Interest of the macrophyte *Myriophyllum alterniflorum* for the detection of contaminants in the environment

The aim of this thesis is to demonstrate the interest of a submerged aquatic macrophyte, *Myriophyllum alterniflorum* for the detection of contaminants in the environment. In situ studies were conducted over 28 days in five aquatic environments, affected by different levels of anthropogenic pressure, during three field seasons (spring 2015, autumn 2015 and spring 2016), to determine whether the accumulation of contaminants in the plant and whether biomarkers can be used to detect the presence of contaminants in water. The accumulation of contaminants over time was correlated with the levels of contaminants in the water; the influence of the duration of exposure has been studied. In all three campaigns, biomarker response, MDA content, and nitrate reductase activity were correlated with contaminant levels in water and in the plant; however, the influence of the duration of exposure on the evolution of the biomarker response is lower compared to the accumulation of contaminants. Thus, the study of biomarkers could allow a more reliable assessment of the quality of water bodies than the monitoring of contaminant accumulation in the plant. During the spring 2015 campaign, a much broader biomarker panel was investigated to define the most relevant biomarkers for assessing water quality. A methodology for evaluating water quality is proposed, considering a biomarker analysis protocol: a first assay of Chlb and MDA is simple and less expensive. When no evidence of human impact is shown, no further analysis is required. On the other hand, when an alteration is highlighted, the analysis of other more specific biomarkers such as G6PDH and γ -GCS activities will be necessary. The response of γ -GCS activity is specific for metal stress, so the response of this biomarker should lead to the analysis of metals / metalloids in *M. alterniflorum*.

Keywords: Biomonitoring, *Myriophyllum alterniflorum*, Metals, Arsenic, Biomarkers.

