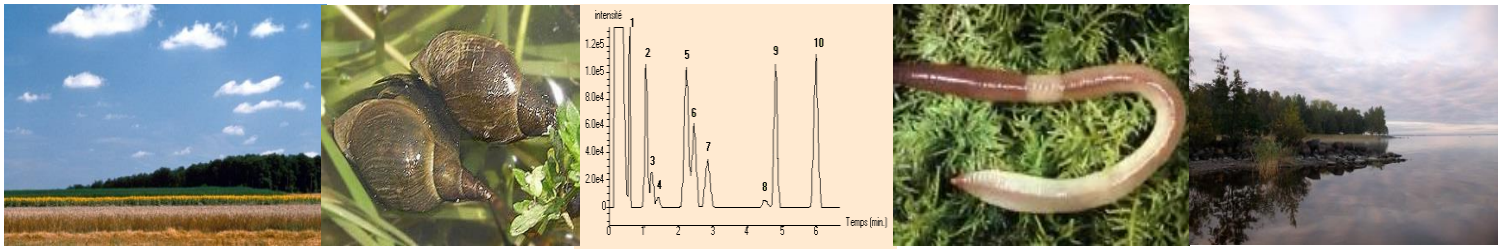
5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA



Biarritz, 25-27 novembre 2014

Réseau des Ecotoxicologues de l'INRA

http://www6.inra.fr/ecotox

doi:10.13140/2.1.3288.6569

INRA SCIENCE & IMPACT

ECOTOX

Institut National de la Recherche Agronomique

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie

25-27 novembre 2014

Domaine de Françon – Biarritz

Comité d'organisation

Agnès Bouchez (Thonon-les-Bains)
Laurence Denaix (Bordeaux)
François Laurent (Toulouse)
Fabrice Martin-Laurent (Dijon)
Christian Mougin (Versailles)

Réseau des Ecotoxicologues de l'INRA

Edition / Logistique / Secrétariat

Anne-Marie Bouchon (Bordeaux)
Patricia Braconnier (Bordeaux)
Céline Duisit (Versailles)

Portail internet

Christine Sireyjol (Versailles)

Remerciements

Ce séminaire a bénéficié du soutien financier des départements *Environnement et Agronomie, Ecologie des Forêts, Prairies et Milieux Aquatiques ainsi que du Métaprogramme SMaCH* de l'INRA.
Il est également soutenu par le réseau *EcoBASC* du LabEx BASC (ANR-11-LABX-0034).

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie

Domaine de Françon, Biarritz, 25-27 novembre 2014

Programme

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA

Domaine de Françon, Biarritz, 25-27 novembre 2014

Programme

Mardi 25 novembre

16h00 : accueil des participants (café…)

17h00-17h10 : Ouverture du séminaire : organisateurs

17h10-17h40 : L'écotoxicologie : attentes de la DS ENV de l'INRA : M. Tixier-Boichard et C. Mougin

17h40-18h00 : Proposition de structuration nationale Ecotoxicologie et Toxicologie : J. Garric, F. Martin-Laurent et C. Mougin

18h00-18h30 : La FCS Rovaltain : P. Garrigues et W. Sanchez

18h30-19h00 : Le RTP d'écotoxicologie microbienne : S. Pesce et F. Martin-Laurent

19h00-19h30 : Le réseau Ecotox de l'INRA, bilan et perspectives : C. Mougin

19h30 : apéritif

20h00 : dîner

Mercredi 26 novembre

8h30 : Session 1 : Scénario d'exposition (exposome, biodisponibilité...). Modératrices : Laurence Denaix et Isabelle Lamy

8h30-8h50 : Morin S. *et al*. : Echantillonneurs passifs : évaluation de l'exposition des biofilms aux mélanges de pesticides, et du risque écotoxique dans les cours d'eau

8h50-9h10 : Nélieu S. *et al*. : Evaluation de la (bio)disponibilité environnementale de l'époxiconazole pour des vers de terre

9h10-9h30 : Beaumelle L. *et al*. : La modélisation graphique comme outil d'étude de la biodisponibilité des métaux pour le ver de terre

9h30-9h50 : Pauget B. *et al*. : Influence des sources de contamination et des caractéristiques des sols sur la biodisponibilité des métaux

9h50-10h10 : Henner P. *et al*. : Identification de transporteurs impliqués dans l'absorption et la translocation de césium chez *Arabidopsis thaliana* – projet DEMETERRES

10h10-10h30 : Oustrière N. *et al*. : Évaluation de la phytotoxicité d'un sol contaminé en Cu géré par stabilisation in situ : le cas des biochars

10h30-11h00 : pause-café

11h00-11h20 : Marchand L. *et al*. : Evaluation des risques et options de phytoremediation proposées dans le cadre d'un sol urbain contaminé par les éléments traces et les HAP

11h20-11h40 : Cosio C. et Régier N. : Analyse du transcriptome pour évaluer la biodisponibilité des polluants dans des mélanges chez *Elodea nuttallii*

11h40-12h40 : Ecotox : Quelle veille pour le réseau? : C. Sireyjol

12h40-14h00 : déjeuner

14h00 : Session 2 : Ecodynamique des contaminants. Modérateur : Christian Mougin

14h00-14h20 : Goulas A. *et al*. : Impacts de l'origine et du traitement de produits résiduaires organiques valorisés en agriculture sur le devenir et la disponibilité des antibiotiques entrant dans les sols cultivés

14h20-14h40 : Corbel S. *et al.* : Devenir et transfert des cyanotoxines de type microcystine dans un système sol-plante

14h40 : Session 3 : Evaluation du risque environnemental (effet directs et indirects sur la physiologie, le comportement, la dynamique des pops et des communautés). Modérateurs : Agnès Bouchez et Fabrice Martin-Laurent

14h40-15h00 : Keck F. *et al.* : Lien entre la phylogénie des diatomées et leur sensibilité aux herbicides

15h00-15h20 : Kienzler A. et *al*. : Genotoxicity and DNA-repair-capacity impairment in a fish-liver cell line exposed to runoff from coal-tar-sealed pavement (résumé non diffusé)

15h20-15h40 : Stork V. et *al*. : Evaluation of the ecotoxicological impact of pesticides on the diversity and the abundance of soil microorganisms

15h40-16h00 : Crouzet O. et *al.* : Les communautés microbiennes photosynthétiques (cyanobactéries et micro-algues) comme bioindicateurs de stress phytosanitaires dans les sols agricoles

16h00-16h30 : pause-café

16h30-16h50 : Pelosi C. *et al*. : Réduire les pesticides pour augmenter les populations de vers de terre dans les champs cultivés

16h50-17h10 : Gimbert F. *et al*. : Effet de l'exposition au mercure sur la régénération tissulaire chez l'escargot Cantareus aspersus

17h10-17h30 : Brun-Barale A. *et al*. : Effets non-intentionnels du bio-insecticide *Bacillus thuringiensis*

17h30-18h45 : Reboud X. et C. Mougin. Le métaprogramme SMaCH : quels apports du réseau Ecotox ?

19h30 : dîner

21h00 : Présentation de l'infrastructure ANAEE-F et de la mission du CoDir en Guyane

Jeudi 27 novembre

8h30 : Session 3 : Evaluation du risque environnemental (effet directs et indirects sur la physiologie, le comportement, la dynamique des populations et des communautés). Modérateurs : François Laurent et Michel Mench

8h30-8h50 : Liber Y. et *al*. : Absorption et répartition du [^{14}C]-chlordécone chez les graminées

8h50-9h10 : Marchand L. *et al*. : Production de biomasse racinaire chez six espèces de macrophytes en réponse à une exposition au cuivre : variabilité intra-spécifique vs. tolérance constitutive

9h10-9h30 : Cornu J.-Y. *et al*. : Nicotianamine racinaire et homéostasie de Zn et Ni chez *Arabidopsis halleri*

9h30-9h50 : Hego E. *et al*. : Tolérance au Cu chez *Agrostis capillaris* L. : du phénotype aux déterminants moléculaires dans le protéome soluble foliaire

9h50-10h10 : Perrier F. *et al*. : Différences inter-variétales d'accumulation de Cd chez le blé dur (*Triticum durum* sp.)

10h10-10h40 : pause-café

10h40-11h30 : C. Mougin : Les productions du réseau, le numéro spécial ESPR et la collection ISTE

11h30-12h00 : Synthèse et conclusion du séminaire

12h00 : déjeuner

13h30 : fin du séminaire, départ

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA

***Domaine de Françon*, Biarritz, 25-27 novembre 2014**

Résumés des présentations

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA

***Domaine de Françon*, Biarritz, 25-27 novembre 2014**

Session 1

Scénario d'exposition (exposome, biodisponibilité...)

Echantillonneurs passifs : évaluation de l'exposition des biofilms aux mélanges de pesticides, et du risque écotoxique dans les cours d'eau

Soizic MORIN[1], Sandra KIM TIAM[1], Stéphane PESCE[2], Aurélie MOREIRA[1], Mélissa EON[1], Caroline GARDIA PAREGE[3], Hélène BUDZINSKI[3], Nicolas MAZZELLA[1]

[1]Irstea, UR EABX. 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex
[2]Irstea, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS70077, 69626 Villeurbanne cedex
[3]Université de Bordeaux, EPOC-LPTC, UMR 5805 CNRS, 33405, Talence Cedex, France
soizic.morin@irstea.fr

Introduction

La contamination généralisée des cours d'eau par les pesticides, généralement en mélanges et à concentrations relativement faibles, requiert la prise en compte dans le diagnostic de la complexité de l'exposition. Le développement récent de l'échantillonnage passif des contaminants a permis d'une part de mieux considérer la diversité des contaminants présents dans l'environnement, et d'abaisser leurs limites de détection, fournissant ainsi un panorama plus exhaustif de la contamination réelle.

Le biofilm est une communauté complexe, composée de microalgues, de bactéries, de champignons, de protozoaires, etc. enchâssés dans une matrice polysaccharidique. Son utilisation en écotoxicologie revêt un haut degré de pertinence environnementale, comparé aux espèces modèles utilisées traditionnellement. Elle permet de mieux comprendre et prédire les impacts réels de contaminants pour l'écosystème, bien mieux que l'extrapolation de résultats déconnectés de la complexité des conditions de milieu (diversité des organismes, et de leurs relations).

Le modèle biofilm a ainsi été utilisé avec succès dans de nombreuses études écotoxicologiques au laboratoire, utilisant des contaminants seuls ou en combinaisons simples (binaires, ternaires) de substances. Cependant, la qualification du risque écotoxique associé aux mélanges de contaminants est difficilement envisageable par ce biais, la multiplicité des mixtures possibles (en termes de composition et de concentrations) empêchant de tester toutes les combinaisons susceptibles d'être rencontrées *in situ*.

Nous proposons ici de présenter les avancées récentes permises par le couplage entre échantillonnage passif et écotoxicologie, pour la mesure du potentiel toxique dans les milieux aquatique, et pour la mise en œuvre d'expérimentations plus réalistes environnementalement.

Matériels et méthodes

Les travaux présentés ici visent à décrire différents types d'expérimentations, couplant extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers, Fauvelle et al., 2014) permettant d'obtenir des mixtures réalistes de pesticides, et approches écotoxicologiques à l'échelle de la communauté périphytique. Les POCIS sont des échantillonneurs passifs utilisés pour mesurer les concentrations chroniques moyennes dans les milieux aquatiques de substances organiques, notamment les pesticides les plus hydrophiles (voir par exemple Harman et al., 2012). Ils contiennent une matrice adsorbante qui concentre les contaminants dissous pendant la durée d'immersion des échantillonneurs dans l'eau. Les mélanges complexes de pesticides organiques qui peuvent en être extraits ont été utilisés : 1- pour mettre en œuvre des tests de toxicité à court terme via des approches PICT (Pollution Induced Community Tolerance, Blanck et al., 1988) et EDA (Effect-Directed Analysis, Brack, 2003), et 2- comme contaminant composite dans des expérimentations de laboratoire (exposition chronique).

Résultats et discussion

PICT : L'élaboration de courbes dose/réponse utilisant des concentrations croissante en mélange de pesticides, pour différents biofilms (en termes d'origine et d'historique d'exposition) et différents mélanges confirme la pertinence de l'utilisation de ces extraits d'échantillonneurs passifs. Le long

d'un gradient amont/aval de contamination, la tolérance des biofilms traduit leur préexposition (ou non) aux mélanges utilisés (e.g. Pesce et al., 2011).

EDA : L'optimisation des tests de fluorimétrie miniaturisés (Kim Tiam et al., 2014a) a permis la mise en œuvre d'approches EDA. A partir d'extraits de POCIS provoquant un effet toxique sur des cultures de diatomées, la mixture complexe a été fractionnée de plus en plus finement par HPLC, selon un gradient d'hydrophobicité, avec l'objectif d'identifier la fraction (et donc la classe de contaminants, voire le composé précis) responsable de la toxicité. Dans l'étude réalisée, aucune de ces fractions (ou sous-fraction) ne provoquait seule l'effet toxique escompté, en revanche leurs combinaisons binaires s'avéraient toxiques. Les résultats démontrent, dans ce cas, que non seulement la dose de contaminants, mais également leur combinaison, produit la toxicité mesurée, indiquant probablement une additivité ou une synergie des effets individuels des fractions.

Exposition plus réaliste dans les expérimentations chroniques au laboratoire : Les résultats encourageants des travaux présentés ci-dessus ont ouvert la voie à diverses applications, au laboratoire, de l'extrait d'échantillonneur passif comme contaminant complexe, plus pertinent qu'une liste finie de substances (généralement réduite). L'utilisation de ces mélanges toxiques directement extraits du milieu au laboratoire (en canaux artificiels), à des concentrations environnementales, a été optimisée. Nous avons alors pu simuler les effets d'une contamination complexe sur des biofilms non pré-exposés (Morin et al., 2012) et/ou d'une levée de pression toxique pour des biofilms issus de sites contaminés (Kim Tiam et al., 2014b).

Conclusion et perspectives

Le couplage de l'échantillonnage passif et des approches classiques d'écotoxicologie nous ont permis de mettre en évidence des effets aigus et chroniques de pesticides en mélange avec l'utilisation des POCIS. Ces échantillonneurs passifs ne couvrent cependant pas la large gamme de contaminants susceptibles d'être présents dans le milieu (e.g. métaux), et la fraction échantillonnée ne représente pas intégralement le mélange potentiellement toxique.

Mots-clés : POCIS, biofilm, mélange complexe, faible dose, potentiel toxique

Références

Blanck, H., Wängberg, S.A., Molander, S., 1988. Pollution-Induced Community Tolerance - A new ecotoxicological tool., Functional Testing of Aquatic Biota for estimating Hazards of Chemicals. Cairns J. Jr, Pratt J.R. (Eds), Philadelphia, pp. 219-230.

Brack, W., 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? Anal. Bioanal. Chem. 377, 397-407.

Fauvelle, V., Mazzella, N., Belles, A., Moreira, A., Allan, I., Budzinski, H., 2014. Optimization of the polar organic chemical integrative sampler for the sampling of acidic and polar herbicides. Anal. Bioanal. Chem. 406, 3191-3199.

Harman, C., Allan, I.J., Vermeirssen, E.L.M., 2012. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler—a critical review. Environ. Toxicol. Chem., 2724-2738.

Kim Tiam, S., Libert, X., Morin, S., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., Mazzella, N., 2014a. Single and mixture effects of pesticides and a degradation product on fluvial biofilms. Environ. Monit. Assess. 186, 3931-3939.

Kim Tiam, S., Morin, S., Pesce, S., Feurtet-Mazel, A., Moreira, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., 2014b. Environmental effects of realistic pesticide mixtures on natural biofilm communities with different exposure histories. Sci. Total Environ. 473–474, 496-506.

Morin, S., Pesce, S., Kim-Tiam, S., Libert, X., Coquery, M., Mazzella, N., 2012. Use of polar organic chemical integrative samplers to assess the effects of chronic pesticide exposure on biofilms. Ecotoxicology 21, 1570-1580.

Pesce, S., Morin, S., Lissalde, S., Montuelle, B., Mazzella, N., 2011. Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms. Environ. Pollut. 159, 735-741.

Evaluation de la (bio)disponibilité environnementale de l'époxiconazole pour des vers de terre

Sylvie Nélieu[1], Ghislaine Delarue[1], Pierre Awad[2], Félix Fraillon[2], Céline Pelosi[2]

UR251 Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés
[1]INRA, Campus INRA-AroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon
[2]INRA, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex
sylvie.nelieu@versailles.inra.fr

Introduction

Le lien entre la concentration totale d'un contaminant dans le sol et ses effets sur les organismes telluriques n'est pas direct, à cause des processus de sorption. Les limitations de la (bio)disponibilité environnementale dépendent de l'organisme cible, des propriétés du sol et de différents processus évoluant avec le temps [1]. Il est difficile de faire le lien entre disponibilité, biodisponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique, par exemple dans le cas de contaminants organiques adsorbés dans des sols pour les vers de terre. Pourtant, ces organismes sont importants car en tant qu'ingénieurs de l'écosystème, ils influencent la structure et la chimie du sol. Les vers de terre peuvent être affectés par des contaminants tels que l'époxiconazole (EPX), un fongicide persistant souvent utilisé en grandes cultures. Ce pesticide présente une toxicité chronique importante vis-à-vis de l'espèce résistante *Eisenia fetida* et sûrement encore plus préoccupante pour d'autres vers vivant réellement en sols cultivés et plus sensibles, comme *Aporrectodea icterica* [2].

L'objectif de notre étude était de développer et tester une méthode d'extraction douce de l'époxiconazole afin d'évaluer sa disponibilité environnementale pour *A. icterica*.

Matériels et méthodes

Après agitation pendant une nuit, les échantillons en mélange sol-extractant ont été centrifugés et le surnageant dilué. Les vers de terre exposés puis mis à jeûner ont été congelés et broyés. L'EPX a alors été extrait sous ultra-sons par un mélange eau/acétonitrile, et les extraits purifiés par la méthode QuEChERS puis sur silice.

Les analyses ont été réalisées par chromatographie liquide UHPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem en mode MRM.

Résultats et discussion

Concentration en époxiconazole dans les vers de terre

Après exposition de cinq *A. icterica* pendant 7 ou 28 jours à 1 ou 10 DA (dose agronomique) d'EPX formulé (Opus) en sol limoneux, la tendance s'est avérée identique dans tous les cas. La relation entre l'EPX total présent dans le sol (en µg/g de sol sec) et la teneur en EPX dans les vers (en µg/g de poids frais) était d'environ 33%. Ce pourcentage, assimilable à la biodisponibilité environnementale, a donc été considéré comme notre objectif de rendement pour le choix du milieu d'extraction.

Choix du milieu pour réaliser l'extraction douce

Des sols dopés ont été extraits par différents mélanges hydro-organiques ou par des solutions de cyclodextrine. Les résultats se sont révélés globalement convergents dans l'ensemble des configurations testées : sol sableux ou limoneux, enrichi en matière organique sous forme de crottin ou non, et dopé 1 ou 7 jours avant l'extraction. La plupart des mélanges eau/méthanol et eau/acétonitrile ont conduit à des rendements d'extraction largement supérieurs à l'objectif de 33% (figure 1). Nous avons choisi la solution aqueuse d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine 50 mM. Cet extractant, permettant d'obtenir un rendement assez proche de 30%, répond de plus aux critères de la norme ISO 17402 car la cyclodextrine piège l'EPX dans sa cavité.

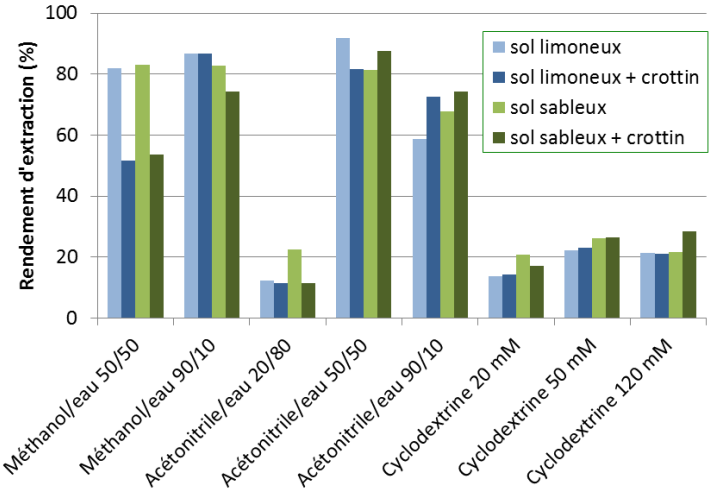


Figure 1. Rendements d'extraction de l'EPX formulé à 10 DA après 7 jours de contact, obtenus avec différents solvants doux. *(moyennes de 2 répétitions)*.

Sensibilité de la méthode aux paramètres influant sur la disponibilité de l'EPX

Pour être exploitable, la méthode d'extraction douce se doit d'être sensible aux paramètres connus pour leur influence sur la disponibilité d'un contaminant dans le sol. Qu'ils soient obtenus avec un dopage par le pesticide pur ou formulé, les résultats ont permis d'observer des différences sur l'ensemble des paramètres testés. Ainsi, le sol de texture limoneuse, plus adsorbant, conduit à des rendements systématiquement inférieurs au sol sableux (figure 2a). Les rendements diminuent également avec le vieillissement (figure 2b).

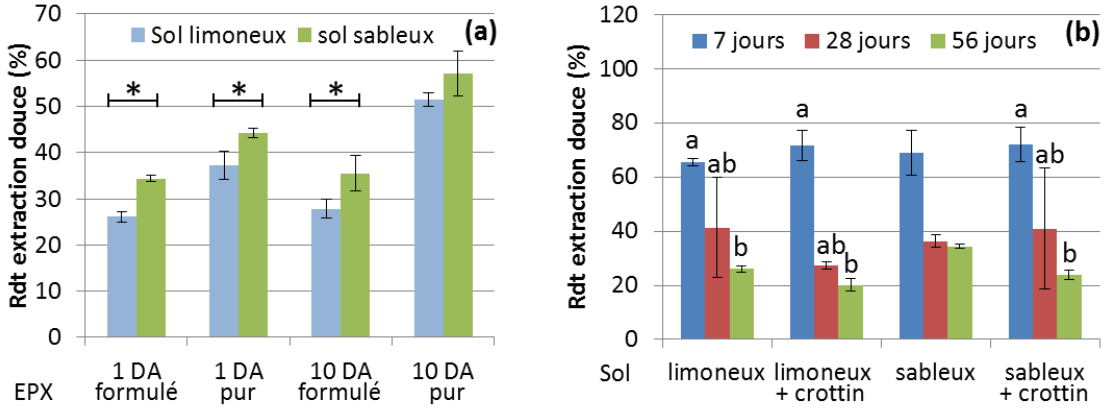


Figure 2. Rendements d'extraction de l'EPX selon la texture du sol (a, 56 jours) ou le temps de vieillissement (b, EPX formulé 1 DA). *(n=3, test Mann et Whitney (a) ou Kruskal et Wallis (b))*

Conclusion et perspectives

La méthode sélectionnée pour évaluer la (bio)disponibilité de l'époxiconazole pour les vers de terre est basée sur l'utilisation de l'hydroxypropyl-β-cyclodextrine. Elle permet d'obtenir un rendement faible, proche du ratio déterminé pour *A. icterica* exposé en conditions similaires. De plus, elle s'avère sensible aux capacités de sorption du sol et au vieillissement.

En parallèle, cette méthode est et sera utilisée pour explorer la relation entre la concentration en EPX dans le sol et ses effets délétères sur le ver (activités enzymatiques, réserves énergétiques,…).

Mots-clés : biodisponibilité, extraction douce, pesticide, sol

Références

[1] Harmsen J., 2007. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. J. Environ. Qual. 36:1420-1428.

[2] Pelosi C., Joimel S., Makowski D., 2013. Searching for a more sensitive earthworm species to be used in pesticide homologation tests – A meta-analysis. Chemosphere 90:895-900.

La modélisation graphique comme outil d'étude de la biodisponibilité des métaux pour le ver de terre

Léa Beaumelle, Isabelle Lamy, Mickaël Hedde

UR251 Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés
INRA, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex
mhedde@versailles.inra.fr

Introduction

La biodisponibilité est un concept dont il n'est pas possible de rendre compte par une unique mesure chimique ou biologique. Pourtant la biodisponibilité est centrale dans l'évaluation des risques environnementaux liés notamment aux éléments en trace métalliques présents dans les sols agricoles. Dans la littérature, les indicateurs les plus utilisés pour mesurer la biodisponibilité ne sont en fait pas hiérarchisés, apparaissent non génériques, et leur compréhension peut être faussée par des facteurs confondants. La biodisponibilité peut être décrite avantageusement comme un processus à trois étapes (Harmsen et al. 2007) : (i) la disponibilité des métaux dans le sol, (ii) leur absorption par l'organisme et (iii) les effets des métaux sur l'organisme. La modélisation graphique (telle que le SEM: modélisation par équations structurelles) représente alors un cadre d'analyse pertinent pour tester les hypothèses de causalité qui sous-tendent cette définition et à terme parvenir à identifier des jeux d'indicateurs pertinents pour mesurer la biodisponibilité.

Matériels et méthodes

Un modèle SEM a été créé sur la base de la définition en trois étapes de la biodisponibilité. Dans ce modèle, chaque étape est modélisée par une variable latente (c'est-à-dire une variable non mesurée, conceptuelle, reflétée par différentes variables observées). Les relations de causalité relient directement entre elles ces variables latentes, et non les variables observées. Le modèle reflète l'hypothèse d'une chaîne de causalité entre disponibilité, absorption et impact. Pour tester ce modèle SEM de biodisponibilité, nous avons réalisé une expérience d'exposition de vers de terre (*Aporrectodea caliginosa,* Savigny*)* en conditions contrôlées de laboratoire. Un large panel de sols prélevés *in situ* a été choisi afin de disposer d'un gradient d'exposition aux métaux réaliste notamment en Cd. La disponibilité des métaux dans les sols a été quantifiée expérimentalement (extractions $CaCl_2$) et théoriquement (modélisation semi-empirique). Les métaux absorbés par les animaux après exposition ont été quantifiés dans les vers entiers et dans trois fractions subcellulaires. Enfin des biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique ont permis d'évaluer les effets des métaux sur les vers de terre.

Résultats et discussion

Le modèle SEM a été confronté aux données expérimentales et a permis d'identifier des jeux d'indicateurs chimiques et biologiques qui vérifiaient les hypothèses d'une chaîne de causalité entre disponibilité, absorption et effets, et ce dans le contexte de sols faiblement contaminés. Le modèle SEM obtenu *in fine* pour le Cd est représenté dans la figure ci-dessous. Nous avons montré que parmi les biomarqueurs considérés pour évaluer les effets (biomasse, réserves énergétiques, activités enzymatiques…), seule l'expression de la métallothionéine vérifiait le modèle. Nos résultats confirment la pertinence de cet indicateur pour renseigner la biodisponibilité du Cd. Ils montrent de plus que ce biomarqueur est robuste aux facteurs confondants que sont les paramètres physico-chimiques du sol et la multi-contamination.

Les résultats ont mis en évidence que l'unique prise en compte des fractions disponibles du Cd (dans la solution du sol ou facilement extractible) ne suffisait pas à expliquer la relation entre teneur totale en Cd dans le sol et biodisponibilité environnementale. En effet dans le modèle, la teneur totale avait un effet direct sur la variable latente décrivant la biodisponibilité environnementale. Cela suggère que les fractions de métaux disponibles pour les vers ne sont pas uniquement des fractions solubles ou

facilement extractibles, mais également des formes plus fortement adsorbées aux constituants du sol.

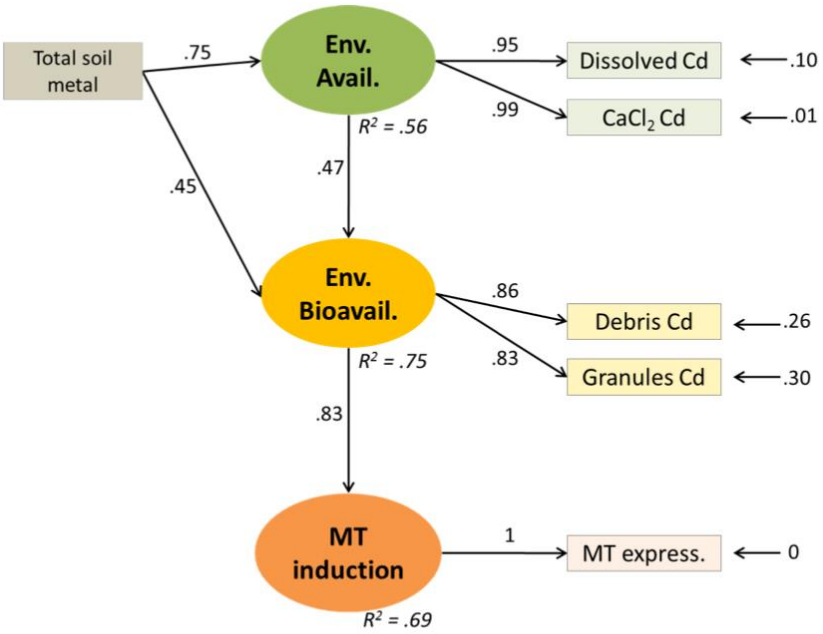


Figure. Modèle par équations structurelles (SEM) de biodisponibilité du Cd pour le ver de terre. Les variables latentes sont représentées par des ellipses et les variables observées par des rectangles. Les flèches symbolisent les relations causales et les coefficients standardisés prédits par le modèle sont donnés. La disponibilité (Env. Avail.) est mesurée par la teneur en Cd dissous dans la solution du sol (Dissolved Cd) prédite par le modèle de Sauvé et al. 2000 et par la concentration en Cd extrait au $CaCl_2$. L'absorption (Env. Bioavail.) est reflétée par la teneur en Cd dans deux fractions subcellulaires: les débris et les granules. L'impact est reflété par l'expression du gène codant la MT (métallothionéine), seul biomarqueur qui vérifiait le modèle SEM dans nos conditions.

Conclusion et perspectives

Cette étude montre la pertinence de l'approche SEM qui permet d'aller au-delà de mesures uniques représentant imparfaitement le concept de biodisponibilité et de fournir un cadre d'analyse synthétique pour évaluer la biodisponibilité dans un contexte environnemental réaliste. Un intérêt majeur du modèle est de pouvoir représenter des variables théoriques qui sont reflétées par plusieurs mesures. Cela a permis de s'affranchir des imperfections de chacune des variables observées pour modéliser chaque étape de la biodisponibilité. De plus, ce modèle présente l'avantage de rendre compte de manière synthétique des relations entre disponibilité et biodisponibilité. Ce type de modèle nécessite cependant un grand nombre d'observations. En se focalisant sur les relations causales entre les trois maillons de la chaîne de causalité qui constituent la biodisponibilité, nous avons montré que ces relations pouvaient être robustes.

Mots-clés : modélisation graphique, biodisponibilité, sol, vers de terre

Références

Harmsen, J. (2007). “Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard meth- ods”. In: J. of Environ. Qual. 36.5, 1420–1428.

Sauvé, S., W. Hendershot, and H. E. Allen (2000). “Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter”. Environ. Sc. & Tech. 34.7, 1125–1131.

Influence des sources de contamination et des caractéristiques des sols sur la biodisponibilité des métaux

Pauget Benjamin, Gimbert Frédéric, Coeurdassier Mickaël et de Vaufleury Annette

UMR 6249 Chrono-Environnement, CNRS - Université de Franche-Comté, UsC INRA
16, route de Gray, F-25030 Besançon Cedex.
benjamin.pauget@univ-fcomte.fr

Introduction

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la biodisponibilité et des transferts de métaux, de nombreux paramètres doivent être étudiés (van Gestel, 2008). En effet, les différentes sources de contamination pour un organisme et les propriétés du sol qui influent sur la mobilité des métaux dans le sol sont importantes à prendre en compte lors d'évaluations de la biodisponibilité (Pauget et al., 2012). Parmi les bioindicateurs de la qualité des sols, l'escargot (*Cantareus aspersus*) intègre de multiples sources (sol, plantes ...) et voies (digestive, cutanée ...) de contamination. Cependant, la contribution de chaque source sur la biodisponibilité des métaux et l'influence des paramètres du sol sur cette contribution n'ont jamais été étudiés en tenant compte des processus dynamiques de la biodisponibilité.

Matériel et méthode

Les cinétiques d'accumulation du Cd et du Pb ont été déterminées grâce à l'exposition d'escargots *Cantareus aspersus* (âgés de 3 mois et pesant 5,1±0,7 g) en laboratoire pendant 10 jours. Pour estimer l'influence des sources de contamination et des caractéristiques des sols des combinaisons de source (sol/végétation) et de caractéristique (pH/MO) ont été réalisées (Figure 1).



		[Cd] mg/kg	[Pb] mg/kg	pH_{eau} -	MO g/kg
Sol contaminé	7C	18.0	1980	7.29	14.8
	7P	17.9	1980	7.35	74.5
	5P	18.1	2030	4.73	80.9
Sol non contaminé	7C	0.263	33.1	7.7	15
	7P	0.21	25.6	7.6	76.4
	5P	0.221	27.2	4.93	77.7

Figure 1 : Modalité d'exposition. Pour chaque modalité, le chiffre correspond au pH et la lettre au taux de matière organique (MO) : C=control et P=enrichi. S: sol, L : Laitue. L'étoile et l'éclair représentent une contamination en Cd et en Pb.

Des prélèvements ont été réalisés après 2, 5, 7 et 10 jours d'expositions aux différentes modalités et 2, 5, 7 et 10 jours de dépuration avec sol et végétation non contaminés. Après 24h de jeûne, les escargots ont été sacrifiés et les viscères analysés par ICP-AES. Les cinétiques d'accumulation et d'élimination ont ensuite été modélisées à l'aide d'un modèle toxicocinétique (Gimbert et al., 2006).

Résultats et discussion

La modélisation des cinétiques d'accumulation (Figure 2) a permis la détermination des flux d'assimilation des escargots exposés aux sols et/ou à de la laitue contaminés. Cette étude a montré que la source principale d'assimilation du Cd était la laitue (68%), tandis que celle de Pb était le sol (90%) (Tableau 1). Ces résultats sont à mettre en relation avec les différences de disponibilité environnementale dans le sol (Pauget et al., 2011) et de biodisponibilité trophique dans la végétation (Monteiro et al., 2008) entre ces deux métaux.

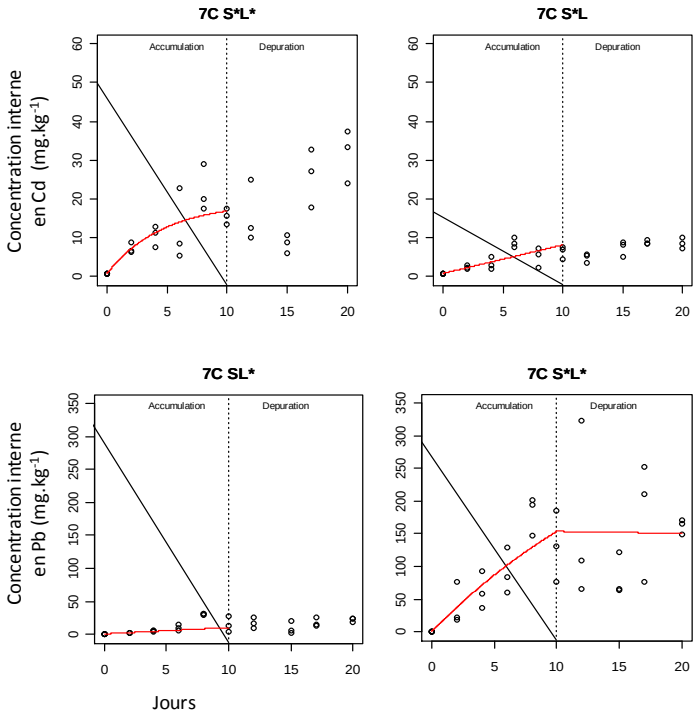


Figure 2. Exemple de cinétiques d'accumulation et de dépuration du Cd (haut) et du Pb (bas) pour l'escargot.

Une augmentation de la contribution de la laitue a été mise en évidence avec une diminution de deux unités de pH du sol (tableau 1), en relation avec l'augmentation de la solubilité du Cd et de son transfert à la laitue. Une augmentation de la contribution du sol à l'assimilation de métal a été mise en évidence probablement due à une augmentation de la consommation du sol par les escargots du sol, en relation avec une augmentation du taux de matière organique (Elmslie, 1998).

Tableau 1. Contributions relatives du sol et de la laitue à la biodisponibilité du Cd et du Pb chez *C. aspersus*.

Contribution	Soil	Metal	
		Cd (%)	Pb (%)
Sol	7C	17.1±2.54	89.5±6.98
	7P	45.9±2.70	95.6±2.25
	5P	32.6±11.6	84.4±1.64
	Moyenne	31.9±14.4	89.9±5.64
Laitue	7C	82.9±2.54	10.5±6.98
	7P	54.1±2.70	4.4±2.25
	5P	67.4±11.6	15.6±1.64
	Moyenne	68.1±14.4	10.1±5.64

Conclusion et perspectives

Cette étude, avec la quantification de la contribution des sources d'exposition sur l'assimilation des métaux, apporte de nouvelles informations nécessaires à une meilleure compréhension des processus qui modulent la biodisponibilité et le transfert des métaux chez des organismes exposés à de multiples sources de contamination. Ainsi, pour une évaluation pertinente des risques environnementaux, mesurer uniquement les niveaux de contamination totale des sols peut s'avérer insuffisant.

Mots-clés : bioaccumulation ; dépuration ; toxicocinétiques ; évaluation des risques ; *Helix aspersa*

Références

Elmslie LJ., 1998. J Mollus Stud 64, 400-401.
Gimbert F, de Vaufleury A, Douay F, Scheifler R, Coeurdassier M, Badot P-M., 2006. Environ Int. 32, 866-875.
Monteiro MS, Santos C, Soares AMVM, Mann RM., 2008. *Environ Toxicol Chem.* 27, 2548-2556.
Pauget B, Gimbert F, Coeurdassier M, Scheifler R, de Vaufleury A., 2011. *J Haz. Mat*.. 192 1804–1811.
Pauget B., Gimbert F., Scheifler R., Coeurdassier M., de Vaufleury A., 2012. *Sci. Tot. Environ*. 431 413–425
van Gestel C.A.M, 2008. *Sci. Tot. Environ*. 406, 385-395.

Identification de transporteurs impliqués dans l'absorption et la translocation de césium chez *Arabidopsis thaliana* – projet DEMETERRES

Pascale HENNER[1], Laure GENIES[1], Ludovic MARTIN[2], Nathalie PRAT-LEOHNARDT[2], Alain VAVASSEUR[2]

[1]IRSN/PRP-ENV/SERIS/Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transfert de radionucléides, Cadarache, Bât 183, B.P. 3, 13115 St Paul-lez-Durance
pascale.henner@irsn.fr
[2]CEA/DSV/IBEB/SBVME/Laboratoire de Biologie et Développement des Plantes, Cadarache, B.P.1, 13115 St Paul Lez Durance

Introduction

Suite à l'accident de Fukushima, un Plan National de Réponse à un Accident Nucléaire ou Radiologique Majeur a été élaboré en France (SGSDN, 2014). Un objectif majeur en phase post-accidentelle est la reconquête des territoires contaminés, ce qui appelle un effort de R&D particulier pour le design de solutions technologiques innovantes, réalistes et peu génératrices de déchets secondaires pour traiter de larges volumes de sols (notamment agricoles) ou effluents contaminés par les radionucléides. Le projet DEMETERRES financé dans le cadre des Investissements d'Avenir et piloté par l'ANR regroupe des organismes de recherche (IRSN, CEA, INRA…) et des industriels (VEOLIA, AREVA…) dans ce but (figure 1). IRSN, CEA et INRA travaillent plus particulièrement sur le volet phytotechnologique de ce projet, avec 2 objectifs opposés, le safe food (↓concentrations) et la dépollution (↑), en utilisant des modèles végétaux (riz, *Arabidopsis*, colza). De nombreux travaux ont été réalisés sur le transfert sol-plante de césium depuis l'accident de Tchernobyl mais se révèlent non suffisants, notamment sur la compréhension fine des mécanismes de transport *in planta*. Afin de mieux comprendre et évaluer a priori l'intensité de ces transferts, les transporteurs responsables de l'absorption et de la translocation du césium chez les plantes sont recherchés et leur fonctionnement analysé. Etant donné la proximité chimique entre le K été le Cs, ce sont les transporteurs de K qui sont visés (Figure 1). Cette présentation se propose d'une part de présenter les objectifs du projet Demeterres, volet phytotechnologique et, d'autre part, de présenter quelques résultats obtenus chez *Arabidopsis* (thèse Laure Geniès).

Matériels et méthodes

L'identification repose sur une comparaison de performances entre un écotype sauvage (Col0) et une lignée mutante. Nous avons abordé ce travail avec les mutants affectés au niveau de transporteurs de K de la famille des KUP/HAK/KT, notamment HAK5 et KUP9. En amont, la nature des lignées est vérifiée et l'obtention de lignées homozygotes est parfois un préalable nécessaire. Le phénotypage est réalisé selon deux voies. L'absorption et la translocation du Cs et/ou du K sont testées en hydroponie, qui permet également d'évaluer l'impact de paramètres du milieu sur le transfert (cations compétiteurs, pH…). Un screening des mutants vis-à-vis de paramètres de toxicité peut être également conduit in vitro ou en hydroponie, avec différentes mesures réalisées (croissance, pigments photosynthétiques…).

Résultats et discussion

La première partie du travail a consisté à qualifier la cinétique d'absorption de l'écotype sauvage vis-à-vis de la concentration croisée en K et Cs, comportement qui sera la référence pour évaluer les performances des lignées mutantes. Comme pour le K, l'absorption du Cs semble présenter un double système, saturable à [Cs] <200µM et non saturable au-delà, ce qui avait été montré chez des céréales (Shaw & Bell, 1989 ; White & Broadley, 2000). Toutefois les paramètres cinétiques (Km, Vm) varient d'une espèce à l'autre et sont différents pour le Cs et le K. Outre cette caractérisation, nous avons débuté le phénotypage de lignées mutantes.

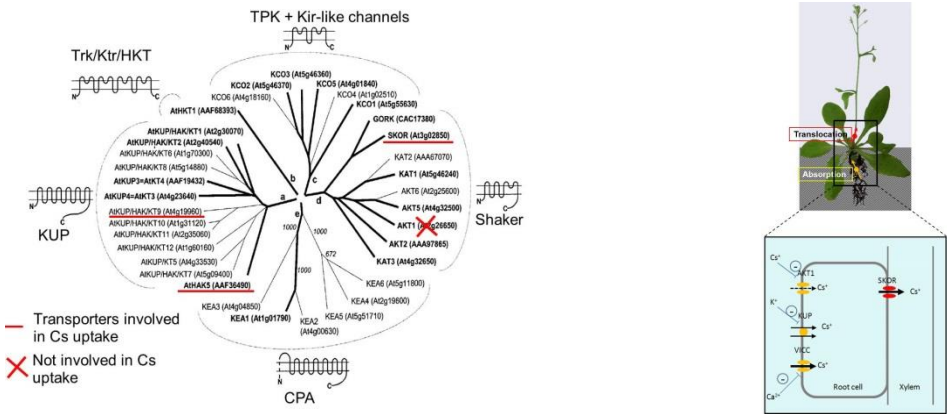


Figure 1. Arbre des transporteurs de K (d'après Mäser et al., 2001) et schéma expliquant le transport de Cs in planta (d'après White & Broadley, 2000).

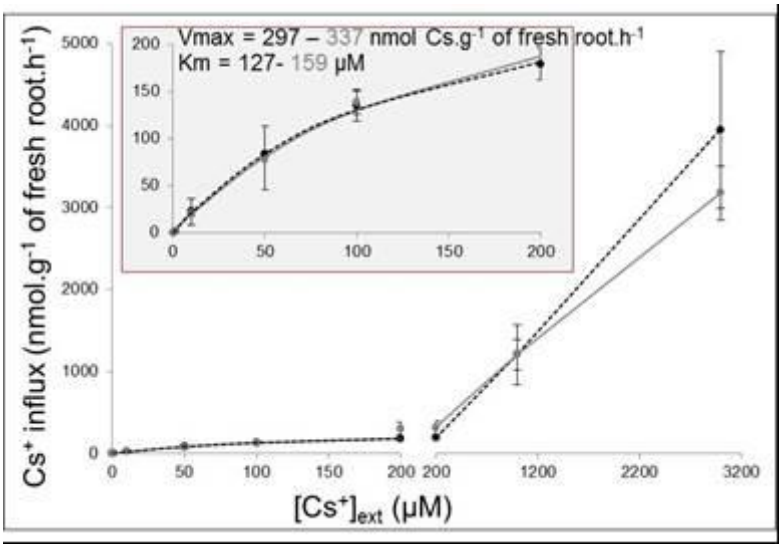


Figure 2. Absorption de Cs après 15 min en fonction de la concentration de Cs et du niveau de K dans la solution nutritive (100 µM en gris, 3 mM en noir).

Conclusion et perspectives

Ces recherches fondamentales, faisant appel à des mutants type OGM, ont pour but d'identifier les structures génétiques sur lesquelles concentrer les recherches chez les espèces d'intérêt agronomique (transposition) pouvant aller jusqu'à la sélection de génotypes adaptés sociétalement acceptables (ex. safe food, plantes non OGM). Des tests en grandeur réelle seront possibles, notamment chez le riz.

Mots-clés : césium, plantes supérieures, transfert, transporteurs, potassium

Références

Mäser et al. (2011) Plant Physiology **16**(4) : 1646-1667.
SGDSN (2014) Plan National de Réponse à un Accident Nucléaire ou Radiologique Majeur, n° 200/SGDSN/PSE/PSN, Février 2014.
Shaw and Bell (1989) Journal of Environmental Radioactivity **10**(3): 213-231.
White and Broadley (2000) New Phytologist **147**(2): 241-256.

Évaluation de la phytotoxicité d'un sol contaminé en Cu géré par stabilisation in situ : le cas des biochars

Nadège OUSTRIERE, Lilian MARCHAND, Joseph William GALLAND, Lunel GABBON, Michel MENCH

UMR BIOGECO INRA 1202, Ecologie des communautés, Université de Bordeaux, bat.B2, allée G. St-Hilaire, CS 5003, 33615, Pessac, et 69 Route d'arcachon, 33612, Cestas, France
oustriere.nadege@gmail.com

Introduction

En France, 838 sites sont référencés comme étant contaminés au Cu. Dans de nombreux cas, dont les sites de traitement du bois, la contamination du sol résulte de l'utilisation de produits cuivrés, e.g. $CuSO_4$, CCA, etc., aux propriétés fongicides. Ces sites sont des sources secondaires de contaminations diffuses pouvant générer des expositions aux effets toxiques pour les organismes des milieux récepteurs. La stabilisation *in situ* permet d'immobiliser des éléments traces (ET) dans le sol via l'ajout d'amendements. Elle vise à diminuer la migration horizontale ou verticale (lixiviation) des contaminants par réduction du pool labile et limite l'exposition des compartiments biologiques de la rhizosphère. Le biochar est le résultat de la pyrolyse (traitement thermique) de biomasse, en milieu à faible teneur en oxygène. L'application de biochar permet d'augmenter la surface réactive nette du sol, améliore la respiration microbienne, modifie le pH et la capacité d'échange cationique (CEC). Ces propriétés aident aussi à la rétention de nutriments, d'eau et de contaminants organiques et inorganiques. L'objectif est d'évaluer l'efficacité de 2 types de biochar, d'origine animale et végétale, à faciliter la croissance de plantes sur un sol d'un site de traitement du bois contaminé au Cu, à l'aide d'un biotest en conditions contrôlées sous serre.

Matériels et méthodes

Le sol (0-25 cm) a été prélevé sur un site de traitement du bois, en France (FR pH 6,2) contaminé au Cu par le lessivage de bois traités au $CuSO_4$ puis au CCA de type C. Un sol non contaminé a été collecté dans un jardin (CTRL, pH 5,6, 45 mg Cu/kg, Gradignan, France). Le sol contaminé non traité (Unt, 964 mg Cu/kg) est comparé au même sol amendé par du biochar provenant de biomasse d'origine végétale (VB, écorce de pin) ou animale (AB, fientes de poulet) au taux de 1% ou 2,5%. Les sols sont placés en pot (1 kg). La phytotoxicité des sols a été quantifiée à l'aide d'un biotest. Après le semis de 4 graines de *Phaseolus vulgaris*, la vitesse de développement des plantules est quantifiée pendant 14 jours en attribuant une note de 1 à 4 pour le stade de développement de chacune des 4 plantes du pot. Après 15 jours de croissance, les parties aériennes et racinaires ont été récoltées et pesées, puis analysées.

Résultats et discussion

Quelle que soit l'origine du biochar ajouté, des symptômes de toxicité tels que l'absence de germination, la courbure accentuée des feuilles ainsi que la nécrose des jeunes surfaces foliaires étaient visibles au niveau phénotypique. Le taux d'apport de biochar au sol et l'interaction entre le type de biochar, VB ou AB, et ce taux influencent la survie des haricots, i.e. p-values: 8,03 x 10^{-4} et 0,04 (Fig. 1). Le taux de survie des haricots est nul avec 2,5 % d'AB et s'étale entre 0,7 et 1 pour les autres modalités d'amendement.

Type de Biochar	Quantité de Biochar (%)	Taux de survie
Animal	0	0,7 ± 0,1
	1	0,8 ± 0,3
	2,5	0,0 ± 0
Végétal	0	1,0 ± 0
	1	1,0 ± 0
	2,5	0,9 ± 0,1

Fig. 1 : Taux de survie des haricots cultivés sur le sol contaminé en Cu, amendé ou non avec du biochar végétal ou animal : 0%, 1%, ou 2,5%. Valeurs moyennes pour chaque traitement (n=3).

Quelle que soit l'origine et les concentrations de biochar ajoutées (0, 1, et 2,5%), les vitesses de croissance des haricots sont le plus souvent similaires à celle pour le sol Ctrl (Fig. 1). Après 15 jours de croissances, les haricots ont atteint le stade 4 de croissance. Seul l'ajout de 2,5% d'AB empêche la germination des graines qui reste au stade 0. L'augmentation du taux de VB ajouté au sol

contaminé cause une légère croissance de la production de biomasses racinaires et aériennes des haricots (Fig. 2). A 2,5% de VB, les valeurs de biomasses racinaires et aériennes restent inférieures à celles pour le sol contrôle. A l'inverse, l'augmentation du pourcentage d'AB au sol contaminé fait diminuer progressivement les biomasses racinaires et aériennes des haricots. Avec 0 et 1% d'AB, les biomasses racinaires et aériennes diminuent d'une amplitude maximale de 0,02 g pot^{-1} mais avec 2,5% d'AB les haricots ne germent pas.

Fig. 1

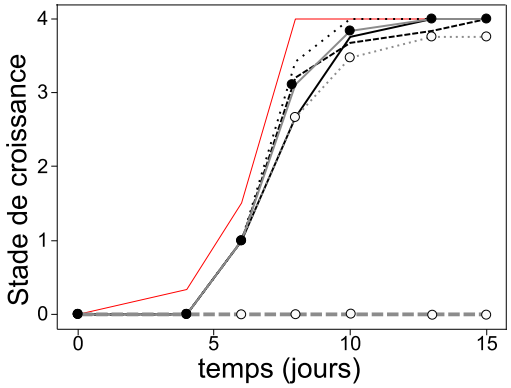


Fig. 2 : Stades de croissance des haricots cultivés sur le sol contaminé en Cu et sur sol contrôle (rouge), amendé ou non avec du biochar végétal (noir) ou animal (gris): 0% (lignes), 1% (pointillés), ou 2,5% (tirets). Valeurs moyennes pour chaque traitement (n=3).

Fig. 2

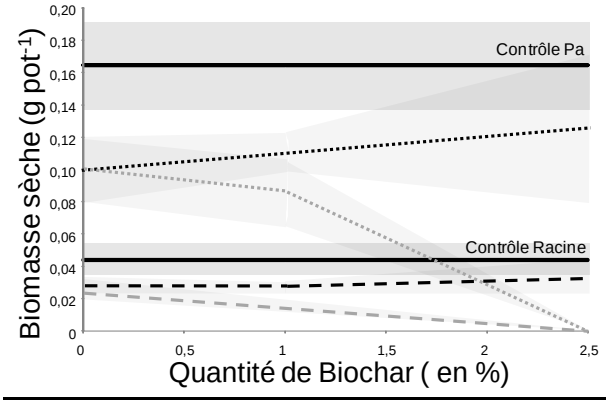


Fig. 3 : Biomasse sèche (en g pot^{-1}) des racines (tirets) et des parties aériennes (pointillés) des haricots pour le sol contaminé amendé ou non avec du biochar végétal (noir) ou animal (gris). Valeurs moyennes pour chaque traitement (n=3).

Conclusion et perspectives

L'apport d'AB a diminué la vitesse de croissance et la production de biomasses racinaires et aériennes du haricot. Ce biochar peut contenir des composés phytotoxiques limitant la germination des graines et le fonctionnement des racines. Le taux de germination diffère selon l'origine et le protocole de fabrication du biochar apporté au sol. Les biochars d'origine animale sont connus pour contenir des quantités importantes de contaminants organiques (e.g. HAP) et d'éléments traces (e.g. Cu et Zn). Lors de la pyrolyse ou de la combustion, des contaminants organiques peuvent se former et les contaminants inorganiques s'accumulent dans la phase solide produite. L'effet négatif sur la production de biomasses racinaires et aériennes pourrait être aussi attribué à une moindre disponibilité de l'azote (N). L'augmentation du taux d'apport de VB au sol UNT a augmenté la production de biomasses racinaires et aériennes de *P. vulgaris*. L'ajout de ce biochar a pu diminuer le pool labile de Cu et donc l'exposition au Cu de *P. vulgaris.* Ceci sera exploré avec les analyses des ET dans la solution du sol et les parties aériennes de *P. vulgaris*. Selon nos résultats, il serait préférable d'utiliser un biochar végétal plutôt qu'animal pour ce sol contaminé en Cu et d'apporter une quantité importante (i.e. 2,5%).

Mots-clés : cuivre, biochar, phytotoxicité, stabilisation in situ, phytomanagement

Evaluation des risques et options de phytoremediation proposées dans le cadre d'un sol urbain contaminé par les éléments traces et les HAP

Lilian MARCHAND, William GALLAND, Nadège OUSTRIERE,
Celestino QUINTELA-SABARIS, Michel MENCH

UMR BIOGECO INRA 1202, Ecologie des communautés, Université de Bordeaux, bat. B2, allée G. St-Hilaire, CS 5003, 33615 Pessac, France
marchand.lilian@gmail.com

Introduction

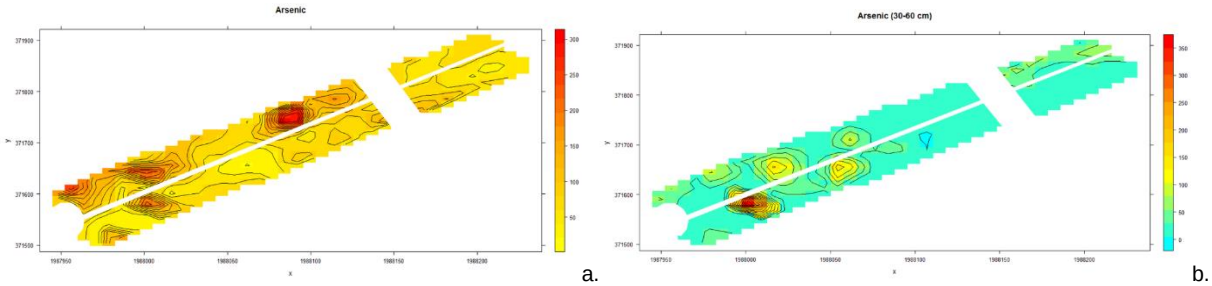
L'utilisation de zones d'activités industrielles situées à proximité d'un centre-ville a abouti, au siècle dernier, à la contamination des sols par des éléments traces (ET) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Cette source secondaire de contaminants pourrait engendrer des voies d'exposition et une probabilité de risque pour les populations, en particulier dans le cas de la conversion de ces friches industrielles en zones de loisirs. La phytoremédiation - basée sur l'utilisation d'assemblages plantes/micro-organismes - est une technique à faible coût et respectueuse de l'environnement qui s'avère efficace pour éliminer et /ou stabiliser les ET/HAP dans les sols contaminés. Dans cette étude, les voies d'exposition et les excès de risques individuels ont été évalués sur un ancien site industriel voué à être reconverti en un parc urbain.

Matériels et méthodes

Les concentrations en ET ont été mesurées dans l'eau interstitielle du sol (Rhizons), dans les parties aériennes de *Medicago sativa* et *Populus nigra* en croissance *in situ* ainsi que dans les parties aériennes de plants de *Phaseolus vulgaris* après une exposition de 14 jours en conditions contrôlées (Biotest). Les teneurs totales en ET/HAP ont été cartographiées à l'échelle du site. Les teneurs totales en ET et HAP dans les sols du site (en mg kg sol: As 4-360, Cu 5-6000, Cd 0.5-13.4, Zn 10-22300, ∑HAP 0.8-330) sont supérieures aux valeurs fréquentes dans les sols sableux français. Le pH du sol est alcalin (pH > 8).

Résultats et discussion

La contamination du sol en ET et en HAP est surtout localisée dans l'horizon de surface (0-30 cm). Le sous-sol (30-60 cm) présente un patron de contamination similaire, avec cependant des concentrations en ET et HAP inférieures à celles observées en surface (Fig. 1) La migration des ET depuis les phases porteuses du sol vers l'eau interstitielle est faible au droit du site. Le ionome foliaire des trois espèces végétales considérées présente des valeurs similaires aux concentrations foliaires fréquentes dans les parties aériennes de plantes (Blum et al., 2012).



a. b.

Figure 1. Variabilité spatiale de la concentration totale en ETM (cas de l'Arsenic) dans a. l'horizon de surface (0-30 cm) du sol et b. l'horizon 30-60 cm (mg/kg MS sol)

Conclusion et perspectives

Le biotest réalisé sur *P. vulgaris* n'a pas montré d'effet délétère sur la croissance des plants, et ce quelle que soit la parcelle considérée. Les ionomes foliaires de *M. sativa* et *P. nigra* n'étaient pas supérieurs aux valeurs fréquentes dans les parties aériennes de plantes (Blum et al., 2012). Cette absence d'effet délétère peut être mise en relation avec des concentrations en ET dans les eaux interstitielles voisines de celles observées dans les sols sableux non contaminés. Le pH alcalin du site a limité la mobilité des ET vers ces eaux interstitielles La cartographie des risques liés à l'ingestion de terre par les jeunes enfants a cependant mis en évidence un risque lié à cette exposition aux ET. Des options de phytorémediation ont donc été proposées pour réduire les voies d'exposition potentielles (i.e., ingestion de terre par les jeunes enfants, envol particulaire). Les espèces proposées sont *Populus nigra*, *Festuca pratensis* et *Agrostis capillaris*, connues pour leur tolérances aux ET. *Medicago sativa* a également été proposée après un premier test de croissance, positif, *in situ* pour sa capacité à enrichir le sol en N, permettant ainsi une reprise de l'activité des micro-organismes qui participent à leur tour la dégradation des HAP et à la stabilisation des ET. Cette technique favorisera la phytoextraction de certains ET (Cd, Zn, Mo, Ni dans les feuilles de *P. nigra*) et leur phytostabilisation (Cu et Pb dans la rhizosphère de *P. nigra* et des graminées) ainsi que la rhizodégradation des HAP (Rhizosphère de l'ensemble des espèces, dont celle de *M.sativa*). A l'issue de la première saison de végétation le couvert végétal a été rétabli sur l'ensemble du site, dominé par *M. sativa*. Un premier relevé botanique a permis de recenser un total de 72 espèces sur le site en juin 2014.

Mots-clés : phytoextraction, phytostabilisation, restauration écologique, rhizodégradation

Références

Blum WEH., Horak O., Mentler A. and Puschenreiter M. 2012. UNESCO – EOLSS Environmental and Ecological chemistry – Vol.II – Trace elements. http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-13-03-04.pdf

Analyse du transcriptome pour évaluer la biodisponibilité des polluants dans des mélanges chez *Elodea nuttallii*

Claudia COSIO[1], Nicole REGIER[2]

[1]Institut F.-A. Forel, Université de Genève, CH-1290 Versoix, Suisse.
Claudia.Cosio@unige.ch

Introduction

Dans le contexte de l'écotoxicologie, l'utilisation des gènes comme première réponse observable d'un organisme à un stress est envisagée compte tenu de sa rapidité et sensibilité par rapport à des tests classiques (croissance, reproduction). Nous avons effectué une analyse de RNAseq sur *E. nuttallii* exposée à des concentrations croissantes de Hg, MMHg, Cd et Cu pour analyser la réponse globale de la plante et aussi identifier des gènes biomarqueurs d'exposition aux métaux (Regier et al., 2013, Flück et al, 2014).

Matériels et méthodes

Exposition

Pour le RNAseq, des tiges de 10 cm ont été exposées 24 h à 500 µg/L et 5 mg/L $CdCl_2$, 200 ng/L, 80 µg/L and 1 mg/L $HgCl_2$. Pour le nCounter: contrôle, 10, 50 and 200 ng/L $HgCl_2$, 200 µg/L $HgCl_2$, 30 ng/L CH_3HgCl, 200 ng/L $HgCl_2$ + 30 ng/L CH_3HgCl, 65 ng/L and 325 µg/L $CuCl_2$, 200 ng/L $HgCl_2$ + 65 ng/L $CuCl_2$, 500 µg/L $CdCl_2$ and 200 ng/L $HgCl_2$ + 500 µg/L $CdCl_2$, des sédiments (concentration Hg 1.8±0.03 mg/kg), salinité (4 g/L NaCl), température (10°C), obscurité, exposition sur le terrain (Babeni ; Roumanie) à 1, 4 and 6 m correspondant à 3.63±0.12, 2.9±0.96, 3.09±0.61 and 0.30±0.05 ng/L Hg respectivement.

RNAseq

L'ARN a été purifié par TRI-reagent (Sigma) suivi de RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Les échantillons ont ensuite été traités avec le mRNA-Seq sample prep kit (Illumina). Les cDNA sont ensuite séquencés avec Illumina Solexa flow cell et the Chrysalis 36 cycles sequencing kit pour 2x54 cycles (contrôle, 200 ng/L $HgCl_2$, 500 µg/L $CdCl_2$, 5 mg/L $CdCl_2$) et 75 cycles (contrôle, 80 µg/L $HgCl_2$, 1 mg/L $HgCl_2$). Le transcriptome *de novo* a été assemblé avec VELVET (OASES) avec une taille moyenne de 200 bp et un hash de 31. La quantification se fait avec le programme MAQ.

NanoString nCounter

79 gènes ont été choisis, puis 200 ng ARN purifié ont été hybridé. Les données ont été analysées avec le programme Genesis.

Résultats et discussion

Au total 181'663 contigs ont été assemblés et 39'434 annotés. Nous avons ensuite sélectionné les gènes régulés ≥ 2 fois après l'exposition au métal en fonction de la dose. Différentes conditions ont été testées (lumière, température, pH, salinité et mélange de métaux) et les plantes ont également été exposées sur le site contaminé de Babeni, puis l'expression des gènes sélectionnés analysée par nCounter. Le profil d'expression des gènes est un biomarqueur d'exposition aux métaux efficace notamment dans les échantillons environnementaux complexes pour lesquels il a été ≥100 fois plus sensible que d'autres paramètres (bioaccumulation, photosynthèse, croissance). Nous avons pu différencier statistiquement les plantes exposées à des concentrations élevées en métaux (µg L^{-1}), à des concentrations de métaux faibles (ng L^{-1}), et à d'autres paramètres environnementaux (lumière, salinité, température ; Fig 1). Le niveau d'expression des gènes sélectionnés est de plus statistiquement corrélé à la concentration de Hg à partir de 0,056 ng L^{-1} Hg, bien en dessous du seuil actuel pour les risques environnementaux de ce métal.

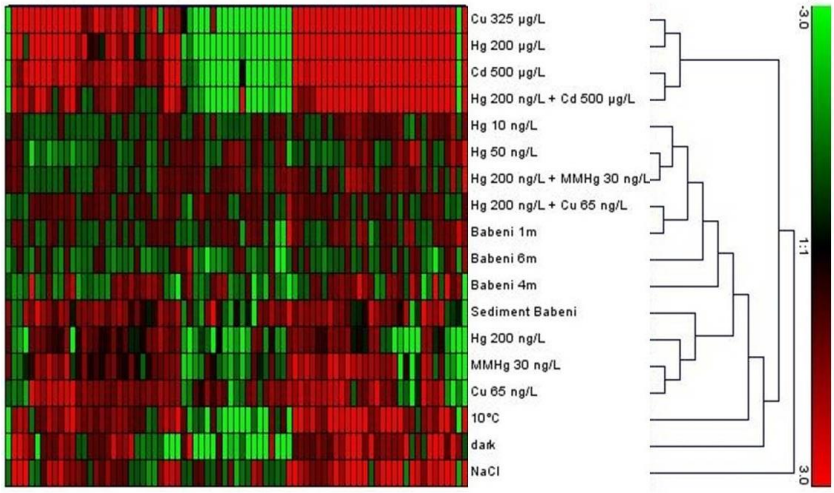


Figure 1. Analyse par regroupement hiérarchique de l'expression des gènes de *E. nutallii* induits (rouge) ou réprimés (vert) en réponse à différentes concentrations de métaux ou de mélanges complexes au laboratoire et sur le terrain.

Conclusion et perspectives

Ces travaux confirment que la transcriptomique est très sensible et que sa rapidité en fait un outil prometteur pour déterminer l'exposition des organismes et la quantité biodisponible de polluants dans l'environnement.

Mots-clés : biodisponibilité, macrophytes, mélanges, métaux, transcriptome

Références

Regier N., Baerlocher L., Münsterkötter M., Farinelli L., **Cosio C.*** (2013) Analysis of the *Elodea nuttallii* transcriptome in response to mercury and cadmium pollution: development of sensitive tools for rapid ecotoxicological testing. ***Env Sci Tech*** 47:8825-8834.

Flueck R., Slaveykova V.I., and **Cosio C.** (2014) Uptake kinetics of inorganic and methyl mercury by two representative aquatic primary producers. *Proceedings* in *SETAC*. Basel, Switzerland.

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA

***Domaine de Françon*, Biarritz, 25-27 novembre 2014**

Session 2

Ecodynamique des contaminants

Impacts de l'origine et du traitement de produits résiduaires organiques valorisés en agriculture sur le devenir et la disponibilité des antibiotiques entrant dans les sols cultivés

Anaïs GOULAS[1], Valérie BERGHEAUD[1], Sabrina FERHI[1], Valérie DUMENY[1], Sylvie NELIEU[2], Marjolaine DESCHAMPS[1], Sabine HOUOT[1], Claire-Sophie HAUDIN[1], Pierre BENOIT[1]

[1]UMR 1091 Environnement Grandes Cultures, INRA-AgroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon
[2]UR 251 Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés, INRA, F-78026 Versailles Cedex
agoulas@grignon.inra.fr

Introduction

Les antibiotiques prescrits en santé humaine et vétérinaire sont retrouvés dans les boues de station d'épuration et les effluents d'élevage dans des gammes de teneurs variables (100-1000 $\mu g.kg^{-1}$ matière sèche (MS) ; 3500-9000 $\mu g.kg^{-1}$ MS, respectivement). La valorisation agronomique de ces produits résiduaires organiques (PRO) conduit à une contamination chronique des sols cultivés par de faibles quantités d'antibiotiques. Ces substances peuvent perturber le fonctionnement microbien des sols et les processus associés, mais aussi conduire à l'acquisition d'une antibiorésistance avec un risque à long terme de dissémination de celle-ci [1]. De tels impacts sur les micro-organismes dépendent a priori de la fraction biodisponible d'antibiotiques dans le sol [2,3]. Les traitements des PRO, en particulier le compostage, peuvent diminuer les concentrations en antibiotiques dans les PRO et modifier leur disponibilité au sein de la matrice ainsi que leur devenir dans les sols après épandage. Les objectifs de cette étude sont de caractériser en conditions contrôlées, à l'aide d'extractions chimiques douces, l'évolution de la (bio)disponibilité de deux antibiotiques introduits dans un sol cultivé lors de l'apport de deux PRO (compost de boue et de déchets verts (DVB) et fumier de bovin (FUM)).

Matériels et méthodes

Deux antibiotiques ont été sélectionnés dans cette étude : le sulfaméthoxazole (SMX) et la ciprofloxacine (CIP). Après contamination du PRO (DVB et FUM) par l'antibiotique marqué au carbone 14 (^{14}C-SMX : 0,74 $mg.kg^{-1}$ MS ; ^{14}C-CIP : 4,97 $mg.kg^{-1}$ MS), celui-ci a été incorporé aux sols étudiés (site QualiAgro, Feucherolles, Véolia-INRA). L'incubation a été réalisée durant 28 jours à 28°C. La minéralisation des antibiotiques et celle de la matière organique des mélanges sol/PRO ont été suivies au cours de l'incubation par les mesures du $^{14}C\text{-}CO_2$ et du $C\text{-}CO_2$ total dégagé. La disponibilité de chacun des antibiotiques a été évaluée dans les mélanges sol/PRO à T_0, T_7 et T_{28} (jours) à l'aide d'extractions douces réalisées avec différentes solutions aqueuses présélectionnées. Cette première extraction a été suivie d'une seconde avec un mélange acétonitrile/eau afin d'extraire une fraction plus importante de résidus d'antibiotiques. Enfin, la combustion des échantillons secs a été effectuée dans le but de quantifier la fraction de résidus non extractibles.

Résultats et discussion

Concernant le ^{14}C-SMX dans la modalité sol/DVB (Fig. 1), des quantités importantes de résidus non extractibles sont formées à 28 jours et la fraction minéralisée reste très faible (2%) en fin d'incubation, ce qui pourrait refléter une biodisponibilité limitée pour les micro-organismes. En effet, la disponibilité du ^{14}C-SMX diminue rapidement au cours des sept premiers jours. Le choix de l'extractant ($CaCl_2$, EDTA, 2-hydroxypropyl-β-Cyclodextrine (HPCD)) impacte plus les proportions relatives de résidus extraits par les différentes solutions aqueuses et par le mélange à base d'acétonitrile que la proportion de résidus non extractibles, suggérant bien que ces résidus sont immobilisés de façon non réversible.
L'évolution des fractions extraites est similaire dans les mélanges sol/FUM, avec cependant une fraction de résidus non extractibles plus importante au bout de 28 jours. La minéralisation de la

matière organique étant plus importante pour la modalité FUM (8% et 26% du carbone organique apporté par le DVB et le FUM, respectivement à 28 jours), la stimulation de l'activité microbienne pourrait participer aux quantités plus importantes de résidus non extractibles pour cette modalité.

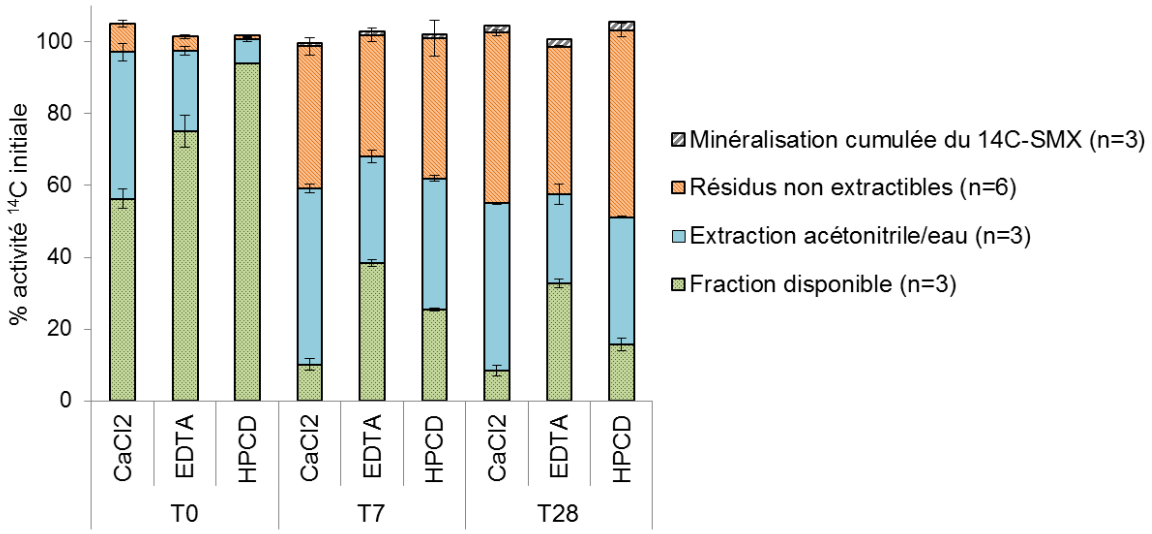


Figure 1. Répartition de la radioactivité du ^{14}C-SMX en fonction du temps dans les mélanges sol/DVB

Contrairement au ^{14}C-SMX, la disponibilité de la ^{14}C-CIP est très faible dès T_0 puisque les fractions extraites par les solutions aqueuses de tétraborate de sodium, d'EDTA ou de HPCD sont inférieures à 7% dans les deux modalités de mélange sol/PRO. La formation de résidus non extractibles s'effectue donc de façon très rapide, dès le contact de l'antibiotique avec la matrice. La minéralisation de la ^{14}C-CIP ne dépasse pas 1% du carbone 14 apporté initialement, ce qui renforce l'hypothèse d'une biodisponibilité très faible de cet antibiotique.

Conclusion et perspectives

Les extractions douces réalisées à l'aide des différentes solutions aqueuses montrent des disponibilités bien supérieures du sulfaméthoxazole par rapport à la ciprofloxacine. Ces composés pharmaceutiques se trouvant sous différentes formes chimiques selon le pH des matrices (sol, PRO, solutions d'extraction), la disponibilité de ces antibiotiques dépend donc de ce facteur. Leurs comportements dans les sols cultivés de même que leurs impacts potentiels sur les communautés microbiennes seront différents. La recherche des produits de dégradation des antibiotiques dans les différents extraits est en cours de réalisation afin de suivre leur évolution au cours du temps et ainsi caractériser les transformations possibles. Parallèlement, des bio-essais microbiens mis en place dans des conditions d'incubation similaires permettront, au travers d'une analyse des relations dose - réponse, de confronter les effets à la disponibilité des antibiotiques et de leurs dérivés dans les mélanges sol/PRO, et d'identifier les fractions impactantes.

Mots-clés : devenir, (bio)disponibilité, antibiotiques, sols, produits résiduaires organiques

Références

[1] Jechalke S., Heuer H., Siemens J., Amelung W., Smalla K. 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. Trends Microbiol. 22:536-545.

[2] Harmsen J. 2007. Measuring Bioavailability: From a Scientific Approach to Standard Methods. J. Environ. Qual. 36:1420-1428.

[3] Semple K.T., Doick K.J., Wick L.Y., Harms H. 2007. Microbial interactions with organic contaminants in soils: Definitions, processes and measurement. Env. Pol. 150:166-176.

Remerciements : Projet CEMABS (ANR CESA 2013) et DIM ASTREA (Région Ile-de-France)

Devenir et transfert des cyanotoxines de type microcystine dans un système sol-plante

Sylvain CORBEL[1], Christian MOUGIN[2], Sylvie NELIEU[2], Ghislaine DELARUE[2], Noureddine BOUAICHA[1]

[1] UMR 8079 Laboratoire ESE, UPS CNRS AgroParisTech, Bât 362, F-91405 Orsay Cedex
[2]UR251 Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés
INRA, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex
sylvain.corbel@u-psud.fr

Introduction

La présence de cyanobactéries dans les eaux de surface est souvent accompagnée de la production d'une grande quantité de cyanotoxines. Ces cyanotoxines induisent des effets néfastes sur certains organes de mammifères. Parmi elles, la microcystine leucine-arginine (MC-LR) est l'hépatotoxine la plus communément retrouvée dans l'environnement. Elle inhibe les protéines phosphatase de type 1A et 2A (MacKintosh et al., 1990). Récemment, des études ont porté sur les effets phytotoxiques des microcystines (Corbel et al., 2014b). A notre connaissance, le devenir des microcystines dans un sol agricole et l'éventuel transfert vers des plantes maraîchères, lors d'une irrigation avec des eaux contaminées, reste peu étudié. Un des objectifs de notre travail est d'approfondir nos connaissances sur le devenir et le transfert de MCs, après irrigation du sol, vers la tomate (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom). Ainsi, dans un premier temps une MC-LR marquée au carbone 14 (^{14}C-MC-LR) a été utilisée afin de caractériser le devenir de cette toxine dans le sol et le transfert à la plante. Dans un second temps, une approche environnementale où un sol agricole était irrigué, de façon chronique, avec des concentrations réalistes d'extrait de cyanobactéries issu de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) a été mise en place pour déterminer le devenir et le transfert des MCs dans un système sol-plante. Au plan finalisé, le transfert et l'accumulation dans les plantes permettrait de préciser le risque sanitaire associé à l'irrigation de plantes maraîchères avec des eaux contaminées en microcystines.

Matériels et méthodes

Les cultures de *Microcystis aeruginosa* (PCC7820, Institut Pasteur, France), ont permis la biosynthèse des cyanotoxines utilisées lors de nos expérimentations. D'une part, un précurseur marqué au carbone 14 (^{14}C-$NaHCO_3$) introduit dans le milieu de culture a permis la synthèse de ^{14}C-MC-LR. D'autre part, l'extrait brut de cyanobactéries constitué d'un ensemble de MCs a permis de mettre en place des expérimentations en conditions environnementales. Le sol utilisé était un sol prairial sableux (Pierre Plate, Versailles), subissant 1 ou 2 apports de ^{14}C-MC-LR et laissés incubés jusqu'à 56 jours ou bien un apport quotidien d'extrait de cyanobactéries à des concentrations comprises entre 5 et 100 µg équiv. MC-LR L^{-1}, pendant une durée de 90 jours. La capacité d'adsorption des toxines radioactives aux éléments du sol agricole a été estimée suite à des extractions successives ($CaCl_2$, EDTA, MeOH) et les échantillons étaient ensuite analysés par scintillation liquide et HPLC ou par combustions. La caractérisation du transfert de la ^{14}C-MC-LR vers la tomate MicroTom a été étudiée après culture de la tomate MicroTom en hydroponie. Enfin après expositions à des concentrations environnementales en MCs du système sol-plante, pendant 90 jours, des extraits de sol et de plantes ont été analysés en UHPLC-MS/MS et par test d'inhibition de la protéine phosphatase de type 2A afin d'identifier et de quantifier le transfert des toxines du sol vers les plants de tomate.

Résultats et discussion

Nos résultats concernant le devenir des ^{14}C-MC-LR dans le sol agricole indiquent que ces toxines sont faiblement biodégradées par les microorganismes du sol (minéralisation<11%) et possèdent un temps de demi-vie supérieur à 56 jours. D'autre part ces toxines sont faiblement adsorbées au sol avec une part non-extractible inférieure à 14% de l'apport initial et sont propices au lessivage lors

d'épisodes pluvieux (**Fig. 1**). De même après 90 jours d'irrigation, des toxines conservant leurs propriétés toxiques sont retrouvées dans le sol à des concentrations de 4 ng g^{-1} sol sec. Quant au transfert des ^{14}C-MC-LR vers des tomates maintenues en hydroponie, nous l'avons quantifié avec une accumulation croissante des toxines dans les organes racines>feuilles>tiges dont une partie des toxines sont, soit sous forme liée, soit sous forme libre. Lors de cultures de tomates sur sol, le transfert des toxines dans la plante a aussi lieu dans les racines et dans les feuilles, cependant les toxines ne semblent pas atteindre les parties comestibles de la plante (fruits).

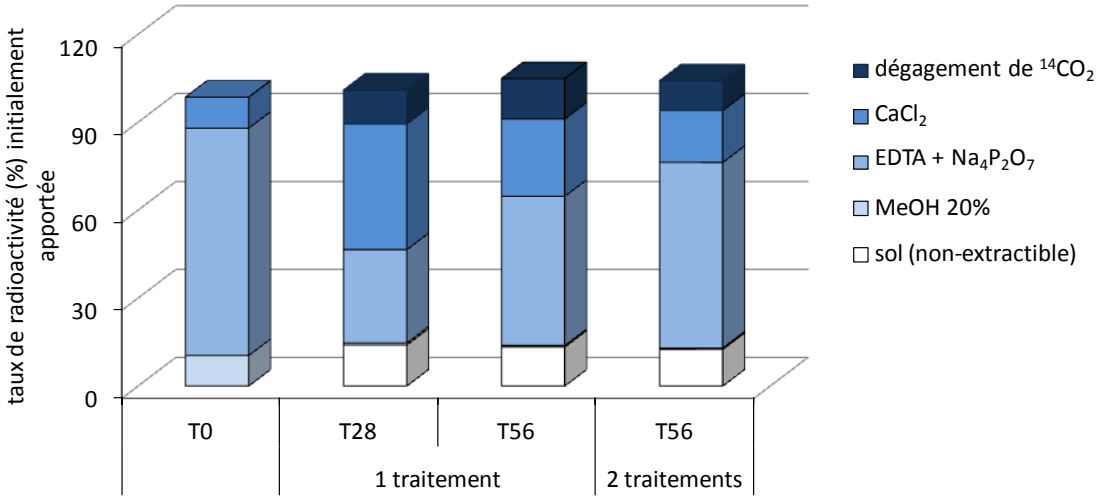


Figure 1. Histogramme illustrant des différentes fractions de carbone 14, minéralisé, extrait au $CaCl_2$ (0,01 M), à l'EDTA+pyrophosphate de sodium (0,1 M), au MeOH 20% ou encore la part non extractible pour une colonne de sol mise à incuber 1 h (T0), 28 jours (T28), 56 jours (T56) avec 1 ou 2 apports à 28 jours d'intervalle (respectivement 21 ou 42 Bq g^{-1} sol sec)(Corbel et al., 2014a)**.**

Conclusion et perspectives

Les microcystines semblent peu biodégradées dans le sol et facilement biodisponibles pour la plante qui en absorbe au niveau racinaire. Cependant si les toxines s'accumulent dans les feuilles, aucune trace de toxine n'est trouvée dans les parties comestibles de la plante. Ainsi le risque sanitaire d'une contamination de la chaine trophique lors d'une irrigation avec des eaux contaminées semble négligeable.

Mots-clés : microcystines, sol, tomate, devenir, transfert

Références

Corbel, S., Bouaïcha, N., Mougin, C., 2014a. Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil. Environ. Chem. Lett. 1–7.
Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014b. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. Chemosphere 96, 1–15.
MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett. 264, 187–192.

Remerciements : S. Corbel remercie le DIM Astrea (Région Ile-de-France) pour le financement de son doctorat.

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA

***Domaine de Françon*, Biarritz, 25-27 novembre 2014**

Session 3

Evaluation du risque environnemental (effet directs et indirects sur la physiologie, le comportement, la dynamique des pops et des communautés).

Lien entre la phylogénie des diatomées et leur sensibilité aux herbicides

François KECK, Floriane LARRAS, Frédéric RIMET, Bernard MONTUELLE, Agnès BOUCHEZ

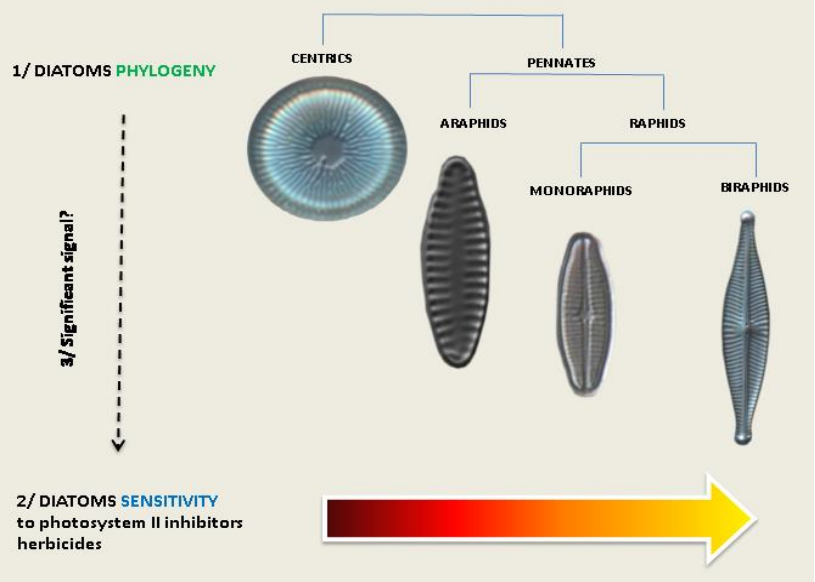
INRA, UMR CARRTEL, 75 av. de Corzent, BP 511, F-74203 Thonon-les-Bains cedex, France
Université Savoie Mont-Blanc, UMR CARRTEL, F-73011 Chambéry cedex, France
agnes.bouchez@thonon.inra.fr

Introduction

La phylogénie reste encore trop peu exploitée en écotoxicologie, alors même que l'existence de liens entre la phylogénie de différents organismes et leur sensibilité à des toxiques peut permettre d'inférer une évaluation *a priori* de leur sensibilité. Des études récentes ont démontré le potentiel de la phylogénie pour évaluer la sensibilité d'amphibiens (Hammond et al, 2012), de microalgues (Eriksson et al, 2009) ou encore de macroinvertébrés (Buchwalter et al, 2008; Carew et al, 2011) à divers polluants, révélant la présence d'un signal phylogénétique, c'est-à-dire la tendance pour des espèces apparentées à partager des caractéristiques écologiques ou biologiques similaires. Nous avons étudié la relation entre la phylogénie et la sensibilité aux herbicides chez des diatomées d'eau douce.

Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée sur la sensibilité de 14 espèces de diatomées (représentatives de la diversité des biofilms du lac Léman) à 4 herbicides inhibiteurs du photosystème II (atrazine, terbutryne, diuron et isoproturon). Les données de sensibilité aux herbicides (CE50 et CE10) ont été obtenues en bioessais monospécifiques en laboratoire. La phylogénie a été établie pour les 14 espèces de diatomées sur deux gènes marqueurs (18S et rbcL). Le signal phylogénétique de la sensibilité a été quantifié pour chaque trait de sensibilité avec la statistique K de Blomberg et al. (2003) et le λ de Pagel (1999). Pour mettre en évidence la structure phylogénétique pour l'ensemble des traits, nous avons utilisé la pPCA (Jombart et al, 2010).



Résultats et discussion

Grâce à ces outils statistiques récents, nous avons pu mettre en évidence un signal phylogénétique fort pour la sensibilité des diatomées aux herbicides inhibiteurs de la photosynthèse. Une division

majeure de la sensibilité apparaît au sein de l'arbre phylogénétique. Les espèces les plus sensibles sont principalement les diatomées centriques ou pennées araphidées (dans cette étude, Thalassiosirales et Fragilariales), tandis que les espèces les plus résistantes sont principalement des diatomées pennées (dans cette étude, Cymbellales, Naviculales et Bacillariales). Cependant, on observe une grande variabilité dans la sensibilité des diatomées au sein du clade des pennées raphidées, qui pourrait s'expliquer par des différences dans les préférences trophiques des espèces (autotrophie ou hétérotrophie). Ces traits semblent apporter une information complémentaire à celle de la phylogénie pour expliquer les différences de sensibilité observées au sein d'un même clade.

Conclusion et perspectives

L'utilisation de la phylogénie peut donc aider à prévoir la sensibilité des communautés en vue de la protection de leur écosystème. Il reste cependant à évaluer la norme de réponse des espèces et la comparer aux variations interspécifiques de sensibilité. Toutefois, les données de sensibilité obtenues à partir de bioessais ne sont disponibles que pour très peu d'espèces alors même que les diatomées présentent une énorme diversité. L'afflux actuel de données de séquence d'ADN permet d'établir des phylogénies robustes pour un nombre croissant d'espèces et devrait permettre d'inférer leur sensibilité aux contaminants en utilisant le signal phylogénétique. Ainsi, le développement de méthodes permettant de prédire la sensibilité d'organismes en s'appuyant sur la phylogénie représente un défi pour améliorer notamment l'efficacité de la bioindication basée sur la communauté des diatomées.

Mots clés **:** phylogénie, sensibilité, diatomées, herbicides, bio-évaluation

Références

Blomberg S.P., Garland Jr T., Ives A.R. (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, *57*, 717–745.

Buchwalter D.B., Cain D.J., Martin C.A., Xie L., Luoma S.N., Garland Jr T. (2008) Aquatic insect ecophysiological traits reveal phylogenetically based differences in dissolved cadmium susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *105*, 8321–8326.

Carew M.E., Miller A.D., Hoffmann A.A. (2011) Phylogenetic signals and ecotoxicological responses: potential implications for aquatic biomonitoring. *Ecotoxicology*, *20*, 595–606.

Eriksson K.M., Antonelli A., Nilsson R.H., Clarke A.K., Blanck H. (2009) A phylogenetic approach to detect selection on the target site of the antifouling compound irgarol in tolerant periphyton communities. *Environ. Microbiol.*, *11*, 2065–2077.

Hammond J.I., Jones D.K., Stephens P.R., Relyea R.A. (2012) Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. *Evol. Appl.*, *5*, 593–606.

Jombart T., Pavoine S., Devillard S. & Pontier D. (2010) Putting phylogeny into the analysis of biological traits: a methodological approach. Journal of Theoretical Biology 264, 693–701.

Larras F., Keck F., Montuelle B., Rimet F., Bouchez A. (2014) Linking diatoms sensitivity to herbicide to phylogeny: a step forward for biomonitoring? *Environ. Sci. Technol.* 48:1921-1930

Pagel M. (1999) Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*, *401*, 877–884.

Evaluation of the ecotoxicological impact of pesticides on the diversity and the abundance of soil microorganisms

Veronika STORCK, Céline BAGUELIN, Nadine ROUARD, Jéremie BEGUET, David BRU, Marion DEVERS, Fabrice MARTIN-LAURENT

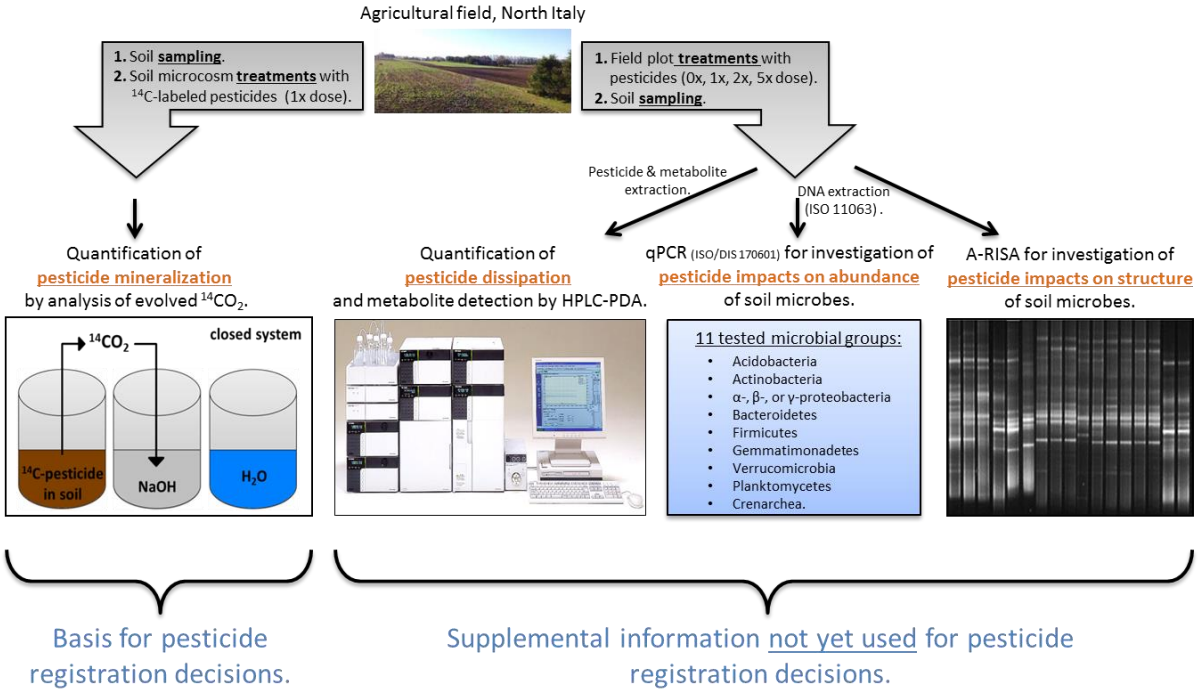
UMR Agroécologie, Equipe EMFI (Ecologie Microbienne Fonctionnelle pour la gestion des Intrants), INRA, 17 Rue Sully, F-21000 Dijon Cedex
vstorck@dijon.inra.fr, celine.baguelin@dijon.inra.fr

Introduction

Pesticides intensely used in agriculture to increase crop yields can stimulate (biodegradation) or inhibit (toxicity) non-target organisms (NTO) such as soil microbial communities important for ecosystemic functioning. Until now, pesticide registration decisions concerning ecotoxicity on soil microbes exclusively rely on simple carbon and nitrogen mineralization tests (OECD 217 and 216) which are general methods not giving the full picture of possible impact on soil microorganisms and possible consequences on ecosystemic functions. Within the framework of the European IAPP Marie Curie project 'LOVE-TO-HATE' (http://lovetohate.bio.uth.gr), we investigate the interest of novel methods evaluating the ecotoxicological impact of pesticides on soil microbial communities. The aim of the project is to establish standardized and novel methods for assessment of the ecotoxicity of pesticides on soil microorganisms. Thus in this study, we estimate the impact of one insecticide (chlorpyrifos, CHL), one herbicide (isoproturon, IPU) and one fungicide (tebuconazole, TCZ) on the abundance and diversity of soil microorganisms in regards to the environmental fate of these three pesticides estimated by monitoring their mineralization and dissipation in soil.

Material and methods

The investigated soil is situated in an Italian agricultural field (45°04'80''N, 09°45'60''E) untreated for at least 5 years. Pesticide mineralization tests were performed in soil microcosms of 10 g soil dwt treated with the recommended pesticide dose. Mineralization of ^{14}C-labeled pesticides was quantified by analysis of evolved $^{14}CO_2$ by liquid scintillation counting. Pesticide dissipation was investigated in field plots at 0x, 1x, 2x or 5x recommended agricultural dose for 125 days. Pesticides and their main metabolites were analyzed by HPLC-PDA. The impact of pesticide on soil microbes was done on soil DNA extracted according to ISO standard 11063 to quantify by qPCR (ISO/DIS 170601) the abundance of 11 soil microbial groups and to study the genetic structure of the global bacterial community by A-RISA.



Results and discussion

Soil microbes respectively mineralized 40, 20 or 8% of CHL, IPU or TCZ within 150 days under laboratory conditions. All three pesticides dissipated continuously in the field soil. Several metabolites were detected during the time course of the dissipation: 3,5,6-trichloropyridinol (TCP) the metabolite of CHL was detected. Transitory accumulation of monodesmethyl-isoproturon (MDIPU) and didemethyl-isoproturon (DDIPU) known metabolites of IPU was observed during its dissipation. Results concerning the quantification of the eleven bacterial groups by qPCR and the study of the genetic structure of the bacterial community (A-RISA) all along the experiment will be presented and discussed in light of the scenario of exposure defined by dissipation studies.

Conclusions and perspectives

Conclusions and perspectives will be presented accordingly.

Key words: pesticide ecotoxicity, mineralization, dissipation, qPCR, A-RISA

Les communautés microbiennes photosynthétiques (cyanobactéries et micro-algues) comme bioindicateurs de stress phytosanitaires dans les sols agricoles

Olivier CROUZET [1], Christelle MARRAULD [1], Pierre JOLY [2], Clarisse MALLET [2], Frédéric RIMET [3], Annette BERARD [4]

[1] UR INRA 251 PESSAC, 78026 Versailles cedex.
[2] UMR CNRS 6023 LMGE, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand.
[3] UMR INRA 0042 CARRTEL, INRA - Université de Savoie, 74203 Thonon-les-Bains Cedex.
[4] UMR INRA/UAPV 1114 EMMAH, 84914 Avignon.
olivier.crouzet@versailles.inra.fr

Introduction

Les indicateurs microbiens classiquement utilisés sont essentiellement basés sur des mesures d'activités ou de diversité des communautés bactériennes et fongiques, mais ils manquent de pertinence (sensibilité) vis-à-vis des stress phytosanitaires, en particulier des herbicides. Les microorganismes photosynthétiques des sols (cyanobactéries et micro-algues), pourraient constituer de bons bioindicateurs de pressions phytosanitaires, compte tenu de leurs points communs avec les plantes supérieures et à l'instar des acquis dans les milieux aquatiques. Néanmoins, dans les sols, les connaissances disponibles sur leur écologie et leurs réponses aux stress (environnementaux et contaminants) sont limitées. Les projets DevImCocMic (EC2CO) et COMIPHO (PI-SPE) ont porté sur l'intérêt des cyanobactéries et micro-algues édaphiques comme indicateurs de pressions phytosanitaires. Des approches en microcosmes et in situ ont été mises en place pour analyser les effets d'herbicides sur ces communautés microbiennes photosynthétiques.

Matériels et méthodes

Des développements méthodologiques ont été réalisés afin d'identifier des marqueurs biochimiques et moléculaires pertinents pour décrire les effets de phytosanitaires sur la biomasse et la diversité des communautés micro-algales. Une méthodologie PICT *(Pollution-Induced Community Tolerance)* a été mise en œuvre pour tester l'acquisition de tolérance des communautés, en fonction du passif de traitement des sols aux herbicides.

Des études en microcosmes et au champ (sites expérimentaux présentant différents systèmes de culture et types de sols : La Cage, INRA Versailles ; Marmilhat, ENITA Clermont-Ferrand) ont été réalisées pour tester la pertinence de ces outils.

Les expérimentations en microcosme ont nécessité le développement de dispositifs adaptés (éclairage et humidité), afin d'analyser les réponses des communautés à des molécules formulées ou non, en cocktail ou non. L'approche au champ a permis de caractériser la diversité taxonomique des communautés micro-algales et cyanobactériennes dans des systèmes de culture Biologique et Conventionnel et d'en comparer les niveaux de tolérance.

Résultats et discussion

Les marqueurs biochimiques et moléculaires développés ont démontré leur pertinence pour l'étude des communautés microbiennes photosynthétiques des sols en microcosmes. Appliqués au champ, les outils moléculaires ont permis des suivis exhaustifs de la diversité des microorganismes photosynthétiques *(Fig. 1)*. Les dosages pigmentaires, présentant des limites de détection (HPLC + détection fluorescence) nécessitent d'être validés *in situ*.

Les herbicides impactent les communautés microbiennes photosynthétiques à la fois en terme de biomasse et de structure génétique et biochimique (1, 2). Parmi les molécules herbicides étudiées, certaines (Isoproturon et S-metolachlor) ont induit des effets dès la dose agronomique. Les effets toxiques sont augmentés par les formulations commerciales.

Le type de sol influence fortement la composition des communautés microbiennes photosynthétiques, ainsi que les temps de réponse au stress herbicide, mais les cyanobactéries

restent les plus impactées : celles-ci semblent être moins favorisées en système conventionnel où des pesticides sont utilisés. Des résultats similaires ont été obtenus en microcosme, suite aux effets de l'isoproturon.

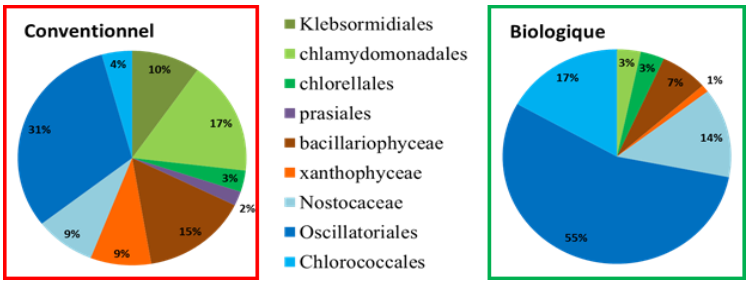


Figure 1. Diversité taxonomique des communautés microbiennes photosynthétiques (ADNr 23S plastidial) des sols sous conduite Biologique (Bio) ou Conventionnel (Conv), du site de La Cage.

Cependant, les effets des pesticides au champ sont plus difficiles à caractériser, puisque les communautés répondent à l'ensemble des facteurs caractérisant un système de culture (intrant fertilisant, densité de semis, sol et travail du sol). Notre approche PICT, visant à évaluer la tolérance des communautés à un contaminant auquel elles sont régulièrement exposées, a mis en évidence une tolérance accrue à l'isoproturon (utilisé en conventionnel) chez les communautés microbiennes photosynthétiques du sol Conv par rapport à celles du sol Bio *(Fig. 2)*. Des résultats similaires avaient été démontrés pour l'atrazine (3).

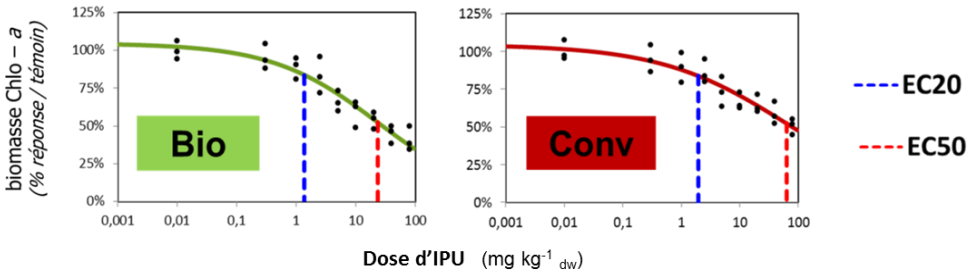


Figure 2. Approche PICT testant la tolérance à l'Isoproturon (IPU) des communautés microbiennes photosynthétiques des sols Bio et Conv (La Cage), via la mesure de biomasse chlorophyllienne.

Conclusion et perspectives

Les communautés cyanobactériennes et micro-algales édaphiques ont été impactées à des doses auxquelles les activités et la structure des communautés bactériennes ou fongiques ne répondaient pas (1, 2). Les microorganismes photosynthétiques des sols constituent un modèle biologique innovant pour développer des bioindicateurs de pressions et d'exposition des sols aux herbicides. En laboratoire, des études plus exhaustives (type de sol, molécules avec divers modes d'action) permettraient de tester l'intérêt de certains pigments ou taxons comme indicateurs de pression phytosanitaire. De meilleures connaissances de leur écologie dans les sols (diversité génétique, fonctions) demeurent indispensables pour interpréter les réponses aux contaminants et comprendre le déterminisme des facteurs environnementaux. L'approche PICT semble prometteuse pour évaluer les pressions spécifiques liées aux usages d'herbicides au champ.

Mots-clés : communautés microbiennes photosynthétiques, sols, herbicides, diversité, tolérance

Références

1. Crouzet et al., 2012. Dose-dependent effects of the herbicide mesotrione on soil cyanobacterial communities. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 10.1007/s00244-012-9809-9.
2. Joly et al. 2014. Soil surface colonization by phototrophic indigenous organisms, in two contrasted soils treated by formulated maize herbicide mixtures. Ecotoxicology, DOI 10.1007/s10646-014-1304-9
3. Bérard et al. 2004. Procedures for determining the pesticide sensitivity of indigenous soil algae - a possible bioindicator of soil contamination? Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46: 24-31.

Réduire les pesticides pour augmenter les populations de vers de terre dans les champs cultivés

Céline PELOSI[1], François CHIRON[2], Florence DUBS[3], Mickaël HEDDE[1], Audrey MURATET[4], Jean-François PONGE[5], Sandrine SALMON[5], David MAKOWSKI[6,7]

[1]INRA, UR251 PESSAC, F-78026 Versailles Cedex, France
[2]Muséum national d'Histoire naturelle, UMR 7204 MNHN-CNRS-UPMC, 55 rue Buffon, F-75005 Paris
[3]IRD, UMR BIOEMCO, Centre France Nord, 93143 Bondy Cedex
[4]ODBU, Observatoire départemental de la Biodiversité urbaine, Direction de la Nature, des Paysages et de la Biodiversité, Conseil général de la Seine-Saint-Denis, F-93006 Bobigny Cedex
[5]Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS UMR 7179, 4 Ave du Petit-Château, F-91800 Brunoy
[6]INRA, UMR211 Agronomie, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon
[7]AgroParisTech, UMR211 Agronomie, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon
celine.pelosi@versailles.inra.fr

Introduction

L'intensification des pratiques agricole a conduit à une réduction de la biodiversité du sol dans les zones cultivées. Les bénéfices potentiels de l'agriculture biologique et des systèmes à bas niveaux d'intrants sur les organismes du sol n'ont pas été évalués de manière précise. Les vers de terre, qui remplissent des fonctions agroécologiques importantes, peuvent être affectés par les applications de pesticides, principalement les espèces qui vivent dans les couches superficielles du sol.

Matériels et méthodes

A partir d'une base de données expérimentales sur 5 années incluant des systèmes de culture conduits en agriculture conventionnelle et d'autres conduits en agriculture biologique, nous avons établi une relation statistique simple entre l'Indice de Fréquence de Traitements (IFT) phytosanitaires – un indicateur de pression en pesticides – et l'abondance de trois espèces de vers de terre communes en Europe. Celles-ci vivent en contact plus ou moins étroit avec la surface du sol et sont donc potentiellement exposées de manière différente aux pesticides. Les trois espèces de vers de terre appartiennent à des groupes fonctionnels différents et sont impliquées dans la décomposition de la matière organique de surface et l'évolution de la structure du sol.

Résultats et discussion

Les résultats montrent que l'IFT Total a un effet négatif sur les densités de populations des 3 espèces étudiées (Figure 1). Les insecticides ont des effets négatifs plus marqués sur les espèces de vers de terre étudiées que les herbicides et les fongicides. Par ailleurs, les espèces qui vivent le plus en contact avec la surface du sol sont les plus affectées par les pesticides. La densité de ces espèces pourrait être multipliée par 1,5 à 4 si l'IFT était divisé par deux, comme le prévoit le plan Ecophyto 2018 (Table 1).

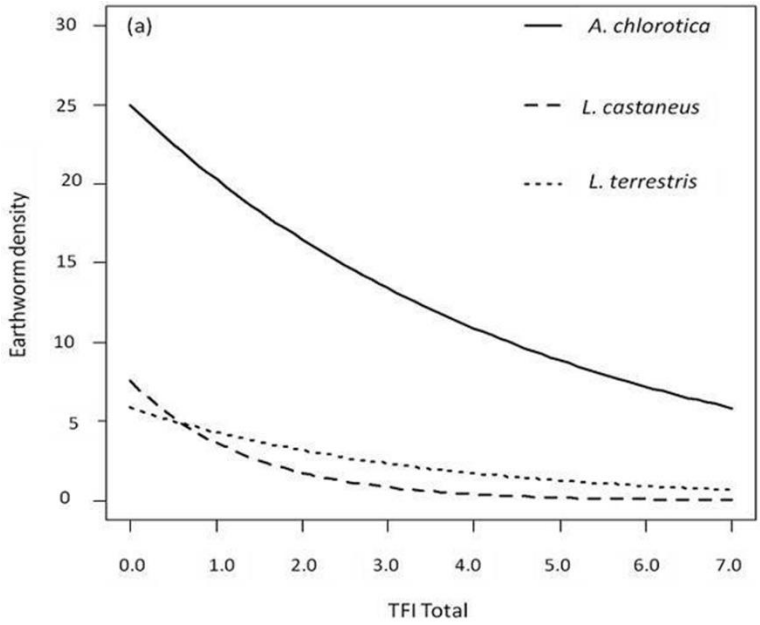


Figure 1. Régressions de Poisson des densités des 3 espèces de vers de terre i.e. *Lumbricus castaneus, Lumbricus terrestris*, and *Allolobophora chlorotica* en fonction de l'Indice de Fréquence de Traitements phytosanitaires (IFT Total).

Earthworm species	Mean TFI Total in France in 2006 (TFI Total = 3.8)	France objective for 2018 (TFI Total = 1.9)
L. castaneus	0.5 ± 0.2	1.9 ± 0.4
L. terrestris	2.3 ± 0.4	3.3 ± 0.4
A. chlorotica	11.4 ± 0.9	16.8 ± 0.8

Table 1. Prédictions des densités des 3 espèces de vers de terre en fonction de l'Indice de Fréquence de Traitements phytosanitaires moyen (Mean TFI) en France en 2006 et de ses objectifs pour 2018 (Jacquet et al., 2011), en utilisant les régressions de Poisson.

Conclusion et perspectives

Nos résultats montrent qu'une réduction de l'utilisation des pesticides augmenterait les densités de populations de vers de terre dans les champs cultivés.

Mots-clés : densité de populations, Indice de Fréquence de Traitements phytosanitaires, agriculture biologique, systèmes de culture conventionnels, pesticides.

Effet de l'exposition au mercure sur la régénération tissulaire chez l'escargot *Cantareus aspersus*

Frédéric GIMBERT, Louise DUCRET et Annette de VAUFLEURY

UMR 6249 Chrono-Environnement, CNRS - Université de Franche-Comté, UsC INRA, 16 route de Gray, F-25030 Besançon Cedex.
frederic.gimbert@univ-fcomte.fr

Introduction

La régénération consiste en la reconstitution d'une partie d'un organisme après sa perte, volontaire (autotomie) ou accidentelle. Chez les gastéropodes, peu d'études décrivent les aptitudes régénératives du pied et leurs conséquences écophysiologiques (Rupert and Peters, 2011 ; Hoso, 2012). Le coût de la régénération peut en soi perturber les dynamiques individuelles et populationnelles des organismes (Maginnis, 2006), mais qu'en est-il chez des organismes soumis à un stress supplémentaire tel que la contamination du milieu ? Récemment, la régénération de la partie postérieure du pied a été observée en quelques semaines chez l'escargot *Cantareus aspersus* (Gimbert, 2013 ; obs. pers.) qui fréquente de nombreux milieux, y compris les friches industrielles sur lesquelles il s'expose, par exemple, aux métaux (Mourier et al., 2011). L'objectif de ce travail de recherche sera donc d'évaluer l'influence de l'exposition au mercure (Hg) sur (i) la régénération du pied chez l'escargot *Cantareus aspersus* ; (ii) la croissance individuelle et (iii) la bioaccumulation de Hg.

Matériels et méthodes

Des escargots juvéniles *Cantareus aspersus,* âgés d'un mois et pesant 1,0±0,4 g, ont été exposés, durant sept semaines et via la nourriture (Helixal®), à une gamme de concentrations en Hg : 0, 100, 200 et 600 $\mu g_{Hg}.g_{nourriture}^{-1}$, qui correspond à la CI_{50} croissance de *C. aspersus* (Caire, 2013). Pour chaque concentration d'exposition, deux lots d'escargots ont été exposés : des non amputés et des amputés au niveau de la partie postérieure du pied. Les réponses mesurées concernent la croissance (masse fraîche hebdomadaire et taux de croissance) et la bioaccumulation du Hg (SAAVF).

Résultats et discussion

Régénération tissulaire

La durée de régénération complète de la partie postérieure du pied des escargots dépend de la concentration d'exposition au Hg : 28 jours pour Hg0 et Hg100, 35 pour Hg200 et 42 pour Hg600. Comme observé sur les tentacules régénérées après amputation chez la limace terrestre *Limax valentianus* (Matsuo et al., 2010), la partie régénérée du pied des escargots est fonctionnelle avec production de mucus et contractions musculaires.

Effet cumulatif sur la croissance

Etudiées séparément, l'amputation et l'exposition au Hg provoque une inhibition significative de la croissance des escargots (Tableau 1). La régénération tissulaire provoque un effet similaire à l'exposition à 200 $mg_{Hg}.g_{nourriture}^{-1}$, *i.e.* une diminution de 30% du taux de croissance.

Tableau 1 : Comparatif des taux de croissance ($g.j^{-1}$) des escargots amputés (A) et non amputés (NA) exposés à différentes concentrations en Hg via la nourriture (0, 100, 200 et 600 $\mu g.g^{-1}$). Les valeurs minimales et maximales correspondent aux intervalles de confiance à 95 %. Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes.

	modalités	minimum	moyenne	maximum	r^2
Hg0	non amputé	0,133	$0,141^{a}$	0,150	0,90
	amputé	0,088	$0,100^{b}$	0,112	0,73
Hg100	non amputé	0,108	$0,119^{b}$	0,130	0,85
	amputé	0,100	$0,111^{bc}$	0,121	0,81
Hg200	non amputé	0,087	$0,097^{c}$	0,107	0,71
	amputé	0,062	$0,071^{d}$	0,079	0,77
Hg600	non amputé	0,034	$0,041^{e}$	0,048	0,44
	amputé	0,021	$0,026^{f}$	0,030	0,76

Les stress physiologiques et chimiques ont un effet synergique sur la croissance de l'escargot avec des inhibitions de croissance atteignant 50% et 80% chez les animaux amputés et exposés à 200 et 600 $mg_{Hg}.g_{nourriture}^{-1}$.

Des modifications de l'allocation énergétique pouraient être responsables de ces résultats, avec des investissements à la régénération tissulaire et à la gestion (séquestration, excrétion) du Hg limitant l'allocation énergétique à la croissance (Kooijman, 2009).

Bioaccumulation du Hg

La concentration en Hg dans la partie postérieure du pied augmente avec la concentration d'exposition (Figure 1). Si les différences d'accumulation sont nettes entre Hg0, Hg100 et les fortes expositions, les concentrations internes semblent cependant atteindre un plateau, autour de 300 $\mu g.g^{-1}$ pour les individus amputés et à 600 $\mu g.g^{-1}$ pour les non amputés.

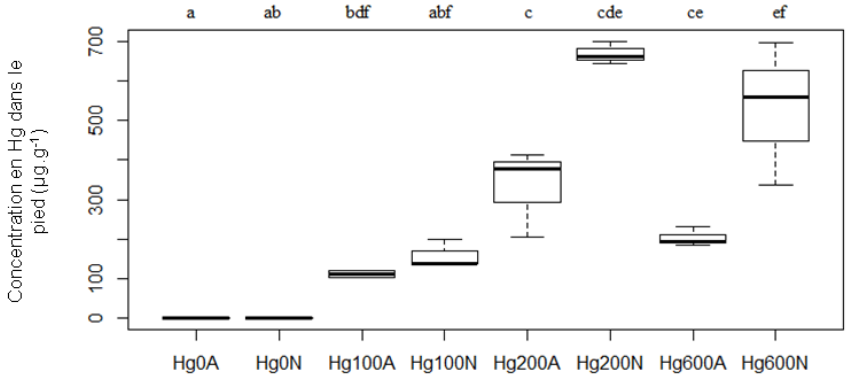


Figure 1. Concentration en Hg à t=7 sem. dans la partie postérieure du pied des escargots soumis à diverses concentrations (0, 100, 200, 600 $\mu gHg.g^{-1}$). A=amputés ; N=non amputés. Des lettres différentes témoignent d'une différence significative (Anova, p<0,05).

Cette différence importante pourrait être mise en relation avec une modification de la composition tissulaire (type cellulaires, protéines,…) de la partie régénérée du pied (Zaldibar et al., 2008). Par exemple, la synthèse de protéines MXR (MultiXenobiotic Resistance), protéines membranaires à l'origine de l'excrétion de xénobiotiques via un transport actif, pourrait faciliter l'excrétion du Hg (Achard et al., 2004).

Conclusion et perspectives

Ainsi, des stress chimique et physiologique peuvent conduire aux mêmes impacts sur certains caractères biologiques comme la croissance. Les mécanismes associés ne sont cependant pas similaires et recouvrent à la fois l'évitement de la source de contamination, les perturbations de la dynamique énergétique et des modifications cellulaires voire moléculaires. Des études complémentaires (histologie, protéomique, …)

sont ainsi nécessaires afin de discriminer et hiérarchiser les modes d'action de ces stress et les réponses à différents niveaux d'organisation biologique chez l'escargot.

Mots-clés : croissance, bioaccumulation, stress physiologique, stress chimique, *Helix aspersa*

Références

Achard M., Baudrimont M., Boudou A., Bourdineaud J.P., 2004. *Aquatic Toxicol*. 67, 347-357.

Caire A. L., 2013. Rapport de stage Master Ecosystèmes et Environnement, Université de Franche-Comté, 20 p..

Hoso M., 2012.. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci*. 279, 4811-4816.

Kooijman S.A.L.M., 2009. Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 532 p.

Maginnis T. L. 2006. *Behavioral Ecology* 17, 857-872.

Matsuo R., Kobayashi S., Murakami J., Ito E., 2010. PLoS ONE 5, e9054.

Mourier B., Fritsch C., Dhivert E., Gimbert F., Coeurdassier M., Pauget B., de Vaufleury A., Scheifler R., 2011. Chemosphere 85, 1057-1065.

Rupert S.D., Peters W.S., 2011. *J. Moll. Studies* 0, 1-4.

Zaldibar B., Cancio I., Soto I., Marigómez I., 2008. *Environ. Pollut.* 156, 367-379.

Effets non-intentionnels du bio-insecticide *Bacillus thuringiensis*

Alexandra BRUN-BARALE, Rihab LOUDAHIEF, Olivia BENGUETTA,
Marie-Paule ESPOSITO, Matthieu PASCO, Armel GALLET et Marcel AMICHOT

UMR INRA 1355 CNRS 7254 Université Nice-Sophia Antipolis, 400 route des Chappes,
BP 167, 06903 SOPHIA-ANTIPOLIS cedex
marcel.amichot@sophia.inra.fr

Introduction

Les insecticides sont utilisés depuis de très nombreuses années pour protéger les cultures d'insectes ravageurs et pour contrôler des vecteurs de maladies (moustiques, glossine...). La grande majorité des insecticides utilisés sont des neurotoxiques de synthèse. Leur toxicité intrinsèque et leurs effets secondaires couplés aux quantités utilisées ont eu cependant des conséquences importantes d'un point de vue environnemental et sanitaire. Des efforts ont ainsi été réalisés pour en réduire l'utilisation et pour trouver des produits ou procédés de substitution. Ainsi les bio-insecticides comme tels. Le plus utilisé d'entre eux est issu de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt est un bacille gram positif aérobie et sporulant "dit" du sol. La sporulation s'accompagne de la production de cristaux protéiques contenant des toxines (Cry et Cyt). Plus de 200 toxines Cry ont été identifiées, à chaque souche de Bt, sa gamme de toxines. D'autre part, une toxine Cry est toxique envers quelques espèces d'insectes (Bravo et al., 2011). Ce bio-insecticide représente actuellement 2% du total du marché des insecticides, ce chiffre ne tient pas compte de l'utilisation des toxines Cry en OGM. S'il existe de très nombreux travaux portant sur la toxicité aiguë de ces toxines, il en existe très peu dès que l'on s'intéresse à la toxicité subaiguë ou chronique (ex : Celandroni et al., 2014). Une partie de nos résultats portant sur les effets de Bt sur l'adaptation à un stress chimique et sur la réponse immunitaire sera présentée.

Matériels et méthodes

Souches de Bt :

Nous avons utilisé différentes souches de Bt dérivées soit de Bt var Kurstaki (Btk), soit de Bt var israelensis (Bti). Btk est actif contre des lépidoptères, Bti contre des moustiques. Nous disposons aussi de souches dérivées ne produisant pas de toxines Cry.

Souches de drosophile :

La drosophile a été choisie car elle n'est sensible à aucune des souches de Bt utilisées ici. Nous avons travaillé avec deux souches : une sauvage et une exprimant une protéine fluorescente (cherry) sous le contrôle du promoteur d'un peptide antimicrobien (diptéricine) régulé par la voie Imd.

Adaptation à un stress chimique :

Nous avons évalué la sensibilité des drosophiles à la deltaméthrine après intoxication par les différentes souches de Btk et Bti. Cela a été fait par calcul des DL50 puis complété par des mesures d'activités enzymatiques (P450, estérases et GST).

Réponse immunitaire :

Nous avons suivi la fluorescence émise par cherry dans le tube digestif correspondant aux sites d'expression de la diptéricine suite à une intoxication par Btk et ses dérivés. Ces observations ont ensuite été comparées aux résultats de qPCR obtenus pour la diptéricine.

Résultats et discussion

Adaptation à un stress chimique :

Bt diminue les capacités d'adaptation à un stress chimique de façon différente selon la souche : Btk ou Bti. Cependant, de façon intrigante, cet effet ne semble pas associé au contenu en toxine Cry des différentes souches testées.

Réponse immunitaire :

La souche Btk réduit clairement la réponse immunitaire par comparaison à la réponse que l'on obtient avec une souche dépourvue de toxines Cry. De façon préliminaire, nous avons observé qu'une seule toxine Cry purifiée peut avoir cet effet. De plus, cet effet dépend de la zone du tube digestif testée.

Conclusion et perspectives

Ces travaux montrent que Bt peut avoir des effets secondaires sur des organismes non visés par les traitements et insensibles à la toxicité aiguë que peut exercer Bt sur les insectes sensibles. Cependant, ces effets peuvent ne pas être perçus faute de référence adaptée.

Les fonctions affectées sont très diverses et, en plus de celles présentées ici, peuvent aussi concerner la différenciation cellulaire, la longévité... Enfin, la drosophile n'est pas le seul organisme affecté par ces effets secondaires.

Les perspectives sont de deux ordres :

- Continuer d'explorer les effets secondaires de Bt sur la drosophile en abordant les questions de mécanistique.

- Evaluer les impacts physiologiques, individuels voire populationnels de ces effets pour élargir les études vers d'autres organismes.

Mots-clés : *Bacillus thuringiensis*, toxine Cry, effet non intentionnel, insecticide, immunité

Références

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. & Soberón, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1–9, doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006

Celandroni, F., Salvetti, S., Senesi, S. & Ghelardi, E. (2014) *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells. *FEMS Microbiology Letters,* doi:10.1111/1574-6968.12615

Absorption et répartition du [^{14}C]-chlordécone chez les graminées

Yohan LIBER[1234], Sophie PASCAL-LORBER[123], François LAURENT[123]

[1]Université de Toulouse ; INP, UPS ; ECOLAB ; ENSAT, F-31326 Castanet Tolosan
[2]CNRS ; ECOLAB ; F-31326 Castanet Tolosan
[3]INRA ; ECOLAB, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse
[4]ENTPE, LEHNA, 3 Rue Maurice Audin, F-69518 Vaulx-en-Velin
sophie.pascal@toulouse.inra.fr

Introduction

Le chlordécone (CLD) est un insecticide organochloré utilisé contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* de 1973 à 1993 aux Antilles françaises. En raison de sa grande rémanence dans l'environnement, le CLD a entraîné la contamination des sols, des eaux et des cultures (Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). De plus, un lien a été mis en évidence entre l'exposition au CLD et le fort taux d'incidence de cancer de la prostate aux Antilles (Multigner et al., 2010). Le CLD est également impliqué dans l'apparition de troubles moteurs et cognitifs chez les enfants en bas âge en raison d'une exposition chronique pré- et post-natale (Dallaire et al., 2012 ; Boucher et al., 2013). La phytodépollution pourrait être envisagée pour diminuer les concentrations en CLD dans le sol. Dans ce but, dans un premier temps, nous avons comparé la capacité d'absorption de quelques graminées différant par leur métabolisme (C3/C4), leur capacité à transpirer ou le développement de leur biomasse afin de mieux cerner les caractéristiques de la plante la plus adaptée.

Matériels et méthodes

Plantes. *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Miscanthus giganteus et Miscanthus sinensis.*

[^{14}C]-Chlordecone. Activité spécifique : 1,43 10^9 Bq/mmol, pureté radiochimique 97%. **Culture en phytotron**. 24°C/20°C, photopériode 16h/8h, jour/nuit. **Arrosage.** Solution nutritive. **Expérimentation**. Les graines de maïs et de blé ont été semées dans des béchers de 1 L contenant 1 kg de terre tamisée à 2,32 mm contaminée par le [^{14}C]-CLD (1 mg/kg, 11 000 Bq/pot, 4 répétitions). Les plants individualisés de roseaux de Chine ont été repiqués dans des béchers de 2 L contenant 1,5 kg de terre contaminée par le [^{14}C]-CLD (1 mg/kg, 34 500 Bq/pot, 3 répétitions). Les mesures de transpiration foliaire ont été réalisées tout au long de la culture. Après 2 mois de culture, les parties aériennes ont été découpées en plusieurs morceaux pour mettre en évidence un éventuel gradient du CLD. Blé : 6 morceaux (3-3-3-5-8 cm) ; Maïs : 4 morceaux pour la tige et 6 pour les feuilles ; Miscanthus : séparation des feuilles et des entrenœuds. Les échantillons sont ensuite séchés au four à 60°C pendant 48 h avant analyse. **Quantification de la radioactivité.** La radioactivité est mesurée après combustion oxydative d'une fraction aliquote de chaque échantillon à l'aide d'un oxidizer. Le ^{14}CO2 résultant est piégé dans un mélange de scintillants puis compté par scintillation liquide.

Résultats et discussion

1. Influence de la transpiration et de la biomasse sur l'absorption du chlordécone

A la fin de l'expérimentation, le blé a absorbé le CLD de manière plus importante par rapport aux autres plantes étudiées (**Tableau 1**). Cependant, cette meilleure absorption du blé n'est pas uniquement corrélée à la transpiration ou au développement de la biomasse. En effet, les miscanthus ont un développement de leurs parties aériennes 5 fois plus important et ont transpiré 2 à 3 fois plus que le blé alors qu'ils ont absorbé 2,5 fois moins de CLD. Le prélèvement plus efficace du blé pourrait s'expliquer par un transfert plus important du CLD vers les parties aériennes ou par une adsorption/absorption moins sélective liée à la structure du système racinaire. En effet, la présence d'un rhizome chez les miscanthus pourrait agir comme un réservoir piégeant le CLD.

PLANTE	Absorption (ng)	Transpiration (mL)	Absorption/Transpiration	Poids sec
Maïs	1 292 ± 324	656 ±199	1,97 ± 0,30	3,75 ±1,25
Blé	5 992 ± 2 243	1 118 ±287	5,36 ± 0,94	3,23 ± 0,38
Miscanthus gig.	890 ± 190	2 373 ± 683	0,38 ± 0,04	14,32 ± 3,15
Miscanthus sin.	3 469 ±381	3 080 ± 958	1,20 ± 0,38	21,58 ± 5,20

Tableau 1. Quantité de chlordécone absorbée en fonction de la transpiration.

2. Répartition du chlordécone dans les parties aériennes

Un gradient est mis en évidence le long des tiges de miscanthus (**figure 1**) et de maïs, traduisant un phénomène de rétention. En effet, à cause de sa lipophilie élevée, le CLD a tendance à s'accumuler dans la partie inférieure des plantes et à former ainsi un gradient acropétale de diffusion (Létondor et al., 2015). Il existe également un gradient acropétale dans les feuilles lorsque les plants sont jeunes et n'ont pas encore formé de hampes florales. Par contre, il n'y a plus de gradient dans les feuilles plus âgées, l'accumulation du CLD étant uniquement due à la transpiration.

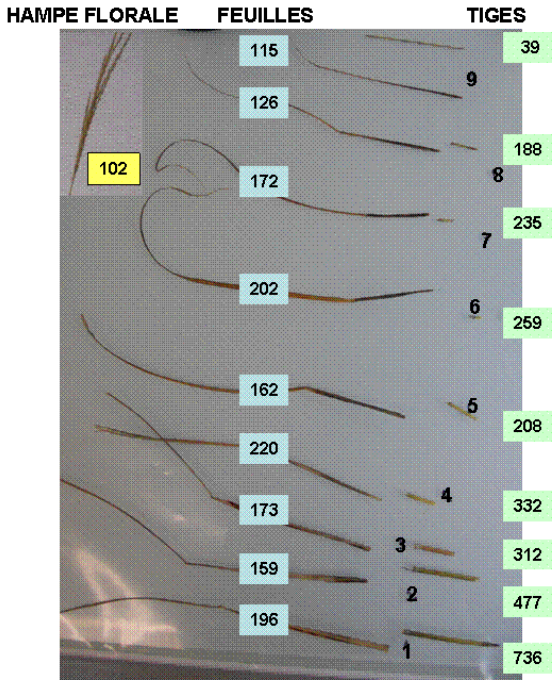


Figure 1. Distribution du chlordécone chez *Miscanthus sinensis* (ng/g poids sec).

Conclusion et perspectives

Malgré le développement important de leur biomasse, l'extraction du CLD par les graminées reste limitée, les plantes en C3 paraissant toutefois plus efficaces. Par conséquent, il est important d'associer la phytodépollution du CLD à d'autres techniques telles que l'association avec des microorganismes (bactéries, champignons) ou à un travail sur le sol (adjonction de tensioactifs biodégradables).

Mots-clés : chlordécone, graminées, absorption, gradient, dépollution

Références

Boucher O., Simard M.N., Muckle G., Rouget F., Kadhel P., Bataille H., Chajès V., Dallaire R., Monfort C., Thomé J.-P. Multigner, L. and Cordier, S. 2013. Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. Neurotoxicology 35:162-168.

Cabidoche Y.M. and Lesueur-Jannoyer M. 2012. Contamination of Harvested Organs in Root Crops Grown on Chlordecone-Polluted Soils. Pedosphere 22 SI:562-571.

Dallaire R., Muckle G., Rouget F., Kadhel P., Bataille H., Guldner L., Seurin S., Chajès V., Monfort C., Boucher O., Thomé J.-P. Jacobson, S.W., Multigner L. and Cordier, S. 2012. Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. Environ. Res. 118:79-85.

Létondor C., Pascal-Lorber S. and Laurent F. 2015. Uptake and distribution of chlordecone in radish: different contamination routes in edible roots. Chemosphere 118:20-28.

Multigner L., Ndong J.R., Giusti A., Romana M., Delacroix-Maillard H., Cordier S., Jegou B., Thome J.P. and Blanchet P. 2010. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. J. Clin. Oncol. 28:3457-3462.

Production de biomasse racinaire chez six espèces de macrophytes en réponse à une exposition au cuivre : variabilité intra-spécifique vs. tolérance constitutive

Lilian MARCHAND, Nadège OUSTRIERE, Celestino QUINTELA-SABARIS, Aliaksandr KOLBAS, Michel MENCH

UMR BIOGECO INRA 1202, Ecologie des communautés, Université de Bordeaux, bat. B2, allée G. St-Hilaire, CS 5003, 33615 Pessac, France
marchand.lilian@gmail.com

Introduction

Les écosystèmes aquatiques sont (in)directement touchés par les contaminations en éléments traces (ET) d'origine agricole, industrielle ou domestique. Les macrophytes des zones humides offrent un service écosystémique essentiel en piégeant les ET dans leur rhizosphère. Parmi ces ET, Cu est un contaminant récurrent des écosystèmes aquatiques, avec des sources multiples, *i.e.* fongicides (bouillie bordelaise), effluents industriels et de station d'épuration, ruissellement de zones urbaines et industrielles. Des travaux de décontamination de matrices *eau* contaminées en Cu sous l'action de la rhizosphère de macrophytes ont été menés au laboratoire BIOGECO. En parallèle, le rôle de la diversité intra-spécifique dans la réponse à l'exposition au Cu a été étudié pour 6 espèces communément utilisées en zones humides construites: *Typha latifolia, Phragmites australis, Phalaris arundinacea, Juncus effusus, Iris pseudacorus* et *Schoenopectus lacustris.*

Matériels et méthodes

Quatorze sites (7 en France, 1 en Espagne, 1 en Italie, 3 en Australie, 1 en Biélorussie et 1 au Portugal) formant un gradient de contamination du sol en Cu (3-1750 mg kg^{-1} sol) ont été échantillonnés, sur lesquels 29 populations (5 *J. effusus*, 3 *S. lacustris*, 6 *P. arundinacea*, 5 *I. pseudacorus*, 7 *P. australis* et 3 *T. latifolia*) ont été prélevées (racines/rhizomes). Chaque population représente un clone qui a été multiplié, puis standardisé en serre pendant une saison de végétation complète. Lors de la seconde saison de végétation post-récolte, les individus standardisés de chaque population ont été exposés à un gradient de contamination en Cu (0.08-25 µM) pendant 3 semaines. A l'issu du test, la biomasse produite a été mesurée.

Résultats et discussion

En conditions non contaminées (0.08 µM), la production de biomasse racinaire varie fortement pour l'ensemble des 6 espèces de macrophytes en fonction de la population considérée. Cette production de racines/rhizomes dépend de la population, mais pas de la dose sur le gradient 2.5-25 µM Cu pour *T. latifolia* et *I. pseudacorus*. A l'inverse, sur ce même gradient, la production de biomasse souterraine dépend à la fois de la dose, mais également de la population pour *P. australis, J. effusus, S. lacustris* et *P. arundinacea*. La variabilité intra-spécifique influence donc la production de racines/rhizomes lors d'une exposition croissante à Cu chez ces quatre espèces. La tolérance constitutive des macrophytes aux ET – ici Cu - rapportée dans la littérature n'est vérifiée ici que pour deux espèces, *I. pseudacorus* et *T. latifolia*.

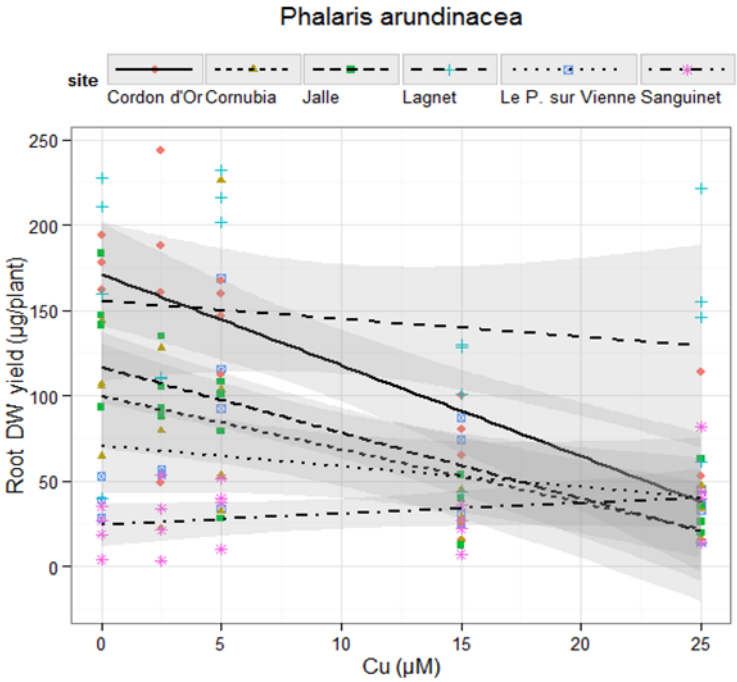


Figure 1. Biomasse racinaire produite après 3 semaines d'exposition sur le gradient 0.08-25 µM Cu : cas de *Phalaris arundinacea*

Conclusion et perspectives

Cette étude établit que la tolérance constitutive aux ET tels Cu (dans une gamme de concentration représentative des conditions environnementales) n'est pas toujours la règle ; la variabilité intra-spécifique influence la réponse à la contamination chez 4 des 6 macrophytes testées. Une étape supplémentaire est nécessaire, visant à établir si – dans le cadre de l'assimilation génétique – cette variabilité déterminée sur un trait phénotypique est aussi identifiable au niveau du génome. L'ensemble de ces conclusions remet en perspective l'utilisation des macrophytes en zones humides construites ; le choix de l'espèce, mais aussi de la population et des microorganismes associés serait à considérer.

Mots-clés : biomasse racinaire, phytoremédiation, tolérance, zone humide

Références

Marchand L., Nsangawimana F, Gonnelli C., Colzi I., Fletcher T., Oustrière N., Kolbas A., Kidd P., Bordas F., Newell P., Alvarenga P., Lamy J.B., Deletic A., Mench M. 2014. Intra-specific variability versus constitutive-like tolerance to face Cu exposure in populations of six rooted macrophytes. Environmental Pollution. 193, 204-215.

Marchand L., Nsanganwimana F., Oustrière N., Grebenshchykova Z., Lizama-Allende K., Mench M. 2014. Copper removal from water using a bio-rack system either unplanted or planted with Phragmites australis, Juncus articulatus and Phalaris arundinacea.Ecological Engineering. 64, 291-300

Nicotianamine racinaire et homéostasie de Zn et Ni chez *Arabidopsis halleri*

Jean-Yves CORNU[1,2], Ulrich DEINLEIN[2], Stephan CLEMENS[2]

[1] UMR 1391 ISPA, INRA Bordeaux-Aquitaine, F-33882 Villenave d'Ornon cedex
[2] Departement de Physiologie Végétale, Université de Bayreuth, Allemagne
jycornu@bordeaux.inra.fr

Introduction

La Nicotianamine (NA) est un acide aminé non protéique synthétisé par toutes les plantes par condensation de trois molécules de S-adénosylméthionine, sous l'action de l'enzyme nicotianamine synthase (NAS). Elle affiche une forte affinité pour les métaux de transition et joue un rôle clé dans l'homéostasie des métaux chez les plantes, à travers son implication dans leurs processus de transport et de chélation. L'objectif principal de ce travail était d'élucider le mécanisme par lequel la nicotianamine impacte la translocation des métaux vers les parties aériennes chez l'hyperaccumulatrice *Arabidopsis halleri*.

Matériels et méthodes

Des mutants sous-expresseurs du gène NAS2, codant pour la synthèse de la nicotianamine racinaire, ont été générés par interférence par ARN et caractérisés vis-à-vis de leur tolérance au Zn, Cd et Ni et de leur accumulation de ces ETM. Le xylème exsudé par poussée racinaire a fait l'objet d'analyses de spéciation et d'une caractérisation métabolique par GC-MS.

Résultats et discussion

La « suppression » de la synthèse de nicotianamine racinaire n'a pas eu d'effet sur la tolérance au Zn et Cd mais a rendu les plantes hypersensibles au nickel. Elle a eu un effet contrasté sur la mobilité de Zn et Ni, réduisant la translocation de Zn vers les parties aériennes mais promouvant celle de Ni. Dans le xylème, les concentrations en Zn étaient positivement, bien que non-stoechiométriquement, corrélées à celles de NA. Deux fractions contenant des complexes de coordination de Zn ont été détectées dans le xylème de la plante sauvage. L'une d'entre elles était fortement réduite chez le mutant sous-expresseur du gène NAS2 et co-éluait avec des complexes de type Zn-malate et/ou Zn-citrate. Les concentrations en acides organiques du xylème se sont avérées insensibles aux variations de teneur en NA racinaire et suffisamment élevées pour complexer la grande majorité du zinc xylémien.

Conclusion et perspectives

Nous pensons que la nicotianamine joue un rôle clé dans le contrôle du chargement de Zn dans le xylème mais pas dans son transport vers les parties aériennes, celui-ci étant assuré en grande partie par des acides organiques.

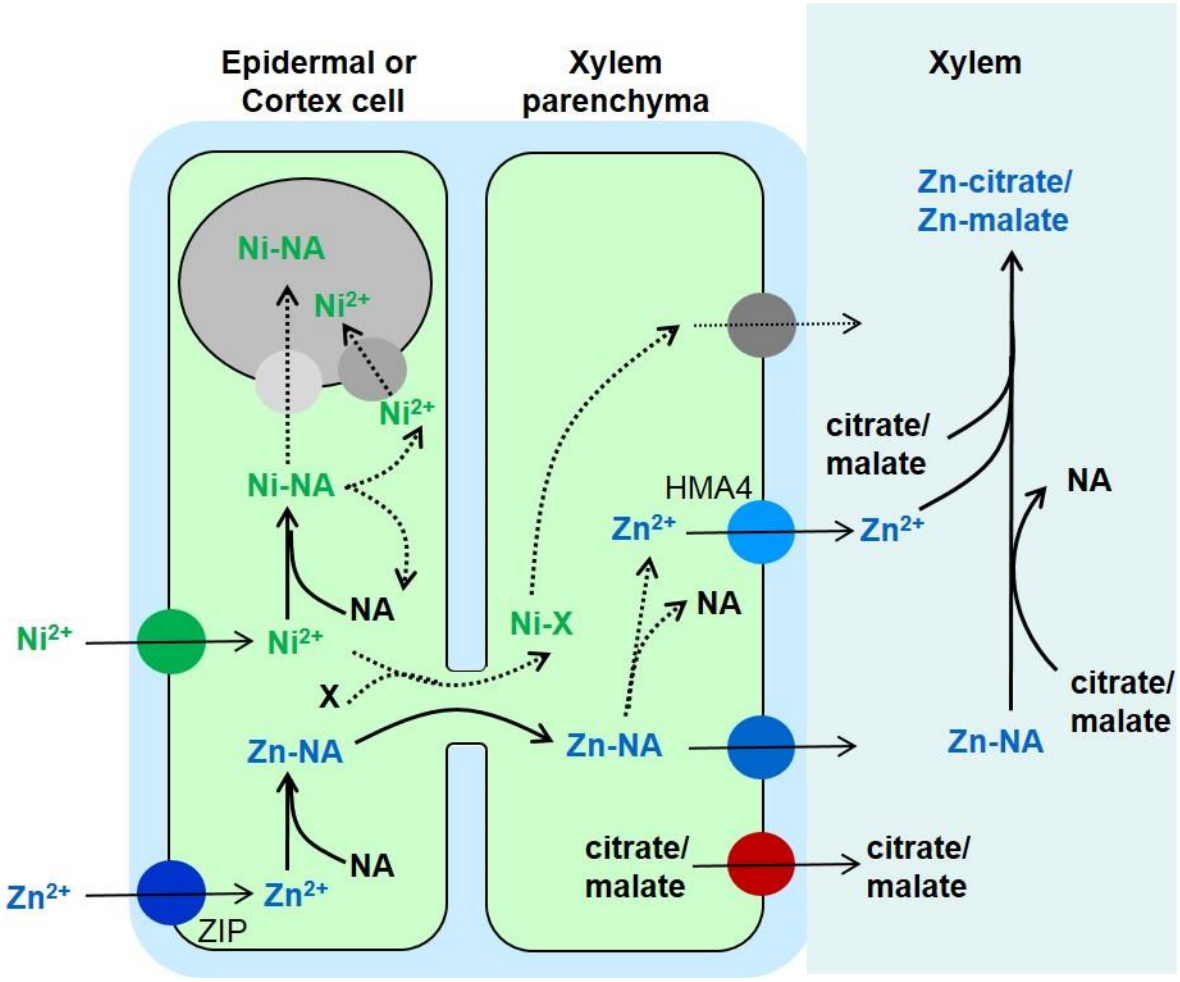


Figure 6. Modèle résumant nos conclusions concernant le rôle contrasté que joue la nicotianamine vis-à-vis de la mobilité de Zn et Ni dans les racines d'*Arabidopsis halleri*.

Mots-clés : homéostasie, métaux, complexation, hypertolérance, hyperaccumulation

Tolérance au Cu chez *Agrostis capillaris* L. : du phénotype aux déterminants moléculaires dans le protéome soluble foliaire

Elena HEGO[1,2], Sébastien VILAIN[3], Aurélien BARRE[4], Stéphane CLAVEROL[5], Jean-William DUPUY[5], Céline LALANNE[1,2], Marc BONNEU[5], Christophe PLOMION[1,2], Michel MENCH[1,2]

[1] UMR1202 BIOGECO, Université Bordeaux, Bât B2, Allée Geoffroy St-Hilaire CS 50023, 33615, Pessac et [2] INRA, 69 route d'Arcachon, 33612, Cestas cedex, France.
[3] Univ. Bordeaux et Bordeaux INP, BPRVS, EA 4135, 33000, Bordeaux, France.
[4] Centre de Bioinformatique de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle, Université Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, FR-33076 Bordeaux, France.
[5] Centre de Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, Université Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, FR-33076 Bordeaux, France.
mench@bordeaux.inra.fr

Introduction

La gestion durable de sols contaminés en éléments traces (ET), notamment par des solutions d'ingénierie écologique basées sur le phytomanagement, nécessite de connaître les mécanismes physiologiques et les déterminants moléculaires sous-jacents de la résistance des plantes aux expositions en excès d'ET et de ses variabilités inter- et intra-spécifiques. Des plantes pseudo-métallophytes, dont *Agrostis capillaris* L., permettent d'explorer ces mécanismes et déterminants moléculaires. Ces connaissances sont utiles pour identifier des biomarqueurs indiquant une imprégnation excessive en ET, sélectionner des plantes résistantes à celle-ci et s'en servir pour initier des communautés végétales propres à produire des biomasses, le plus souvent à usages industriels, et/ou restaurer des services écosystémiques sur sols contaminés en ET (dont des sites marginaux et industriels). L'influence de l'exposition chronique au Cu (1-50 µM) sur le protéome soluble foliaire a été étudiée chez des individus issus de 2 populations, métallicole (M) et non-métallicole (NM), d'*Agrostis capillaris* L. Le but était d'étudier les mécanismes et déterminants moléculaires impliqués dans la réponse des plantes à l'excès de Cu, au niveau des feuilles, d'en déduire des candidats biomarqueurs biochimiques et d'expliquer la tolérance supérieure des plantes M. Des études ont aussi été menées sur les racines [1, 2].

Matériels et méthodes

La population M provient d'un site de traitement du bois et la NM d'une lisière forestière [1]. Après semis, les plantes ont été cultivées pendant 3 mois sur perlite imbibée d'une solution nutritive (milieu non carencé en Si), Cu variant de 1 à 50 µM (sous forme $CuSO_4$) [2]. Les protéines solubles des feuilles ont été extraites par la procédure acide trichloracétique / acétone, et séparées par 2-DE (pH 4-7, gradient linéaire) [1]. L'analyse des gels colorés au CCB (PDQuest) a permis de quantifier 214 spots protéiques reproductibles et 70 protéines différentiellement accumulées ont été identifiées par LC-MS / MS. Les traits phénotypiques et le ionome des feuilles ont aussi été déterminés [2].

Résultats et discussion

La biomasse foliaire (matière sèche, MS) des plantes NM décroît linéairement avec l'exposition croissante au Cu tandis que celle des individus M reste relativement stable jusqu'à 50 µM Cu (Fig. 1a). Les concentrations foliaires en Cu (µg g^{-1} MS), similaires chez les 2 populations ou supérieures chez M à 5, 20, 25 et 40 µM Cu (test Student) et donc réfutant l'hypothèse d'une moindre translocation chez cette population, varient de 8 à 35 et augmentent selon un modèle polynomial avec l'exposition croissante en Cu (Fig. 1b).

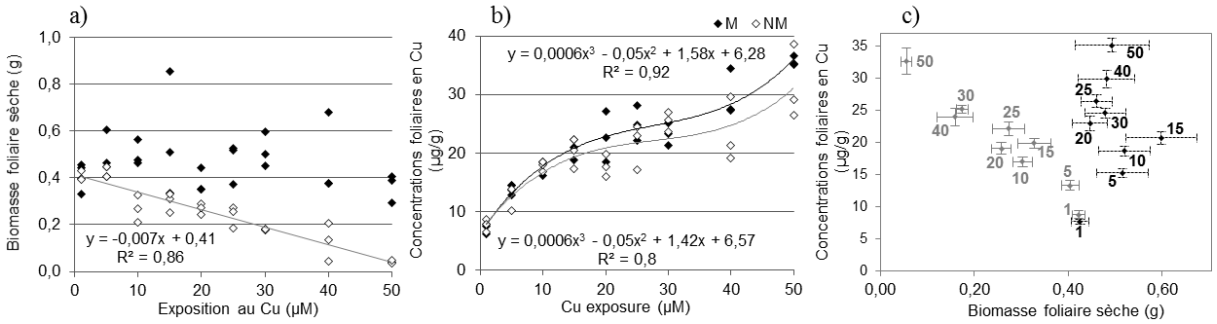


Fig.1.Influence de l'exposition au Cu sur (a) la biomasse MS et (b) les concentrations en Cu des feuilles M (noir) et NM (gris). (c) Relation entre biomasse MS et concentrations en Cu dans les feuilles.

Dans les feuilles M et NM, l'excès de Cu impacte la photosynthèse, perturbant à la fois la production de pouvoir réducteur lors des réactions dépendantes de la lumière (diminution des OEE, complexe cytochrome b6-f, et protéines de liaison des chlorophylles a/b) et la fixation du carbone au regard de la diminution des RuBisCO. La diminution de ces protéines, plus intense chez NM, associée à l'augmentation d'une réductase ferrédoxine-NADP et d'une métalloprotéase FTSH2, indiquent des dommages oxydatifs plus forts chez cette population, confirmés par l'augmentation de thiorédoxines et de thiorédoxine péroxydases. Une respiration accrue et un besoin en acides aminés soufrés, nécessaires aux mécanismes de chélation et détoxification, sont respectivement suggérés par l'augmentation, dans les feuilles des 2 populations, d'isocitrate déshydrogénase et de cystéine/ méthionine synthases. Dans les feuilles NM, l'augmentation des ATPases et des enzymes impliquées dans les processus énergétiques, telles que la glycolyse (phosphoglucomutase, fructose-1,6-biphosphatase, FBP aldolase, TIM et phosphoglycerate mutase), la voie des pentoses phosphates (transketolases) et le cycle de Calvin (sédoheptulose-1,7-biphosphatase et phosphoribulokinase), indique un besoin en composés énergétiques. Des impacts du Cu sur le métabolisme protéique des individus NM sont suggérés par l'augmentation de plusieurs protéines chaperonnes (ClpC2, 60kDa chaperonin, chaperonin CPN60-2, nucléoredoxine et PDI) et une synthèse protéique accrue (augmentation des eukaryotic initiation factors 4A, 50S ribosomal protein L10 et GTP-binding protein TypA). A l'inverse, l'accumulation d'une protéine HSP (70kDa), plus importante dans les feuilles M, contribuerait à la plus forte résistance de cette population à l'excès de Cu en protégeant le métabolisme des protéines.

Conclusion et perspectives

Les traits phénotypiques et les concentrations foliaires en Cu indiquent une plus grande tolérance des plantes M sur l'intervalle 10-50 µM Cu, insinuant une meilleure homéostasie du Cu dans leurs feuilles. Ceci est confirmé par des impacts moléculaires plus importants chez les individus NM, pour une exposition et des concentrations foliaires en Cu similaires. La sélection de lignées très tolérantes au Cu fournirait un matériel adapté à une étude plus approfondie des mécanismes de cette tolérance chez les plantes (utilisant d'autres approches de biologie intégrative) et à la phytostabilisation de sols contaminés en Cu.

Mots-clés : biomarqueur, cuivre, poacée, phytotoxicité, phytomanagement, phytoremédiation, ingénierie écologique, résistance

Références

1. Hego E, Bes C, Bedon F, Palagi PM, Chaumeil P, Barré A, Claverol S, Dupuy JW, Bonneu M, Lalanne C, Plomion C, Mench M 2014 Differential accumulation of soluble proteins in roots of metallicolous and non-metallicolous populations of *Agrostis capillaris* L. exposed to Cu. **Proteomics**, 14, 1746–1758. Doi: 10.1002/pmic.201300168.
2. Hego E, 2014. Mécanismes de tolérance au Cuivre chez des végétaux. Utilisation pour la phytoremédiation de sols contaminés. Thèse de doctorat, Ecole Doctorale Sciences & Environnement, spécialité Ecologie Evolutive, Fonctionnelle et des Communautés, **Université Bordeaux 1**, Talence.

Différences inter-variétales d'accumulation de Cd chez le blé dur (*Triticum durum* sp.)

Fanny PERRIER[1], Sylvie BUSSIERE[1], Cécile CORIOU[1], Frédéric CANDAUDAP[2], Oleg POKROVSKY[2], Christophe NGUYEN[1], Jean-Yves CORNU[1]

[1] UMR 1391 ISPA, INRA Bordeaux-Aquitaine, F-33140 Villenave d'Ornon cedex

[2] GET, Observatoire Midi-Pyrénées, F-31400 Toulouse

fanny.perrier@u-bordeaux.fr, jycornu@bordeaux.inra.fr

Introduction

Au regard de l'évaluation des risques réalisée par l'European Food Safety Agency (EFSA) en 2009, la réduction de l'exposition de la population européenne au cadmium (Cd) demeure un enjeu sanitaire majeur. Les produits végétaux (céréales et produits céréaliers en tête) contribuant majoritairement aux apports alimentaires en cadmium, il existe depuis 2006 une directive européenne (EC 1881/2006) fixant une teneur maximale en Cd dans les denrées alimentaires commercialisées à destination de l'alimentation humaine. Pour le blé et le riz, cette valeur seuil a été fixée à 0,2 mg Cd kg^{-1}. Il est toutefois question pour ces 2 céréales d'abaisser cette valeur seuil, à terme, à 0,1 mg Cd kg^{-1}. Cette baisse rendrait non commercialisable une fraction non négligeable de la production de blé dur, qui reste, parmi les blés, l'espèce la plus accumulatrice de Cd. Il convient donc d'identifier des leviers agronomiques à même d'abaisser la teneur en Cd du grain de blé dur. Cette expérimentation vise à évaluer le poids du levier variétal. Différentes variétés de blé dur ont ainsi été comparées pour leur tendance à accumuler le cadmium dans le grain. L'origine de ce différentiel d'accumulation a également été abordée.

Matériels et méthodes

Dix variétés de blé dur (8 européennes et 2 canadiennes) ont été cultivées en hydroponie jusqu'à maturité et exposées à une concentration constante de Cd (Cd^{2+} 2 nM) représentative de celle observée en solution de sol agricole. Les dernières 24 h précédant la récolte, la composition isotopique du Cd de la solution nutritive a été modifiée pour une source exclusivement enrichie en ^{111}Cd, de manière à tracer le devenir du cadmium prélevé pendant le remplissage du grain. A la récolte, les blés ont été séparés en 4 organes : racines, tiges, feuilles et grains. L'isotope ^{114}Cd a été quantifié par HR-ICP-MS dans chacun de ces organes, afin d'établir le schéma de répartition globale du Cd accumulé pendant toute la culture. La quantification du rapport isotopique $^{114}Cd/^{111}Cd$ a permis de renseigner ce même schéma de répartition de Cd pour les 24 dernières heures d'exposition.

Résultats et discussion

Bien que la culture se soit déroulée en hydroponie, il convient de souligner la similitude des paramètres agronomiques mesurés à la récolte (PMG, nombre de grains par épi) avec ceux fournis par les obtenteurs. L'ensemble des variétés testées présente toutefois une teneur en eau résiduelle du grain à la récolte légèrement supérieure à 15%.

Un classement des variétés a été établi à partir des teneurs en Cd du grain à maturité. Seule la variété canadienne Strongfield, faiblement accumulatrice de Cd, se distingue significativement des autres, par (i) une teneur inférieure en Cd du grain et (ii) une homogénéité notable entre répliquâts. L'ensemble des teneurs en Cd du grain s'avère, par ailleurs, inférieure à la valeur seuil de 0,1 mg Cd kg, s'échelonnant en moyenne de 0,03 à 0,09 mg Cd kg^{-1}.

Ces différences inter-variétales d'accumulation de Cd dans le grain ne s'expliquent pas par des différences de prélèvement racinaire de Cd. Elles semblent davantage reliées à des différences inter-variétales de translocation de Cd, *i.e.* de transfert du Cd prélevé des racines aux parties aériennes. Une corrélation positive est, en effet, observée entre la quantité de Cd du grain et la quantité de Cd transloqué aux parties aériennes (Figure 1).

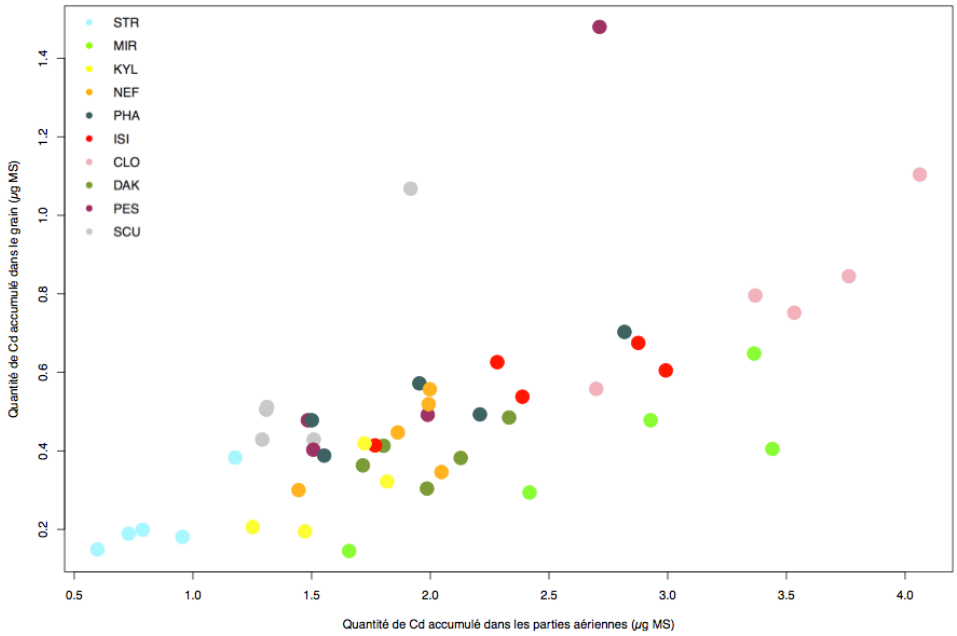


Figure 1. Quantité de Cd accumulé dans le grain en fonction de la quantité de Cd transloqué aux parties aériennes (p-value = $2{,}70.10^{-4}$, $R^2 = 0.64$, n = 48)

L'analyse de covariance indique un effet significatif de (i) la quantité de Cd transloqué aux parties aériennes sur la quantité de Cd accumulé dans le grain, et de (ii) la variété sur la quantité de Cd accumulé dans le grain. En revanche, l'interaction entre la quantité de Cd transloqué aux parties aériennes et la composante variétale n'est pas significative. Le pourcentage de Cd transloqué aux parties aériennes qui est alloué au grain est donc constant entre variétés, avoisinant les 20%.

Les données d'isotopie soulignent qu'un prélèvement racinaire de Cd a bien lieu en fin de remplissage du grain et qu'une fraction non négligeable du Cd néo-prélevé est directement allouée au grain. Un traitement en cours permettra de révéler si le devenir du Cd prélevé en fin de remplissage du grain (i) varie entre cultivars, et (ii) s'il explicite (ou non) une part de la variabilité intra-spécifique d'accumulation de Cd observé dans le grain.

Conclusion et perspectives

Le schéma classiquement reporté dans la littérature (*i.e.* différences de translocation pour expliquer *in fine* la teneur en Cd du grain) est illustré pour la première fois chez des variétés européennes de blé dur cultivées jusqu'à maturité. Les variations inter-cultivars de teneur en Cd du grain demeurent relativement faibles. Cela souligne l'importance de maîtriser, avant tout, la biodisponibilité du Cd dans le sol en contexte agricole. En complément, une orientation génétique des programmes de sélection, selon ce critère d'accumulation en Cd du grain, serait une voie à privilégier pour une garantie à long terme de la qualité sanitaire des récoltes.

Mots-clés : blé dur, variétés, cadmium, répartition, dilution isotopique

Référence

EFSA. 2009. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. EFSA J. 980: 1-139.

5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA

***Domaine de Françon*, Biarritz, 25-27 novembre 2014**

Liste et adresse des participants

Nom Prénom	Unité	Organisme	Mail
AMICHOT Marcel	UMR1355 ISA Institut Sophia Agrobiotech	INRA	Marcel.Amichot@sophia.inra.fr
BAGUELIN Céline	UMR1347 Agroécologie	INRA	celine.baguelin@dijon.inra.fr
BARRIUSO Enrique	UMR1091 EGC Environnement et Grandes Cultures	INRA	Enrique.Barriuso@grignon.inra.fr
BEAUMELLE Léa	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	lea.beaumelle@versailles.inra.fr
BERARD Annette	UMR1114 EMMAH Environnement Méditerranéen.	INRA	annette.berard@avignon.inra.fr
BOLLIET Valérie	UMR1224 ECOBIOP Ecologie Comportementale	INRA	Valerie.Bolliet@st-pee.inra.fr
BONY Sylvie	USC1369 LEHNA Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes	INRA	Sylvie.BONY@entpe.fr
BOUCHEZ Agnès	UMR0042 CARRTEL Centre Alpin de Recherche	INRA	agnes.bouchez@thonon.inra.fr
BRACONNIER Patricia	UMR1391 ISPA Interactions Sol Plante Atmosphère	INRA	Patricia.Braconnier@bordeaux.inra.fr
CAQUET Thierry	UAR1275 EFPA Département Ecologie des Forêts	INRA	efpa@nancy.inra.fr
CARENJOT Ludovic		Enigma France	ludovic.carenjot@enigma-france.com
CHEVIRON Nathalie	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	nathalie.cheviron@versailles.inra.fr
CORNU Jean-Yves	UMR1391 ISPA Interactions Sol Plante Atmosphère	INRA	jean-yves.cornu@bordeaux.inra.fr
COSIO Claudia	Institut F.-A. Forel	Université de Genève	Claudia.Cosio@unige.ch
CROUZET Olivier	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie	INRA	Olivier.Crouzet@versailles.inra.fr
DENAIX Laurence	UMR1391 ISPA Interactions Sol Plante Atmosphère	INRA	Laurence.Denaix@bordeaux.inra.fr
DEVAUX Alain	USC1369 LEHNA Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes	INRA	devaux@entpe.fr
GARRIGUES Philippe	UMR 5255 CNRS Institut des Sciences Moléculaires	Bordeaux1	p.garrigues@ism.u-bordeaux1.fr

GEFFARD Olivier	UR MALY Laboratoire d'Ecotoxicologie	Irstea	olivier.geffard@irstea.fr
GIMBERT Frédéric	UMR 6249 Chrono-Environnement, USC INRA	Université Franche-Comté	frederic.gimbert@univ-fcomte.fr
GOULAS Anaïs	UMR1091 EGC Environnement et Grandes Cultures	INRA	agoulas@grignon.inra.fr
HAUDIN Claire-Sophie	UMR1091 EGC Environnement et Grandes Cultures	AgroParis Tech	haudin@agroparistech.fr
HEDDE Mickael	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie	INRA	Mickael.Hedde@versailles.inra.fr
HENAFF Gautier		Enigma France	gautier.henaff@enigma-france.com
HENNER Pascale	IRSN/PRP-ENV/SERIS/Laboratoire de Biogéochimie	IRSN	pascale.henner@irsn.fr
JEAN Séverine	UMR5245 ECOLAB Laboratoire écologie fonctionnelle	INRA	severine.jean@ensat.fr
LAMY Isabelle	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	isabelle.lamy@versailles.inra.fr
LAURENT François	UMR5245 ECOLAB Laboratoire écologie fonctionnelle	INRA	Francois.Laurent@toulouse.inra.fr
MARCHAND Lilian	UMR1202 BIOGECO Biodiversité, Gènes et Communautés	INRA	lmarchan@bordeaux.inra.fr
MARTIN-LAURENT Fabrice	UMR1347 Agroécologie	INRA	fabrice.martin@dijon.inra.fr
MENCH Michel	UMR1202 BIOGECO Biodiversité, Gènes et Communautés	INRA	Michel.Mench@bordeaux.inra.fr
MONTUELLE Bernard	UMR0042 CARRTEL Centre Alpin de Recherche	INRA	bernard.montuelle@thonon.inra.fr
MORIN Soizic	UR EABX Ecosystèmes aquatiques et changements globaux	Irstea	soizic.morin@irstea.fr
MOUGIN Christian	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	christian.mougin@versailles.inra.fr
NELIEU Sylvie	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	sylvie.nelieu@versailles.inra.fr
NGUYEN Christophe	UMR1391 ISPA Interactions Sol Plante Atmosphère	INRA	Christophe.Nguyen@bordeaux.inra.fr

OLLIVIER Elodie	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	elodie.ollivier@versailles.inra.fr
OUSTRIERE Nadège	UMR1202 BIOGECO Biodiversité, Gènes et Communautés	INRA	oustriere.nadege@gmail.com
PASCAL-LORBER Sophie	UMR5245 ECOLAB Laboratoire écologie fonctionnelle	INRA	sophie.pascal@toulouse.inra.fr
PELOSI Céline	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie	INRA	Celine.Pelosi@versailles.inra.fr
PERRIER Fanny	UMR1391 ISPA Interactions Sol Plante Atmosphère	INRA	fanny.perrier@u-bordeaux.fr
PESCE Stéphane	UR MAEP Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions	Isrtea	stephane.pesce@irstea.fr
SANCHEZ Wilfried		FCS Rovaltain	w.sanchez@fcsrovaltain.org
SAPPIN-DIDIER Valérie	UMR1391 ISPA Interactions Sol Plante Atmosphère	INRA	Valerie.Sappin@bordeaux.inra.fr
SIREYJOL Christine	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	christine.sireyjol@versailles.inra.fr
STORCK Véronika	UMR1347 Agroécologie	INRA	vstorck@dijon.inra.fr
THOISY Jeanne-Chantal	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	jeanne-chantal.thoisy@versailles.inra.fr
ZAGATTI Pierre	UR 251 PESSAC Physicochimie et Ecotoxicologie.	INRA	pierre.zagatti@versailles.inra.fr