

# VetAgro Sup

Mémoire de fin d'études d'ingénieur

Étude des réponses des plantes invasives  
*Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides*  
sous conditions de stress hydriques et salins.

Morgane GILLARD

Option GEPV

Génomique, Écophysiologie, Productions Végétales

2013

**CONFIDENTIEL**





# VetAgro Sup

Mémoire de fin d'études d'ingénieur

Étude des réponses des plantes invasives  
*Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides*  
sous conditions de stress hydriques et salins.

Morgane GILLARD

Option GEPV

Génomique, Écophysiologie, Productions Végétales

2013

Maître de stage : Dominique BARLOY

Tuteur de stage : Patricia DREVET





L'étudiant conserve la qualité d'auteur ou d'inventeur au regard des dispositions du code de la propriété intellectuelle pour le contenu de son mémoire et assume l'intégralité de sa responsabilité civile, administrative et/ou pénale en cas de plagiat ou de toute autre faute administrative, civile ou pénale. Il ne saurait, en cas, seul ou avec des tiers, appeler en garantie VetAgro Sup.



## ABSTRACT

Biological invasions are the third cause of biodiversity decline. The Water Primroses *Ludwigia grandiflora* and *Ludwigia peploides* are two invasive aquatic macrophyte species in France. They have important impacts, both economical and ecological. The strategies currently used to fight their invasion don't allow an effective management. In order to determine if these species have a better plasticity than the native species *Mentha aquatica*, water stress and salt stress were applied to the three species for five days. Biochemical analysis have been realized to evaluate global strategies of response to stresses and the mobilization of antioxidant pathways. Results showed differences in the responses depending on stress and species. Salt and water stresses impacted photosynthetic activity and proteins concentration, indicating that an oxidative stress occurred. To deal with salt stress, guaiacol peroxidase was mobilized by *L. grandiflora* and *L. peploides*, while *M. aquatica* used glutathione reductase to scavenge reactive oxygen species. According to the biological variables studied, the two invasives species seems more plastic than the native one. Differential responses in favor to *L. grandiflora* were noted between the two invasives species. This can be explained by their different ploidy level, higher for *L. grandiflora*. Other antioxidant enzymes or some reactive oxygen species could be dosed to bring complementary results.

Key words : Water Primroses, invasive species, salinity, water stress, oxidative stress, ROS, plasticity





# AVANT PROPOS

## Présentation de l'établissement d'accueil

### ► L'INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

Cet institut a été créé en 1946, dans un contexte de reconstruction d'après guerre, et dans le cadre du projet de modernisation de l'agriculture française. Depuis, l'INRA a accompagné les mutations du monde agricole, des filières alimentaires et des territoires.

Désormais, l'INRA mène des recherches dans le but d'établir une alimentation saine et de qualité, à l'aide d'une agriculture compétitive et durable, tout en préservant et valorisant l'environnement. Pour cela, il est implanté dans 18 centres, répartis sur l'ensemble du territoire français.

L'institut s'inscrit au cœur de la recherche agronomique, que ce soit à l'échelle locale ou à l'échelle planétaire. En effet, il s'agit du premier institut de recherche agronomique en Europe, et du deuxième dans le monde.

### ► Le centre de Rennes Bretagne Basse-Normandie

Les recherches menées par ce centre sont variées, et regroupées en cinq grandes thématiques : la biologie animale et végétale intégratives, à travers des approches d'agro-écologie et de gestion durable des productions animales et de la santé des plantes ; le fonctionnement et la gestion des écosystèmes aquatiques ; l'élaboration et la qualité des aliments d'origine animale, avec des objectifs mêlant nutrition et santé ; l'exploitation, les marchés et politiques publiques de l'agriculture et de l'environnement.

L'étude de ces thématiques est répartie entre 20 unités de recherche, d'expérimentation et de service. Parmi elles, l'Unité Mixte de Recherche Écologie et Santé des Écosystèmes m'a accueillie lors de ce stage de fin d'étude.

### ► L'UMR ESE (INRA-Agrocampus Ouest)

Actuellement, l'unité est composée de quatre équipes :

- Écologie halieutique (EH)
- Conservation et restauration des écosystèmes aquatiques (CREA)
- Écologie et qualité des milieux aquatiques (EQMA)
- Écologie et gestion des invasions biologiques (EIB) présentée ci-après

### ► L'équipe EIB

Cette équipe conduit des études sur les invasions biologiques de macrophytes et de vertébrés aquatiques. Il s'agit de déterminer la nature et l'importance des conséquences de ces invasions sur le fonctionnement des écosystèmes touchés. Pour cela, il est nécessaire de comparer la situation observée avant et après l'introduction de l'espèce invasive, ou bien avant et après l'élimination d'une espèce native. De plus, des approches expérimentales complètent les observations sur le terrain, par la mise en culture des macrophytes, l'analyse de leur croissance et de la compétition intra et inter espèces. Ainsi cette équipe contribue aux recherches sur l'évolution de la faune et des anciennes voies de colonisations humaines, grâce à des collaborations avec des archéozoologues. La contribution de généticiens permet l'étude de la microévolution (fondation, mutation/dérive, flux génétiques, parenté).



## REMERCIEMENTS

Je remercie très sincèrement Dominique Barloy pour son encadrement tout au long de ce stage, ainsi que pour sa confiance. Sa motivation et sa bonne humeur communicative étaient stimulantes, et ont participé au succès de ce travail. Ses conseils lors de la mise en place de l'expérimentation, et sa participation à l'ensemble de l'étude ont été d'une grande aide.

J'aimerais ensuite remercier Danièle Vassaux pour son enthousiasme, son savoir-faire et pour ses conseils lors de ces longues journées de manipulation au laboratoire.

Je souhaite remercier Jacques Haury pour ses conseils, ainsi que Michel Bozec pour son aide lors des sorties sur le terrain. Merci également à Sylvain d'avoir pensé à nous ramener « des peplodes » lors de ses excursions au Nord de Nantes.

Merci à Antoine Gallard d'avoir gardé un œil sur les Jussies.

Je tiens particulièrement à remercier Florence Val pour son aide et son œil critique lors de la préparation des oraux.

Un grand merci à Anne-Laure Besnard pour m'avoir aidé à mettre en route l'autoclave, ainsi et qu'à Gaëlle Hamelin, à la fois pour la mise en route de l'autoclave mais aussi pour ses conseils sur le dosage de la peroxydase.

Merci à l'ensemble de l'UMR ESE, de l'UMR U3E et de l'équipe pédagogique ESP pour leur accueil pendant ces six mois.

Je voudrais également remercier Patricia Drevet pour son suivi et ses conseils tout au long de ce stage.

Enfin, merci à Boris Fumanal d'avoir accepté d'assister à ma soutenance.



# TABLE DES MATIÈRES

## TABLES DES FIGURES, DES TABLEAUX ET DES ABRÉVIATIONS

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>I – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>1. Espèces végétales invasives</b> .....	<b>- 2 -</b>
1.1. Processus d’invasion.....	- 2 -
1.2. Invasions biologiques végétales en France .....	- 2 -
<b>2. Deux macrophytes invasives à fort impact : les jussies</b> .....	<b>- 3 -</b>
2.1. Historique de l’invasion.....	- 3 -
2.2. Biologie et écologie des <i>Ludwigia</i> invasives.....	- 3 -
2.2.1. Morphologie .....	- 3 -
2.2.2. Mode de propagation et de reproduction.....	- 3 -
2.2.3. Les biotopes favorables .....	- 4 -
2.2.4. Perturbation de la vie aquatique .....	- 4 -
2.2.5. Gestion des écosystèmes .....	- 4 -
<b>3. Plasticité adaptative et réponses aux stress</b> .....	<b>- 5 -</b>
3.1. Hypothèses sur la plasticité adaptative .....	- 5 -
3.2. Réponses des espèces invasives et natives face aux stress .....	- 6 -
3.2.1. Réponses morphologiques.....	- 6 -
3.2.2. Réponses physiologiques .....	- 6 -
<b>4. Voies de réponses des plantes aux stress</b> .....	<b>- 7 -</b>
4.1. Mécanismes généraux de réponse aux stress biotiques et abiotiques.....	- 7 -
4.2. Stress oxydants et réponses de la plante .....	- 7 -
4.2.1. Les espèces réactives de l’oxygène .....	- 7 -
4.2.2. Impacts des ROS sur le métabolisme cellulaire .....	- 8 -
▪ Conséquence du stress oxydant .....	- 8 -
▪ Rôle dans la signalisation cellulaire.....	- 8 -
4.2.3. Mécanismes de détoxification des ROS .....	- 9 -
▪ Les antioxydants non-enzymatiques .....	- 9 -
▪ Les antioxydants enzymatiques .....	- 9 -



<b>II - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>1. Matériel végétal .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.1. Choix des espèces .....	- 10 -
1.2. Conservation, croissance et multiplication .....	- 10 -
<b>2. Dispositif expérimental .....</b>	<b>- 10 -</b>
2.1. Mise en place de l'essai .....	- 10 -
2.2. Stress appliqués .....	- 11 -
2.2.1. Stress salin.....	- 11 -
2.2.2. Stress hydrique .....	- 11 -
2.2.3. Cinétique de prélèvement.....	- 11 -
<b>3. Analyses biochimiques.....</b>	<b>- 11 -</b>
3.1. Préparation des échantillons .....	- 11 -
3.2. Analyses globales .....	- 12 -
3.2.1. Dosage des pigments .....	- 12 -
3.2.2. Dosage colorimétrique des protéines totales .....	- 12 -
3.3. Analyses concernant le système anti-oxydant .....	- 12 -
3.3.1. Dosage de la capacité anti-oxydante .....	- 12 -
3.3.2. Dosage de la peroxydation lipidique .....	- 13 -
3.3.3. Dosage de l'activité de la peroxydase (GPOX).....	- 13 -
3.3.4. Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST).....	- 13 -
3.3.5. Dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR).....	- 14 -
<b>4. Traitement statistique des données .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>III - RÉSULTATS.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>1. Analyse phénotypique des réponses aux stress .....</b>	<b>- 15 -</b>
1.1. Stress salin .....	- 15 -
1.2. Stress hydrique.....	- 16 -
<b>2. Réponses physiologiques et biochimiques.....</b>	<b>- 16 -</b>
2.1. Réponses face au stress salin .....	- 16 -
2.1.1. Réponses globales .....	- 16 -
▪ Chlorophylle a.....	- 16 -
▪ Chlorophylle b .....	- 17 -
▪ Ratio chlorophylle a/b.....	- 17 -
▪ Caroténoïdes .....	- 18 -
▪ Protéines totales .....	- 18 -
2.1.2. Réponses spécifiques au stress oxydant .....	- 19 -





▪ Capacité antioxydante .....	- 19 -
▪ Guaiacol peroxydase .....	- 19 -
▪ Glutathion réductase .....	- 20 -
2.2. Réponses face au stress hydrique .....	- 21 -
2.2.1. Réponses globales .....	- 22 -
▪ Chlorophylle a.....	- 22 -
▪ Chlorophylle b .....	- 23 -
▪ Ratio chlorophylle a/b.....	- 23 -
▪ Caroténoïdes .....	- 24 -
▪ Protéines totales .....	- 25 -
2.2.2. Réponses spécifiques au stress oxydant .....	- 26 -
▪ Capacité antioxydante .....	- 26 -
▪ Guaiacol peroxydase .....	- 26 -
▪ Glutathion réductase .....	- 26 -
<b><i>IV - DISCUSSION</i></b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>1. Réflexion sur le dispositif expérimental et les méthodes utilisées</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>2. Réponses aux stress hydrique et salin</b> .....	<b>- 27 -</b>
2.1. Mobilisation des voies générales de réponse au stress .....	- 28 -
2.1.1. Activité photosynthétique.....	- 28 -
2.1.2. Activité protéique .....	- 29 -
2.2. Mobilisation des voies anti-oxydantes.....	- 29 -
2.2.1. Capacité anti-oxydante .....	- 30 -
2.2.2. Réponse enzymatique.....	- 30 -
▪ Guaiacol peroxydase .....	- 30 -
▪ Glutathion réductase .....	- 31 -
<b>3. Différences entre espèces</b> .....	<b>- 32 -</b>
3.1. Distinction entre les espèces invasives et l'espèce native .....	- 32 -
3.1.1. Différences intrinsèques des trois espèces .....	- 32 -
3.1.2. Différences de réponse face aux stress.....	- 32 -
3.2. Comportement des deux espèces invasives face au stress.....	- 34 -
<b><i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i></b> .....	<b>- 36 -</b>
<b><i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i></b> .....	<b>- 37 -</b>
<b><i>TABLE DES ANNEXES</i></b> .....	<b>- 42 -</b>



## TABLE DES FIGURES

Figure 1 – Représentation schématique des principales barrières limitant la diffusion des plantes introduites .....	2
Figure 2 – Carte de la distribution géographique des <i>Ludwigia</i> spp sur le territoire français ...	3
Figure 3 – Morphologie générale des Jussies .....	3
Figure 4 – Morphologie de <i>Ludwigia grandiflora</i> et <i>Ludwigia peploides</i> et leurs stipules respectifs permettant de les différencier .....	3
Figure 5 – Cycle de développement des Jussies .....	3
Figure 6 – Normes de réaction de l'espèce invasive <i>Alternanthera philoxeroides</i> et de l'espèce native <i>Alternanthera sessilis</i> soumises à trois conditions de disponibilité en eau .....	6
Figure 7 – Voies de réponses mises en place face par la plante face à des stress biotiques et abiotiques .....	7
Figure 8 – Production des ROS .....	8
Figure 9 – Les deux étapes de la réaction d'Haber Weiss .....	8
Figure 10 – Schématisation des réactions de détoxication des ROS .....	9
Figure 11 – Représentation du dispositif expérimental des stress hydriques et salins appliqués à <i>L.grandiflora</i> , <i>L. peploides</i> , et <i>M. aquatica</i> , pour un temps de cinétique donné .....	10
Figure 12 – Schéma résumant les différentes étapes nécessaires à l'obtention de l'extrait cellulaire des plantes d'intérêt, utilisé pour les différentes analyses biochimiques .....	11
Figure 13 – Principe du dosage colorimétrique de Bradford au bleu de Coomassie .....	12
Figure 14 – Principe de la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) .....	13
Figure 15 – Principe de la méthode TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances) .....	13
Figure 16 – Principe du dosage de l'activité de la guaiacol peroxydase (GPOX) .....	13
Figure 17 – Principe du dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) .....	14
Figure 18 – Principe du dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR) .....	14
Figure 19 – Modifications morphologiques de <i>L. grandiflora</i> , <i>L. peploides</i> et <i>M. aquatica</i> au cours du temps, en fonction des différentes concentrations des solutions salines .....	15
Figure 20 – Coloration des solutions salines selon l'espèce, après 3 jours à 3 g.L <sup>-1</sup> .....	15
Figure 21 – Modifications morphologiques de <i>L. grandiflora</i> , <i>L. peploides</i> et <i>M. aquatica</i> au cours du temps, en fonction des différents niveaux d'eau .....	16
Figure 22 – Concentrations en chlorophylle a selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	17
Figure 23 – Ratios chlorophylle a/chlorophylle b selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	17
Figure 24 – Concentrations en caroténoïdes selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	18
Figure 25 – Concentrations en protéines totales selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	18
Figure 26 – Quantité d'antioxydants selon l'espèce l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	19



Figure 27 – Activité de la guaiacol peroxydase selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	19
Figure 28 – Activité de la glutathion réductase selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	20
Figure 29 – Concentrations en chlorophylle a selon l'espèce l'intensité du stress hydrique et le temps d'application .....	21
Figure 30 – Ratios chlorophylle a/chlorophylle b selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application .....	23
Figure 31 – Concentrations en caroténoïdes selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application .....	24
Figure 32 – Concentrations en protéines totales selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application .....	25
Figure 33 – Quantité d'antioxydants présents selon l'espèce, l'intensité du stress et le temps d'application .....	26
Figure 34 – Activité de la guaiacol peroxydase selon l'espèce l'intensité du stress hydrique et le temps d'application .....	26
Figure 35 – Activité de la glutathion réductase selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application .....	26
Figure 36 – Bilan des résultats obtenus .....	27

## **TABLE DES TABLEAUX**

Tableau 1 – Liste des espèces végétales aquatiques invasives présentes sur la liste noire de la région centre en 2013 .....	2
Tableau 2 – Exemple des coûts d'arrachage de la Jussie .....	5
Tableau 3 – Dates, lieux et coordonnées GPS des récoltes de matériel végétal .....	10
Tableau 4 – Bilan des différences significatives obtenues entre les témoins des différentes espèces, pour les variables biologiques mesurées .....	32



## TABLE DES ABRÉVIATIONS

AAPH : 2,2'-Azobis (2-méthylpropionamide) Dihydrochloride

ANOVA : analyse de variance

APX : ascorbate peroxydase

ASH : ascorbate

BSA : sérum albumine bovine

CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène

Chl : chlorophylle

DO : densité optique

DTNB : acide 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

esp : espèce

GPOX : guaiacol peroxydase

GPX : glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSSG : glutathion oxydé

GSH : glutathion réduit

GST : glutathion S-transférase

LO : Longueur d'onde

MDA : malondialdéhyde

MF : matière fraîche

MS : matière sèche

NaCl : chlorure de sodium

NPK : azote, phosphore, potassium

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

P : valeur p

PAC : Politique agricole commune

PVP : polyvinylpyrrolidone

qsp : quantité suffisante pour

rep : répétition biologique

ROS : reactive oxygen species

SOD : superoxyde dismutase

TBARS : Thiobarbituric Acid-Reactive Substances

TNB : acide 5-thionitrobenzoic

tps : temps de cinétique





## INTRODUCTION

Les phénomènes d'invasion biologique sont aujourd'hui considérés comme l'une des principales causes de perte de la biodiversité (Monty & Mahy 2009), après la destruction des milieux et le réchauffement climatique (Paradis et al. 2008).

Une espèce invasive est une espèce exotique envahissante, dont la prolifération dans les milieux naturels ou semi-naturels conduit à des changements significatifs de composition, de structure ou de fonctionnement des écosystèmes (Vahrameev & Nobilliaux 2013). Leur appellation est souvent confondue avec celle d'espèce exotique qui concerne toutes les espèces non-indigènes d'un territoire, souvent importées par l'homme mais qui ne sont pas nuisibles. Le terme "espèce invasive" est également assimilé à tort à celui d'espèce "envahissante", qui lui concerne les espèces natives du milieu (Richardson *et al.* 2000).

La nécessité de lutter contre les espèces invasives est actuellement reconnue au niveau de la politique environnementale française. Ainsi, à travers l'article 23 de la loi Grenelle du 3 août 2009, l'État français s'est engagé à mettre en œuvre des plans de luttés contre les espèces exotiques envahissantes, terrestres et marines, afin de prévenir leur installation et leur extension et réduire leurs impacts négatifs (Légifrance).

Or, mieux lutter contre une espèce nécessite l'acquisition de nouvelles connaissances vis à vis de sa dispersion, de son adaptation et de sa gestion par exemple. Les espèces auxquelles nous nous sommes intéressés sont les jussies *Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides*. Elles ont été classées espèces invasives les plus dangereuses, pour les graves nuisances écologiques et socio-économiques dont elles sont responsables en France. Ainsi, l'arrêté ministériel du 2 mai 2007 en interdit la commercialisation, le transport, l'utilisation horticole et l'introduction dans le milieu naturel (Smida *et al.* 2010). Il s'agit des seules espèces invasives dont l'utilisation est régie par la loi en France.

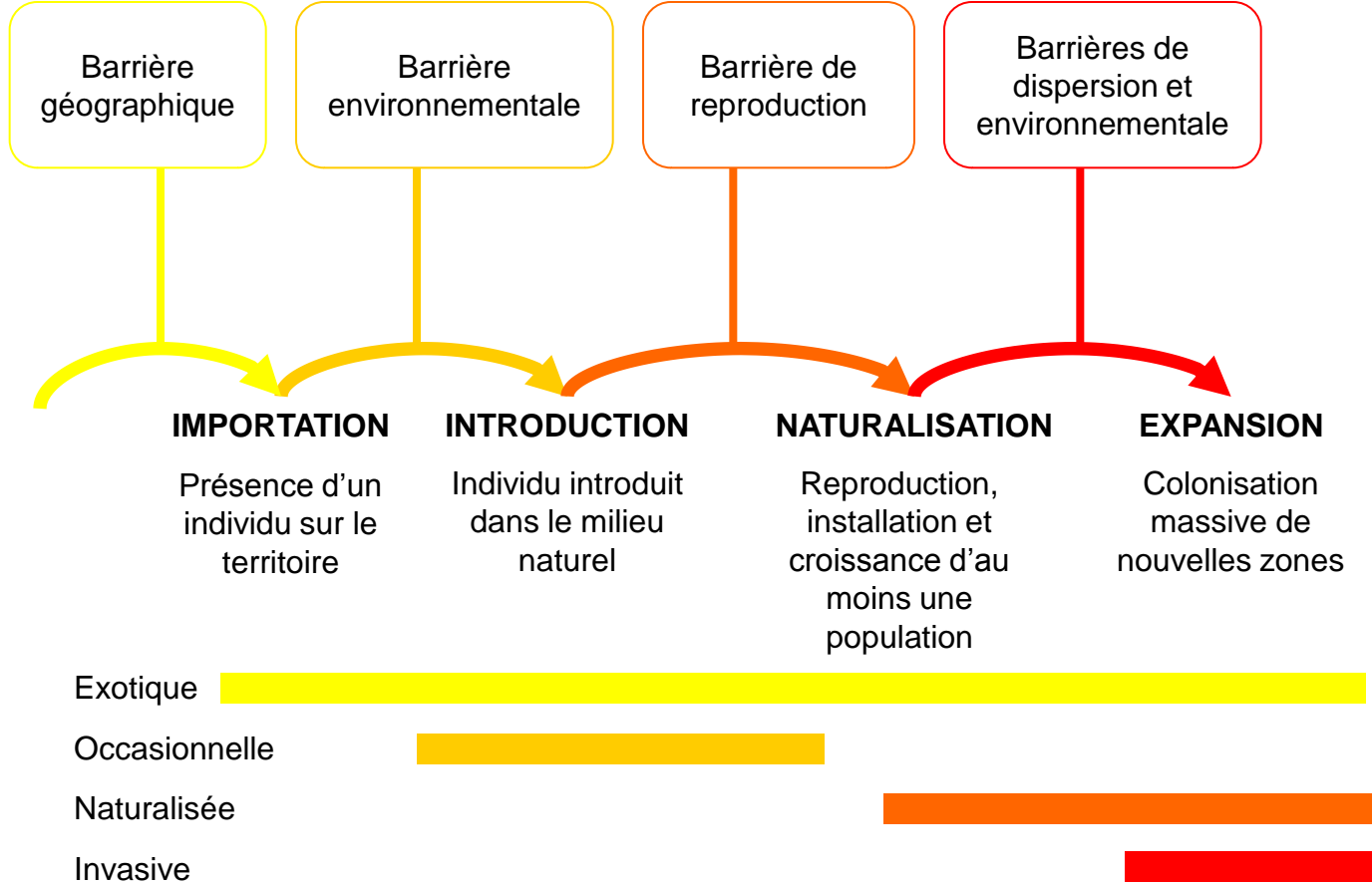
Cette étude a été menée afin d'appréhender les réponses de ces deux espèces face à des stress hydriques et salins.

Les changements climatiques à venir pourraient entraîner une augmentation des températures, d'où résulterait une diminution du niveau d'eau des eaux intérieures. D'une part, ce changement conduirait les plantes aquatiques à s'adapter à l'exondaison. D'autre part, cela pourrait provoquer une augmentation de la concentration en NaCl, notamment dans les zones à l'intersection entre eau douce et eau salée, telles que les estuaires, les marais côtiers ou les lagunes littorales. Ces modifications du milieu créeraient un environnement stressant pour les espèces présentes. Il serait donc intéressant de déterminer si les jussies sauraient s'acclimater à ces nouvelles conditions hydriques et salines.

Pour répondre à cela, l'approche qui a été choisie est une approche physiologique. L'expérimentation conduite au cours de ce stage de fin d'étude avait pour but de confirmer ou infirmer l'hypothèse récurrente dans la bibliographie, selon laquelle les plantes invasives présentent des réponses adaptatives et une plasticité phénotypique plus élevées que les natives. Nous avons supposé pour cela que la plasticité phénotypique des plantes invasives se traduit au niveau de leur métabolisme par la mobilisation des voies de défense généralistes impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques.

À long terme, un des objectifs de cette expérimentation est de pouvoir fournir de nouvelles stratégies de gestion des plantes invasives.

La première partie de ce rapport de stage permettra de prendre connaissance du contexte général de l'étude menée. Une seconde partie sera consacrée à la présentation des matériels et méthodes utilisés pour mener à bien cette étude. Puis les résultats obtenus seront analysés, avant d'être discutés dans une quatrième partie.



**Figure 1** - Représentation schématique des principales barrières limitant la diffusion des plantes introduites. (D'après Vahrameev & Nobilliaux 2013, Richardson 2000)

**Tableau 1** - Liste des espèces végétales aquatiques invasives présentes sur la liste noire de la région centre en 2013 (Vahrameev & Nobilliaux 2013)

Nom latin	Nom commun
<i>Azolla filiculoides</i>	Azolla fausse-fougère
<i>Crassula helmsii</i>	Crassule de Helms
<i>Egeria densa</i>	Elodée dense
<i>Eichhornia crassipes</i>	Jacinthe d'eau
<i>Elodea canadensis</i>	Elodée du Canada
<i>Elodea nuttallii</i>	Elodée à feuilles étroites
<i>Hydrocotyle ranunculoides</i>	Hydrocotyle fausse-renoncule
<i>Lagarosiphon major</i>	Grand lagarosiphon
<i>Lemna minuta</i>	Lentille d'eau minuscule
<i>Ludwigia grandiflora</i>	Jussie à grandes fleurs
<i>Ludwigia peploides</i>	Jussie faux-pourpier
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Myriophylle aquatique
<i>Pistia stratioides</i>	Laitue d'eau

# I – Introduction bibliographique

---

## 1. Espèces végétales invasives

D'après la définition de Richardson *et al.* (2000), une espèce végétale est considérée comme invasive lorsqu'elle produit un grand nombre de descendants fertiles, à une distance considérable des pieds parents, et qui possède un potentiel de propagation important, sur une surface considérable. Autrement dit, il s'agit d'une espèce qui se développe rapidement et densément au sein de communautés végétales existantes, tout en augmentant sa distribution spatiale (Ruaux 2008).

### 1.1. Processus d'invasion

Le processus d'invasion peut être divisé en différentes étapes, qui sont plus ou moins nombreuses selon les auteurs. Il est possible de distinguer l'importation à partir d'un pays étranger, l'introduction dans le milieu naturel, la naturalisation de l'espèce, et enfin l'expansion (Richardson *et al.* 2000, Ruaux 2008, Monty & Mahy 2009). Lors de l'ensemble de ces étapes, l'espèce doit faire face à différentes barrières qui peuvent limiter son expansion, telles que les barrières géographiques, environnementales, reproductives, ou encore de dispersion (figure 1).

Les étapes d'importation et d'introduction peuvent être accidentelles ou volontaires, il s'agit des phases que l'Homme influence le plus dans le processus d'invasion. L'espèce introduite peut être naturalisée lorsqu'elle parvient à survivre et à se reproduire régulièrement, sans intervention humaine (Richardson *et al.* 2000). Pour cela, la tolérance au climat de la région d'implantation est une condition essentielle.

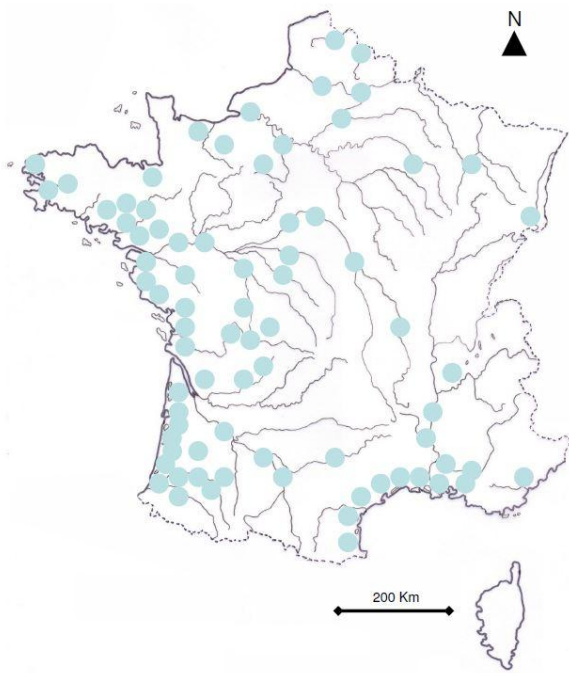
Une fois que l'espèce est installée, elle se déplace et évolue dans son milieu, de manière à s'y adapter. Si elle parvient à se propager, augmenter fortement le nombre d'individus qui la compose, elle devient invasive. Cependant, le franchissement de l'ensemble de ces barrières n'est pas irréversible, certaines étant fluctuantes, tel le climat (Richardson *et al.* 2000).

### 1.2. Invasions biologiques végétales en France

La France est un des pays d'Europe qui possède le plus d'espèces exotiques naturalisées. Celles qui deviennent invasives peuvent avoir des conséquences importantes sur les écosystèmes de par leur considérable dissémination dans les milieux, entraînant des répercussions écologiques et économiques non négligeables (Bresh *et al.* 2008). Parmi elles, la renouée du Japon (*Reynoutria japonica*) est redoutée pour son occupation des sols agricoles, tandis que l'ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*) a un impact sur la santé humaine, lié à son pouvoir hautement allergisant (Bohren 2011).

Des listes noires des espèces exotiques envahissantes sont établies dans les différentes Régions françaises. Ces listes sont en constante évolution, et les espèces sont hiérarchisées selon l'intensité de l'invasion. A titre d'exemple, 59 espèces végétales ont été recensées en région Centre, dont 22% en milieu aquatique (tableau 1) (Vahrameev & Nobilliaux 2013).

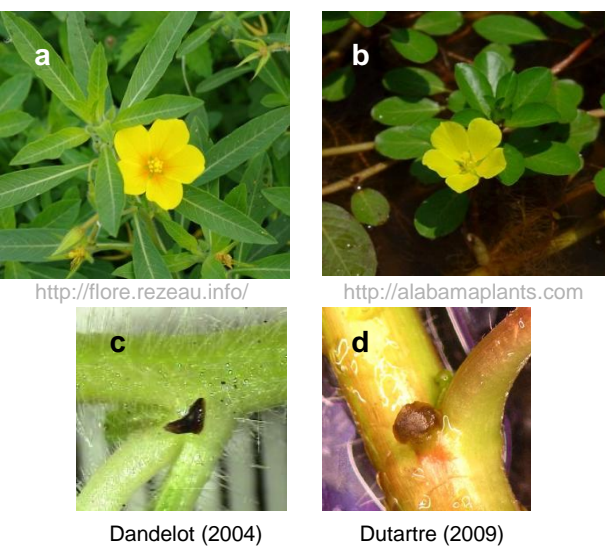
Le milieu aquatique est donc particulièrement touché par les invasions végétales (Onema 2010). Ainsi les eaux douces françaises ont été colonisées par des espèces telles que l'élodée du Canada (*Elodea canadensis*); le myriophylle du Brésil (*Myriophyllum aquaticum*), l'égérie dense (*Egeria densa*), ou encore les jussies (*Ludwigia grandiflora*, *Ludwigia peploides*), qui sont l'objet de cette étude.



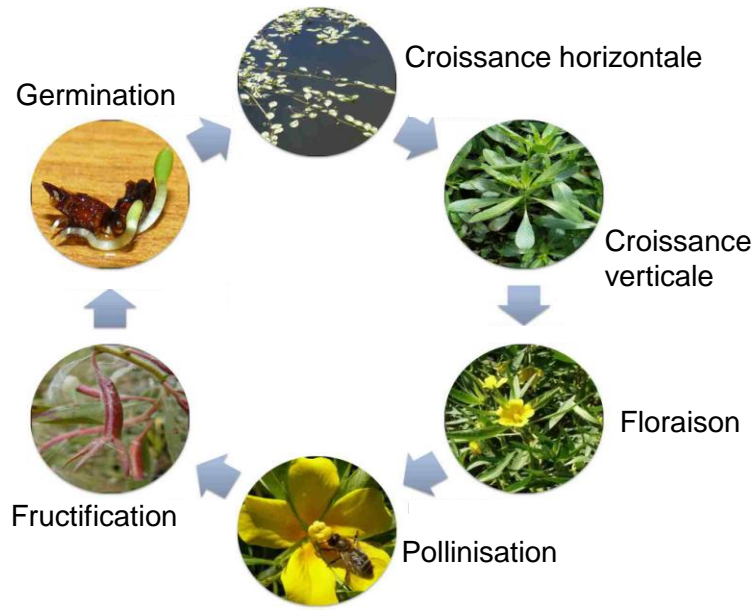
**Figure 2** – Carte de la distribution géographique des *Ludwigia spp* sur le territoire français (Dandelot 2004)



**Figure 3** – Morphologie générale des Jussies a) tige feuillée b) nœud c) tige rampante d) racine e) racine aërifère (Dutartre 2009)



**Figure 4** - Morphologie de *Ludwigia grandiflora* (a) et *Ludwigia peploides* (b) et leurs stipules respectifs (c, d) permettant de les différencier



**Figure 5** – Cycle de développement des Jussies (<http://www.eptb-vilaine.fr>)

## 2. Deux macrophytes invasives à fort impact : les jussies

Les jussies (*Ludwigia spp*) sont des plantes macrophytes, hydrophytes et amphibies de la famille des Onagraceae (Smida *et al.* 2010). Des études cytologiques et morphologiques ont permis l'identification de deux taxons différents en France : *Ludwigia peploides* subsp *montevidensis* qui est une espèce diploïde autogame ( $2n = 16$ ) et *Ludwigia grandiflora* subsp *hexapetala*, une espèce décuploïde allogame ( $2n = 80$ ) (Thouvenot 2012). Ces deux espèces sont présentes en Afrique, en Amérique latine, en Amérique du Nord, en Australie et en Europe (Smida *et al.* 2010).

### 2.1. Historique de l'invasion

Les jussies sont probablement originaires d'Amérique du Sud, et ont été importées en France suite à des échanges entre jardins botaniques au XIX<sup>ème</sup> siècle (Dandelot 2004). Ainsi elles furent introduites dans le fleuve Lez de Montpellier vers 1830 (Smida *et al.* 2010). L'utilisation importante des jussies en tant que plantes ornementales aquatiques au cours du XX<sup>ème</sup> siècle a accéléré leur expansion en France et en Europe (Dandelot *et al.* 2005). Peu à peu, l'ensemble du territoire français a été colonisé (figure 2). Actuellement, *L. peploides* est présente dans la plupart des régions françaises bordant la Méditerranée, excepté celles du Sud-Est. *L. grandiflora*, quant à elle, a colonisé le reste de la France, surtout la côte Atlantique et les régions de l'Ouest en général (Dandelot *et al.* 2005).

### 2.2. Biologie et écologie des *Ludwigia* invasives

#### 2.2.1. *Morphologie*

Les jussies invasives développent de nombreuses et longues tiges à libre enracinement et libre ramification, présentant des nœuds très rapprochés qui émettent de nombreuses racines adventives (figure 3). Souvent, ces racines n'ont aucun contact avec le substrat et puisent directement dans l'eau les nutriments nécessaires. De plus, des racines aérifères permettent une meilleure flottaison des tiges émergées et un contact direct avec l'air, indispensable en conditions anoxiques (Dandelot 2004). À l'automne, les parties émergées des plantes se dessèchent et seules les tiges radicales très enfouies dans la vase subsistent pendant l'hiver. Aux premières chaleurs de juin, les tiges croissent rapidement, il y a formation de fleurs jaunes, puis de fruits, de fin juin à début octobre (Thouvenot 2012). En période de floraison, les deux espèces se distinguent par la taille de leurs fleurs : de 4 à 5 cm pour *L. grandiflora*, 2 à 3 cm pour *L. peploides*. En revanche, en dehors de cette période, identifier chacune des espèces à partir de critères macro-morphologiques s'avère plus compliqué. Certains traits tels que la forme des feuilles ou la pilosité de la tige paraissent différents, mais évoluent au cours du développement des plantes. Ainsi, le critère le plus fiable qui ait été trouvé pour les différencier est la forme des stipules, qui sont en triangle pour *L. grandiflora* et arrondis pour *L. peploides* (figure 4) (Dandelot 2004).

#### 2.2.2. *Mode de propagation et de reproduction*

Les jussies se propagent majoritairement par multiplication végétative. Ainsi lorsque des fragments de tiges sont arrachés et emportés par le courant, ils peuvent générer rapidement de nouvelles plantes par bouturage (Dandelot 2004). Cette reproduction végétative est la base du pouvoir invasif de ces plantes aquatiques.

Cependant en France, depuis quelques années, les jussies sont capables de produire des semences viables, leur permettant ainsi d'achever leur cycle de reproduction sexuée (figure 5). La pollinisation paraît être principalement entomogame. L'apparition de la reproduction sexuée pour ces espèces fortement invasives pose question quant aux éventuelles conséquences sur le potentiel adaptatif des deux espèces. Des hybrides des deux espèces ont été créés en conditions expérimentales en fécondant des stigmates de *L. peploides* avec du pollen de *L. grandiflora*. En



revanche, cette hybridation n'a pas été observée *in situ*, mais son éventualité est appréhendée vis-à-vis de la possible expression de la vigueur hybride et du potentiel invasif qui en découlerait (Dandelot 2004).

### **2.2.3. Les biotopes favorables**

Les *Ludwigia spp* ont tendance à coloniser les cours d'eau lents préférentiellement dans les anses de dépôt. De même, elles peuvent envahir les zones humides, les fossés et les plans d'eau. Leur production de biomasse est importante, elle peut doubler en environ deux semaines et atteindre 2 à 3 kg de matière sèche par mètre carré (Thouvenot 2012). La croissance de ces macrophytes est influencée par les conditions climatiques. Les printemps doux sont favorables à l'expansion des peuplements. La lumière semble jouer un rôle important sur la croissance des *Ludwigia spp*, qui supportent l'ombrage, mais préfèrent les sites ensoleillés (Dandelot 2004).

Désormais les jussies sont de plus en plus observées dans les prairies humides (Haury *et al.* 2011). Cette adaptation au milieu terrestre, tout comme l'apparition de la reproduction sexuée, laisse craindre l'expansion des jussies.

### **2.2.4. Perturbation de la vie aquatique**

Un des impacts principaux de la prolifération des jussies est la désoxygénation des eaux qui engendre des conditions anoxiques défavorables à la vie aquatique. En effet, la croissance plus importante en été provoque l'émergence des axes feuillés, ce qui stoppe la production de dioxygène dans l'eau et limite la pénétration des rayons lumineux (Dandelot 2004). Au niveau des sédiments, l'anoxie favorise le développement de bactéries sulfo-réductrices, qui dégagent de l' $H_2S$ , entraînant la mort des poissons et des macro-invertébrés (Smida *et al.* 2010). Ainsi cet enchaînement de réactions provoque un dysfonctionnement de l'hydrosystème et une diminution importante de la biodiversité des taxons indigènes. De plus, à l'automne les rameaux émergés deviennent sénescents, tombent et s'amassent de manière à former une litière qui se minéralise intensément sur les sédiments, et qui ralentit la circulation de l'eau (Thouvenot 2012). Étant donné que l'appareil racinaire des jussies dépasse souvent les cinq mètres de longueur, il retient les débris minéraux et organiques, entraînant le comblement du plan d'eau (Smida *et al.* 2010).

### **2.2.5. Gestion des écosystèmes**

La prolifération des jussies engendre des nuisances importantes pour les activités humaines (Haury *et al.* 2011) suite à la gêne de la circulation de l'eau, l'obstruction des prises d'eau, ainsi que la fermeture des plans d'eau. Les milieux qui sont les plus impactés une fois envahis sont les zones piscicoles, cynégétiques ou ludiques, mais aussi celles à forte valeur patrimoniale telles que les espaces naturels protégés et les sites Natura 2000. Ces espèces n'ont pas de réels prédateurs qui puissent en permettre l'élimination. Quelques cas de consommation par des animaux (coléoptères, écrevisse américaine, bétail, chevaux) ont été signalés, mais ces observations restent anecdotiques. Il semblerait que globalement les herbivores évitent de se nourrir de ces plantes, notamment à cause de leur teneur en saponine (Dandelot 2004).

Le passage des jussies du milieu aquatique au milieu terrestre engendre, outre un problème de compétition avec d'autres plantes, des difficultés vis-à-vis de l'utilisation du milieu. En effet, les agriculteurs ne peuvent plus percevoir certaines aides de la PAC si les espèces végétales d'une parcelle ne sont pas majoritairement fourragères (Haury *et al.* 2011).

Il existe différents moyens de réguler les populations de ces espèces aquatiques invasives, tels que l'arrachage mécanique ou manuel, la lutte chimique, ou encore la pose de filtre sur les canaux d'alimentation. L'application de produits phytosanitaires représentait près de 30% des moyens de lutte utilisés par les gestionnaires (Dandelot 2004), cependant leur utilisation est interdite depuis 2009 (Lambert *et al.* 2010).

**Tableau 2** – Exemple des coûts d'arrachage de la Jussie (Haury et al 2011)

IAV : Institution d'aménagement de la Vilaine ; PNR Brière : Parc naturel régional de Brière ; CCEG : Communauté de commune d'Erdre et de Gesvres

<b>Gestionnaire du site</b>	<b>Année</b>	<b>Surface traitée</b>	<b>Quantité récoltée</b>	<b>Type d'arrachage</b>	<b>Coût (TTC)</b>
IAV	2007	25 000 m <sup>2</sup>	880 m <sup>3</sup>	Mécanique	63 500 €
PNR Brière	2010	33 km, 50 ha	111 t	Manuel	68 400 €
IAV	2010	4 km	130 m <sup>3</sup>	Manuel	27 650 €
CCEG	2010	5 km	27,5 m <sup>3</sup>	Manuel	19 500 €



L'arrachage mécanique est couramment utilisé dans les lieux accessibles aux engins, qui sont souvent très fréquentés par le public et les pêcheurs (Smida *et al.* 2010). Cette technique d'arrachage n'est efficace qu'à très court terme, le temps d'une saison. Au final, il s'avère que cette méthode de régulation est contreproductive puisqu'elle facilite le bouturage et la repousse des racines enfouies. Quant à l'arrachage manuel, il s'agit d'une opération minutieuse adaptée aux herbiers peu développés, sur des sites peu accessibles ou qui ont un intérêt important pour le patrimoine (Dandelot 2004). Les coûts d'arrachage sont élevés (tableau 2) et il faut y ajouter les frais de transport et d'élimination de ces gros volumes de biomasse, qui peuvent être de plusieurs tonnes pour une zone traitée. Actuellement, cette biomasse arrachée est acheminée jusqu'aux décharges pour être incinérée, mais il semblerait qu'une valorisation soit possible, *via* l'extraction de métabolites secondaires (Smida *et al.* 2010). En effet de nombreux composés chimiques sont présents dans les différentes espèces du genre *Ludwigia*, tels que les saponines, les flavonoïdes, ou encore les triterpènes. (Dandelot 2004).

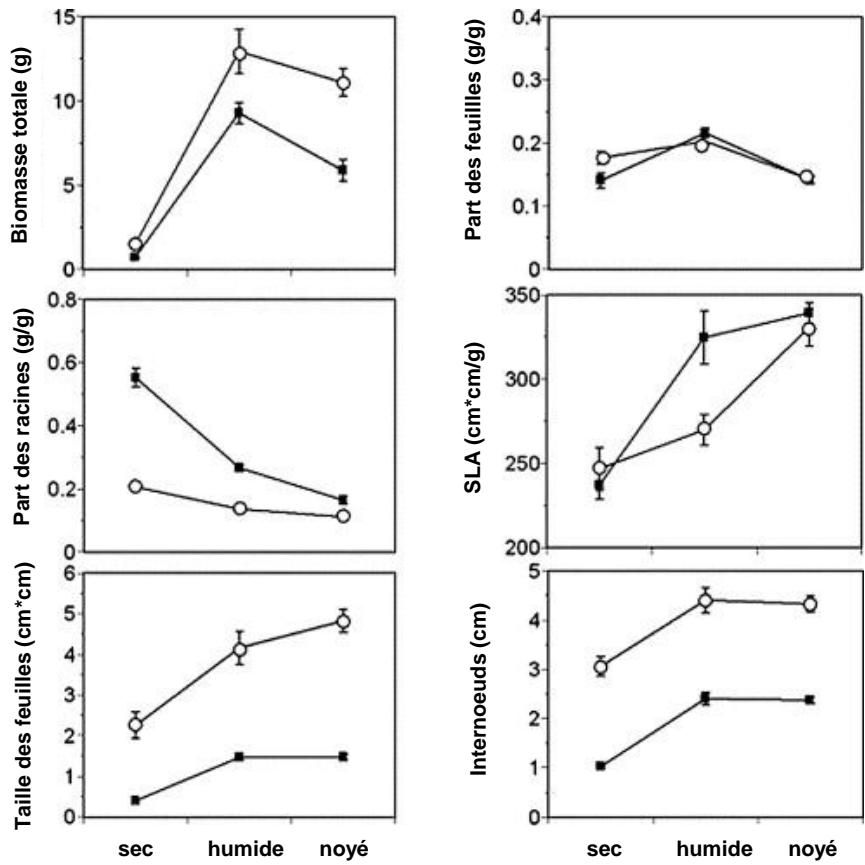
Il y a quelques années, les méthodes de lutte mises en œuvre pour réguler les populations de *Ludwigia spp* n'aboutissaient pas à des résultats probants, puisque dans l'ensemble il y avait un retour à l'état initial deux ans après l'intervention. Depuis, l'association de l'arrachage mécanique pour évacuer la majorité de la biomasse à l'arrachage manuel pour la finition du travail, a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Ainsi en Ille et Vilaine, les chantiers réalisés en 2006 et 2007 aux Étangs d'Apigné ont permis une réduction durable de la surface des herbiers. La surface initiale en 2006 était de 1,20 ha et suite aux opérations, seuls 0,70 ha subsistaient en 2008 et 0,24 ha en 2009 (Haury *et al.* 2011).

### **3. Plasticité adaptative et réponses aux stress**

#### **3.1. Hypothèses sur la plasticité adaptative**

Lorsque l'expression phénotypique d'un génotype varie en réponse à des facteurs environnementaux, il est question de plasticité phénotypique (Davidson *et al.* 2011). Ainsi, les traits fonctionnels sont une base très utilisée pour décrire les différences entre les stratégies des communautés végétales et leur adaptation à leur environnement (Drenovsky *et al.* 2012). Les mécanismes d'invasion et de résistance à l'invasion font l'objet de plusieurs hypothèses qui s'opposent (Drenovsky *et al.* 2012). L'une de ces hypothèses affirme que les plantes invasives ont une plasticité plus élevée que les plantes natives, ce qui leur confère des capacités d'adaptation plus avantageuses face à des conditions environnementales fluctuantes. Cette hypothèse est fondée sur le fait que pour réussir à s'installer dans un milieu qui possède des conditions environnementales nouvelles pour l'espèce, les plantes envahissantes possèdent une plasticité phénotypique importante. De plus, cet atout de pouvoir faire face aux conditions de milieu changeantes leur procure également un avantage compétitif sur la végétation indigène.

Cependant, certaines études citées par Drenovsky *et al.* (2012) s'appuyant sur cette hypothèse suggèrent que la plasticité peut varier selon le type de ressource disponible et ne confère donc pas forcément des aptitudes plus avantageuses. Par exemple, la croissance des plantes invasives en conditions nutritives limitantes est liée à une utilisation plus efficace des ressources disponibles, ainsi qu'à la capacité de construire des tissus plus minces et moins denses. Cette croissance rapide aboutit à une taille avantageuse, mais représente un coût pour la plante. La durée de vie des tissus est en effet réduite et le maintien des fonctions physiologiques diminue lors d'un stress hydrique (Drenovsky *et al.* 2012). De plus, la production et la maintenance des mécanismes sensoriels tels que les récepteurs protéiques permettant l'acquisition d'informations représente un coût énergétique et matériel. Sous conditions stressantes, ces récepteurs sont particulièrement sollicités, ce qui engendre une augmentation de leur turn-over et donc une augmentation des coûts de la plasticité.



**Figure 6** – Normes de réaction de l'espèce invasive *Alternanthera philoxeroides* (■) et de l'espèce native *Alternanthera sessilis* (○) soumises à trois conditions de disponibilité en eau. Ces conditions sont les suivantes : sec (ajout de 100 mL d'eau lorsque le flétrissement est constaté), humide (sol saturé en eau) et noyé (submersion partielle de plantes, 3 à 4 cm d'eau au dessus du sol). Les données représentent la moyenne de cinq clones pour chaque espèce ± 1 erreur standard. SLA : specific leaf area, surface foliaire spécifique (Geng et al 2006)

Cette limite explique en partie pourquoi les potentialités de la plasticité adaptative ne sont pas poussées au maximum par les espèces végétales (Valladares *et al.* 2007).

A première vue, les changements climatiques devraient favoriser les espèces ayant un fort niveau de plasticité. Cependant les modifications environnementales seront parfois à multiples facteurs, biotiques ou abiotiques, ce qui risque de limiter les réponses plastiques des plantes (Valladares *et al.* 2007).

### 3.2. Réponses des espèces invasives et natives face aux stress

De nombreux exemples étayent l'hypothèse que la capacité d'acclimatation des espèces végétales invasives à un environnement changeant est due à leur plasticité phénotypique et physiologique plus importante.

#### 3.2.1. *Réponses morphologiques*

Geng *et al.* (2006) ont appliqué différents régimes hydriques allant du déficit hydrique à l'inondation, à l'espèce invasive *Alternanthera philoxeroides* et à sa congénère native *Alternanthera sessilis*. La plasticité des deux espèces a été mesurée *via* l'allocation de la biomasse et les traits morphologiques. Dans l'ensemble, les deux espèces montrent une plasticité en fonction de la disponibilité en eau. Cependant, les réponses obtenues étaient quantitativement différentes, le taxon invasif s'avérant plus plastique pour certains traits (figure 6). Ainsi, les différences de plasticité phénotypique observées entre *A. philoxeroides* et *A. sessilis* pourraient expliquer en partie l'adaptation d'*A. philoxeroides* à des habitats ayant différentes disponibilités en eau.

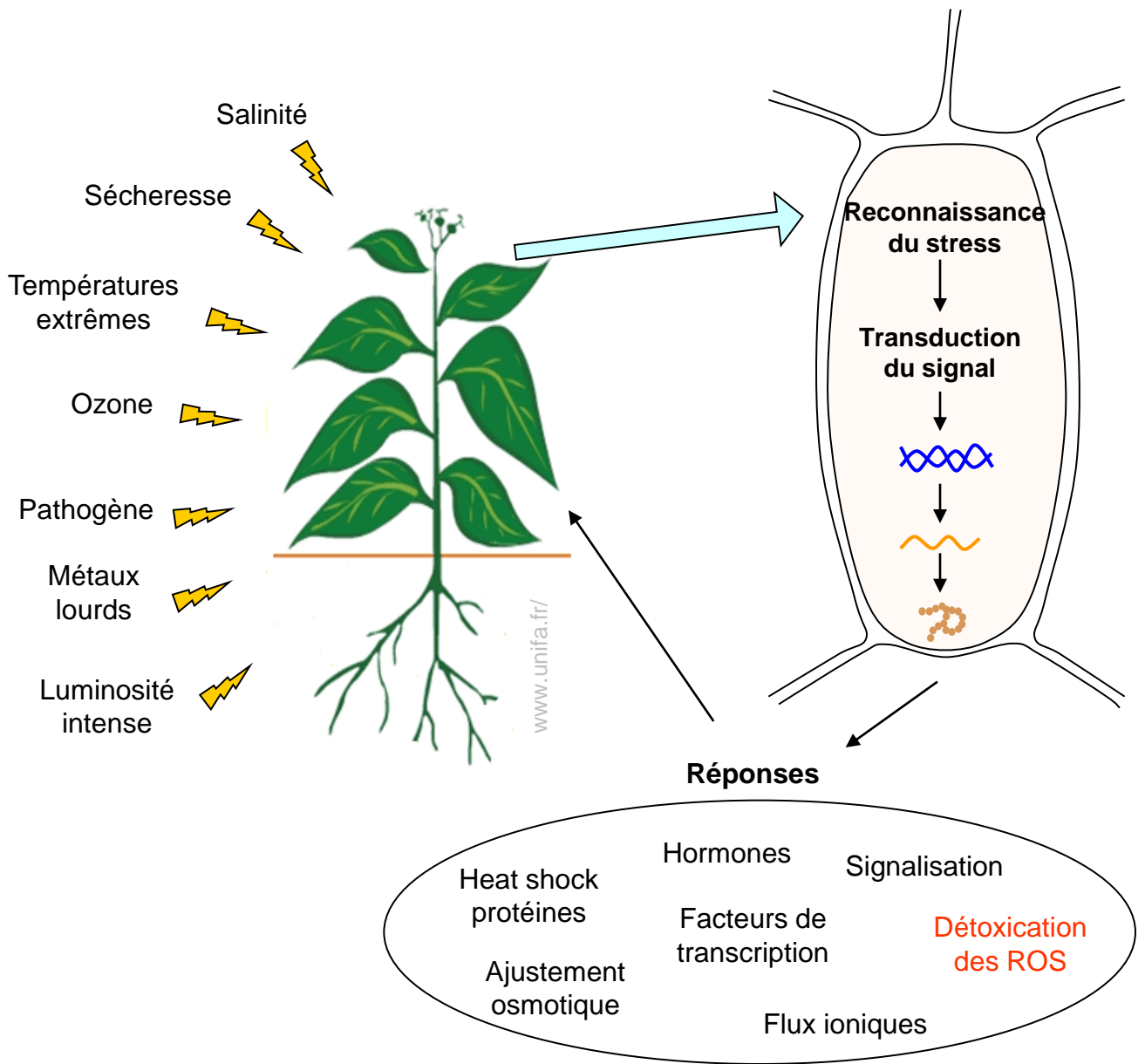
Schumacher *et al.* (2008) ont étudié le développement de différentes espèces ligneuses, invasives et natives, soumises à différents stress hydriques et lumineux. L'hypothèse posée par les auteurs supposait un avantage des taxons natifs, ce qui a été infirmé par les résultats. Ceux-ci ont révélé que l'impact du stress hydrique sur le taux de croissance des espèces invasives est équivalent à celui des espèces natives. En particulier, les espèces invasives à croissance rapide ont montré une forte plasticité qui leur permet de rivaliser avec succès avec les espèces locales plus tolérantes aux stress, notamment sur les sites où les ressources sont limitées.

Dans l'étude de Baruch et Goldstein (1999) comparant différents taxons végétaux d'Hawaii, les coûts de construction cellulaire des espèces invasives étaient inférieurs à ceux investis par les espèces natives, notamment pour la croissance des feuilles. Cela suggère que les plantes invasives utilisent les ressources carbonées d'une manière plus efficace que les plantes natives, en engageant moins d'énergie par unité de feuille produite.

#### 3.2.2. *Réponses physiologiques*

Suite aux mesures de la capacité photosynthétique, le taux de transpiration et la fluorescence chlorophyllienne de 3 espèces natives et 3 espèces invasives de Californie, Funk et Zachary (2010) ont montré que ces espèces répondent toutes de manière différente aux stress hydrique et lumineux appliqués. Cependant, aucune différence significative n'a pu être établie entre les espèces natives et invasives. Il semblerait que les espèces vivant dans des écosystèmes plus arides ont à leur disposition une gamme plus large de réponses au stress.

L'équipe de Liu et Pang (2010) a comparé les réponses de deux algues rouges : *Grateloupia turuturu*, une espèce invasive, et *Palmaria palmata*, native du milieu. Les résultats soutiennent que *G. turuturu* possède un potentiel de tolérance des stress plus important, probablement lié à ses capacités invasives. En effet, suite à l'adjonction d' $H_2O_2$  dans le milieu, l'espèce invasive était capable de supporter des concentrations plus importantes de cette espèce réactive de l'oxygène (ROS), se révélant plus résistante au stress oxydatif. De plus, les activités des enzymes



**Figure 7** – Voies de réponses mises en place face par la plante face à des stress biotiques et abiotiques

antioxydantes étaient supérieures à celles de *P. palmata*, indiquant une capacité de détoxification des ROS plus importante pour l'espèce invasive *G. turuturu*.

L'exposition de deux espèces d'ulves à différentes concentrations en cuivre a permis d'identifier une hétérogénéité de réponses en termes de croissance, de pigmentation, de capacité antioxydante. La toxicité du cuivre a eu des effets notoires sur l'activité photosynthétique. Les mesures effectuées à différentes échelles biologiques ont montré que *Ulva armoricana*, invasive, est plus tolérante au cuivre que *Ulva pertusa*, native (Han *et al.* 2008).

Morais *et al.* (2012b) ont comparé la germination des graines sous contraintes salines de la légumineuse exotique *Acacia longifolia* et de son équivalente native, *Ulex europaeus*. Ces jeunes plantes ont ensuite été utilisées pour une détermination enzymatique. Ils ont observé que la germination de l'espèce native était plus affectée par les traitements salins que celle d'*A. longifolia*. En parallèle, des réponses enzymatiques anti-oxydantes de nature et d'intensité différentes ont été observées, suggérant que parmi les stress environnementaux impactant la germination, les stress oxydants pourraient être une composante importante.

## 4. Voies de réponses des plantes aux stress

### 4.1. Mécanismes généraux de réponse aux stress biotiques et abiotiques

D'après Grime (1979), un stress peut être considéré comme étant une contrainte externe qui limite la productivité à un niveau inférieur au potentiel génétique d'une plante. Ce potentiel génétique correspond au potentiel de production lorsque les conditions de croissance et de développement sont optimales.

S'il est courant de distinguer les stress biotiques et abiotiques, les réponses de défense apportées par les plantes sont en partie comparables.

Les espèces végétales perçoivent les signaux de leur environnement *via* des récepteurs de nature protéique notamment. La reconnaissance d'un stress entraîne la transduction du signal perçu et une transmission de l'information au sein de la cellule, puis dans l'ensemble de la plante. Des modifications ont lieu au niveau génomique dans un premier temps, les mécanismes de contrôle moléculaire de tolérance aux stress étant basés sur l'activation et la régulation de gènes spécifiques. Ces derniers sont impliqués dans l'ensemble des réponses aux stress, telles que la signalisation, le contrôle transcriptionnel, la production d'hormones, la protection des membranes et des protéines, ainsi que la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Wang *et al.* 2003) (figure 7).

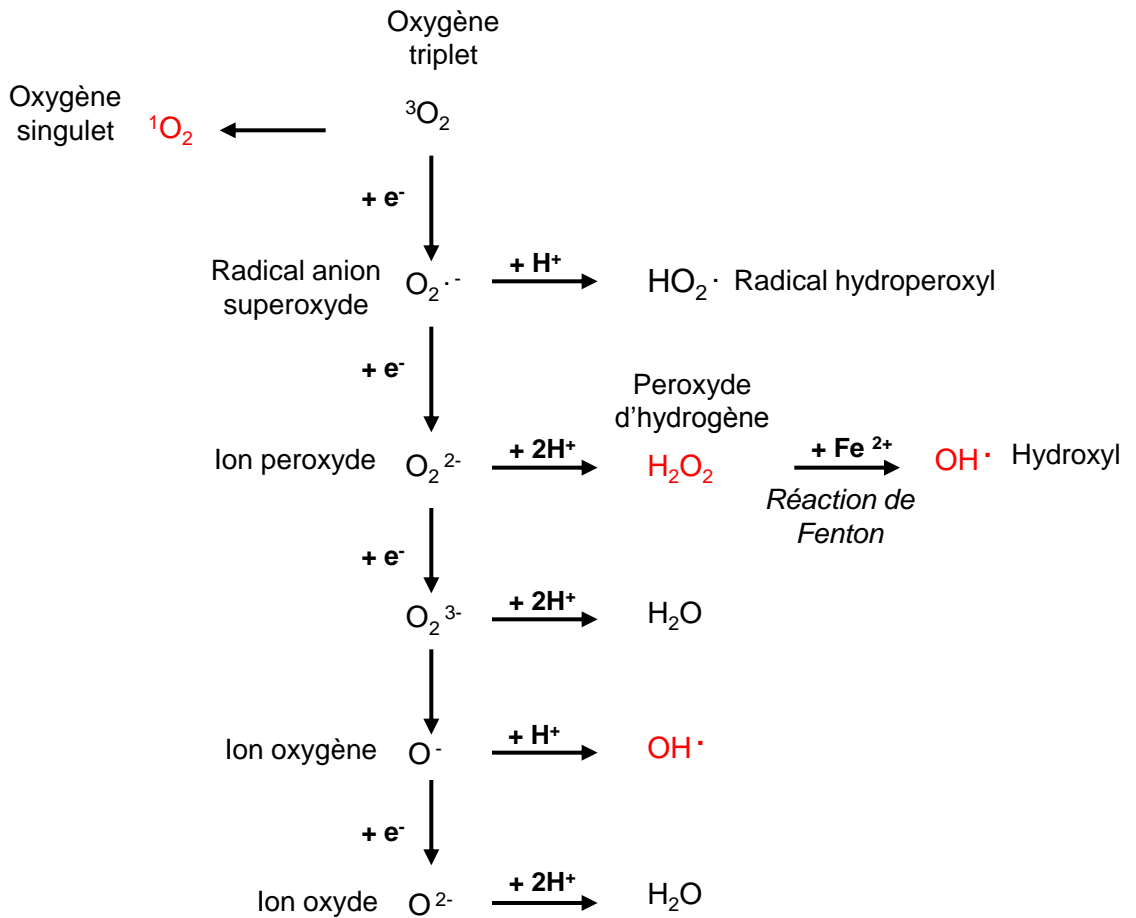
Il s'agit pour l'organisme de contrer le stress, ou du moins d'y survivre. Les réponses engendrées sont variées, et dépendent notamment de la nature, de l'intensité et de la durée du stress. L'ajustement osmotique est une réponse courante face à un déficit hydrique ou à une salinité élevée, tout comme les flux ioniques. Par ailleurs, des heat shock protéines, qui font partie des fonctions chaperonnes, sont produites suite à un stress thermique (Buchanan *et al.* 2000).

Les réponses engendrées peuvent être immédiates ou tardives, communes à la plupart des stress ou bien spécifiques à l'un d'eux. Dans le cadre de cette étude, c'est la réponse de détoxification des ROS (Reactive Oxygen Species) qui nous a plus particulièrement intéressés.

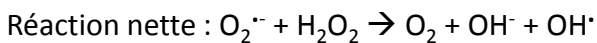
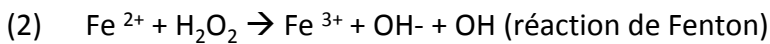
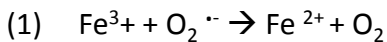
### 4.2. Stress oxydants et réponses de la plante

#### 4.2.1. *Les espèces réactives de l'oxygène*

Ces molécules sont des sous-produits de différentes voies métaboliques, et sont donc produites en permanence par différents compartiments cellulaires, tels que les chloroplastes, les mitochondries ou encore les peroxysomes (Torres 2006).



**Figure 8** - Production de différents ROS par transfert d'énergie ou par réduction séquentielle univalente de l'oxygène à l'état fondamental (triplet) (D'après Gill et Tuteja 2010 et Appel et Hirt 2004)



**Figure 9** - Les deux étapes de la réaction d'Haber Weiss (1) Formation de  $\text{Fe}^{2+}$  réduit (2) Réaction de Fenton (D'après Kerher 2000) :

La plupart des ROS sont produits suite à des réactions d'oxydo-réduction dont la base est l'oxygène (figure 8). En effet, l'oxygène généré dans les chloroplastes lors de la photosynthèse peut accepter les électrons qui passent par les photosystèmes I et II, formant ainsi des radicaux anions superoxyde  $O_2^{\cdot -}$ . A pH faible, la réduction de  $O_2^{\cdot -}$  est inévitable, certains  $O_2^{\cdot -}$  cèdent leur électron à d'autres  $O_2^{\cdot -}$ , formant ainsi des ions peroxyde  $O_2^{2-}$ , dont l'oxydation conduit à la génération de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . L'ion  $O_2^{\cdot -}$  peut également être oxydé, formant ainsi un radical hydroperoxyl  $HO_2^{\cdot}$  (Mittler *et al.* 2011). De plus, en présence de métaux de transition tels que le cuivre et le fer, d'autres réactions chimiques ont lieu, telles que les réaction d'Haber-Weiss et de Fenton (figure 9) (Kehrer 2000). Ces réactions génèrent un radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , qui est une des espèces chimiques les plus réactives du monde biologique.

L'oxygène singulet  $^1O_2$ , qui est le premier état électronique excité d' $O_2$ , est un ROS insolite puisqu'il n'est pas lié à un transfert d'électron. Une dissipation d'énergie insuffisante pendant la photosynthèse peut conduire à la formation de chlorophylle à l'état de triplet. Ce dernier peut réagir avec un triplet d'oxygène  $^3O_2$  et ainsi générer le très réactif  $^1O_2$  (Gill & Tuteja 2010).

#### **4.2.2. Impacts des ROS sur le métabolisme cellulaire**

##### **▪ Conséquence du stress oxydant**

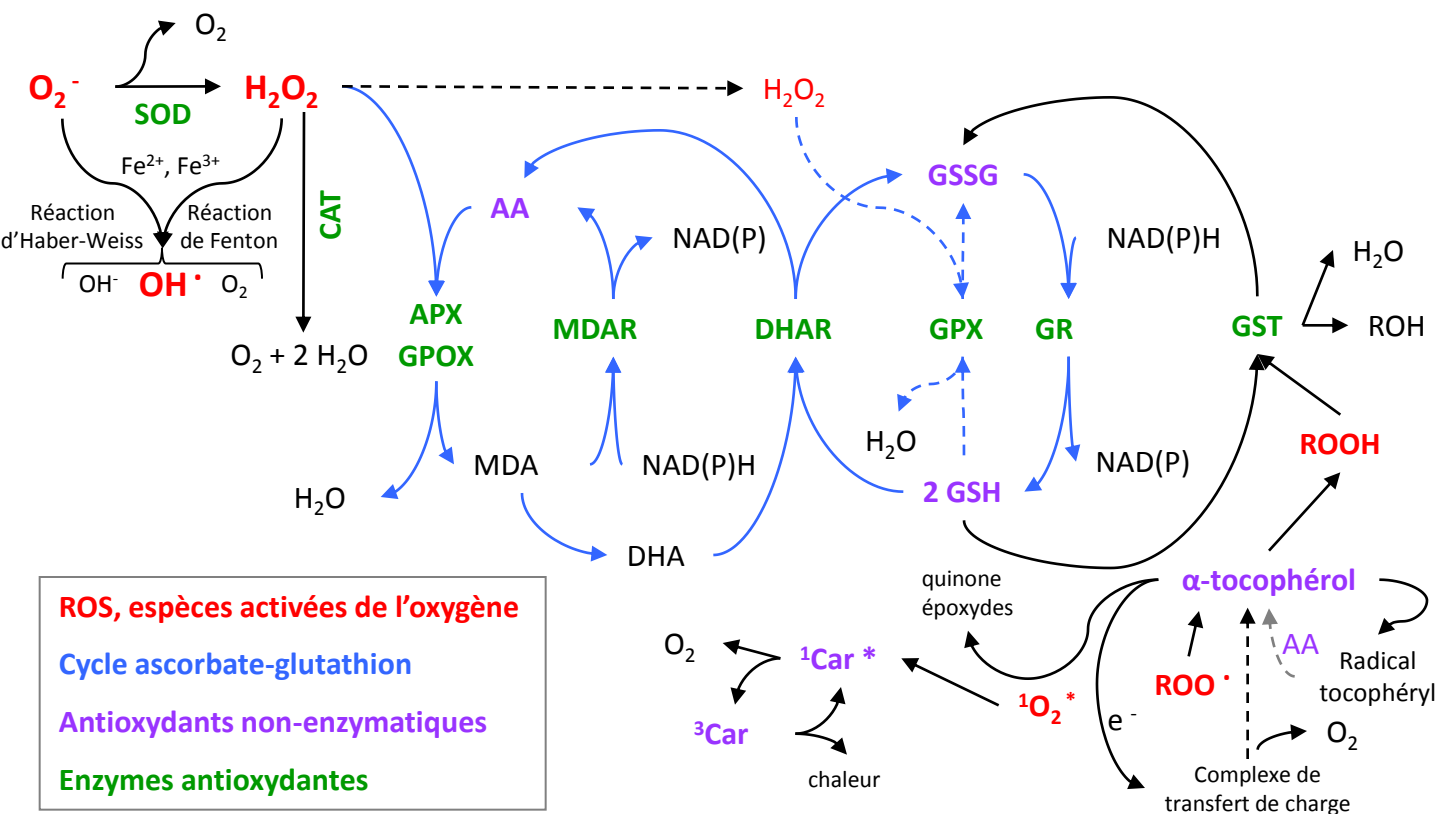
Lorsque les conditions cellulaires sont stables, les ROS sont produits à la même vitesse qu'ils sont piégés, les dommages cellulaires sont donc moindres. Cependant, cet équilibre peut être perturbé par différents stress biotiques et abiotiques, entraînant une augmentation brusque de la quantité de ROS intracellulaire, appelé burst oxydatif (Gill & Tuteja 2010). Ce stress secondaire est appelé stress oxydant. Générés en quantité importante lors d'un stress oxydant, les ROS qui sont des molécules très réactives et toxiques, peuvent causer des dommages importants tels que l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides, la détérioration des glucides et des ADN mitochondriaux, chloroplastiques et génomiques. Ces dommages peuvent conduire à la mort cellulaire (Gill & Tuteja 2010).

La réaction de peroxydation lipidique engendre des produits formés à partir de précurseurs polyinsaturés, ce qui inclut les petits fragments hydrocarbures tel que les cétones, les malondialdéhydes (MDA), et autres composés apparentés. Dans la plupart des cellules et des membranes des organites, la peroxydation lipidique a lieu quand il y a une certaine quantité de ROS et qu'un seuil est atteint. Ainsi cela n'affecte pas uniquement le fonctionnement cellulaire normal, mais cela aggrave également le stress oxydatif à travers la production de radicaux dérivés de lipides (Gill & Tuteja 2010).

L'oxydation des protéines peut être définie comme étant une modification covalente d'une protéine, induite par des ROS ou par des sous-produits des stress oxydatifs. La majorité des types d'oxydation protéique sont irréversibles. En général, la carbonylation des protéines est un marqueur de l'oxydation des lipides. L'oxydation d'un certain nombre d'acides aminés engendre des groupes carbonyles libres qui peuvent inhiber ou modifier leur activité, et ainsi augmenter la sensibilité aux attaques protéolytiques (Gill & Tuteja 2010).

##### **▪ Rôle dans la signalisation cellulaire**

Il a été montré que les ROS influencent l'expression d'un certain nombre de gènes et de voies de signal de transduction. Ceci suggère que les cellules ont établi des stratégies afin d'utiliser les ROS comme des stimuli et signaux biologiques, qui activent et contrôlent différents programmes génétiques de réponse aux stress. Chez les plantes, il y a de nombreux systèmes à deux composantes de types histidine-kinase qui pourraient être des « détecteurs de ROS » (Mittler *et al.* 2004). Les ROS activent leur production en se transférant rapidement dans la plante, constituant ainsi leur propre signal de propagation. Chaque cellule située sur le trajet du signal peut activer sa propre machinerie de production de ROS et ainsi poursuivre la transmission du signal (Mittler *et al.* 2011).



**Figure 10** - Schématisation des réactions de détoxication des ROS

Abréviations : AA ascorbate; APX ascorbate peroxydase; Car caroténoïde; Car \* caroténoïde excité; CAT catalase; DHA déhydroascorbate; DHAR déhydroascorbate réductase; GPOX guaiacol peroxydase; GPX glutathion peroxydase; GR glutathion réductase; GSH glutathion réduit; GSSG glutathion oxydé; GST glutathion-S-transférase; MDA monodéhydroascorbate; MDAR monodéhydroascorbate réductase;  $ROO^\cdot$  radical peroxyde; ROOH hydroperoxyde; SOD superoxyde dismutase (D'après Mittler 2004 et Gill et Tuteja 2010)



Lorsqu'elles sont confrontées à un stress modéré, les plantes s'adaptent à ces conditions défavorables pour leur croissance, en augmentant la synthèse d'enzymes anti-oxydantes. En revanche sous conditions de stress sévères, l'expression des gènes correspondant aux enzymes anti-oxydantes diminue (Shaikhali *et al.* 2008). De plus, certaines enzymes, telle que l'ascorbate peroxydase, sont alors inhibées. De nombreux gènes codants pour des enzymes anti-oxydantes du cytosol sont induits de manière progressive, jusqu'à de très hauts niveaux. Concernant la production des enzymes anti-oxydantes du chloroplaste, le phénomène contraire est observé : la plupart sont de plus en plus générées jusqu'à un certain niveau de stress, puis leur production diminue en réponse à un stress oxydatif important, qui entraîne de fortes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par exemple. L'hypothèse avancée est que l'expression de ces gènes serait contrôlée soit par des régulateurs qui inhibent ou activent l'expression, soit par une interaction antagoniste des voies de signalisation (Shaikhali *et al.* 2008)

### **4.2.3. Mécanismes de détoxification des ROS**

Lorsque les conditions cellulaires sont stables, les ROS sont piégées par différents mécanismes de défense antioxydants (Gill & Tuteja 2010), qui peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques. Lors d'un stress abiotique, l'accumulation de ROS entraîne une diminution de l'activité photosynthétique et active les mécanismes de défense du cytosol. C'est alors l'évolution de l'équilibre entre la production et l'élimination de ces ROS par les antioxydants qui déterminera le sort de la cellule (Neill *et al.* 2002).

#### **▪ Les antioxydants non-enzymatiques**

Des molécules non-enzymatiques peuvent intervenir dans la détoxification des ROS. Il peut s'agir de l'acide ascorbique (ASH, ou vitamine C), du glutathion (GSH), de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), de caroténoïdes, ou encore de flavonoïdes (Apel & Hirt 2004).

L'ensemble des réactions de détoxification des ROS est schématisé sur la figure 10. Ces réactions sont nombreuses, et complexes de par leur complémentarité, puisque les produits de certaines réactions servent de substrats à d'autres. Le cycle ascorbate-glutathion est au cœur des mécanismes anti-oxydants. Ce cycle se déroule au niveau du chloroplaste et est activé dès qu'il y a une luminosité suffisante. D'autres réactions de détoxification des ROS ont lieu à partir et autour de ce cycle (Apel & Hirt 2004).

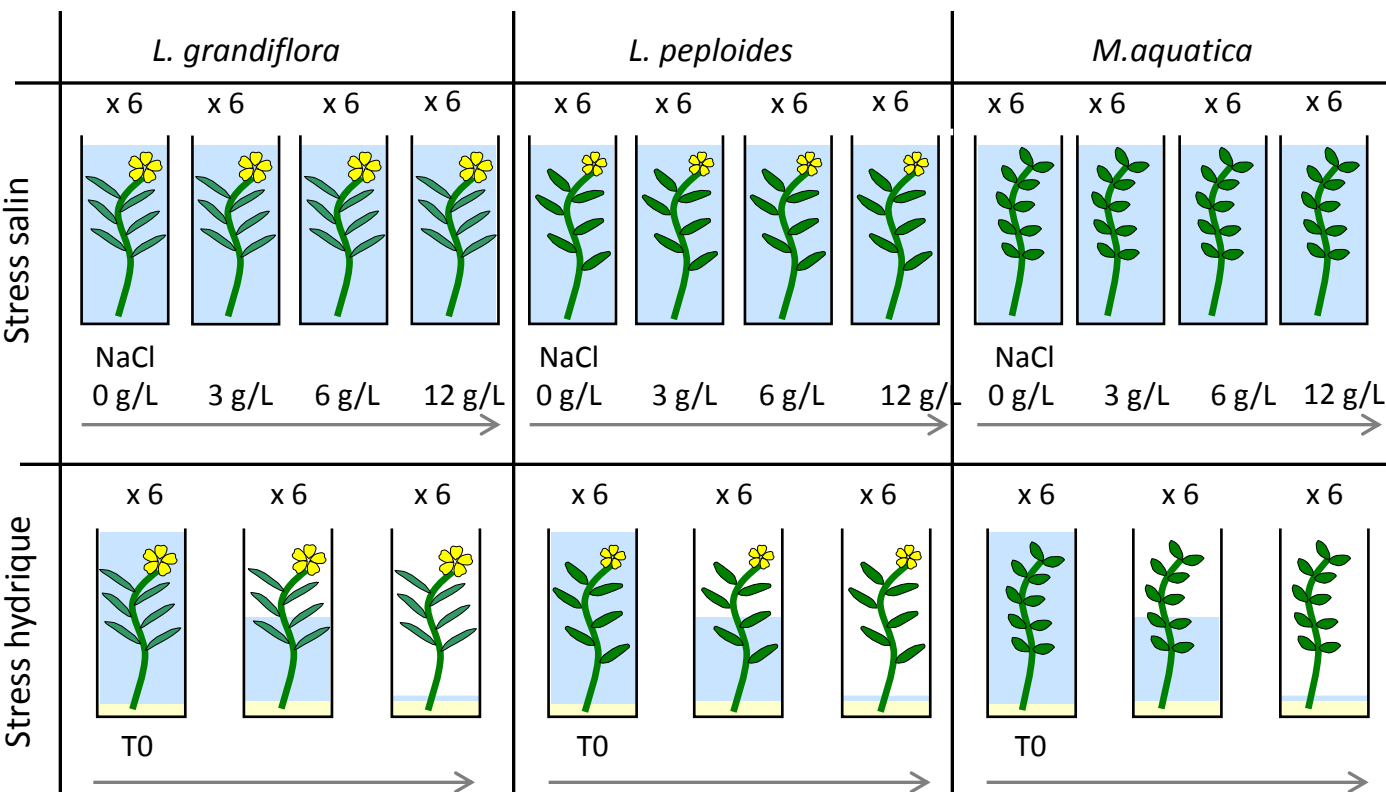
#### **▪ Les antioxydants enzymatiques**

L'accumulation de ROS induite par des stress est contrée par le système enzymatique anti-oxydant, qui inclut la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion-S-transférase (GST) ou encore la catalase (CAT), la guaiacol peroxydase (GPOX), et la glutathion réductase (GR) (Apel & Hirt 2004).

L'étude présentée dans ce rapport de stage a pour but de confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle les plantes invasives présentent des réponses adaptatives et une plasticité phénotypique plus élevées que les natives. La plasticité phénotypique des jussies invasives a été évaluée *via* la mobilisation des voies de défense généralistes impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Ce travail est basé sur la comparaison des réponses générales et des réponses anti-oxydantes des deux espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides* et de l'espèce native *M. aquatica* vis-à-vis des stress salin et hydrique.

**Tableau 3** – Dates, lieux et coordonnées GPS des récoltes de matériel végétal

Espèce	Date de récolte	Lieu	Coordonnées GPS
<i>L. peploides</i>	11 avril 2013	Lieu-dit La Musse (44)	N 47° 14,446" W 1° 47,242"
<i>L. grandiflora</i>	12 avril 2013	Étangs d'Apigné - Étang B	N 48° 05,704" W 1° 44,453" N 48° 05,704" W 1 44,452" N 48° 05,702" W 1 44,454"
<i>M. aquatica</i>	12 avril 2013	Étangs d'Apigné - Étang B	N 48° 05,702" W 144,454"
<i>L. peploides</i>	2 mai 2013	Lieu-dit La Musse (44)	N 47° 14,446" W 1° 47,242"
<i>M. aquatica</i>	2 mai 2013	Étangs d'Apigné - Étang B	N 48° 05,702" W 1 44,454"
<i>M. aquatica</i>	21 mai 2013	Étangs d'Apigné - Étangs B et C	N 48° 05,717" W 1 44,339" N 48° 05,672" W 1 44,387"
<i>M. aquatica</i>	3 juin	Étangs d'Apigné - Étang B	N 48° 05,702" W 1 44,454" N 48° 05,717" W 1 44,339"
<i>M. aquatica</i>	10 juin 2013	Étangs d'Apigné - Étang B	N 48° 05,702" W 1 44,454" N 48° 05,717" W 1 44,339"
<i>L. peploides</i>	20 juin 2013	Lieu-dit La Musse (44)	N 47° 14,446" W 1° 47,242"



**Figure 11** – Représentation du dispositif expérimental des stress hydriques et salins appliqués à *Ludwigia grandiflora*, *Ludwigia peploides*, et *Mentha aquatica*, pour un temps de cinétique donné. Au total, respectivement 96 et 72 plantes de chaque espèce ont été nécessaires pour conduire une répétition biologique des stress salins et hydriques. L'expérimentation sera répétée trois fois pour chacun des stress.

## II - Matériels et méthodes

---

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Choix des espèces

Les plantes invasives étudiées sont *Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides*. Leur comportement face aux stress appliqués a été comparé à celui d'une espèce native issue du même écosystème, la menthe aquatique (*Mentha aquatica*). Cette espèce présente une morphologie comparable à celle des jussies, et se comporte de la même manière en arborant des tiges rampantes pour se multiplier. De plus, la menthe aquatique est adaptée à la fois au milieu aquatique et au milieu terrestre lors de son exondaison, tout comme *L. grandiflora* et *L. peploides*.

Les plantes ont été prélevées directement en milieu naturel. Les espèces *L. grandiflora* et *M. aquatica* ont ainsi été récoltées aux étangs d'Apigné (étang B), situés à Rennes. *L. peploides* a quant à elle été ramassée au Nord de Nantes, au lieu-dit La Musse (commune de Bouée). Le tableau 3 résume les dates, lieux et coordonnées GPS des prélèvements. Les trois espèces étaient plus ou moins faciles à maintenir en aquarium, ce qui a conduit à des prélèvements successifs de *L. peploides* et *M. aquatica* sur le terrain, en milieu naturel.

#### 1.2. Conservation, croissance et multiplication

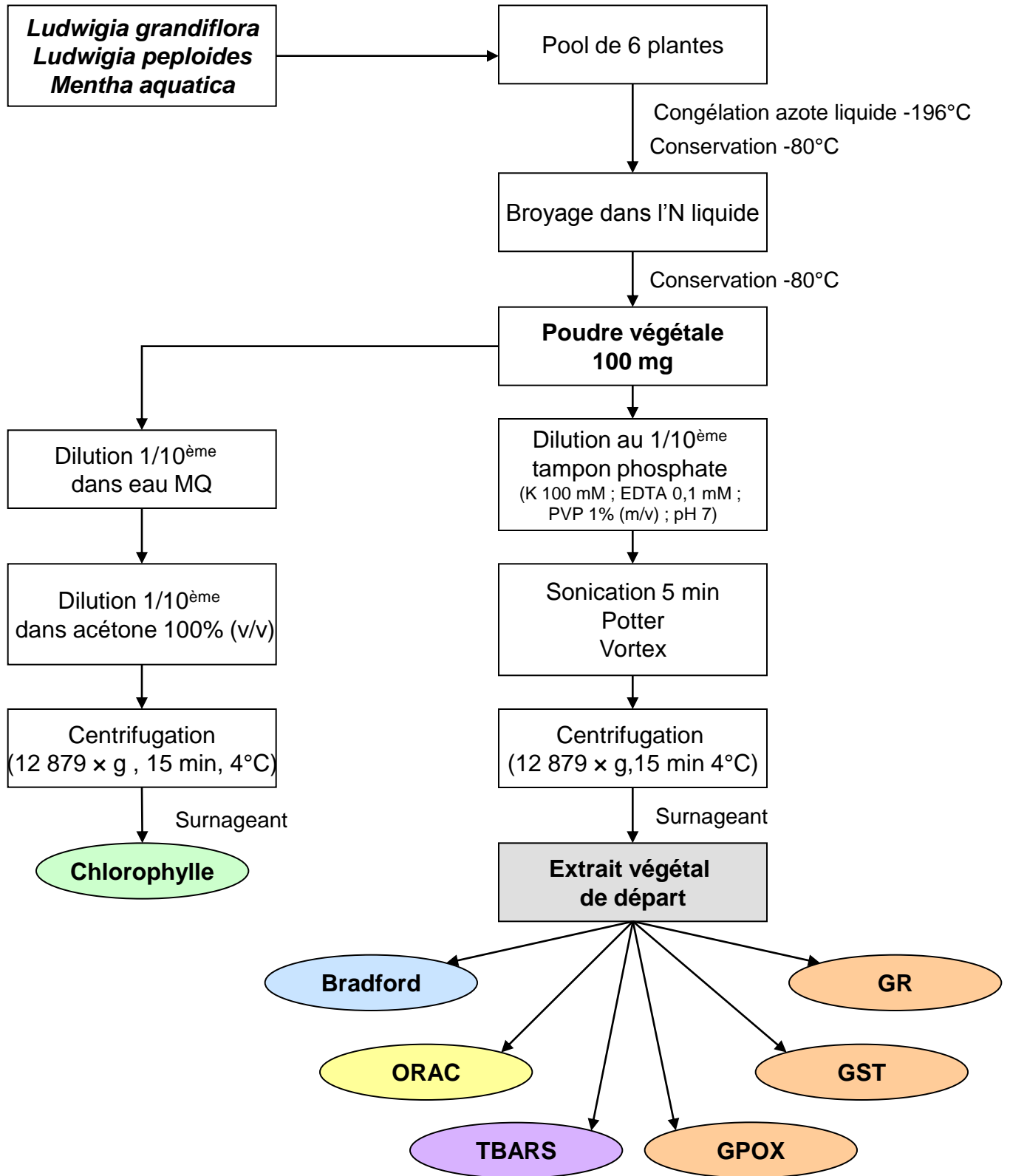
Après prélèvement sur le terrain, le matériel végétal a été conservé une à deux semaines en chambre froide à 5°C, avant d'être nettoyé. Les individus les plus avancés physiologiquement ont été sélectionnés et élevés en aquarium (40 cm x 24,5 cm x 24,5 cm = 24 L) dans 10 L d'eau à 20°C, photopériode 16/8, dans une chambre de culture semblable à celle utilisée pour les essais proprement dits. L'eau a été enrichie avec une solution d'engrais du commerce de type NPK 4.6.8 (annexe 1) diluée selon les recommandations du fournisseur. Les plantes les moins avancées ont été transférées dans des bacs de plus grande taille, à 20°C photopériode 16/8, afin de favoriser leur croissance et leur multiplication, dans de l'eau sans ajout d'engrais.

### 2. Dispositif expérimental

#### 2.1. Mise en place de l'essai

Trois à cinq jours avant la mise en place de chaque essai, une centaine d'individus de chaque espèce a été normalisée à une taille de 10 cm de longueur, puis acclimatée dans des aquariums (35 cm x 21,5 cm x 22 cm = 16,5 L) dans la chambre de culture utilisée pour les essais (25°C, photopériode 16/8). Puis, afin de limiter les potentiels effets de compétition entre les individus, les plantes ont été introduites dans des récipients individuels (Ø 8 cm). Dans le cas du stress hydrique, les plantes ont été ancrées dans 3 cm de sable de Fontainebleau, support considéré comme inerte.

Une fois les plantes acclimatées, celles-ci ont été soumises à deux types de stress, hydrique et salin. Le dispositif expérimental mis en place est résumé sur la figure 11. Les plantes ont été réparties de manière aléatoire, afin d'éviter un potentiel biais technique lié à la localisation dans la chambre de culture, sur respectivement 2 et 3 plateaux pour les stress hydriques et salins.



**Figure 12** - Schéma résumant les différentes étapes nécessaires à l'obtention de l'extrait cellulaire des plantes d'intérêt, utilisé pour les différentes analyses biochimiques.

N : azote ; EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique ; PVP : polyvinylpyrrolidone ; MQ : milli-Q ; ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity ; TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances ; GPOX : guaiacol peroxydase ; GST : glutathion-S-transférase ; GR : glutathion réductase.

## 2.2. Stress appliqués

### 2.2.1. *Stress salin*

Un stress salin a été appliqué, selon un gradient de quatre concentrations en NaCl (NaCl 98%, VWR, ref 27788.297), soit 0 g.L<sup>-1</sup> (témoin) ; 3 et 6 g/L, correspondant aux concentrations mesurées dans les marais côtiers (Thouvenot et al. 2012) ; 12 g/L, choisi afin d'induire un stress intense.

### 2.2.2. *Stress hydrique*

Le stress hydrique appliqué correspond à des niveaux de stress hydrique différents. Trois gradients de niveau d'eau ont été appliqués : un témoin zéro (T0) avec une plante totalement immergée (750 mL), un niveau d'eau intermédiaire (350 mL) recouvrant la moitié de la plante qui reflète une exondaison (T1/2), et un niveau où l'eau affleure le sable, apparenté à un déficit hydrique intense (T1). Dans le cas de ce dernier stress, le niveau de l'eau est réajusté si nécessaire au cours de l'expérimentation. Afin de maintenir leur émergence, les individus des traitements T1/2 et T1 étaient soutenus par un tuteur.

### 2.2.3. *Cinétique de prélèvement*

Afin d'évaluer les réponses des trois espèces aux différents stress, une cinétique de prélèvement a été réalisée sur un pas de temps de cinq jours. Les prélèvements ont eu lieu 4h, 28h, 3 jours (=72h), et 5 jours (=120h) après le début du stress, soit un total de quatre prélèvements pour chaque niveau de stress. Les modifications phénotypiques occasionnées par les stress ont été photographiées aux temps 28h, 3 jours et 5 jours. Trois répétitions biologiques ont été effectuées par type de stress, et étalées sur un laps de temps de 3 à 4 semaines. Chaque stress a été appliqué aux trois espèces végétales. Pour chaque répétition biologique, six plantes par espèce ont été prélevées aléatoirement, à raison de 2 plantes (stress salin) et 3 plantes (stress hydrique) par plateau. Ces six plantes ont été poolées au moment du prélèvement afin de supprimer l'effet individu.

Lors des prélèvements, les différents pools de plantes ont été immédiatement congelés à -196°C dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

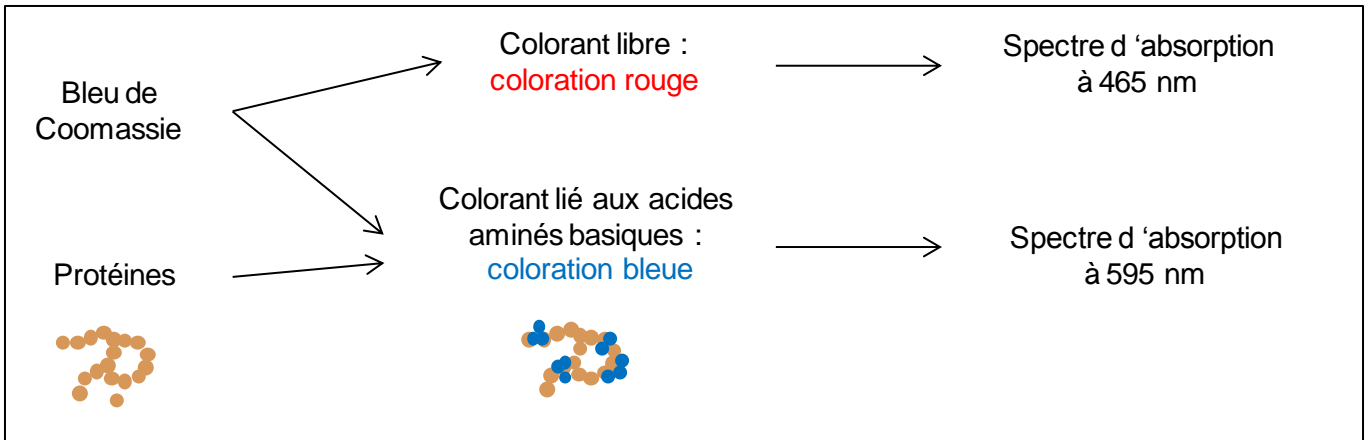
## 3. **Analyses biochimiques**

L'ensemble des analyses décrites ci-dessous ont été réalisées sur 252 échantillons, correspondant à 7 modalités de stress, aux 4 temps de prélèvement, aux 3 espèces et aux 3 répétitions biologiques. Les différentes analyses réalisées ont nécessité de nombreuses mises au point, en particulier l'ajustement des gammes d'étalonnage et la quantité de substrat nécessaire aux réactions enzymatiques. Afin de mesurer l'impact des stress appliqués sur les activités anti-oxydantes, différentes analyses biochimiques ont été réalisées, et sont résumées sur la figure 12. Les modifications apportées aux différents protocoles sont détaillées en annexe 2, seuls les protocoles synthétiques sont présentés dans le corps du texte.

Excepté pour les mesures de chlorophylle, les dosages ont été effectués sur microplaques 96 puits. Les mesures dans le visible ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre SpectraMax 340PC (Molecular Devices®), et celles en fluorescence avec un spectrofluorimètre SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices®).

### 3.1. Préparation des échantillons

Les échantillons congelés ont été broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier, puis aliquotés de façon à éviter les congélations/décongélations successives, et ainsi de maintenir l'activité enzymatique des échantillons. Ce matériel a été conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.



**Figure 13** - Principe du dosage colorimétrique de Bradford au bleu de Coomassie

Pour les différentes analyses biochimiques, 100 mg de poudre végétale ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> (m/v) après décongélation sur de la glace pilée, dans un tampon phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH7 ; EDTA 0,1 mM ; PVP 1% (m/v)). L'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) est un agent chélateur qui inhibe les métalloprotéases à zinc, des peptidases, et limite ainsi l'hydrolyse des protéines. Une étape de sonication de 5 minutes a permis d'achever la lyse des cellules. L'échantillon a alors été vortexé puis centrifugé (12 879×g, 15 min, 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a ensuite été utilisé le jour même pour les dosages enzymatiques, protéiques, de peroxydation lipidique et de capacité anti-oxydante. Pour le dosage des pigments, les différentes étapes qui suivent l'étape de broyage n'ont pas été effectuées. Pour l'ensemble des analyses, chaque échantillon a été dosé en triplicat.

## 3.2. Analyses globales

### 3.2.1. *Dosage des pigments*

Afin de mesurer l'activité photosynthétique, la chlorophylle présente dans chaque échantillon a été dosée, d'après le protocole établi par Lichtenthaler & Wellburn (1983). Cent mg de poudre végétale ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau milli-Q. Le mélange a lui-même été dilué au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'acétone 100% (Carlo Erba CH0014), et centrifugé (5000×g, 10 min, 4°C). La densité optique (DO) du surnageant a alors été mesurée au spectrophotomètre UV-visible à double faisceau SPECORD 205 (Analytik Jena®), en cuve en quartz, et dans le visible aux longueurs d'ondes (LO) de 645 et 663 nm. Les caroténoïdes ont été dosés suivant ce même protocole, à une LO de 470 nm.

La teneur en pigments a été déterminée selon les formules suivantes (Lichtenthaler & Wellburn 1983), et exprimée en µg.mL<sup>-1</sup> :

$$\text{Chl a} = 12.21 \times (A663) - 2.81 \times (A645)$$

$$\text{Chl b} = 20.13 \times (A645) - 5.03 \times (A663)$$

$$\text{Car} = (1000 \times A470 - 3.27 \times [\text{Chl a}] - 104 \times [\text{Chl b}]) / 227$$

### 3.2.2. *Dosage colorimétrique des protéines totales*

Ce dosage permet d'une part de mesurer l'activité cellulaire *via* la synthèse protéique, d'autre part de rapporter l'activité enzymatique mesurée à la quantité de protéines totales présente dans l'échantillon.

La teneur en protéines des échantillons a été déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976) adaptée au spectrophotomètre à plaques (annexe 2a). Le principe de cette méthode, schématisé sur la figure 13, repose sur une coloration spécifique des protéines par le bleu de Coomassie, indépendamment de leur séquence. En fonction de sa liaison aux acides aminés basiques des protéines, la couleur du bleu de Coomassie est modifiée, et peut être mesurée au spectrophotomètre à une LO de 595 nm.

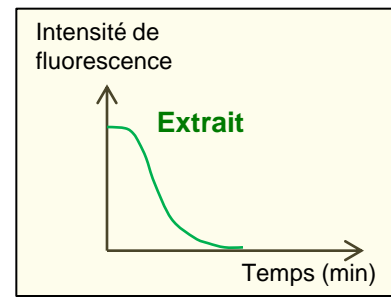
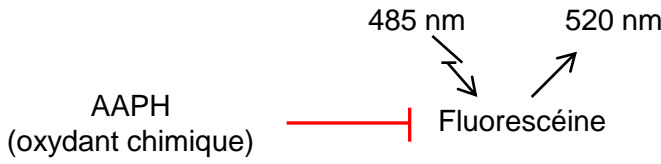
Pour déterminer la concentration en protéines des échantillons, une gamme étalon a été réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) utilisée comme protéine de référence (0 à 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>).

## 3.3. Analyses concernant le système anti-oxydant

### 3.3.1. *Dosage de la capacité anti-oxydante*

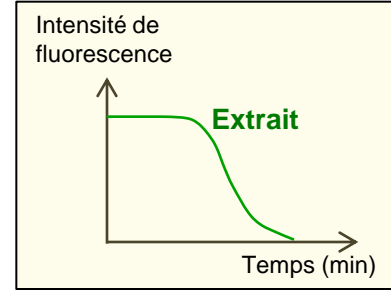
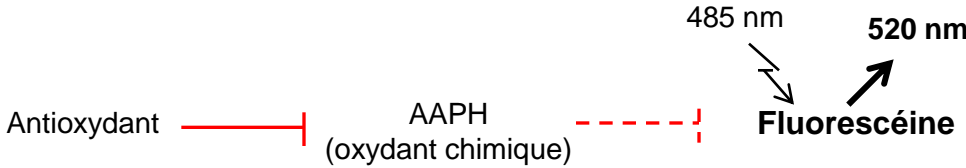
Afin de mesurer la capacité anti-oxydante des échantillons, la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) a été appliquée selon le protocole modifié de Cao et al. (1993) tel que décrit en annexe 2b. Ce test permet d'évaluer l'efficacité des antioxydants présents dans l'échantillon à éliminer les radicaux libres oxygénés d'un échantillon.

**(a) Absence ou faible abondance d'antioxydant dans l'extrait:**



Mesure de fluorescence toutes les minutes pendant 2h

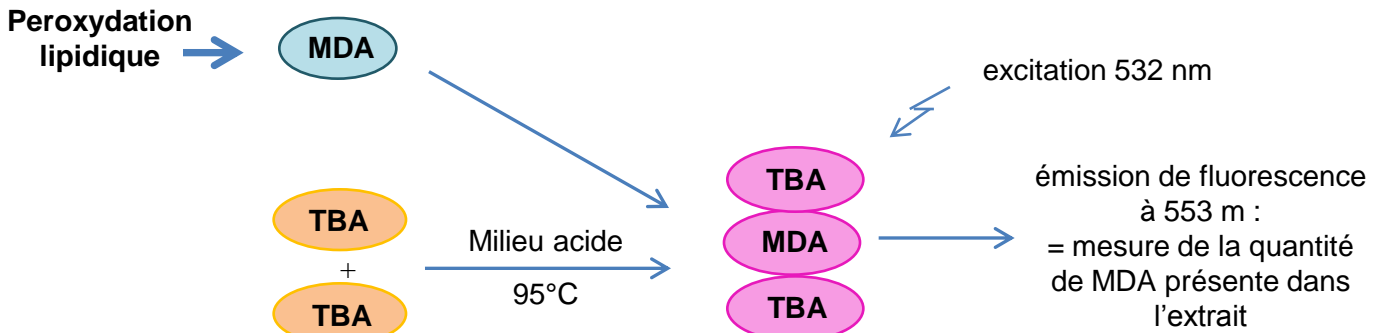
**(b) Présence d'antioxydant dans l'extrait:**



**Figure 14** – Principe de la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

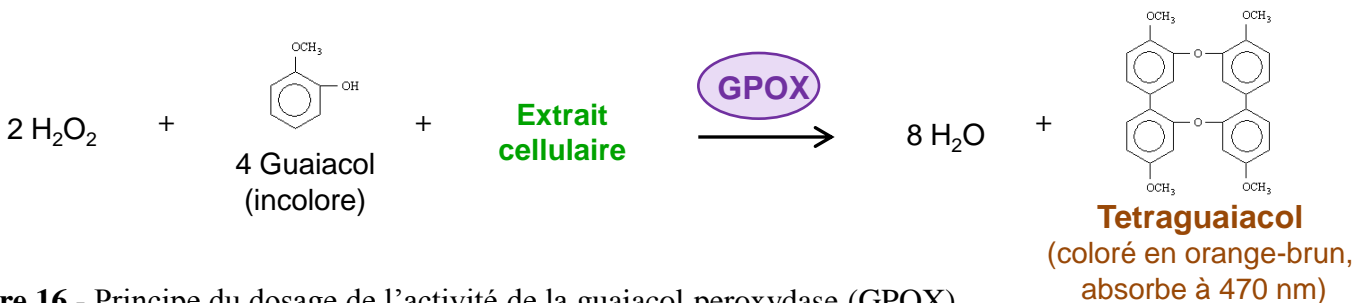
(a) Lorsque l'échantillon contient peu ou pas d'antioxydants, l'AAPH (2,2'-azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochloride) dégrade la fluorescéine rapidement. La fluorescence chute rapidement, et l'aire située sous la courbe est faible.

(b) Si l'extrait végétal contient des antioxydants, la fluorescéine est protégée de l'AAPH pendant un certain temps, sa dégradation est plus lente. Ainsi l'intensité de la fluorescence diminue moins rapidement, et l'aire située sous la courbe est plus importante.



**Figure 15** - Principe de la méthode TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances)

En milieu acide et à chaud, deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) peuvent s'associer à une molécule de MDA (malondialdéhyde), composé témoin de la peroxydation des lipides. Cette association crée un composé rose, le MDA-(TBA)<sub>2</sub> qui émet de la fluorescence à une longueur d'onde de 553 nm.



**Figure 16** - Principe du dosage de l'activité de la guaiacol peroxydase (GPOX)



Pour cela, l'extrait végétal a été mis en présence d'un indicateur fluorescent, la fluorescéine, et d'un radical peroxy stable, l'AAPH (2,2'-Azobis (2-méthylpropionamide) Dihydrochloride) à 37°C. Il s'agit de mesurer la protection exercée par les anti-oxydants contre l'oxydation de la fluorescéine par l'oxydant chimique qu'est l'AAPH. La fluorescence émise a été enregistrée toutes les minutes pendant 2h grâce à un spectrofluorimètre, avec une excitation de la fluorescéine à une LO de 485 nm, et une émission de la fluorescence mesurée à 520 nm.

La fluorescence émise par la fluorescéine décroît quand elle est dégradée par l'AAPH. Lorsque l'échantillon analysé contient des anti-oxydants, la fluorescéine est alors protégée et sa vitesse de dégradation est plus lente (figure 14). La concentration en anti-oxydants des échantillons a été calculée à partir de l'aire sous la courbe obtenue, en soustrayant celle du blanc. La gamme étalon utilisée est constituée de Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), une molécule de référence dont la structure est similaire à celle de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E).

### **3.3.2. Dosage de la peroxydation lipidique**

Lors de la peroxydation lipidique, des aldéhydes sont formés dont le malondialdéhyde (MDA). La méthode TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances), adaptée de Baek *et al.* (1999) et Dawn-Linsley *et al.* (2005) (annexe 2c) permet de quantifier les lipides peroxydés. L'extrait végétal a été chauffé pendant 45 minutes à 95°C, en présence d'acide perchlorique et d'acide thiobarbituric (TBA). Après centrifugation (805  $\times$ g, 15 min 4°C), le surnageant a été extrait dans du butanol-1, avant d'être dosé par spectrofluorimétrie.

En milieu acide et à chaud, le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique forment un composé coloré en rose, le MDA-(TBA)<sub>2</sub>, qui émet de la fluorescence à une LO de 553 nm lorsqu'il est excité à 532 nm (figure 15). Cette méthode permet ainsi de mesurer les molécules de malondialdéhyde préexistantes, et celles formées par décomposition thermique des peroxydes, qu'ils soient présents initialement ou formés au cours de la réaction (Lefèvre *et al.* 1998). Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique comprend donc les malondialdéhydes préexistants, les peroxydes lipidiques, et les produits d'auto-oxydation des acides gras ou des autres substances qui donnent naissance à du malondialdéhyde (ou à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud). Une gamme d'étalonnage de MDA a été réalisée par dilution dans du tampon phosphate (annexe 2c).

### **3.3.3. Dosage de l'activité de la peroxydase (GPOX)**

Le dosage de la guaiacol peroxydase correspond en réalité à la mesure de l'activité des peroxydases par rapport à un substrat donneur d'électrons, ici le guaiacol (2-méthoxyphénol). Il ne s'agit pas du substrat présent dans la cellule végétale. Comme représenté sur la figure 16, la réaction générale catalysée par les peroxydases permet de transformer l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. En utilisant le guaiacol comme substrat, les peroxydases forment du tétraguaiacol, un composé orange-brun.

Pour réaliser ce dosage, le protocole de Srivastava et Van Huystee (1977) a été modifié et adapté en microplaques 96 puits (annexe 2d). L'apparition du tétraguaiacol est mesurée à une LO de 470 nm, toutes les 9 secondes pendant 3 minutes. La vitesse maximale de formation du tétraguaiacol est déterminée à l'aide du logiciel Softmax PRO®. Elle permet de calculer l'activité des peroxydases, en utilisant la valeur du coefficient d'extinction du tétraguaiacol ( $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **3.3.4. Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST)**

Dans la cellule végétale, la GST permet de détoxifier les peroxydes organiques (ROOH) et de réoxyder le glutathion réduit (GSH). Le protocole de dosage suivi a été adapté de celui proposé par Habig *et al.* (1974), et est détaillé en annexe 2e. L'extrait végétal a été mis en présence de CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène), un substrat artificiel de la GST, et de glutathion à l'état réduit

Principe de l'activité de la GST :



Mesure de l'activité de la GST présente dans l'extrait :



**Figure 17** - Principe du dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST).  
GSH : glutathion réduit ; CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène ; GS-DNB : complexe coloré formé entre le CDNB et le GSH

Principe de l'activité de la GR:



Mesure de l'activité de la GR présente dans l'extrait :



**Figure 18** - Principe du dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR)  
GSSG : glutathion oxydé ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit ; GSH : glutathion réduit ; NADP<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé ; DTNB : acide 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic ; TNB : acide 5-thionitrobenzoic

(GSH). Les GST présentes dans les échantillons catalysent la formation d'un complexe coloré entre la GST et le CDNB (figure 17). La coloration de ce GS-DNB a été détectée toutes les 20 secondes pendant 5 minutes en spectrophotométrie, à une LO de 340 nm. La vitesse maximale de formation du GS-DNB est déterminée à l'aide du logiciel Softmax PRO®.

### **3.3.5. Dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR)**

La glutathion réductase n'interagit pas directement avec une espèce réactive de l'oxygène, mais permet de recycler le glutathion réduit par la GST en utilisant le NADPH comme donneur d'électron. Son activité a été mesurée après adaptation du protocole décrit par Vanacker *et al.* (1998) (annexe 2f). Ce dosage repose sur la réaction entre le glutathion réduit (GSH) formé notamment par la GST et le DTNB (acide 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic), dont le produit est le TNB (acide 5-thionitrobenzoic), qui absorbe à 412 nm (figure 18). Sa formation a été suivie par la mesure de la densité optique toutes les 9 secondes pendant 3 minutes, et la vitesse maximale a été déterminée avec le logiciel Softmax PRO®, permettant de calculer l'activité de la GR.

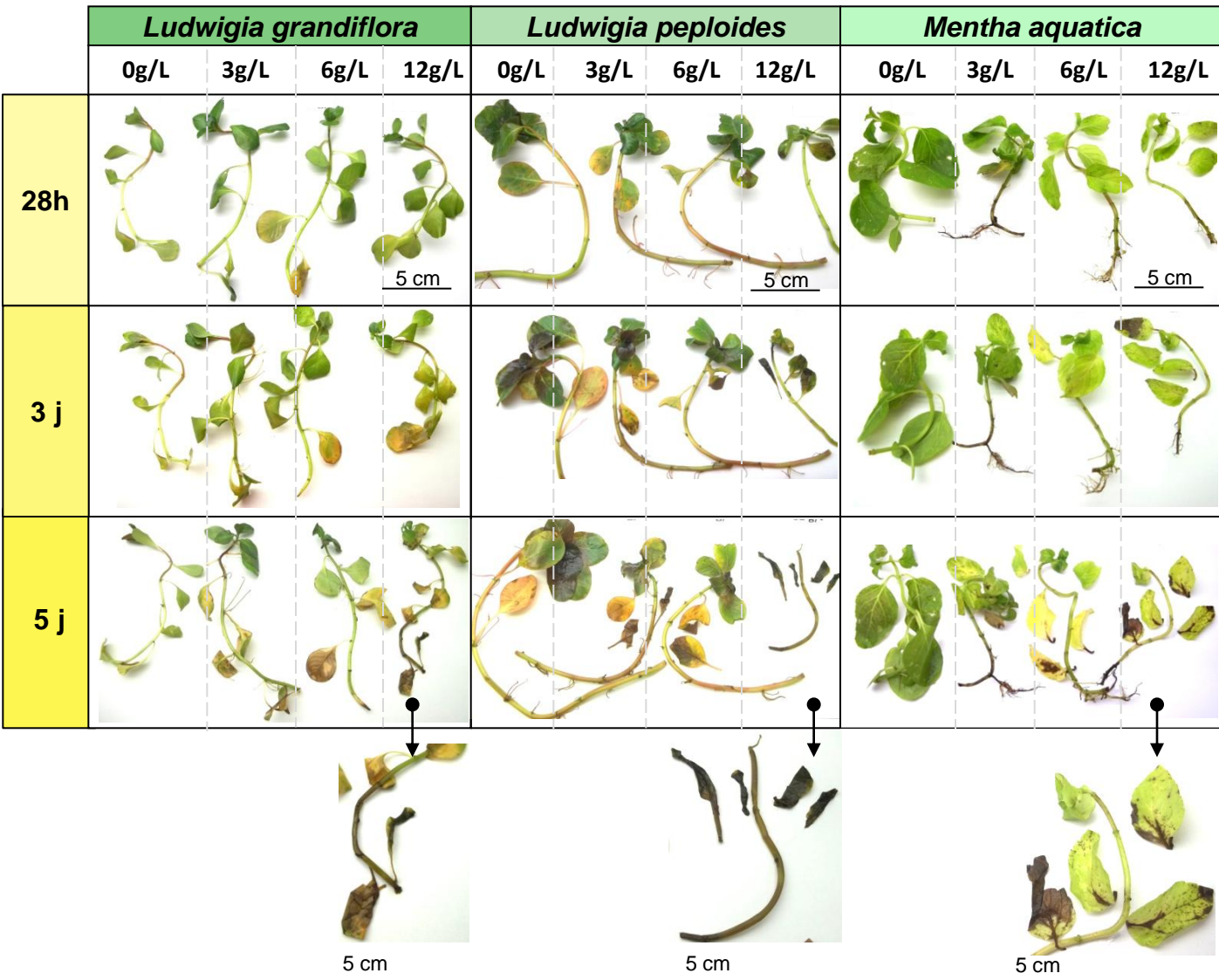
## **4. Traitement statistique des données**

Pour chaque analyse biochimique réalisée, l'ensemble des données obtenues a été traité par une analyse de variance (ANOVA) globale à trois facteurs (espèce, répétition biologique, temps de cinétique), ainsi que les interactions d'ordre 2 et 3 entre ces facteurs. Afin d'étudier séparément les effets du stress salin et du stress hydrique, des ANOVA à 4 facteurs (espèce, temps de cinétique, répétition, intensité de stress) ont ensuite été réalisées pour l'ensemble des variables. Afin d'affiner les résultats obtenus, ce sont ensuite des ANOVA à 3 facteurs (intensité du stress, temps de cinétique, répétition) qui ont été faites pour chaque espèce, et par type de stress. Enfin, des ANOVA à un facteur (temps de cinétique) ont été effectuées sur les données de chaque intensité de stress, par espèce et par type de stress. Pour l'ensemble de ces ANOVA, le seuil de significativité a été fixé à une valeur  $p \leq 0,05$ .

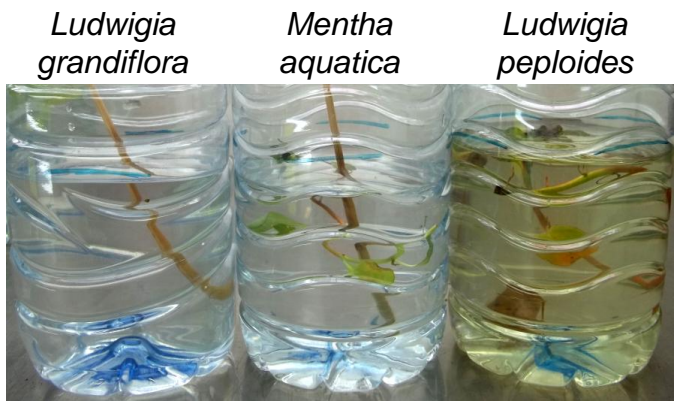
La normalité des résidus et l'homoscédasticité des variances ont été vérifiées respectivement avec les tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett. Si ces conditions étaient respectées ( $>0,05$ ), l'ANOVA était validée. Dans le cas contraire, les données ont été transformées par  $\log_{10}$  afin de tenter de rétablir la normalité des résidus et l'égalité des variances.

Suite à chaque comparaison multiple des moyennes par ANOVA, les moyennes identifiées comme significativement différentes ont été classées grâce au test de Tukey HSD (Honestly Significant Difference).

L'ensemble de ces analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.0.1)



**Figure 19** - Modifications morphologiques de *L. grandiflora*, *L. peploides* et *M. aquatica* au cours du temps, en fonction des différentes concentrations des solutions salines.



**Figure 20** - Coloration des solutions salines selon l'espèce, après 3 jours à 3 g.L<sup>-1</sup>

### III - Résultats

---

L'objectif des expérimentations menées était de mesurer et comparer les réponses générales et anti-oxydantes des espèces *L. grandiflora*, *L. peploides* et *M. aquatica* face à des stress hydriques et salins.

Malgré des mises au point concluantes pour les dosages de la peroxydation des lipides (test TBARS) et de la glutathion S-transférase (GST), les résultats obtenus étaient incohérents et pas assez reproductibles pour pouvoir être exploités et présentés dans ce rapport.

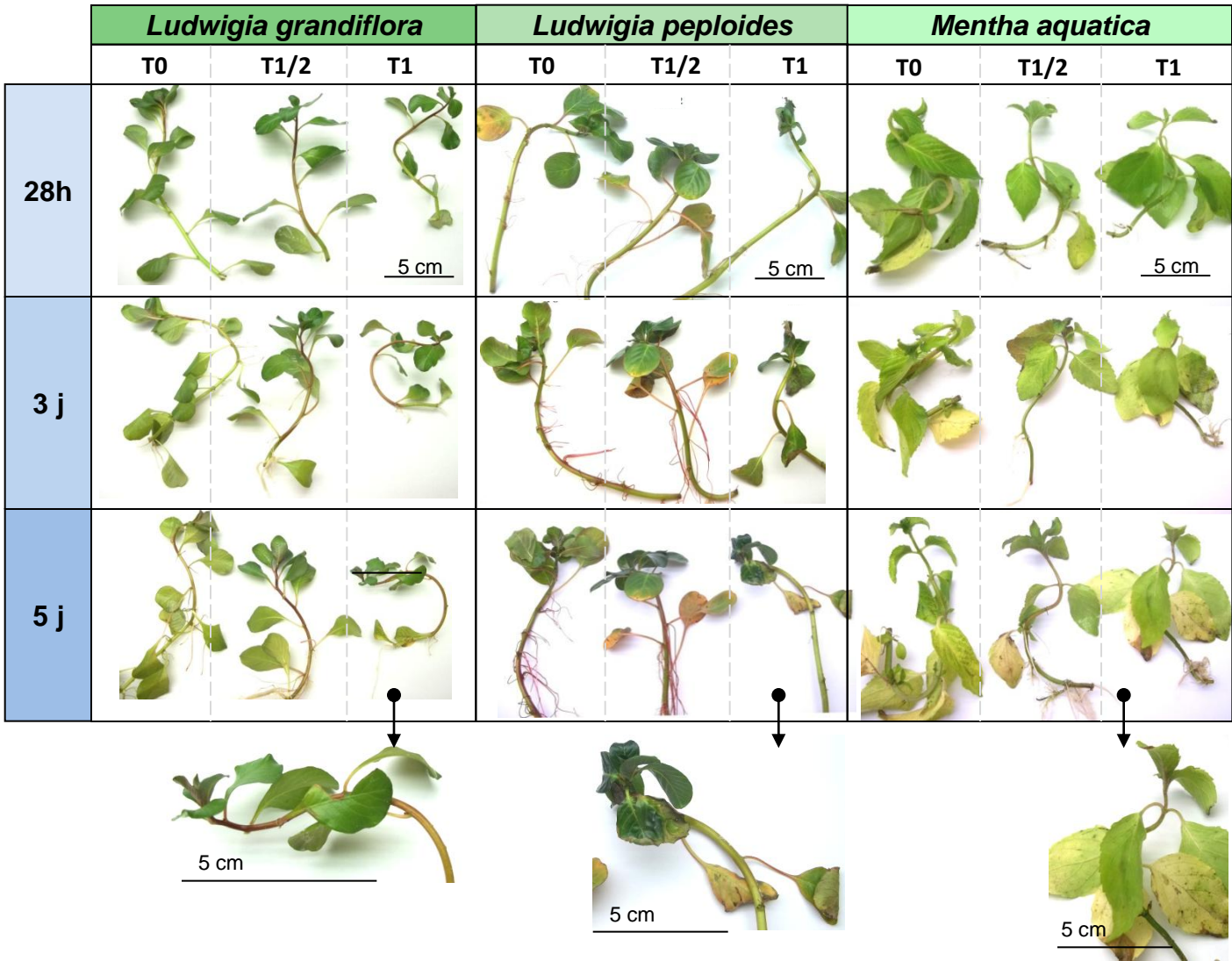
#### 1. Analyse phénotypique des réponses aux stress

Afin de pouvoir comparer les effets des stress sur la morphologie des trois espèces, des photographies des plantes ont été réalisées aux différents temps et pour chaque intensité de stress. Bien que ces clichés ne représentent le suivi que d'un individu au cours du temps pour chacun des stress, l'ensemble des remarques qui suivent correspondent également aux observations qui ont été faites au cours des expérimentations.

##### 1.1. Stress salin

Les effets des différentes concentrations en sels sur les trois espèces sont visibles sur la figure 19. Comparées au témoin à 0 g.L<sup>-1</sup>, les feuilles les plus basses de *L. grandiflora* deviennent sénescentes au bout de 3 jours de stress, quelle que soit l'intensité du stress. Après 3 jours à 3 g.L<sup>-1</sup>, cette espèce est relativement peu affectée, mais la sénescence des feuilles s'accroît au bout de 5 jours. Les stress induits à 6 g.L<sup>-1</sup>, et à 12 g.L<sup>-1</sup> conduisent à une sénescence des feuilles plus marquée, qui s'amplifie après 5 jours à 12 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, où la partie basse de la tige est complètement nécrosée. Les feuilles de *L. peploides* tendent à jaunir au cours du temps, même pour le contrôle à 0 g.L<sup>-1</sup>. Pour les stress à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup>, un ramollissement des plantes a été noté lors des prélèvements, et ce dès 4h après le début du stress. À 3 et 6 g.L<sup>-1</sup>, l'impact des stress sur la morphologie des plantes semble équivalent, avec une sénescence et une nécrose des feuilles les plus basses. L'effet de la concentration à 12 g.L<sup>-1</sup> est très prononcé. Dès 28h, des nécroses se forment et au bout de 5 jours la nécrose de la plante est totale. Au cours de l'expérimentation, une coloration progressive de l'eau en jaune a été observée pour cette espèce (figure 20), peut-être due à un relargage de composés de type polyphénols dans l'eau. Cette coloration semble proportionnelle à l'intensité du stress appliqué. Des échantillons d'eau ont été prélevés, mais n'ont pas été analysés pour le moment. À 3g.L<sup>-1</sup>, les feuilles de *M. aquatica* se dépigmentent peu au cours du temps. L'effet de la concentration en sels est bien plus important à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup>, où les individus ont perdu presque l'ensemble de leurs feuilles au bout de 5 jours. À 12 g.L<sup>-1</sup>, cette perte de feuilles est constatée dès 28h et la nécrose des feuilles débute au bout de 3 jours.

Dans l'ensemble, quelle que soit l'intensité du stress, les trois espèces semblent affectées de la même manière par la présence de NaCl dans l'eau : les individus perdent leur tonicité, jaunissent, les feuilles se détachent et les effets du stress peuvent conduire à la nécrose totale de la plante. Au bout de trois jours d'application d'un stress, l'effet des différentes concentrations en sels est visible morphologiquement, quelle que soit l'espèce. Le stress à 12 g.L<sup>-1</sup> est intense, et affecte fortement les différentes espèces, notamment au bout de 5 jours. Toutefois, alors que *L. peploides* est totalement nécrosée et que *M. aquatica* a perdu l'ensemble de ses feuilles, *L. grandiflora* est moins affectée, et paraît mieux résister à cette intensité de stress.



**Figure 21** - Modifications morphologiques de *L. grandiflora*, *L. peploides* et *M. aquatica* au cours du temps, en fonction des différents niveaux d'eau.  
T0 = immersion complète ; T1/2 = émergence partielle ; T1 = émergence complète

## 1.2. Stress hydrique

Les effets des différents stress hydriques appliqués aux trois espèces sont visibles sur la figure 21. Afin d'éviter que les tiges feuillées soient en contact avec l'eau, des tuteurs supportaient les plantes pour les traitements T1/2 (exondaison partielle) et T1 (exondaison complète). Ceci a pu influencer leur développement, et pourrait expliquer l'aspect recourbé de *L. grandiflora* pour le traitement le plus drastique (T1). Pour cette espèce, le manque d'eau n'a pas entraîné de jaunissement des feuilles. Les individus semblent avoir bien supporté l'émersion T1/2, même au bout de 5 jours. En revanche suite à l'émersion complète, les feuilles se sont desséchées à partir de 3 jours. Concernant *L. peploides*, le jaunissement d'une feuille basse à T0 montre que cette espèce perd facilement ses feuilles les plus basses. L'émersion partielle engendre un jaunissement accentué des feuilles, notamment au bout de 5 jours. Avec une émersion complète, cette espèce présente un assèchement avancé dès 3 jours de stress. De manière générale, nous avons eu des difficultés à maintenir *M. aquatica* en conditions contrôlées, comme le montre l'aspect de la plante témoin T0. Au cours du temps, les feuilles les plus basses se dépigmentent. L'émersion partielle de cette espèce ne semble l'affecter qu'au bout de 5 jours, où certaines feuilles jaunissent. Vis-à-vis de l'émersion complète, cet effet apparaît dès 3 jours.

Lors d'une émersion complète pendant 5 jours, *L. grandiflora* et *L. peploides* semblent plus affectées phénotypiquement que la menthe aquatique, et s'assèchent rapidement. Globalement, les trois espèces supportent plutôt bien l'émersion partielle.

## 2. Réponses physiologiques et biochimiques

Lors de la réalisation des ANOVA, la transformation des données n'a pas toujours permis d'améliorer la normalité des résidus et l'homoscédasticité des variances. S'appuyant sur la robustesse de l'ANOVA, les données concernées ont tout de même été traitées par des tests paramétriques.

Les ANOVA globales réalisées sur l'ensemble des données, avec pour facteurs l'espèce ("esp"), la répétition biologique ("rep") et le temps de cinétique ("tps"), sans distinction de stress, ont permis de mettre en évidence des effets répétition très hautement significatif ( $P < 0,001$ ). Pour la plupart des variables, bien qu'il y ait des différences significatives, aucune des trois répétitions du stress hydrique ne se distingue plus qu'une autre. En revanche, les répétitions biologiques 1 et 2 liées au stress salin se distinguent de la 3<sup>e</sup> répétition pour les variables concernant les pigments. Les ANOVA réalisées sur les données de chaque stress, avec comme facteurs "esp", "rep", "tps" et intensité du stress ("stress"), ont montré des effets "espèce" hautement à très hautement significatifs ( $P < 0,01$  ou  $< 0,001$ ). Pour l'ensemble des stress et des variables analysées, aucune des trois espèces ne se distingue plus particulièrement des autres.

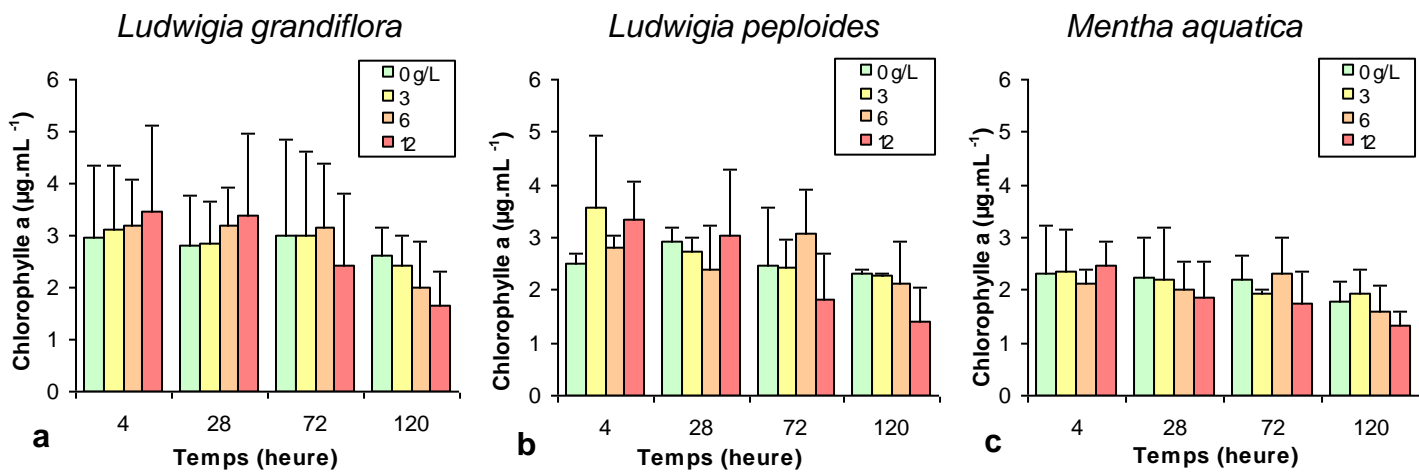
Aucune des interactions d'ordre 3 ("rep×esp×tps") ne s'est révélée significative. Parmi les interactions d'ordre 2, dans l'ensemble, l'interaction "tps×stress" s'est révélée significative ( $P < 0,01$ ). L'impact de l'intensité d'un stress pourra donc être influencé différemment au cours de sa durée, en fonction des variables et des espèces considérées.

### 2.1. Réponses face au stress salin

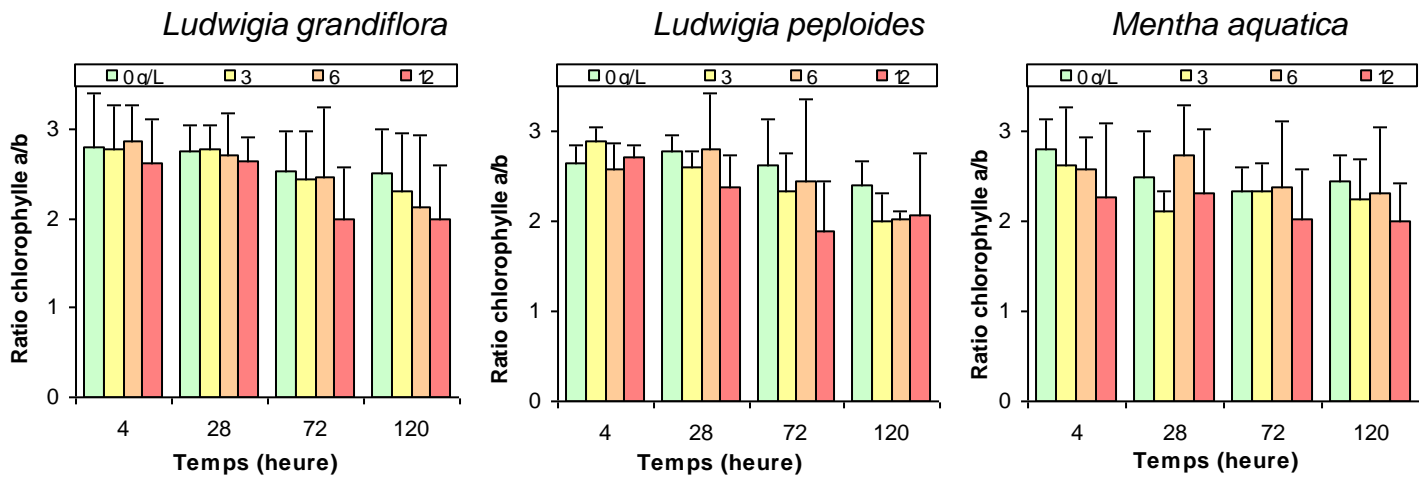
#### 2.1.1. *Réponses globales*

##### ▪ **Chlorophylle a**

Les résultats de l'ANOVA réalisée sur les données du stress salin, avec pour facteurs "esp", "tps", "rep" et "stress", ont montré un effet du facteur "espèce" très hautement significatif pour les valeurs de chlorophylle a ( $P = 7,55 \times 10^{-13}$ ). Le test de comparaison des moyennes de Tukey



**Figure 22** - Concentrations en chlorophylle a selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).



**Figure 23** - Ratios chlorophylle a/chlorophylle b selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).



indique que les trois espèces ont toutes des taux moyens de chlorophylle a significativement différents. Ainsi *M. aquatica* a des taux moyens de chlorophylle a de l'ordre de  $2,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , significativement inférieurs à ceux de *L. peploides* ( $2,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), eux-mêmes inférieurs à ceux de *L. grandiflora* ( $2,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (figure 22).

Afin de mieux caractériser l'effet des stress salins sur les différentes espèces, des ANOVA espèce par espèce ont été réalisées. Pour *L. grandiflora* (figure 22a), l'effet de la cinétique est très hautement significatif ( $P = 5,07 \times 10^{-6}$ ), avec en moyenne un maintien des taux de Chl a entre 4h et 72h (taux moyen =  $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), puis une diminution au bout de 5 jours jusqu'à  $2,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Pour *L. peploides*, l'effet de la cinétique est hautement significatif ( $P = 0,002$ ). En moyenne, une diminution progressive et significative du taux de Chl a est observée entre 4h et 120h, de  $3,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à  $2,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figure 22b). Pour *M. aquatica* (figure 22c), les taux de Chl a diminuent progressivement au cours du temps, de manière significative ( $P = 0,018$ ). La concentration en Chl a n'est pas affectée de manière significative par les différentes intensités de stress ( $P = 0,13$ ), chez aucune des espèces.

Les taux de chlorophylle a ont tendance à diminuer au cours du temps, quelle que soit l'espèce, et quelle que soit l'intensité du stress. Cependant, quelle que soit l'espèce, la concentration en Chl a n'est pas affectée par les concentrations croissantes en NaCl. *M. aquatica* présente des taux de Chl a inférieurs aux deux autres espèces.

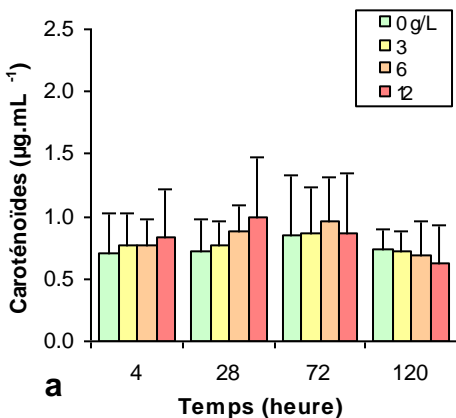
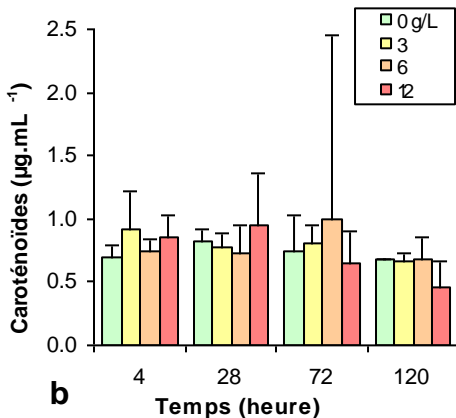
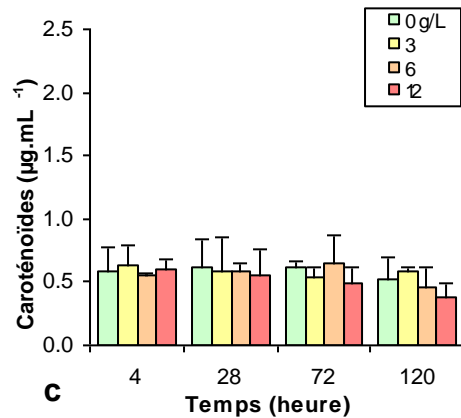
### ▪ Chlorophylle b

Les profils de la chlorophylle b sont proches de ceux obtenus pour la Chl a et sont donc présentés en annexe 3. L'effet "espèce" est très hautement significatif ( $P = 5,04 \times 10^{-8}$ ). La concentration de Chl b présente chez *M. aquatica* est significativement inférieure à celles des deux autres espèces, de l'ordre de  $0,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contre environ  $1,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Les ANOVA espèce par espèce montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif de la concentration en sels sur le taux de Chl b, ce dernier est donc équivalent aux témoins pour les individus stressés. Le taux de Chl b présent dans *L. grandiflora* augmente jusqu'à  $1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au bout de 72h, avant de chuter au bout de 5 jours pour revenir au même taux qu'à 4h ( $0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Concernant les valeurs de Chl b de *L. peploides*, il n'y a pas d'effet du facteur "temps de cinétique" ( $P = 0,50$ ), le taux de Chl b se maintient à environ  $1,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sur toute la durée du stress. Pour *M. aquatica*, la concentration en Chl b chute progressivement et de façon significative, de  $0,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à  $0,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

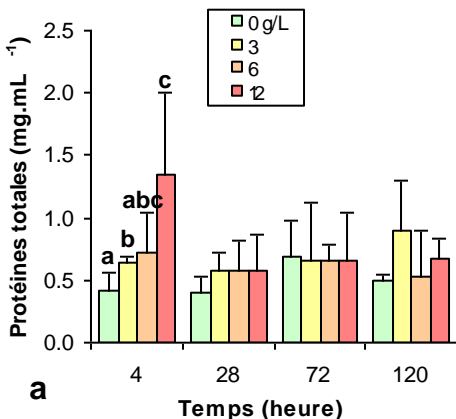
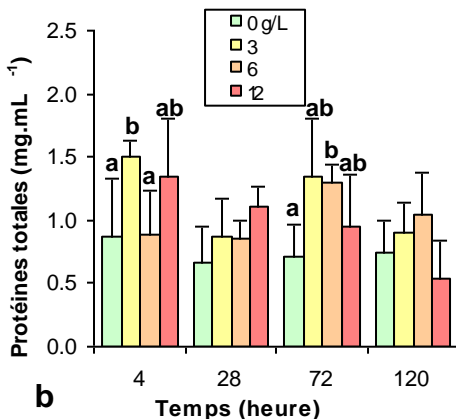
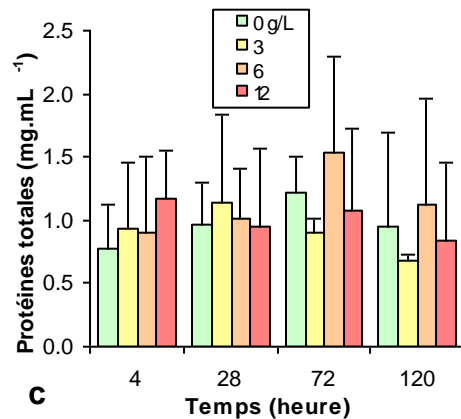
Les trois espèces présentent des profils différents d'évolution de la Chl b dans le temps, quel que soit le stress. Le taux de Chl b est maintenu chez *L. peploides*, il diminue chez *M. aquatica*, et pour *L. grandiflora*, il augmente avant de revenir au taux observé à 4h. L'intensité de la salinité n'influence pas le taux de Chl b, qui reste équivalent au témoin, pour les trois espèces étudiées. *M. aquatica* a des taux de Chl b inférieurs aux deux autres espèces.

### ▪ Ratio chlorophylle a/b

Afin de comparer l'évolution des teneurs en Chl a et b au cours du temps et en fonction de l'intensité du stress, des calculs de ratio Chl a/b ont été réalisés. L'ANOVA globale a mis en évidence que les trois espèces ont des ratios chlorophylle a/b significativement différents ( $P = 0,014$ ). En moyenne, ce ratio est significativement plus élevé pour *L. grandiflora* ( $2,52$ ) que pour *M. aquatica* ( $2,36$ ) (figure 23). La quantité de Chl a contenue dans *M. aquatica* est significativement plus faible que celle présente dans *L. grandiflora*. *L. peploides* n'est pas significativement différente des deux autres espèces, avec un ratio moyen de  $2,43$ . L'effet du temps de cinétique et de l'intensité du stress sont très hautement significatifs ( $P = 1,56 \times 10^{-7}$ ;  $5,19 \times 10^{-5}$  respectivement). À  $12 \text{ g.L}^{-1}$ , toutes espèces confondues, les ratios sont significativement plus faibles que pour les autres conditions de stress ( $2,23$  contre  $2,50$ ), ce qui indique que la Chl a est plus fortement affectée par ce stress intense que la Chl b. La comparaison des moyennes montre également que ces ratios se maintiennent jusqu'à 28h à  $2,63$ , puis chutent significativement à partir

*Ludwigia grandiflora**Ludwigia peploides**Mentha aquatica*

**Figure 24** - Concentrations en caroténoïdes selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).

*Ludwigia grandiflora**Ludwigia peploides**Mentha aquatica*

**Figure 25** - Concentrations en protéines totales selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ). La présence de lettres différentes, obtenues par comparaison des intervalles de confiance, indique une différence significative entre les intensités de stress, pour la même temps. Lorsqu'il n'y a pas de lettre pour un temps, les différentes intensité de stress sont considérées comme égales.

de 72h pour se maintenir aux alentours de 2,26. Aucune différence significative n'a été notée lors des ANOVA réalisées espèce par espèce, et ce quel que soit le facteur.

Le ratio Chl a/b n'est pas stable dans le temps, pour l'ensemble des espèces. Lors d'un stress à 12 g.L<sup>-1</sup>, le ratio obtenu est inférieur chez toutes les espèces comparé à celui observé aux autres concentrations en NaCl. Lors d'un stress salin intense, la Chl a est donc plus affectée que la Chl b.

### ▪ Caroténoïdes

L'ANOVA réalisée sur les données du stress salin, avec les facteurs "esp", "tps", "rep" et "stress", a mis en évidence un effet "espèce" très hautement significatif ( $P = 3,65 \times 10^{-16}$ ). *L. grandiflora* et *L. peploides* sont considérées comme ayant des concentrations en caroténoïdes similaires, de l'ordre de 0,77 µg.mL<sup>-1</sup> en moyenne. *M. aquatica* présente des concentrations en caroténoïdes globalement plus faibles que les deux autres espèces, de 0,56 µg.mL<sup>-1</sup>.

Les ANOVA réalisées espèce par espèce ont mis en évidence un effet du temps très hautement significatif pour *L. grandiflora* ( $P = 2,81 \times 10^{-4}$ ). Le test de comparaison de moyennes de Tukey montre une augmentation progressive et significative de la concentration en caroténoïdes entre 4h et 72h, jusqu'à 0,88 µg.mL<sup>-1</sup>, puis une chute significative au bout de 120h pour revenir à un taux de 0,69 µg.mL<sup>-1</sup> similaire à celui de 4h (figure 24a). L'espèce *L. peploides* présente quant à elle un effet du facteur "temps" significatif ( $P = 2,04 \times 10^{-2}$ ). En moyenne, il n'y a pas de différence significative entre 4h et 28h avec un maintien des concentrations à 0,86 µg.mL<sup>-1</sup>. Puis une chute progressive est observée jusqu'à 5 jours, où le taux de caroténoïdes est significativement plus faible qu'aux temps 4h et 28h (0,62 µg.mL<sup>-1</sup>). (figure 24b). Le facteur "temps" n'a pas d'effet significatif sur les concentrations en caroténoïdes au sein de *M. aquatica*. Les concentrations en caroténoïdes sont donc maintenues au cours du temps pour cette espèce (moyenne = 0,56 µg.mL<sup>-1</sup>). L'effet du facteur "stress" n'est significatif pour aucune des trois espèces.

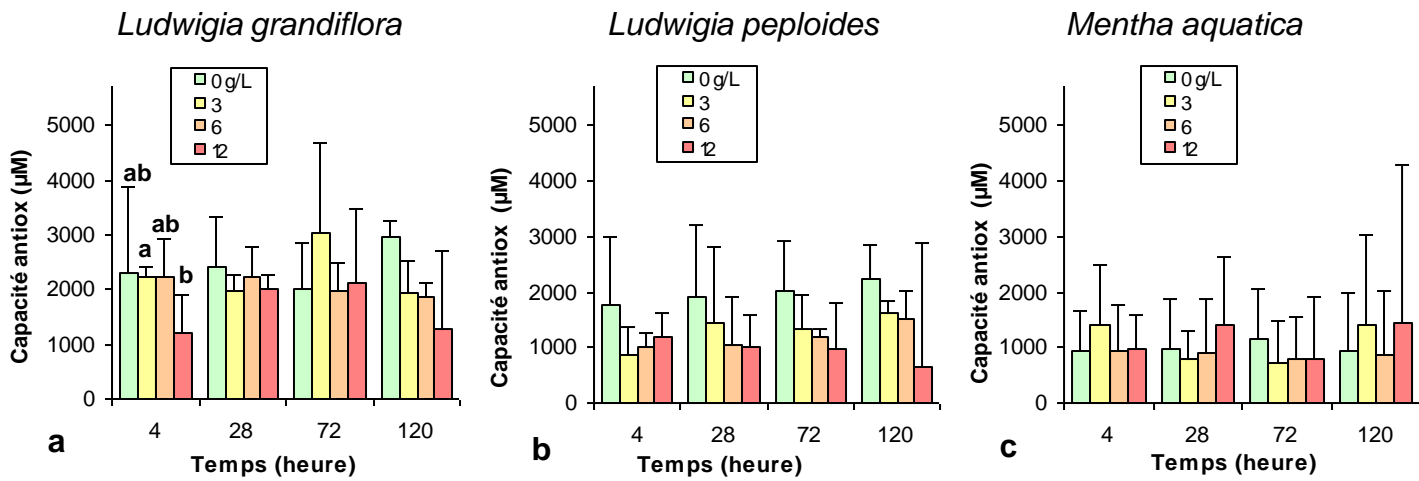
Soumises à un stress salin, les trois espèces étudiées ont des profils d'évolution de la concentration en caroténoïdes tous différents. En effet, si la concentration en caroténoïdes reste stable chez *M. aquatica* au cours de la cinétique étudiée, celle de *L. peploides* se maintient avant de chuter, et les concentrations en caroténoïdes de *L. grandiflora* augmentent, avant de diminuer. Aucune des espèces étudiées n'est impactée par l'intensité du stress.

### ▪ Protéines totales

L'ANOVA globale réalisée sur toutes les espèces confondues a mis en évidence un effet "espèce" très hautement significatif pour la variable "protéines totales" ( $P = 5,70 \times 10^{-9}$ ). La comparaison des moyennes montre que *L. grandiflora* possède des valeurs de protéines de l'ordre de 0,66 mg.mL<sup>-1</sup>, significativement plus faibles que celles de *M. aquatica* (1,01 mg.mL<sup>-1</sup>) et *L. peploides* (0,98 mg.mL<sup>-1</sup>) (figure 25).

Les ANOVA réalisées espèce par espèce avec les facteurs "rep", "tps", "stress" ont montré que les espèces *L. grandiflora* et *M. aquatica* ne montrent pas de différence significative dans leur contenu en protéines totales en fonction de l'intensité du stress et au cours du temps ( $P > 0,01$ ) (figures 25a et 25c). Cependant, pour *L. grandiflora*, le calcul des intervalles de confiance indique que la quantité de protéines produites 4h après le début du stress à 12 g.L<sup>-1</sup> est significativement différente de celle présente dans les plantes témoins et dans les plantes soumises au stress 3 g.L<sup>-1</sup>, avec une concentration moyenne en protéines 3,3 fois plus importante.

Un effet significatif des concentrations en NaCl ( $P = 1,59 \times 10^{-2}$ ) sur la quantité de protéines est à noter chez *L. peploides*. Ses concentrations en protéines sont significativement plus élevées à 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl (1,15 mg.mL<sup>-1</sup>), qu'à 0 g.L<sup>-1</sup> (0,75 mg.mL<sup>-1</sup>) (figure 25b). Ce résultat suggère que les plantes stressées à 3 g.L<sup>-1</sup> ont produit plus de protéines que celles non stressées, et ce sur toute la durée du stress. Le test de comparaison des moyennes de Tukey signale également que les concentrations en protéines à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup> (1 mg.mL<sup>-1</sup>) sont considérées comme équivalentes à



**Figure 26** - Quantité d'antioxydants selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).

celles mesurées à 0 et 3 g.L<sup>-1</sup>. Ces résultats montrent que les concentrations en protéines de *L. peploides* ne varient pas proportionnellement à l'intensité du stress appliqué, puisqu'elles ne sont différentes du témoin qu'à 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl. Cette espèce présente également un effet significatif du facteur "temps" ( $P = 1,89 \times 10^{-2}$ ) avec en moyenne, tous traitements confondus, une diminution significative et progressive des concentrations en protéines au cours du temps, passant de 1,14 mg.mL<sup>-1</sup> à 4h à 0,80 mg.mL<sup>-1</sup> au bout de 5 jours. Ce résultat semble être principalement influencé par les valeurs à 12 g.L<sup>-1</sup>, puisque graphiquement les trois autres concentrations n'ont pas l'air de suivre cette tendance. Par ailleurs, la comparaison des intervalles de confiance de la concentration en protéines totales à chaque temps de la cinétique montre qu'à 4h, le taux de protéines présent dans les plantes stressées à 3 g.L<sup>-1</sup> est significativement 1,7 fois plus important que chez le contrôle. Le même constat est observé à 72h pour les plantes ayant subi un stress à 6 g.L<sup>-1</sup>, où une concentration en protéines 1,8 fois plus importante que dans le témoin est observée.

La concentration en protéines est significativement plus importante que celle du témoin lorsque *L. grandiflora* est soumise pendant 4h à un stress à 12 g.L<sup>-1</sup>. *L. peploides* présente des concentrations en protéines significativement plus importantes que celles du témoin lorsque les individus subissent un stress à 3 g.L<sup>-1</sup>. Ainsi, elle répond au stress plus tardivement que *L. grandiflora*, et pour un stress moins intense. La concentration en sels n'influence pas la quantité de protéines produites *M. aquatica*.

### 2.1.2. Réponses spécifiques au stress oxydant

#### ▪ Capacité antioxydante

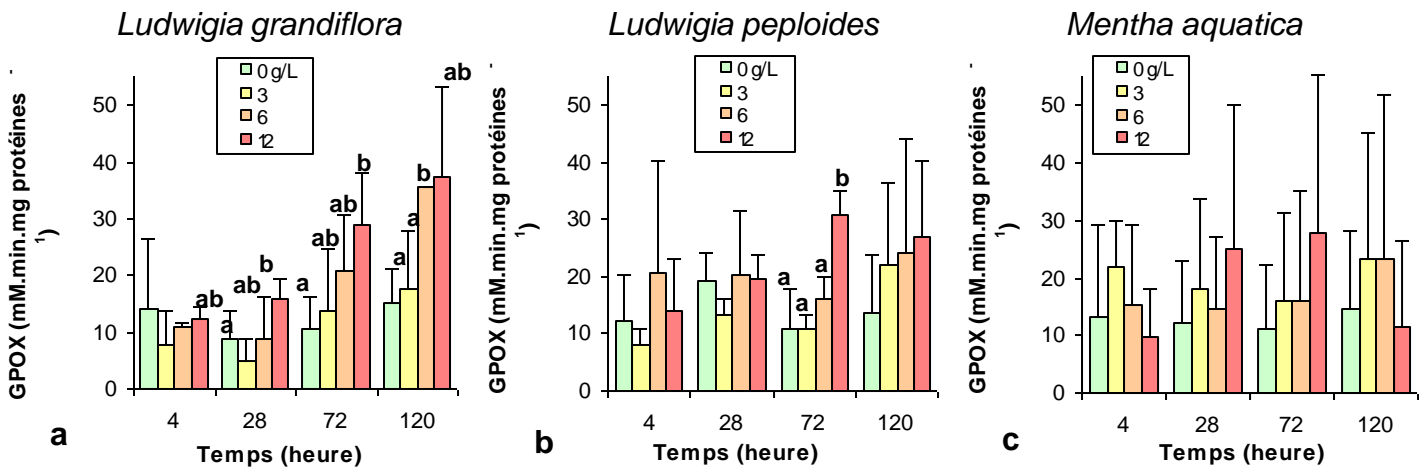
L'analyse de variance toutes espèces confondues, prenant en compte les facteurs "esp", "tps", "rep", "stress", indique un effet "espèce" très hautement significatif ( $P < 2,2 \times 10^{-16}$ ). Cela signifie que toutes les espèces présentent des capacités anti-oxydantes significativement différentes les une des autres. Ainsi, *L. grandiflora* est l'espèce qui contient le plus d'antioxydants, avec en moyenne 2209 µM, et *M. aquatica* celle qui en contient le moins (988 µM) (figure 26). *L. peploides* contient des quantités intermédiaires par rapport aux deux autres espèces, de l'ordre de 1380 µM.

Suite à l'ANOVA réalisée espèce par espèce, aucun effet significatif de l'intensité du stress ou du temps n'a été révélé pour *L. grandiflora* et *M. aquatica*. La capacité anti-oxydante de *L. grandiflora* et *M. aquatica* ne semble pas affectée par les différents niveaux de stress salins, et elle se maintient dans le temps. Toutefois pour *L. grandiflora*, le calcul et la comparaison des intervalles de confiance de la capacité anti-oxydante des plantes stressées montrent qu'au bout de 4h, il y a une différence significative entre le stress à 3 g.L<sup>-1</sup> et celui à 12g.L<sup>-1</sup>, les quantités d'antioxydants étant deux fois moins importantes à 12 g.L<sup>-1</sup>. En revanche, *L. peploides* révèle un effet des différents stress appliqués très hautement significatif ( $P = 4,42 \times 10^{-5}$ ). La comparaison des moyennes permet de dire que la quantité d'antioxydants est significativement plus faible dans les individus stressés à 3, 6 et 12 g.L<sup>-1</sup> (de 987 à 1320 µM) que dans les plantes témoins (1980 µM) (figure 26b).

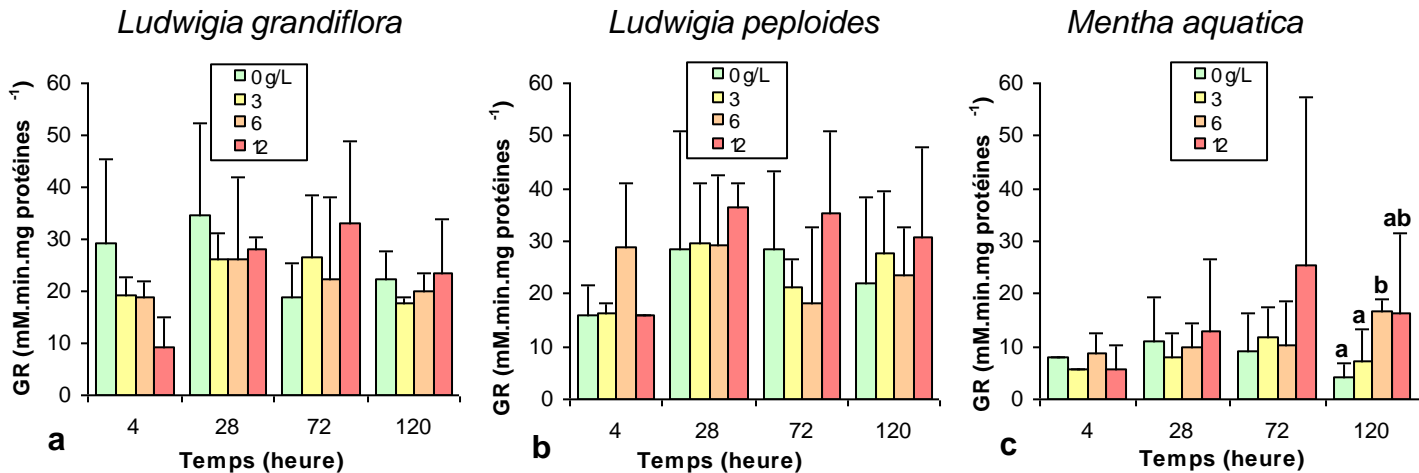
Pour *L. grandiflora*, la quantité de composés anti-oxydants est affectée à 4h pour le stress le plus intense. *M. aquatica* ne semble pas mobiliser les réponses antioxydantes face au stress salin. *L. peploides* réagit différemment de *L. grandiflora* et *M. aquatica* face au stress salin quant à la mobilisation de sa capacité anti-oxydante. Le temps n'a pas d'effet significatif sur la capacité antioxydante de cette espèce, ce qui sous-entend que la réponse anti-oxydante est stable sur toute la durée d'application des stress. Cependant, la quantité d'antioxydant est plus faible quand la plante est stressée, mais se maintient au moins sur un pas de temps de 5 jours, quel que soit le stress salin.

#### ▪ Guaiacol peroxydase

L'ANOVA toutes espèces confondues n'a pas mis en évidence d'effet "espèce" significatif. Les trois espèces présentent des activités de GPOX statistiquement équivalentes, d'environ 17,5 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> en moyenne. (figure 27)



**Figure 27** - Activité de la guaiacol peroxydase selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ). La présence de lettres différentes, obtenues par comparaison des intervalles de confiance, indique une différence significative entre les intensités de stress, pour la même temps. Lorsqu'il n'y a pas de lettre pour un temps, les différentes intensité de stress sont considérées comme égales.



**Figure 28** - Activité de la glutathion réductase selon l'espèce, l'intensité du stress salin et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ). La présence de lettres différentes, obtenues par comparaison des intervalles de confiance, indique une différence significative entre les intensités de stress, pour la même temps. Lorsqu'il n'y a pas de lettre pour un temps, les différentes intensité de stress sont considérées comme égales.

Les différentes concentrations en sels ont un effet significatif ( $P = 8,51 \times 10^{-3}$ ) sur l'activité de la GPOX au sein de *L. grandiflora*. D'après le test de comparaison des moyennes de Tukey, les activités de la GPOX des plantes stressées à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup> (de l'ordre de 24,9 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>) sont significativement plus élevées que celles observées pour les plantes traitées à 0 et 3 g.L<sup>-1</sup> avec 11,5 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> (figure 27a). Le facteur "temps" a également un effet très hautement significatif ( $P = 2,18 \times 10^{-4}$ ). L'activité de cette enzyme chez *L. grandiflora* apparaît statistiquement stable entre 4h et 3 jours, variant entre 9,5 à 18,5 M.mmin.mg de protéines<sup>-1</sup>, puis elle augmente significativement au bout de 5 jours d'application des stress, jusqu'à 31,4 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>. Comme le montre la figure 27a, cet effet est surtout marqué pour les stress à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup>. Les intervalles de confiance permettent de mettre en évidence des différences d'activité de la GPOX entre les intensités de stress, au cours d'un même temps de cinétique. Par exemple au bout de 28h de stress, l'activité de la GPOX est significativement plus importante à 12 g.L<sup>-1</sup> qu'à 3 g.L<sup>-1</sup>, et 1,83 fois plus importante que celle présente dans le témoin. Après 3 jours d'application des stress, il y a 2,7 fois plus d'activité de la GPOX dans les plantes stressées à 12 g.L<sup>-1</sup> que pour les plantes témoin (0 g.L<sup>-1</sup>). Enfin, 5 jours après le début des stress, cette enzyme est 2,4 fois plus active à 6 g.L<sup>-1</sup> qu'à 0 et 3 g.L<sup>-1</sup>. *L. grandiflora* mobilise la GPOX en lien avec l'intensité du stress appliqué, et d'autant plus précocement que le stress est intense.

Comme pour *L. grandiflora*, il y a un effet de l'intensité du stress très hautement significatif ( $P = 1,55 \times 10^{-6}$ ) pour *L. peploides*. L'activité de GPOX est en moyenne significativement plus importante pour les stress les plus intenses à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup> que pour ceux à 0 et 3 g.L<sup>-1</sup>, soit des activités respectives de 21,6 contre 13,5 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> (figure 27b). Ce résultat suggère que *L. peploides* est capable de mobiliser la GPOX en réponse aux stress salins, de manière proportionnelle à l'intensité du stress. L'effet du temps est lui aussi très hautement significatif ( $P = 8,17 \times 10^{-4}$ ). La comparaison des moyennes met en évidence une augmentation de l'activité de la GPOX entre 4h et 28h, passant de 13,8 à 17,6 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, puis un maintien de cette activité jusqu'à 5 jours. Ce résultat ne traduit pas l'observation de la figure 27b, où l'activité de cette enzyme paraît plutôt augmenter à partir de 72h, voire 120h, pour les stress les plus intenses. L'observation des intervalles de confiance à 72h montre une différence significative d'activité entre le stress à 12 g.L<sup>-1</sup> et les trois autres. Ainsi pour ce temps de cinétique, la GPOX est 2,85 fois plus active dans les plantes stressées à 12 g.L<sup>-1</sup> que dans le témoin.

Pour la menthe aquatique, aucun effet significatif des facteurs "temps" et "stress" n'a été observé ( $P = 0,66; 0,54$ ). Ainsi pour *M. aquatica*, l'activité de la GPOX semble être stable dans le temps, avec un taux moyen de 17,2 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, quel que soit le niveau de stress. Cependant, ce maintien de l'activité de la GPOX ne se vérifie pas graphiquement (figure 27c).

En moyenne, l'activité de la GPOX est du même ordre de grandeur quelle que soit l'espèce considérée. Cependant, l'activité de la guaiacol peroxydase est plus importante pour les deux espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides* suite aux stress à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup>. Pour *L. grandiflora* cette mobilisation est d'autant plus précoce que le stress est intense : dès 24h pour le stress à 12 g.L<sup>-1</sup>, au bout de 5 jours pour 6 g.L<sup>-1</sup>. L'espèce native *M. aquatica* ne mobilise pas cette enzyme face aux stress salins appliqués, l'activité de la GPOX reste stable dans le temps.

#### ▪ Glutathion réductase

L'ANOVA, réalisée sans distinction d'espèce, met en évidence un impact du facteur "espèce" très hautement significatif pour cette enzyme ( $P < 2,2 \times 10^{-16}$ ). La comparaison des moyennes montre que *L. grandiflora* et *L. peploides* ont des activités de GR statistiquement équivalentes, d'environ 1,36 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>. *M. aquatica* présente une activité de la GR de 0,90 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> en moyenne, significativement plus faibles que les deux autres espèces (figure 28).

Les facteurs "temps" et "stress" n'ont aucune influence significative sur l'activité de la GR pour *L. grandiflora* (figure 28a). Elle peut donc être considérée comme constante au cours du temps, quel que soit le niveau de stress. L'intensité des stress n'a pas d'influence significative non



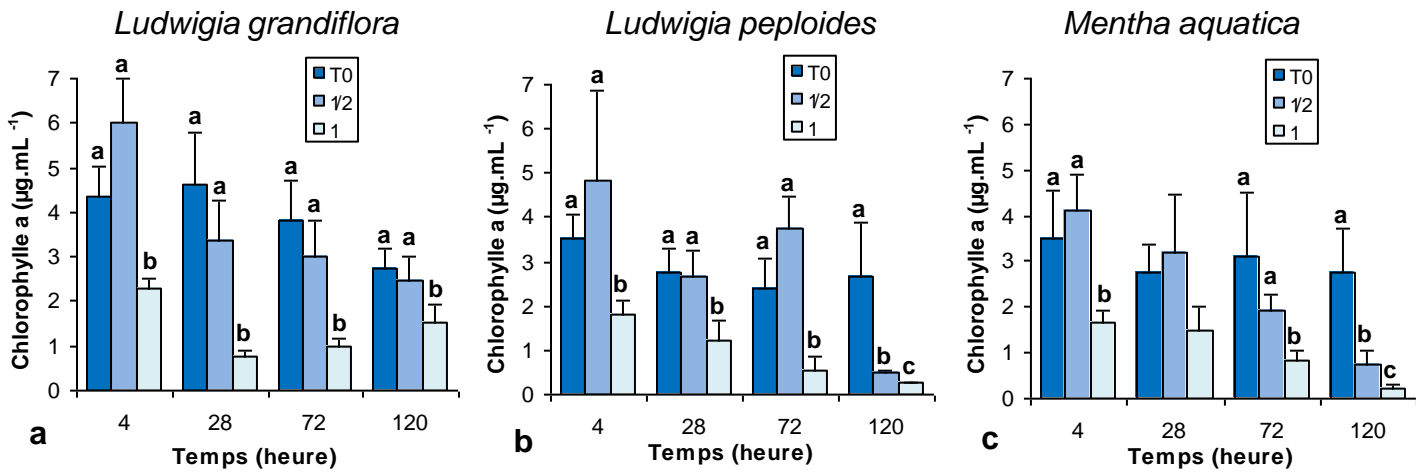


plus sur l'activité de la GR chez *L. peploides*. L'effet du facteur "temps", lui, est significatif ( $P = 4,01 \times 10^{-2}$ ). D'après le test de comparaison des moyennes, globalement il y a une augmentation significative de l'activité de la glutathion réductase entre 4h et 28h, elle passe de 18,6 à 30,41 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>. Ensuite cette activité se maintient jusqu'à 5 jours, avec une activité significativement équivalente à celle de 4h et 28h, de l'ordre de 25 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> (figure 28b). Concernant la menthe aquatique, l'effet de l'intensité du stress est hautement significatif ( $P = 1,57 \times 10^{-3}$ ). A 12g.L<sup>-1</sup>, l'activité de la GR est en moyenne de 14,3 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> et est significativement supérieure à celle des plantes soumises aux stress à 0 et 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, dont l'activité est environ de 8,5 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> (figure 28c). L'activité de l'enzyme à 6 g.L<sup>-1</sup> est de 11,2 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> et significativement équivalente à celle des trois autres intensités de stress. Ces résultats traduisent un comportement différent de *M. aquatica* à 12 g.L<sup>-1</sup> et correspond à une mobilisation plus importante de la GR que pour des stress moins intenses. L'effet du temps d'application du stress est hautement significatif ( $P = 9,73 \times 10^{-3}$ ), l'activité de la GR augmente entre 4h et 72h, passant de 6,8 à 13,2 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>. Cette augmentation moyenne est surtout influencée par les valeurs à 12 g.L<sup>-1</sup>. Cependant, les intervalles de confiance observés à cette concentration sont importants, ce résultat est donc à relativiser, puisque les autres conditions de stress semblent être stables jusqu'à 72h (figure 28c). Aux temps 28h et 120h, elle est en moyenne de 10,4 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, et significativement similaire à celle à 4h et 72h. La comparaison des intervalles de confiance pour le temps 120h montre que l'activité de la GR est significativement plus importante à 6 g.L<sup>-1</sup>, 3,8 fois plus importante que celle du témoin.

La glutathion réductase n'est pas mobilisée par *L. grandiflora* et *L. peploides* en réponse au stress salin, quel qu'il soit. *M. aquatica* présente une activité de la GR plus importante lorsque les plantes ont été soumises à 12g.L<sup>-1</sup> de NaCl, et cette activité augmente au cours du temps. Pour cette espèce, l'enzyme est donc mobilisée lorsque le stress est intense.

## 2.2. Réponses face au stress hydrique

Lors des mesures des chlorophylles et des caroténoïdes, certaines valeurs obtenues suite à l'application des stress hydriques se sont révélées surprenantes. Après réflexion, il est apparu que les plantes ayant subies les stress d'exondaison (T1/2 et T1) présentaient des feuilles plus sèches, voire desséchées. De ce fait, le ratio matière sèche/matière fraîche (MS/MF) était plus important pour ces échantillons que pour les témoins T0. L'ensemble des mesures étant basé sur un poids frais de 100 mg, les échantillons contenant moins d'eau étaient donc plus concentrés en constituants végétaux. Cela n'a pas posé de problème concernant la capacité antioxydante et les analyses enzymatiques, puisque les valeurs obtenues ont été rapportées à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. En revanche, les concentrations en pigments et en protéines sont proportionnelles à la quantité de MS présente dans les 100 mg de MF. Le ratio MS/MF étant plus important pour les échantillons T1/2 et T1, ces concentrations étaient surestimées. Afin de corriger ces valeurs pour qu'elles puissent être exploitées, 100 mg de poids frais des échantillons de la 2<sup>e</sup> répétition biologique du stress hydrique ont été pesés, puis lyophilisés. Le poids sec des échantillons T0 représentait 4 à 7% du poids frais, quand celui des échantillons T1 pouvait aller de 20 à 56%. Le calcul du pourcentage de variation du poids sec des échantillons T1/2 et T1 par rapport à celui du témoin T0 a été réalisé, et ce pour chaque intensité de stress. Cela a permis d'estimer le différentiel entre les échantillons exondés et les échantillons témoins. Ce taux a servi de facteur de correction et a été appliqué aux densités optiques mesurées à partir des poids sec, pour les chlorophylles a et b et les caroténoïdes de la répétition 2. Les facteurs de correction ont été extrapolés pour corriger les résultats de Chl a des répétitions 1 et 3, ainsi qu'à l'ensemble des valeurs de protéines.



**Figure 29** - Concentrations en chlorophylle a selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ). La présence de lettres différentes, obtenues par comparaison des intervalles de confiance, indique une différence significative entre les intensités de stress, pour la même temps. Lorsqu'il n'y a pas de lettre pour un temps, les différentes intensité de stress sont considérées comme égales.

### 2.2.1. Réponses globales

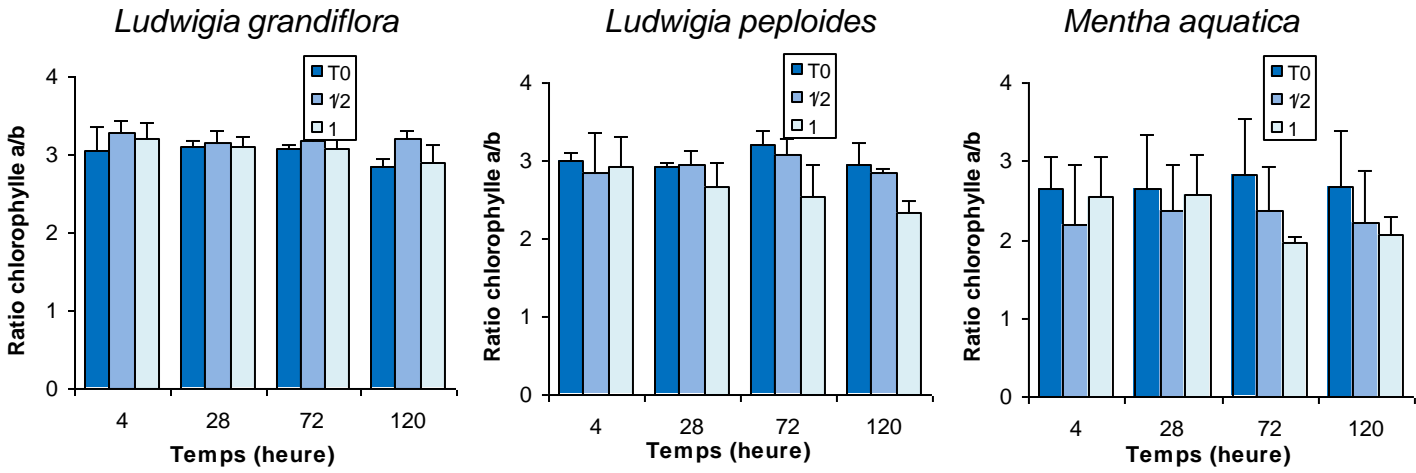
#### ▪ Chlorophylle a

L'ANOVA toutes espèces confondues réalisée sur la variable chlorophylle a avec les facteurs "esp", "tps", "rep" et "stress", montre un effet du facteur "espèce" très hautement significatif ( $P = 1,77 \times 10^{-6}$ ). Le test de comparaison de moyenne nous indique que *L. grandiflora* a des moyennes de Chl a de  $2,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , significativement supérieures à celles de *L. peploides* et *M. aquatica* qui sont de l'ordre de  $2,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figure 29).

L'ANOVA espèce par espèce nous indique que l'effet du stress est très hautement significatif ( $P = 3,86 \times 10^{-8}$ ) pour *L. grandiflora*. En effet, le test de comparaison de moyennes indique que le traitement T1 induit des taux moyens de Chl a de  $1,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , significativement inférieurs à ceux des traitements T0 et T1/2, de l'ordre de  $3,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cette différence entre les intensités de stress est confirmée par l'analyse des intervalles de confiance (figure 29a). Quel que soit le temps, il y a entre 2 à 6 fois moins de Chl a suite à l'exondaison T1 par rapport au témoin. Afin d'obtenir des informations plus précises, des ANOVA ont été réalisées sur les données pour chaque intensité de stress. Ainsi pour le traitement T1, l'effet du temps de cinétique est très significatif ( $P = 2,06 \times 10^{-4}$ ) et la comparaison des moyennes met en avant une diminution significative des concentrations en Chl a entre 4h et 28h, de  $2,28$  à  $0,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ensuite, les concentrations se maintiennent, et remontent à  $1,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au bout de 5 jours, soit un niveau inférieur mais significativement équivalent au témoin. Pour le traitement T1/2, il y a un pic hautement significatif ( $P = 1,61 \times 10^{-3}$ ) à 4h, jusqu'à  $5,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , puis une diminution significative et un maintien des concentrations à une moyenne de  $2,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Il n'y a pas d'effet significatif du facteur "temps" sur le témoin ( $P = 0,056$ ). Malgré des variations allant de  $2,72$  à  $4,64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ces concentrations sont donc considérées comme stables dans le temps. Pour *L. grandiflora*, un stress d'exondaison totale entraîne une baisse significative de la quantité de Chl a dès 4h, puis la production de Chl a augmente, pour revenir à une valeur équivalente à celle observée chez les plantes témoins. Lors d'un stress moins intense (T1/2), *L. grandiflora* présente des taux de Chl a supérieurs à 4h, puis cette valeur décroît, mais se maintient à un taux supérieur à celui observé suite au stress T1.

Pour *L. peploides*, l'ANOVA réalisée révèle un effet du facteur "stress" très hautement significatif ( $P = 6,12 \times 10^{-6}$ ). La comparaison des moyennes montre que les taux de chlorophylle a du traitement T1/2 sont en moyenne équivalents à ceux du témoin T0, de l'ordre de  $2,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . En revanche, les concentrations en Chl a sont plus faibles pour le traitement T1 par rapport aux deux autres ( $0,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$  en moyenne), ce qui est confirmé par les intervalles de confiance (figure 29b). Quel que soit le temps de cinétique, il y a entre 2 à 10 fois moins de Chl a suite à l'exondaison T1 par rapport au témoin. L'effet de la cinétique est également très hautement significatif d'après l'ANOVA ( $P = 7,09 \times 10^{-5}$ ). Dans le but d'affiner les résultats, des ANOVA temps de stress par temps de stress ont été effectuées pour *L. peploides*. Aucun effet de la cinétique n'a été mis en évidence pour le témoin, dont l'évolution de la concentration en Chl a est donc considérée comme stable, malgré des variations entre  $2,3$  et  $3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . En revanche, l'effet du temps de cinétique est hautement significatif pour le traitement T1/2 ( $P = 3,84 \times 10^{-3}$ ), et très hautement significatif pour le traitement T1 ( $P = 6,76 \times 10^{-4}$ ). D'après la comparaison des moyennes, pour le traitement T1/2, la concentration en Chl a se maintient de 4h à 72h entre  $2,66$  et  $4,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , puis diminue significativement jusqu'à  $0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au bout de 5 jours. La diminution de Chl a au cours du temps est progressive et significative pour T1, passant de  $1,79$  à  $0,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$  en moyenne. Pour *L. peploides*, la concentration en Chl a se maintient entre 4h et 72h lors de l'exondaison partielle T1/2, puis chute jusqu'à un niveau supérieur à celui mesuré pour T1. Pour l'exondaison totale T1, la baisse des concentrations est progressive.

L'ANOVA par espèce met en évidence un effet très hautement significatif du facteur "stress" ( $P = 3,42 \times 10^{-8}$ ) chez *M. aquatica*. Ainsi, le test de Tukey montre que les concentrations en chlorophylle a sont différentes entre les trois intensités de stress (figure 29c). Elles sont les plus faibles à T1 pour la menthe aquatique, avec une valeur moyenne de  $1,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ce que l'analyse



**Figure 30** – Ratios chlorophylle a/chlorophylle b selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).

des intervalles de confiance met également en évidence pour la plupart des temps de cinétique (figure 29c). Suite à l'exondaison extrême, il y a toujours 2 à 10 fois moins de Chl a par rapport aux individus témoins. Au traitement T1/2, les concentrations sont statistiquement inférieures à celles du témoin, avec  $2,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contre  $3,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , mais supérieures à celles de T1. Il y a également un effet de la cinétique très hautement significatif ( $P = 9,75 \times 10^{-7}$ ). Les ANOVA réalisées par intensité, ainsi que la comparaison des moyennes indiquent une diminution progressive de  $1,66$  à  $0,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , très hautement significative pour T1 ( $P = 7,71 \times 10^{-4}$ ). Cette décroissance est hautement significative pour le traitement T1/2 ( $P = 1,53 \times 10^{-3}$ ), avec une baisse de la Chl a de  $4,1$  à  $0,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Chl a. Pour le traitement T0, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour le témoin ( $P = 0,73$ ), les concentrations en Chl a oscillent donc dans le temps entre  $3,5$  et  $2,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

*L. grandiflora* est l'espèce qui contient le plus de chlorophylle a. La concentration de ce pigment est fortement impactée par l'intensité du stress appliqué, quelle que soit l'espèce étudiée. L'exondaison totale (T1) entraîne une baisse significative des taux de Chl a par rapport à ceux du témoin et à ceux observés lors de l'exondaison partielle, pour les trois espèces. Cette concentration en Chl a diminue progressivement au cours du temps pour le traitement T1, de façon plus marquée pour *L. peploides* et *M. aquatica* que pour *L. grandiflora*. Pour le traitement T1/2, les trois espèces présentent des profils différents de l'évolution dans le temps de la concentration en Chl a. Globalement, il y a une diminution de la concentration en Chl a après 5 jours d'exondaison partielle. Cependant, le taux de Chl a augmente chez *L. grandiflora* lors des premiers temps de cinétique, alors qu'il se maintient jusqu'à 72h chez *L. peploides*.

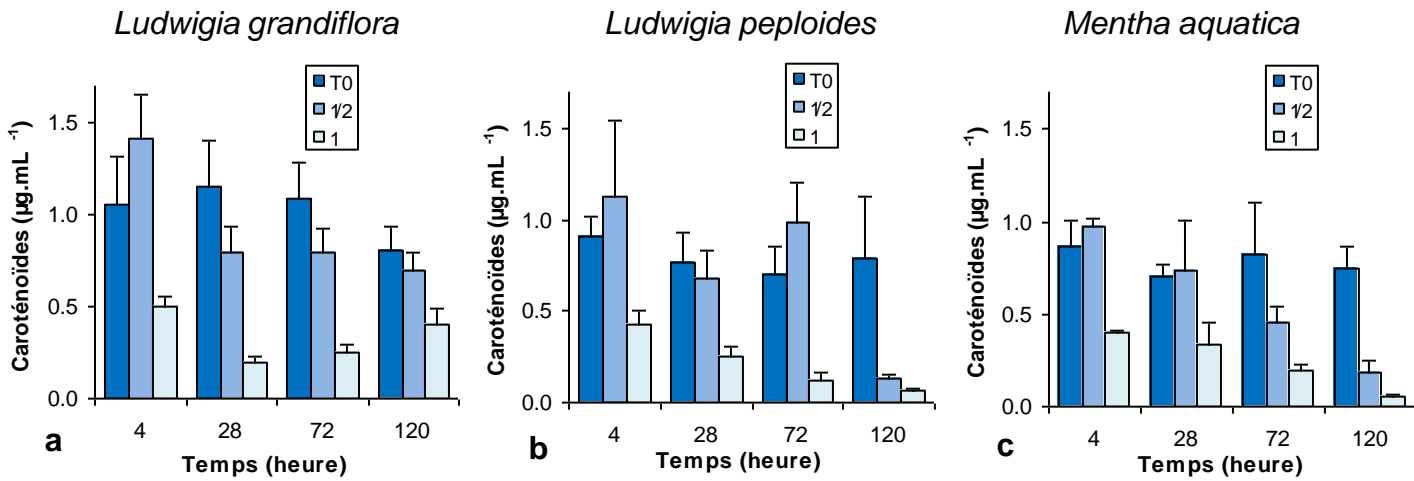
#### ▪ Chlorophylle b

Les profils de chlorophylle b présentent la même tendance que celui de la chlorophylle a, ils sont présentés en annexe 4. D'après l'ANOVA globale, les effets "espèce" et "temps" sont également très hautement significatifs concernant la Chl b ( $P$  respectives  $= 6,36 \times 10^{-4}$ ;  $< 2,2 \times 10^{-16}$ ). Pour ces deux variables, *L. peploides* se distingue des deux autres espèces par des taux de Chl b significativement inférieurs, de l'ordre de  $0,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contre respectivement  $0,96$  et  $0,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour *L. grandiflora* et *M. aquatica*. Pour les trois espèces, la diminution de la Chl b au cours du temps est significative. Cette baisse est plutôt progressive entre 4h et 120h pour *L. peploides* et *M. aquatica*, alors que la diminution est nette à 28h, puis le taux de Chl a est ensuite maintenu pour *L. grandiflora*. Les ANOVA par espèce mettent en évidence un effet "stress" très hautement significatif ( $P > 0,001$ ) pour les trois espèces. Ainsi, quelle que soit l'espèce, le traitement T1 entraîne des concentrations en Chl b plus faibles que pour les deux autres conditions hydriques.

*L. peploides* est l'espèce qui contient le moins de Chl b. Les concentrations en Chl b des trois espèces ne sont pas influencées par les différentes intensités de stress, elles sont plus faibles suite à une exondaison totale. La diminution constatée au cours du temps n'est pas différente du témoin émergé, elle est donc liée à la physiologie des espèces.

#### ▪ Ratio chlorophylle a/b

L'ANOVA réalisée sur les ratios de chlorophylle a/b met en évidence un impact du facteur "espèce" très hautement significatif ( $P = 4,17 \times 10^{-4}$ ). La comparaison des moyennes montre que toutes les espèces sont différentes les unes des autres. Ainsi en moyenne, le ratio de Chl a/b est de  $3,09$  pour *L. grandiflora*, de  $2,85$  pour *L. peploides* et de  $2,42$  pour *M. aquatica* (figure 30). L'effet de l'intensité de stress est lui aussi très hautement significatif ( $P = 2,44 \times 10^{-10}$ ), les ratios à T0 et T1 sont significativement différents, respectivement de  $2,91$  et  $2,66$ . La moyenne des ratios à T1/2 est de  $2,80$ , significativement équivalente aux deux autres intensités de stress. L'effet du facteur "temps de cinétique" est quant à lui significatif ( $P = 0,016$ ), mais la comparaison des moyennes ne permet pas de faire de distinction, avec des ratios compris entre  $2,85$  et  $2,67$ .



**Figure 31** - Concentrations en caroténoïdes selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).

*M. aquatica* est l'espèce qui a le ratio Chl a/b le plus faible, elle contient moins de Chl a que les deux autres espèces. Le ratio des trois espèces est plus faible que pour le témoin suite à l'application du traitement T1. En réponse au stress le plus intense, la Chl a diminue de façon plus prononcée quelle que soit l'espèce.

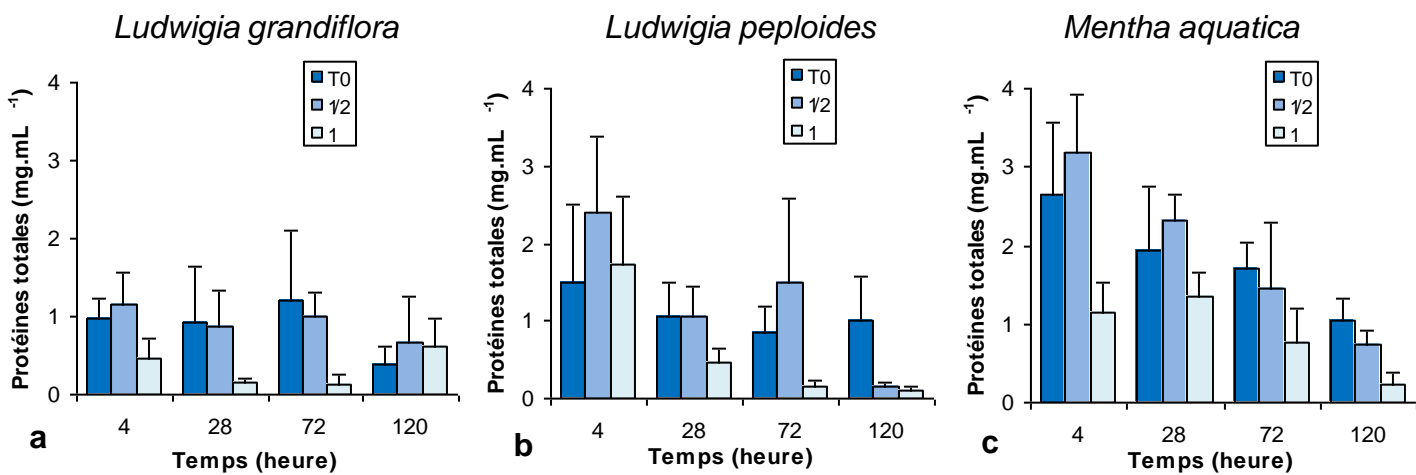
#### ▪ Caroténoïdes

L'ANOVA globale montre que l'incidence de l'espèce est très hautement significative ( $P = 9,3 \times 10^{-8}$ ) sur les concentrations en caroténoïdes. Ces dernières sont en moyenne de  $0,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au sein de *L. grandiflora*, significativement plus élevées que pour celles de *L. peplodes* ( $0,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et *M. aquatica* ( $0,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (figure 31).

L'ANOVA espèce par espèce met en avant que l'intensité du stress a un effet très hautement significatif ( $P = 5,23 \times 10^{-9}$ ) sur les concentrations en caroténoïdes de *L. grandiflora*. Le traitement T1 entraîne des concentrations en caroténoïdes d'environ  $0,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , significativement plus faibles que celles observées suite aux traitements T0 et T1/2 (moyenne =  $0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (figure 31a). De même, l'effet du temps est très hautement significatif ( $P = 8,58 \times 10^{-5}$ ). Les ANOVA intensité par intensité ont permis d'obtenir de plus amples informations concernant l'évolution dans le temps. Ainsi les concentrations en caroténoïdes du témoin T0 restent stables dans le temps, autour de  $1,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Celles liées au traitement T1/2 diminuent significativement de  $1,4$  à  $0,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$  entre 4h et 28h, puis se maintiennent entre  $0,70$  et  $0,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$  jusqu'à 120h (figure 31a). Quant au traitement T1, il provoque une diminution significative des caroténoïdes entre 4h et 28h de  $0,50$  à  $0,19 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , un maintien entre 28 et 72h, et enfin une augmentation significative jusqu'à l'état initial au bout de 5 jours. Chez *L. grandiflora*, la production de caroténoïdes est modulée en fonction de l'intensité du stress hydrique. Lors d'un stress T1/2, la concentration en caroténoïdes diminue jusqu'à 28h, puis se stabilise. Dans le cadre d'un stress intense T1, le même comportement qu'à T1/2 est remarqué, mais avec une diminution plus importante au bout de 28h, et une augmentation à 5 jours.

Pour *L. peplodes*, l'effet de l'intensité du stress sur les caroténoïdes est très hautement significatif ( $P = 5,59 \times 10^{-7}$ ). En moyenne le traitement T1 engendre des concentrations en caroténoïdes de  $0,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$  en moyenne, significativement inférieures à celles de T0 et T1/2 (environ  $0,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (figure 31b). Le temps a un impact très hautement significatif ( $P = 8,97 \times 10^{-5}$ ). Les ANOVA intensité par intensité ont montré que cet effet "temps" n'est pas significatif pour les concentrations en caroténoïdes au traitement T0. Pour le témoin, la quantité de caroténoïdes est donc stable dans le temps. En revanche suite aux traitements T1/2 et T1, la concentration en caroténoïdes diminue progressivement au cours du temps très significativement pour T1/2 ( $P = 2,82 \times 10^{-2}$ ), et de manière très hautement significative pour T1 ( $P = 7,44 \times 10^{-5}$ ). Ainsi lors de l'exondaison partielle (T1/2), la concentration en caroténoïdes stagne entre  $0,68$  et  $1,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  jusqu'à 72h, puis elle chute significativement jusqu'à  $0,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$  après 120h. Suite au traitement T1, les taux de caroténoïdes chutent significativement de  $0,43$  à  $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  entre 4h et 5 jours. Ainsi, en fonction de l'intensité du stress, la quantité de caroténoïdes diminue chez *L. peplodes* avec cependant un maintien de ce taux jusqu'à 72h pour le stress hydrique le moins intense (T1/2).

L'influence de l'intensité du stress sur la concentration en caroténoïdes de *M. aquatica* est très hautement significative ( $P = 1,25 \times 10^{-8}$ ). D'après le test de Tukey, les trois traitements engendrent des concentrations en caroténoïdes significativement différentes. Elles sont plus faibles en moyenne suite au traitement T1/2 qu'après le traitement T0, avec des valeurs de  $0,58$  et  $0,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement. Le traitement T1 conduit à des taux de caroténoïdes de l'ordre de  $0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , significativement inférieurs à ceux obtenus pour les deux autres traitements (figure 31c). L'effet du temps s'avère très hautement significatif ( $P = 2,48 \times 10^{-6}$ ). Globalement, l'immersion totale T0 n'entraîne pas de variations des concentrations en caroténoïdes. En revanche, les émerisions partielles et totales provoquent une diminution progressive de ces concentrations au cours du temps. Pour le traitement T1, les concentrations stagnent entre 4h et 28h à environ  $0,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , puis chutent progressivement et significativement jusqu'à  $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au bout de 120h. Suite à



**Figure 32** - Concentrations en protéines totales selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).



l'exondaison partielle T1/2, la quantité de caroténoïdes diminue progressivement, de manière significative, passant de  $0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à 4h à  $0,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au bout de 5 jours d'exondaison.

La concentration en caroténoïdes est la plus élevée chez *L. grandiflora*, et la moins élevée chez *M. aquatica*. Pour les trois espèces, l'exondaison totale T1 entraîne des taux en caroténoïdes plus faibles par rapport au témoin. Pour le témoin T0, les concentrations en caroténoïdes sont stables dans le temps pour les trois espèces. Ces concentrations diminuent plus ou moins rapidement suite aux traitements T1/2 et T1 pour *L. peploides* et *M. aquatica*. Pour *L. peploides*, à T1/2, la concentration se maintient jusqu'à 72h après le début du traitement. Les concentrations en caroténoïdes sont moins affectées pour *L. grandiflora* après les exondaisons T1/2 et T1. Malgré une chute, les concentrations se stabilisent (T1/2) ou remontent au bout de 5 jours (T1).

### ▪ Protéines totales

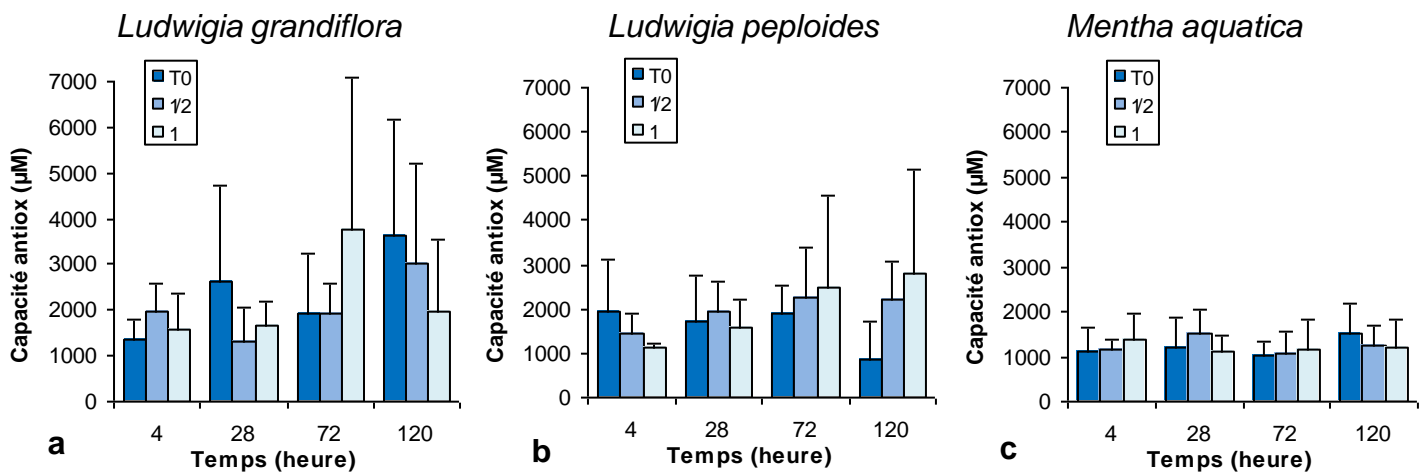
L'ANOVA globale montre que l'effet "espèce" est très hautement significatif ( $P = 2,42 \times 10^{-9}$ ) pour la variable "protéines totales". D'après le test de comparaison des moyennes, les concentrations en protéines sont en moyenne plus élevées chez *M. aquatica* ( $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) que chez *L. grandiflora* et *L. peploides* (respectivement  $0,71$  et  $0,99 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Suite aux ANOVA espèce par espèce, il a été mis en évidence que la concentration en protéines totales chez *L. grandiflora* est impactée de manière hautement significative ( $P = 3,14 \times 10^{-3}$ ) par l'intensité du stress appliqué. Ainsi d'après le test de comparaison des moyennes, la concentration en protéines totales pour le traitement T1 est en moyenne de  $0,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ , significativement plus faible que celle des traitements T0 et T1/2 (moyenne =  $0,90 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (figure 32a). Le temps n'a aucun effet significatif sur les concentrations protéiques de cette espèce ( $P = 0,32$ ). La concentration en protéines est donc stable dans le temps, quelle que soit l'intensité du stress.

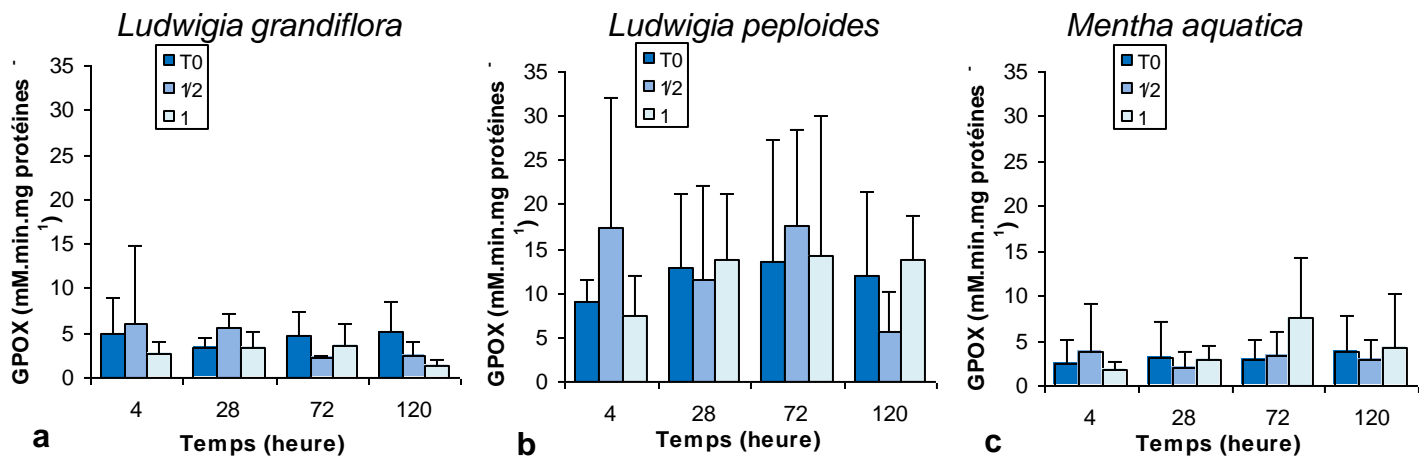
L'effet de l'intensité des stress appliqués à *L. peploides* est significatif ( $P = 1,38 \times 10^{-2}$ ), les trois traitements entraînent des concentrations en protéines totales différentes. L'application du traitement T1/2 mène à des concentrations significativement plus élevées ( $1,27 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) que pour le traitement T1, où les concentrations sont de l'ordre de  $0,61 \text{ mg.mL}^{-1}$  (figure 32b). Les concentrations en protéines au traitement T0 ne sont pas significativement différentes de celles des deux autres traitements, avec des valeurs moyennes de  $1,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Les concentrations en protéines ne sont donc pas différentes du témoin suite à l'exondaison, mais elles varient entre les traitements T1/2 et T1. Les ANOVA réalisées par intensité de stress révèlent que l'impact du temps est très hautement significatif ( $P = 2,27 \times 10^{-4}$ ). La comparaison des moyennes montre une diminution progressive significative des concentrations en protéines au cours du temps suite aux traitements T1/2 ( $3,17$  à  $0,73 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ainsi qu'aux traitements T1 (de  $1,37$  à  $0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). En revanche, le traitement T0 n'entraîne pas de modifications significatives des valeurs au cours du temps ( $P = 0,053$ ). Malgré des variations entre  $1,05$  et  $2,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , les concentrations en protéines sont considérées comme stables au cours du temps pour le témoin.

En ce qui concerne la menthe aquatique, l'ANOVA montre que l'intensité du stress a un effet très hautement significatif ( $P = 9,43 \times 10^{-6}$ ) sur les concentrations en protéines. En effet, l'émersion totale T1 conduit à des concentrations en protéines significativement plus faibles en moyenne ( $0,87 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) par rapport aux traitements T0 et T1/2 (respectivement  $1,83$  et  $1,92 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (figure 32c). L'effet du facteur « temps » est lui aussi très hautement significatif ( $P = 1,64 \times 10^{-6}$ ), puisque la quantité de protéines diminue progressivement au cours du temps, quel que soit le traitement appliqué, passant en moyenne de  $2,32 \text{ mg.mL}^{-1}$  à 4h à  $0,67 \text{ mg.mL}^{-1}$  au bout de 120h de stress.

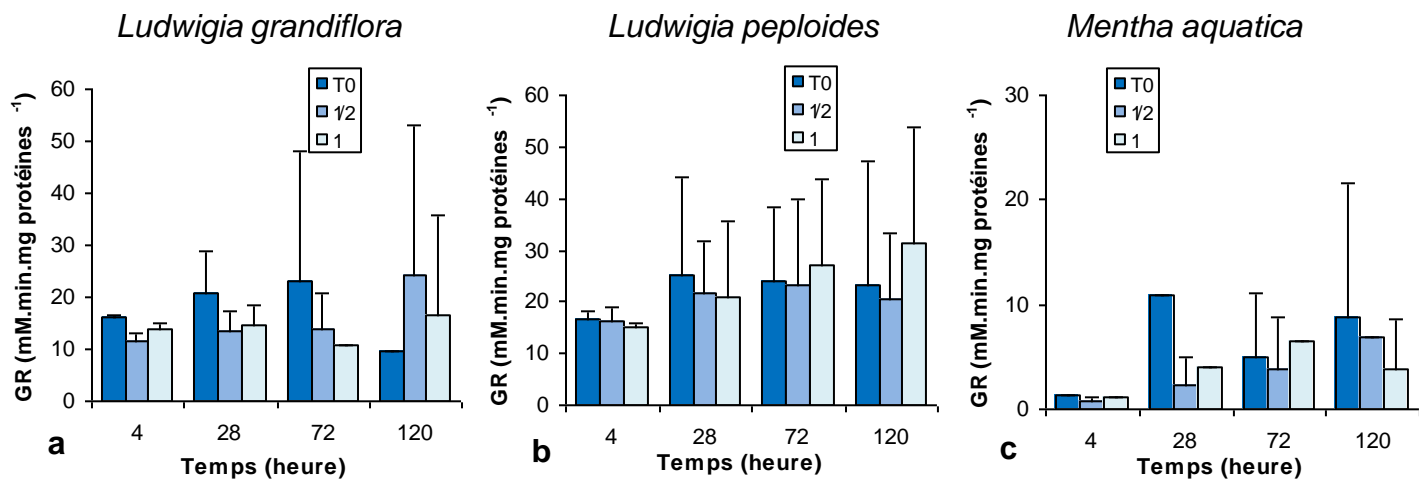
Dans l'ensemble, *M. aquatica* contient plus de protéines que les deux espèces invasives. Les concentrations en protéines des trois espèces sont influencées par les différents stress appliqués ; la concentration est plus faible suite à l'exondaison totale T1. Suite à ce traitement, le contenu en protéines reste stable pour *L. grandiflora*, et diminue au cours du temps pour *L. peploides* et *M. aquatica*.



**Figure 33** - Quantité d'antioxydants présents selon l'espèce, l'intensité du stress et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).



**Figure 34** - Activité de la guaiacol peroxydase selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).



**Figure 35** - Activité de la glutathion réductase selon l'espèce, l'intensité du stress hydrique et le temps d'application. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance ( $\alpha=0,05$ ).

## 2.2.2. Réponses spécifiques au stress oxydant

### ▪ Capacité anti-oxydante

L'ANOVA globale révèle que la capacité anti-oxydante n'est affectée ni par l'intensité des stress, ni par la durée de leur application, quelle que soit l'espèce ( $P > 0,05$ ). En revanche, l'effet "espèce" s'avère très hautement significatif ( $P = 5,48 \times 10^{-5}$ ). D'après le test de comparaison des moyennes, les concentrations en antioxydants sont en moyenne plus faibles pour *M. aquatica* (1229 nM) que pour *L. grandiflora* et *L. peploides* (respectivement 2486 et 1861 nM) (figure 33). Les ANOVA espèce par espèce n'ont montré aucune différence significative pour leur capacité anti-oxydante, quel que soit le facteur.

Ainsi, la capacité anti-oxydante est différente selon l'espèce considérée. La menthe aquatique possède moins d'anti-oxydants que *L. grandiflora* et *L. peploides*. En revanche pour chaque espèce, la capacité anti-oxydante n'est influencée ni par les différents traitements hydriques, ni par leur durée d'application.

### ▪ Guaiacol peroxydase

D'après l'ANOVA globale, l'activité de la GPOX des trois espèces n'est impactée ni par l'intensité des stress appliqués, ni par leur durée. Par contre, l'effet de l'espèce est très hautement significatif ( $P = 1,41 \times 10^{-15}$ ). L'activité de la GPOX est en moyenne plus élevée chez *L. peploides*, avec 1,24 M.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, que chez *L. grandiflora* et *M. aquatica* (en moyenne 0,35 M.min.mg de protéines<sup>-1</sup>) (figure 34). Les ANOVA espèce par espèce n'ont montré aucune différence significative de l'activité de la GPOX, quel que soit le facteur.

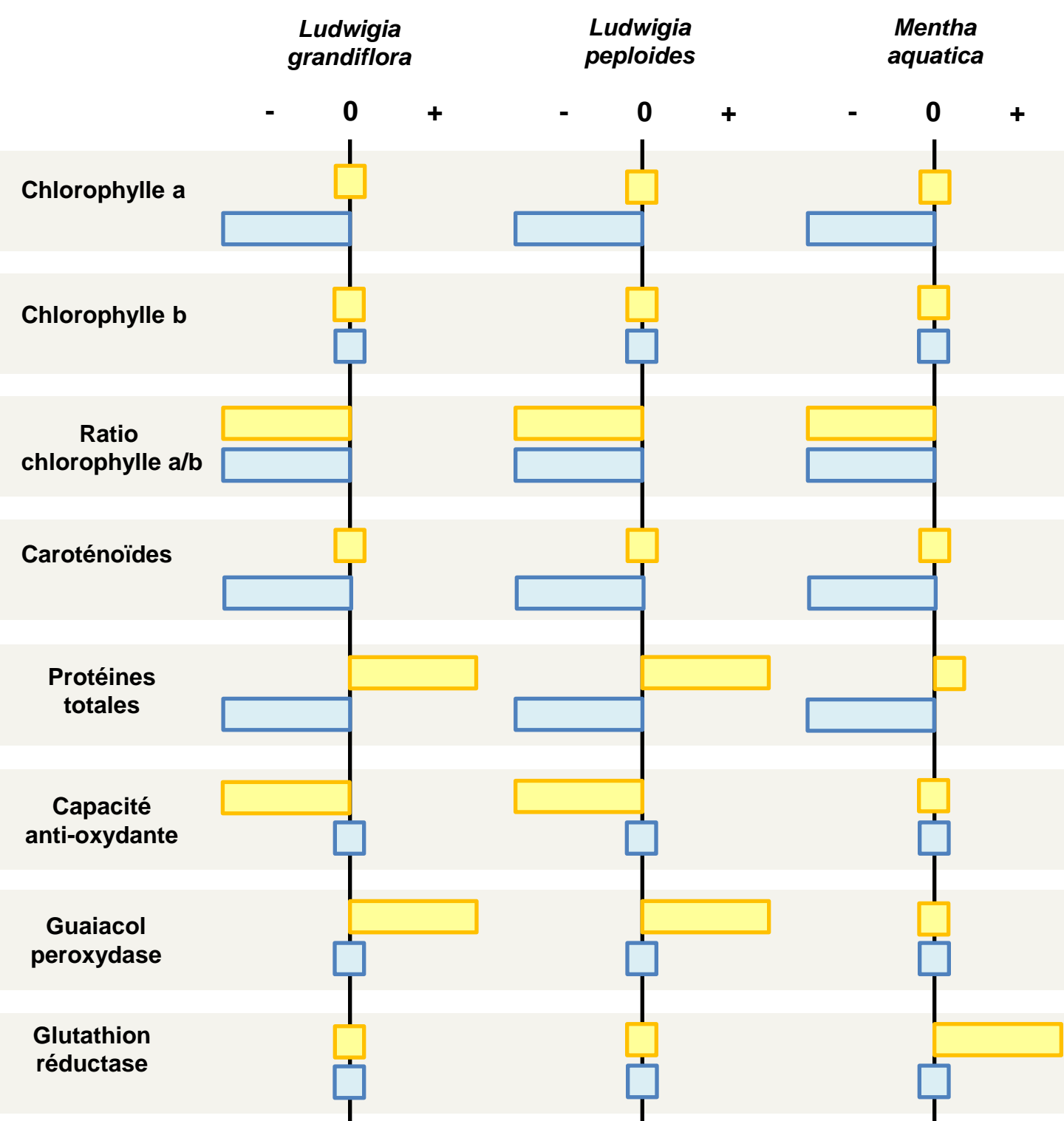
Les différents stress hydriques appliqués n'ont pas d'influence sur l'activité de la GPOX, quelle que soit l'espèce considérée. L'activité de cette enzyme est plus élevée chez *L. peploides*.

### ▪ Glutathion réductase

L'ANOVA globale révèle que le facteur "espèce" influence l'activité de la GR de manière très hautement significative ( $P = 1,84 \times 10^{-15}$ ). En moyenne, l'activité de la GR des trois espèces est significativement différente. *L. peploides* présente l'activité enzymatique la plus importante (22,12 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>), tandis que *M. aquatica* a celle la plus faible avec 4,29 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> en moyenne (figure 35). Au sein de *L. grandiflora* la GR a une activité intermédiaire de 16,24 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, significativement différente des deux autres.

L'activité de la GR mesurée dans *L. grandiflora* n'est influencée ni par l'effet de l'intensité des stress, ni par la durée de ces stress. Cette activité se maintient donc dans le temps à environ 16,24 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, et n'est pas différente de celle du témoin lorsque les individus sont soumis aux stress T1/2 et T1. Aucun effet de l'intensité du stress n'est à signaler vis-à-vis de l'activité de la GR chez *L. peploides*. L'activité de la GR est stable lorsque les plantes sont soumises à un stress hydrique quelle que soit l'intensité du stress. L'effet du temps se révèle très hautement significatif ( $P = 3,02 \times 10^{-4}$ ). En moyenne, il y a une augmentation de l'activité entre 4h et 28h de 16,02 à 22,6 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup>, puis un maintien de cette activité à environ 24 mM.min.mg de protéines<sup>-1</sup> jusqu'à 120h (figure 35b). Cet effet de maintien des moyennes entre 28h et 5 jours est certainement influencé par les traitements T0 et T1/2, qui suivent ce profil. En revanche pour T1, l'histogramme montre une tendance à l'augmentation de l'activité de la GR dans le temps, qui ne se vérifie pas statistiquement. Il n'a pas été possible d'effectuer d'ANOVA par espèce sur les données de GR de *M. aquatica*, les données manquantes étant trop nombreuses.

*L. peploides* est l'espèce dont l'activité de la glutathion réductase est la plus élevée, et *M. aquatica* celle pour qui elle est la plus faible. L'exondaison n'entraîne pas de modification de l'activité de cette enzyme pour *L. peploides* et *L. grandiflora*. Pour *M. aquatica*, les données disponibles ne permettent pas d'obtenir des informations plus précises.



**Figure 36** – Bilan des résultats pour les différentes variables biologiques étudiées. La ligne verticale noire représente les valeurs des témoins, et les barres horizontales jaunes (stress salin) et bleues (stress hydrique) représentent les variations des réponses extrêmes obtenues pour les trois espèces étudiées.

■ Stress salin  
■ Stress hydrique

## IV - Discussion

---

Les résultats présentés précédemment ont été résumés sur la figure 36.

### 1. Réflexion sur le dispositif expérimental et les méthodes utilisées

Malgré des mises au point concluantes pour les dosages de la peroxydation des lipides (test TBARS) et de la glutathion S-transférase (GST), les résultats obtenus se sont avérés incohérents et pas assez reproductibles pour être exploités dans ce rapport. Concernant le test TBARS, il semble que la gamme MDA n'était pas très fiable, et non exploitable pour quantifier la peroxydation des lipides. Le choix du tampon phosphate comme solvant pour diluer cette gamme n'était peut être pas correct, il aurait fallu tester d'autres solvants, tel que l'éthanol, pour la rendre plus stable. L'activité de la GST s'est révélée décroissante dans le temps lors des dosages des échantillons, alors qu'elle augmentait lors des mises au point. Or, pour l'un des substrats de la réaction, l'ascorbate réduit (GSH), deux flacons appartenant à deux lots différents ont été utilisés entre les mises au point et les expérimentations.

Des différences significatives ont été observées entre certaines répétitions biologiques, notamment pour l'expérimentation en stress salin. Ces différences peuvent s'expliquer par l'âge physiologique des plantes, qui était de plus en plus important avec le temps, pouvant modifier l'intensité et la nature des réponses face aux stress.

Le choix de la durée d'application des stress hydriques et salins s'est portée sur 5 jours, avec une cinétique de prélèvement en quatre temps. Par ces choix, nous n'avons pas pu obtenir d'informations sur les réponses précoces (24-48h) des plantes. Or les réponses aux ROS sont décrites comme précoces dans la bibliographie (Laloi *et al.* 2004, Torres 2006, Gill & Tuteja 2010). Cependant, pour l'étude des réponses adaptatives, un pas de temps de 4 à 7 jours est usuel.

Lors de l'expérimentation en stress salin, un jaunissement de *L. peploides* a été noté, même pour les témoins à 0 g/L-1. Ceci est peut être révélateur de conditions de développement qui ne sont pas optimales pour cette espèce.

Considérant l'ensemble des variables biologiques étudiées, le stress T1/2 semble peu affecter les plantes, alors que le stress T1 a des conséquences importantes. Si l'exondaison totale peut paraître extrême pour des espèces aquatiques, elle est néanmoins réaliste étant donné que certaines populations de jussies commencent à envahir les prairies humides, et donc à s'adapter au milieu terrestre. Quant à la menthe aquatique, il s'agit d'une espèce plus ou moins exondée lors de la saison, qui s'adapte et survit sous sa forme terrestre.

L'interaction entre le stress hydrique et le stress salin n'a pas été étudiée, car les plantes risquaient de réagir fortement, et il aurait été difficile de distinguer les effets dus à chacun des stress. Cependant, en conditions naturelles, la diminution du niveau de l'eau pourrait entraîner une augmentation de la concentration en NaCl, notamment dans les zones à l'intersection entre eau douce et eau salée, tels que les estuaires, les marais côtiers ou les lagunes littorales. Cela pourrait justifier d'étudier l'effet combiné des stress hydriques et salins.

### 2. Réponses aux stress hydrique et salin

Les impacts des stress hydrique et salin sur les plantes sont comparables, puisque ces deux stress conduisent à une perte de turgescence de la cellule, et à un déséquilibre de la balance osmotique. Presque tous les aspects de la physiologie des plantes, ainsi que de leur métabolisme cellulaire, sont affectés par le sel et la sécheresse (Mahajan & Tuteja 2005). Cependant, soumise à un stress salin prolongé, la plante doit également répondre à des stress hyper ioniques, dus à la toxicité des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> en fortes concentrations, et à des stress hyper osmotiques, induits par la



difficulté à maintenir l'équilibre de la pression osmotique de la vacuole et du milieu extérieur (Zhu 2002). Suite à l'application de stress hydriques et salins dans le cadre de cette étude, il est donc possible de s'attendre à des résultats similaires pour les deux stress, mais plus accentués pour le stress salin.

## 2.1. Mobilisation des voies générales de réponse au stress

### 2.1.1. *Activité photosynthétique*

Les mesures de pigments sont destinées à évaluer l'activité photosynthétique, et ainsi indirectement de voir l'impact éventuel des stress sur le développement de la plante *via* l'augmentation de la biomasse. Pour MacFarlane et Burchett (2001), la diminution de la concentration en pigments photosynthétiques implique la réduction de l'activité photosynthétique. L'évolution de la concentration en pigments peut donc être extrapolée à celle de l'activité photosynthétique.

Le stress salin, quelle que soit la concentration en NaCl, n'influence pas la concentration en Chl a, Chl b, et caroténoïdes, quelle que soit l'espèce considérée. Ainsi, l'intensité du stress salin n'influence pas le contenu des plantes en pigments photosynthétiques, qui reste équivalent à celui des plantes témoins. Suite à l'application d'un stress hydrique, la concentration en Chl a, en Chl b et en caroténoïdes est fortement impactée par l'intensité du stress appliqué, et ce quelle que soit l'espèce. L'exondaison totale (T1) entraîne des taux de Chl a, de Chl b et de caroténoïdes plus faibles de l'ordre de 35% que pour ceux observés à T0 et T1/2, pour les trois espèces.

Les résultats obtenus révèlent que suite au stress salin, l'activité photosynthétique est maintenue chez *L. peploides*, *L. grandiflora* et *M. aquatica*, et ce quel que soit le niveau du stress appliqué. Pourtant, il est couramment constaté que face à l'application d'un stress salin l'activité photosynthétique diminue (Chen *et al.* 1999, Rout & Shaw 2001, Ali *et al.* 2008). Dans le cas de notre étude, il est donc possible de supposer que ni la synthèse de la chlorophylle, ni l'activité de la chlorophyllase ne sont affectées par la présence de NaCl. Ces résultats biochimiques ne vont pas dans le sens des observations phénotypiques, qui mettent en évidence un jaunissement, puis un brunissement des feuilles les plus vieilles. Les réponses morphologiques observées chez *L. peploides*, *L. grandiflora* et *M. aquatica* sont les mêmes que celles observées pour d'autres macrophytes aquatiques (Rout & Shaw 2001, Upadhyay & Panda 2005, Jampeetong & Brix 2009). Cependant, toutes ces études montrent en parallèle une diminution de la concentration en pigments chlorophylliens. Notre étude repose sur un dosage indirect de l'activité photosynthétique *via* une quantification des chlorophylles et des caroténoïdes. D'autres méthodes plus directes permettent de mesurer l'activité photosynthétique, telles que des mesures de fluorescence chlorophyllienne, de conductivité stomatale, de concentration intercellulaire en CO<sub>2</sub> et du taux de photosynthèse net, comme l'ont fait Ali *et al.* (2008) et Chen *et al.* (1999).

Face à un stress hydrique, la fermeture des stomates est un des premiers mécanismes mis en place par la plante pour prévenir les pertes en eau. Cette obstruction stomatique peut entraîner une diminution de la photosynthèse (Mahajan & Tuteja 2005), et une dégradation des chlorophylles. La fermeture des stomates limite la transpiration de la plante, et donc la perte en eau, mais elle limite aussi l'absorption du CO<sub>2</sub> (Efeoğlu *et al.* 2009). C'est pourquoi les dommages les plus importants engendrés par la limitation en eau sont associés au processus photosynthétique de la plante (Efeoğlu *et al.* 2009, Pinheiro & Chaves 2011). Ces résultats sont cohérents avec la diminution de la concentration en Chl a et en Chl b que nous avons observée suite aux exondaisons appliquées. Elle révèle donc une décroissance de l'activité photosynthétique, d'autant plus que la Chl a est un centre réactionnel des photosystèmes I et II. La diminution conjointe des concentrations en caroténoïdes et en chlorophylles a et b s'explique par leur forte interaction lors de l'interception de la lumière. Les caroténoïdes peuvent avoir une action anti-oxydante, mais ici la diminution de leur concentration





montre qu'ils ne sont pas impliqués dans la lutte contre le stress oxydatif provoquée par un stress hydrique.

Que ce soit suite à l'application d'un stress salin extrême, à  $12 \text{ g.L}^{-1}$ , ou suite à l'exondaison totale des plantes (T1), le ratio Chl a/b observé est plus faible que celui des témoins. Or, la diminution du ratio Chl a/b est considérée comme un symptôme du stress oxydant (Rout & Shaw 2001). Nos résultats semblent montrer que les stress hydrique et salin choisis pour cette étude engendrent bien une réponse secondaire oxydative. Par ailleurs, Rout & Shaw (2001) ont montré que la diminution du ratio Chl a/b peut être due à la génération de ROS, qui endommagent la chlorophylle a. Ainsi la diminution de la concentration en Chl a, constatée pour les trois espèces étudiées suite à l'exondaison partielle et totale, et suite à des stress salins extrêmes, révélerait que l'application de ces stress induit la production d'espèces réactives de l'oxygène chez *L. peploides*, *L. grandiflora* et *M. aquatica*. De plus, lors de l'application de stress salin sur des macrophytes aquatiques, Rout & Shaw (2001) ont observé une diminution des ratios Chl a/b pour *H. verticillata*, une espèce sensible à la salinité. Le ratio Chl a/b des trois espèces que nous avons étudiées étant impacté par la salinité, il est possible de considérer ces trois espèces comme sensibles à la concentration en NaCl. Ce résultat soutient des stratégies de gestion actuellement testées par l'équipe d'accueil, qui consistent à ouvrir à l'eau salée des marais proches de la mer envahis par les jussies (Jacques Haury comm. pers).

Les deux stress appliqués n'ont pas les mêmes impacts sur l'activité photosynthétique.

### **2.1.2. Activité protéique**

Le stress induit par différentes concentrations en sels n'influence pas la quantité de protéines produites pour *L. grandiflora* et *M. aquatica*. *L. peploides* présente des concentrations en protéines significativement plus importantes que celles mesurées chez le témoin lorsque les individus subissent un stress à  $3 \text{ g.L}^{-1}$ . Pour les concentrations en NaCl plus importantes, aucun impact sur les concentrations protéiques n'est à signaler. Le stress hydrique impacte le contenu en protéines totales, pour l'ensemble des espèces étudiées. Les concentrations en protéines sont plus faibles, notamment pour l'exondaison totale T1.

D'après Parida & Das (2005), un stress salin entraîne le plus souvent une diminution de la synthèse protéique. Cependant, une augmentation des concentrations en protéines peut être constatée pour une faible salinité, ce qui corrobore nos résultats. Cette augmentation du contenu en protéines par rapport au témoin indique peut-être une mobilisation importante d'enzymes anti-oxydantes.

Tout comme la diminution du taux de chlorophylle, la diminution de la concentration en protéines est un symptôme typique des stress oxydants (Egert & Tevini 2002). Cette baisse a été observée pour des plantes impactées par la sécheresse, tel que sur le sésame, par Fazeli *et al.* (2007). Or, les ROS provoquent l'inhibition de la synthèse protéique, ou causent la dénaturation des protéines (Gill & Tuteja 2010). La diminution du contenu protéique observée chez *L. peploides*, *L. grandiflora* et *M. aquatica* suggère, comme c'était le cas pour la baisse de la concentration en Chl a et b, que le stress hydrique induit la formation de ROS chez ces trois espèces. D'autre part, Cramer *et al.* (2011) avancent que la diminution de la synthèse protéique peut être due à un changement d'allocation de l'énergie de la plante, qui privilégierait les mécanismes de protection à la croissance.

## **2.2. Mobilisation des voies anti-oxydantes**

L'induction d'un stress oxydant secondaire suite à un stress abiotique engendre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS ont une fonction de signalisation au sein de la cellule, mais affectent également de nombreuses fonctions cellulaires. Afin de limiter ces impacts négatifs sur la cellule, des mécanismes de détoxification sont activés. Ainsi, suite à l'application de stress salins et hydriques, l'ensemble des anti-oxydants est susceptible d'être mobilisé, et plus



particulièrement les enzymes anti-oxydantes (Apel & Hirt 2004). Les caroténoïdes font également partie de ces anti-oxydants, mais les résultats présentés précédemment ont montré qu'ils ne sont pas mobilisés suite au stress salin, et qu'ils sont même dégradés et/ou moins synthétisés suite à un stress hydrique.

### 2.2.1. Capacité anti-oxydante

La capacité anti-oxydante représente l'efficacité des anti-oxydants présents dans l'échantillon à éliminer les radicaux libres oxygénés d'un échantillon. La génération de ROS au-delà de la capacité anti-oxydante d'un système biologique cause un stress oxydant.

La capacité anti-oxydante de *L. grandiflora* et de *L. peploides* est significativement plus faible dans des plantes stressées à 12 g.L<sup>-1</sup> de NaCl que celle mesurée pour des plantes non stressées. En revanche, aux stress à 3 et 6 g.L<sup>-1</sup>, cette capacité anti-oxydante reste équivalente à celle présentée par les plantes témoins. Par ailleurs, la capacité anti-oxydante de ces deux espèces n'est pas modifiée par les stress hydriques, même intenses. La capacité anti-oxydante de la menthe aquatique n'est affectée ni par les stress salins, ni par les stress hydriques.

Face à une salinité élevée, nous avons observé une diminution de la faculté des mécanismes de défense anti-oxydants chez les trois espèces. Lors d'un stress au froid, la chute de la capacité anti-oxydante des courgettes peut entraîner une augmentation des dommages cellulaires (Zheng *et al.* 2008). Cet exemple conforte nos résultats, puisque la baisse de capacité anti-oxydante à 12 g.L<sup>-1</sup> se traduit phénotypiquement par la nécrose partielle ou totale de *L. grandiflora* et *L. peploides* au bout de 5 jours de stress. Contrairement à leur réaction au stress salin, les trois espèces étudiées ont maintenu leur capacité anti-oxydante alors qu'elles étaient soumises à un stress hydrique, et ce quelle que soit l'intensité de ce stress. Il existe peu de données bibliographiques concernant l'évolution de la capacité anti-oxydante suite à des stress, le test ORAC étant plus souvent utilisé pour déterminer le potentiel anti-oxydant des fruits et légumes. Cette mesure reflète la capacité anti-oxydante globale, mais ne montre pas les spécificités de réponses des différents composés anti-oxydants, telles que les enzymes.

### 2.2.2. Réponse enzymatique

De nombreuses enzymes anti-oxydantes sont impliquées dans les réponses au stress oxydant, telles que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), et l'ascorbate peroxydase (APX) entre autres. L'activité des quatre enzymes évoquées précédemment est fréquemment mesurée lors de l'étude de la détoxification des ROS. Cependant, la mesure de l'activité de la SOD et de la GPX se fait notamment à l'aide de kits trop onéreux pour être en adéquation avec l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Concernant la CAT, le spectrophotomètre nécessaire à son dosage dysfonctionnait lorsque les mises au point des dosages ont été faites. Ainsi, notre choix s'est plutôt porté sur la GST, la GPOX et la GR, qui sont également des enzymes importantes du cycle ascorbate-glutathion, et dont l'activité est couramment mesurée.

#### ▪ Guaiacol peroxydase

La GPOX représente le dosage d'un groupe d'enzymes anti-oxydantes, les peroxydases, à l'aide d'un substrat non cellulaire, le guaiacol. Au sein de la cellule, les peroxydases éliminent l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en le transformant en H<sub>2</sub>O.

Lors du stress salin, l'activité de la GPOX augmente proportionnellement à l'intensité du stress pour les deux espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides*, en particulier à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup>. Les différents stress hydriques appliqués n'ont aucune influence sur l'activité de la GPOX, quelle que soit l'espèce considérée.



L'augmentation de l'activité de la peroxydase constatée telle que pour les stress salin à 6 et 12 g.L<sup>-1</sup> est une réponse enzymatique courante des plantes face à la salinité (Rout & Shaw 2001, Sudhakar *et al.* 2001, Cavalcanti *et al.* 2004). En effet, cela permet à la plante de se protéger contre les ROS. Pour Rout & Shaw (2001), l'augmentation de l'activité de la peroxydase est plus importante pour les espèces tolérantes au stress, et moins importante dans les espèces sensibles. Ces auteurs suggèrent que la mobilisation des peroxydases face à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est importante dans la tolérance aux sels. Ainsi, à travers leur capacité à mobiliser la GPOX, *L. grandiflora* et *L. peploides* seraient moins sensibles à la salinité que *M. aquatica*, sans pour autant être tolérantes. En effet, les modifications phénotypiques montrent qu'elles supportent mal ce type de stress. Par ailleurs, Lin & Kao (2002) ont montré qu'une forte activité de la GPOX est souvent associée à une réduction de la croissance des plantes, conséquence nécessaire pour que les mécanismes de protection soient mobilisés le plus efficacement possible, ce qui corrobore nos résultats. En plus de son pouvoir anti-oxydant, la GPOX a également un rôle dans la synthèse des composants de la paroi : elle catalyse la féruoxylation des hémicelluloses, et l'insolubilisation des glycoprotéines riches en hydroxyproline, permettant la rigidification de la paroi (Cavalcanti *et al.* 2004). Ce renforcement de la paroi pourrait avoir des conséquences positives sur la turgescence de la cellule lors d'un stress salin.

Il a été montré que l'application d'un stress hydrique sur le sésame et sur certains cultivars de maïs n'a pas d'influence sur l'activité de la GPOX (Li *et al.* 1998, Egert & Tevini 2002). Cela conforte les résultats obtenus au cours de notre étude, où la GPOX n'apparaît pas comme étant impliquée dans la détoxification des ROS suite à l'application d'un stress hydrique. Cependant, dans l'ensemble, les plantes soumises à un stress hydrique mobilisent la GPOX face au stress oxydatif engendré, comme cela a été établi chez le riz et sur certaines populations de *Populus przewalskii* (Srivalli *et al.* 2003, Lei *et al.* 2006). Il semblerait que les plantes macrophytes aquatiques que nous avons étudiées, elles, ne mobilisent pas la GPOX suite à un stress hydrique.

#### ▪ Glutathion réductase

La glutathion-réductase est une enzyme anti-oxydante qui n'interagit pas directement avec une espèce réactive de l'oxygène. Son activité permet de recycler le glutathion réduit (GSH), en utilisant le NADPH comme donneur d'électron, afin qu'il puisse être utilisé par une autre enzyme anti-oxydante, la glutathion S-transférase (GST).

L'activité de la GR observée lors de cette étude diffère en fonction du type de stress et de l'espèce. Ainsi, la GR n'est pas mobilisée par *L. grandiflora* et *L. peploides* suite à l'application d'un stress salin, quel qu'il soit. *A contrario*, *M. aquatica* présente une activité de la GR plus importante lorsque les plantes ont été soumises à un stress salin intense (12g.L<sup>-1</sup> de NaCl). Par contre, l'exondaison n'entraîne pas de modification de l'activité de cette enzyme, pour aucune de ces espèces.

La glutathion réductase est mobilisée par *M. aquatica* dans des situations de stress salin intense. L'augmentation de l'activité de la GR peut induire l'augmentation du glutathion, sous sa forme oxydée ou réduite, et ainsi permettre la régénération de l'ascorbate, participant à la tolérance aux ROS. Ali *et al.* (2008) confirment que l'accroissement de l'activité de la GR augmente la tolérance au stress oxydatif. Parida & Das (2005) ont quant à eux remarqué que l'activité de la GR est souvent induite seulement suite à de forts stress. Ainsi, par la mobilisation de la GR suite au stress à 12 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, *M. aquatica* se défend contre les ROS.

Les variétés de maïs testées par (Li *et al.* 1998) ne montrent pas de variation de l'activité de la GR suite à un stress hydrique, tout comme nous l'avons constaté pour *L. peploides*, *L. grandiflora* et *M. aquatica*. Cette enzyme est donc peu utilisée par les plantes étudiées pour lutter contre un déficit en eau.

**Tableau 4** - Bilan des différences significatives entre les valeurs des témoins des différentes espèces, pour les variables biologiques mesurées

LG : *Ludwigia grandiflora* ; LP : *Ludwigia peploides* ; MA : *Mentha aquatica*

Variables \ Espèce	LG	LP	MA
<b>Chlorophylle a</b>			
<b>Chlorophylle b</b>			
<b>Ratio chlorophylle a/ chlorophylle b</b>			
<b>Caroténoïdes</b>			
<b>Protéines</b>			
<b>Capacité anti-oxydante</b>			
<b>Guaiacol peroxydase</b>			
<b>Glutathion réductase</b>			

Valeurs les plus élevées  
 Valeurs intermédiaires  
 Valeurs les plus faibles

D'après les résultats obtenus, le stress salin entraîne des réponses plus nombreuses et plus marquées que le stress hydrique, ce qui est en accord avec les résultats attendus, au vu des stress ioniques et osmotiques engendré par les ions NaCl.

### 3. Différences entre espèces

#### 3.1. Distinction entre les espèces invasives et l'espèce native

##### 3.1.1. *Différences intrinsèques des trois espèces*

L'ensemble des variables biologiques étudiées ont montré des différences notables entre les espèces. Le tableau 4 résume les différences constatées pour les plantes témoins des trois espèces étudiées, indépendamment des stress appliqués. Excepté pour les concentrations en Chl b et en protéines, *M. aquatica* est l'espèce qui possède les plus faibles valeurs pour l'ensemble des variables biologiques. *L. grandiflora* se caractérise par les concentrations et les activités les plus élevées, sauf pour les protéines et la GPOX. Quant à *L. peploides*, ses concentrations et ses activités se rapprochent tantôt de celles de *L. grandiflora*, tantôt de celles de *M. aquatica* ou sont intermédiaire à celles des deux autres espèces. *L. peploides* a des valeurs significativement plus élevées que les deux autres espèces uniquement pour l'activité de la GPOX.

Ces différences montrent les trois espèces n'ont pas le même contenu de base pour les différentes variables biologiques mesurées. Cela peut expliquer pourquoi les stress salins et hydriques n'influencent pas les trois espèces de la même manière.

Les concentrations plus importantes en pigments chlorophylliens de *L. grandiflora* et *L. peploides* peuvent être la marque d'une activité photosynthétique plus importante que celle de *M. aquatica*, qui pourrait promouvoir leur succès invasif. C'est ce qu'ont constaté Mcalpine *et al.* (2008) avec l'espèce invasive *Berberis darwinii*. Cependant, l'extrapolation de cette conclusion à notre étude est à nuancer, puisque nous n'avons mesuré que la concentration en pigments, et non pas l'activité photosynthétique proprement dite.

##### 3.1.2. *Différences de réponse face aux stress*

L'hypothèse de départ de notre travail est que les plantes invasives présentent des réponses adaptatives et une plasticité phénotypique plus élevées que les natives, traduites par la mobilisation des voies de défense généralistes impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Le but de cette étude était de définir si les jussies mobilisent leur métabolisme, et plus particulièrement leur système anti-oxydant, plus efficacement que la menthe aquatique en réponse à des stress salins et hydriques. Il s'agissait également d'établir en fonction de l'espèce concernée et du stress appliqué, si ce sont les mêmes enzymes qui sont impliquées dans les réponses au stress.

Pour une grande partie de ces variations, les tendances constatées sont similaires à celles présentées pour les plantes témoins, et ne permettent pas de conclure à un effet significatif du stress étudié intra et inter-espèces. Cependant, certaines variables biologiques ont des concentrations ou des activités fluctuantes au cours du temps.

La concentration en protéines totales et la capacité anti-oxydante n'évoluent pas lorsque *M. aquatica* est soumise à un stress salin, et ce quelle que soit l'intensité du stress. Cependant, les valeurs de ces variables biologiques sont plus élevées lors d'un stress salin à 6 ou 12 g.L<sup>-1</sup>, pour au moins une des deux espèces invasives. De plus, les deux espèces invasives et l'espèce native ne mobilisent pas les mêmes enzymes anti-oxydantes face à un stress salin. L'activité de la GR augmente chez *M. aquatica* lors d'un stress intense, tandis que c'est l'activité de la GPOX qui est plus importante pour *L. grandiflora* et *L. peploides* à forte salinité.





Une étude comparable a été réalisée sur *Acacia longifolia* et *Ulex europaeus* par Morais et al. (2012a) montrant des réponses enzymatiques différentes face au NaCl. D'après ces auteurs, l'activité de la GR est plus importante pour l'espèce invasive *Acacia longifolia*, et l'activité de la GPOX diminue proportionnellement à la salinité pour les deux espèces considérées. Nos résultats ne vont pas dans ce sens puisque c'est pour l'espèce native *M. aquatica* que l'activité de la GR augmente le plus, alors que l'activité de la GPOX est plus importante au sein des espèces invasives. *M. aquatica*, *L. grandiflora* et *L. peploides* apparaissent toutes les trois capables de détoxifier les ROS, mais semblent mobiliser des enzymes anti-oxydantes différentes. Les réactions de détoxification des ROS sont réalisées soit directement par la GPOX, pour *L. grandiflora* et *L. peploides*, soit indirectement par la GR, qui renouvelle le pool de glutathion, pour *M. aquatica*. Ainsi, ce sont deux parties différentes du cycle ascorbate-glutathion qui sont mobilisées par les espèces invasives et natives considérées. Les espèces invasives et natives étudiées ne mobilisent pas les mêmes voies de défense enzymatique face au stress salin, mais les résultats obtenus ne permettent pas de déclarer l'une des stratégies plus efficace que l'autre. D'autre part, nos résultats montrent que les deux espèces invasives étudiées sont capables de moduler leur production de protéines et leur capacité anti-oxydante face au stress salin, en fonction de son intensité.

Les résultats obtenus face aux exondaisons partielles et totales des plantes, montrent que la concentration en pigments chlorophylliens et en protéines totales diminue dans le temps, quelle que soit l'espèce. Cependant, globalement, cette diminution est progressive pour *M. aquatica*. En revanche, les baisses remarquées chez *L. grandiflora* et *L. peploides* sont brutales, elles ont lieu sur un pas de temps de 24h, et interviennent après un maintien des concentrations en Chl a, en Chl b et en caroténoïdes plus ou moins long.

Lors d'un stress hydrique, la diminution progressive des concentrations en pigments chlorophylliens de *M. aquatica* peut signifier qu'il n'y a pas de protection de l'activité photosynthétique, qui est plus rapidement affectée par le manque d'eau. Au contraire, la chute de la concentration en pigments des espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides* intervient après une période de latence. Cela suggère que l'activité photosynthétique de ces deux espèces n'est pas impactée immédiatement après l'induction du stress. Cependant, aucun élément bibliographique ne soutient ces résultats à ce jour. Pour Garcia-Serrano *et al.* (2009), l'espèce native *Senecio malacitanus* apparaît plus adaptée et plus résistante à la sécheresse que ses équivalentes invasives, constat observée suite à la mesure du contenu en eau des feuilles et des échanges gazeux.

La diminution des concentrations en pigments et en protéines suite à une exondaison est moins rapide chez *L. grandiflora* et *L. peploides*. Par rapport au comportement de *M. aquatica*, le maintien de l'activité photosynthétique qui caractérise les deux espèces invasives, avant une diminution significative des concentrations en pigments, est peut être le signe d'une meilleure tolérance au manque d'eau. Une meilleure tolérance de *M. aquatica* face à l'exondaison était attendue, puisqu'elle rencontre cette situation en saison estivale. Les résultats que nous avons obtenus montrent que *M. aquatica* mobilise uniquement la GR face aux stress salins. Dans l'ensemble, elle se défend moins, mais son métabolisme de base, représenté par la concentration en protéines, n'est pas affecté. Le système de mobilisation contre les ROS, incarné par sa capacité anti-oxydante, ne semble pas mobilisé globalement pour cette espèce native, sur le pas de temps étudié, et pour les concentrations en NaCl appliquées. Ceci suggère que seules les espèces invasives étudiées ont été capables d'adapter leur métabolisme face à un stress salin, ce qui pourrait être considéré comme une marque de plasticité adaptative.

Ainsi, les conclusions obtenues convergent dans le sens de notre hypothèse, les deux espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides* réagissent mieux aux stress hydrique et salin que l'espèce native *M. aquatica*. Ces résultats sont à considérer sur la base des variables biologiques étudiées. Les jussies invasives mobilisent plus leur métabolisme face aux stress, en maintenant, voire en augmentant certaines concentrations et activités. Ceci peut être une conséquence d'une plasticité adaptative plus élevée pour ces espèces invasives.



### 3.2. Comportement des deux espèces invasives face au stress

Malgré leurs similitudes morphologiques en milieu naturel, *L. grandiflora* et *L. peploides* ne répondent pas de la même manière aux stress appliqués. Les analyses phénotypiques ont mis en évidence une résistance de *L. grandiflora* plus importante que *L. peploides*, quel que soit le stress. Lors de l'application d'un stress salin intense ( $12\text{g.L}^{-1}$ ), *L. peploides* est totalement nécrosée, alors que *L. grandiflora* montre un appareil végétatif aérien qui semble fonctionnel. Lors d'une exondaison, au bout de 5 jours, *L. grandiflora* est moins asséchée que *L. peploides*. Les résultats obtenus suite aux analyses biochimiques ont confirmé ces réponses différentielles.

Le contenu protéique de *L. grandiflora* augmente de manière précoce (4h), uniquement pour le stress salin le plus intense ( $12\text{g.L}^{-1}$ ). En revanche, la concentration en protéines de *L. peploides* diminue plus tardivement (72h) et pour un stress moins intense ( $6\text{g.L}^{-1}$ ). Cette concentration reste constante pour *L. peploides* lors d'un stress plus intense à  $12\text{g.L}^{-1}$ . L'activité de la guaiacol peroxydase est plus importante pour les deux espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides* suite aux stress à 6 et  $12\text{g.L}^{-1}$  de NaCl. Pour *L. grandiflora* cette mobilisation est d'autant plus précoce que le stress est intense : dès 24h pour le stress à  $12\text{g.L}^{-1}$ , au bout de 5 jours pour  $6\text{g.L}^{-1}$ . D'autre part, pour *L. peploides*, la présence de NaCl dans l'eau entraîne sa coloration, proportionnellement au stress appliqué.

Suite à une exondaison, les taux de Chl a et de Chl b augmentent pour *L. grandiflora* lors des premiers temps de cinétique, alors qu'ils se maintiennent au moins jusqu'à 72h chez *L. peploides*, avant de chuter. Les concentrations en caroténoïdes diminuent plus ou moins rapidement suite aux traitements T1/2 et T1 pour *L. peploides*. Ces concentrations en caroténoïdes sont moins affectées pour *L. grandiflora* suite aux mêmes traitements, puisque malgré une chute, les concentrations se stabilisent (T1/2) ou remontent au bout de 5 jours (T1). Enfin les stress hydriques appliqués entraînent une diminution du contenu protéique de *L. peploides*, et une stabilité pour celui de *L. grandiflora*.

L'augmentation du contenu phénolique sous conditions salines a été constaté chez plusieurs espèces, telles que la mûre (Agastian *et al.* 2000) ou le radis (Muthukumarasamy *et al.* 2000). Les composés phénoliques incluent un nombre considérable de molécules, dont certaines ont une activité anti-oxydante, avec leur rôle de détoxification des radicaux libres, mais aussi grâce à leurs propriétés chélatantes (Urquiaga & Leighton 2000). Ainsi, l'éventuelle production et relargage de polyphénols par *L. peploides* pourrait être une spécificité de cette espèce dans sa stratégie de défense contre les stress.

Cette étude a permis de mettre en évidence que *L. peploides* et *L. grandiflora* répondent aux stress salin et hydrique en modifiant à la fois leur métabolisme général (contenu protéique et chlorophyllien) et leur système anti-oxydant (capacité et enzymes anti-oxydantes). Les réponses pour les deux espèces invasives sont soit quantitatives (augmentation, maintien ou diminution des valeurs mesurées), soit modulées dans le temps avec des réponses plus ou moins précoces, et souvent en lien avec l'intensité des stress. Les résultats suggèrent que *L. grandiflora* et *L. peploides* ont toutes les deux des capacités adaptatives leur permettant de répondre à des stress différents, et d'intensités variées. Cependant, le comportement de *L. grandiflora* vis-à-vis des stress hydriques et salins semble indiquer que cette espèce est davantage capable que *L. peploides* d'ajuster son métabolisme face à des stress abiotiques. En effet, *L. grandiflora* a montré, sous contrainte saline, une capacité à mobiliser son activité photosynthétique, sa synthèse protéique, ainsi que son activité anti-oxydante, plus précocement que *L. peploides*. Funk & Zachary (2010) ont montré que suite à l'application de stress lumineux et hydrique sur trois espèces invasives et trois espèces natives, il existe des réponses différentielles entre les espèces invasives. Thouvenot *et al.* (2012) ont étudié les réponses à la salinité de deux macrophytes invasives, et ont constaté des différences de réponses, malgré l'appartenance des deux espèces au même type biologique. Il est donc courant d'observer des différences entre espèces invasives, même si contrairement à notre étude, les espèces répondant ainsi ne font pas partie du même genre.



Une des différences majeures entre les deux espèces invasives concerne leur niveau de ploïdie. *L. grandiflora* est décaploïde, tandis que *L. peploides* est diploïde. Il n'a pas encore été établi à ce jour si le génome décaploïde de *L. grandiflora* est issu d'une hybridation interspécifique, comme c'est le cas pour le blé, ou bien s'il s'agit seulement de la duplication d'un même génome. Quoi qu'il en soit, cette décaploïdie constitue un avantage, et pourrait expliquer une plasticité plus élevée et le succès d'adaptation de *L. grandiflora*. En effet, la redondance des gènes permet d'en changer les fonctions, en modifiant les copies abondantes de gènes clés (Comai 2005). Chandra & Dubey (2009) ont suivi l'impact d'un stress hydrique sur des espèces du genre *Cenchrus* ayant des niveaux de ploïdie différents. Il est apparu que la diminution des caractéristiques photosynthétiques suite à un stress hydrique est plus importante pour les espèces annuelles diploïdes que pour les espèces pérennes diploïdes et tétraploïdes, ce qui appuie en partie nos résultats. De plus, la capacité de récupération suite aux manques d'eau est plus prononcée dans les plantes pérennes tétraploïdes et hexaploïdes que dans les espèces annuelles diploïdes, pour plusieurs traits physiologiques. Par ailleurs, selon Meratan *et al.* (2008), la meilleure tolérance à la salinité d'*Acanthophyllum glandulosum* peut être attribuée à son plus haut niveau de ploïdie. Ces exemples étayent l'hypothèse énoncée précédemment : les différences de réponses au stress hydrique observées entre *L. peploides* et *L. grandiflora*, souvent en faveur de cette dernière, peuvent s'expliquer par leurs différences en termes de niveau de ploïdie.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude réalisée était basée sur l'analyse globale des réponses aux stress hydrique et salin de *L. grandiflora*, *L. peploides* et *M. aquatica*. Une partie de ce travail a porté plus spécifiquement sur la mobilisation des voies de réponse au stress oxydant. Ces deux approches ont permis d'obtenir des résultats concluants et complémentaires.

Des réponses spécifiques liées aux stress et aux espèces ont été mises en exergue. Les deux stress appliqués ont des impacts différents sur les concentrations en pigments photosynthétiques, en protéines, ainsi que sur l'activité enzymatique et la capacité anti-oxydante. La sensibilité globale à la salinité montrée par *L. grandiflora* et *L. peploides* est encourageante vis-à-vis des opérations de gestion consistant à l'ouverture à l'eau salée des marais côtiers envahis par les jussies. Les impacts des stress hydriques et salins sur le métabolisme général des plantes traduisent l'action des ROS, et montrent ainsi que ces deux types de stress engendrent bien un stress oxydatif chez les espèces étudiées. Les deux enzymes anti-oxydantes étudiées sont impliquées de manière différente selon le type de stress et selon l'espèce. Les différences observées entre les espèces invasives *L. grandiflora* et *L. peploides* et l'espèce native *M. aquatica* confirment l'hypothèse de départ. La mobilisation du métabolisme des deux espèces invasives face aux stress, en maintenant, voire en augmentant certaines concentrations et activités, traduit leur plasticité plus élevée que celle de l'espèce native. Des réponses différentielles ont également été pointées entre les deux espèces invasives, et peuvent en partie s'expliquer par leur niveau de ploïdie différent.

Les perspectives qui peuvent être envisagées pour poursuivre ce travail sont présentées ci-dessous.

L'interprétation des résultats présentés précédemment repose sur l'hypothèse que chacune des espèces étudiées produit les mêmes ROS et en même quantité pour un stress donné. Il serait cependant intéressant de vérifier ce postulat par un dosage des ROS dans les échantillons analysés.

Comme expliqué précédemment, les enzymes anti-oxydantes dont nous avons dosé l'activité ne sont pas celles qui sont mesurées usuellement pour suivre les réponses au stress oxydant. Ainsi, des dosages de la catalase, de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase ou encore de l'ascorbate peroxydase, pourraient être réalisés pour obtenir des informations supplémentaires, d'autant que l'ensemble des échantillons broyés a été conservé à -80°C. De nouvelles mises au point du dosage de l'activité de la GST et de la peroxydation des lipides (test TBARS) seraient également intéressantes.

Il est courant suite à un stress hydrique de réhydrater les plantes, afin d'observer leur réaction de récupération suite à ce stress (Chandra & Dubey 2009, Pinheiro & Chaves 2011). Il pourrait être intéressant de soumettre les jussies invasives et la menthe aquatique à une réhydratation, en limitant la durée du stress à 3 jours.

Les résultats obtenus grâce à cette étude pourront être étayés, et complétés par une approche transcriptomique, ou bien par une approche métabolique. Ces deux approches pourraient être conduites avec *a priori*, en ciblant certains gènes ou certains métabolites, ou bien sans *a priori*, en analysant l'ensemble des informations disponibles au sein de la plante. À court terme, une préférence sera donnée à l'approche métabolique, qui permet d'avoir plus facilement et plus rapidement des informations générales sur les réponses globales. Cette approche permettrait également de déterminer si la coloration de l'eau par *L. peploides* suite à un stress salin est due à des polyphénols.





## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agastian P, Kingsley SJ, Vivekanandan M (2000) Effect of Salinity on Photosynthesis and Biochemical Characteristics in Mulberry Genotypes. *Photosynthetica* 38:287–290
- Ali B, Hayat S, Fariduddin Q, Ahmad A (2008) 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 72:1387–1392
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373–399
- Baek BS, Kwon HJ, Lee KH, Yoo MA, Kim KW, Ikeno Y, Yu BP, Chung HY (1999) Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation. *Arch Pharm Res* 22:361–366
- Baruch Z, Goldstein G (1999) Leaf construction cost, nutrient concentration, and net CO<sub>2</sub> assimilation of native and invasive species in Hawaii. *Oecologia* 121:183–192
- Bohren C (2011) Le point sur les plantes envahissantes. *Recherche agronomique Suisse* 3:108–113
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248–254
- Bresh C, Onesto JP, Mandon I (2008) Plantes invasives et diversification horticole : exigences économiques et écologiques. In: Versailles, France
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14:303–311
- Cavalcanti FR, Oliveira JTA, Martins-Miranda AS, Viégas RA, Silveira JAG (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist* 163:563–571
- Chandra A, Dubey A (2009) Assessment of ploidy level on stress tolerance of *Cenchrus* species based on leaf photosynthetic characteristics. *Acta Physiol Plant* 31:1003–1013
- Chen K, Hu G, Keutgen N, Janssens MJ., Lenz F (1999) Effects of NaCl salinity and CO<sub>2</sub> enrichment on pepino (*Solanum muricatum* Ait.): II. Leaf photosynthetic properties and gas exchange. *Scientia Horticulturae* 81:43–56
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6:836–846
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11:163
- Dandelot S (2004) Les *Ludwigia* spp. invasives du Sud de la France : Historique, Biosystématique, Biologie et Ecologie. *Hydrobiologie : Aix-Marseille* 3 : 2004
- Dandelot S, Verlaque R, Dutartre A, Cazaubon A (2005) Ecological, Dynamic and Taxonomic Problems Due to *Ludwigia* (Onagraceae) in France. *Hydrobiologia* 551:131–136
- Davidson AM, Jennions M, Nicotra AB (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecology Letters* 14:419–431



- Dawn-Linsley M, Ekinci FJ, Ortiz D, Rogers E, Shea TB (2005) Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 141:219–222
- Drenovsky RE, Khasanova A, James JJ (2012) Trait convergence and plasticity among native and invasive species in resource-poor environments. *Am J Bot* 99:629–639
- Efeoğlu B, Ekmekçi Y, Çiçek N (2009) Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African Journal of Botany* 75:34–42
- Egert M, Tevini M (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany* 48:43–49
- Fazeli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol Plant* 51:98–103
- Funk JL, Zachary VA (2010) Physiological responses to short-term water and light stress in native and invasive plant species in southern California. *Biol Invasions* 12:1685–1694
- Garcia-Serrano H, Caño L, Escarré J, Fleck I, Sans FX (2009) Physiological comparison of alien *Senecio inaequidens* and *S. pterophorus* and native *S. malacitanus*: Implications for invasion. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 204:445–455
- Geng Y-P, Pan X-Y, Xu C-Y, Zhang W-J, Li B, Chen J-K (2006) Phenotypic plasticity of invasive *Alternanthera philoxeroides* in relation to different water availability, compared to its native congener. *Acta Oecologica* 30:380–385
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909–930
- Grime JP (1979) *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley & Sons
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-Transferases : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Han T, Kang S-H, Park J-S, Lee H-K, Brown MT (2008) Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquatic Toxicology* 86:176–184
- Haury J, Damien JP, Maisonneuve JL, Bottner B (2011) La gestion des Jussies en milieu aquatique et en prairies humides. In: *Plantes invasives, la nécessité de différentes approches*. Estuarium, Angers, p 266
- Jampeetong A, Brix H (2009) Effects of NaCl salinity on growth, morphology, photosynthesis and proline accumulation of *Salvinia natans*. *Aquatic Botany* 91:181–186
- Kehrer JP (2000) The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43–50
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7:323–328
- Lambert E, Dutartre A, Coudreuse J, Haury J (2010) Relationships between the biomass production of invasive *Ludwigia* species and physical properties of habitats in France. *Hydrobiologia* 656:173–186
- Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol J-P, Théron P, Torreilles J (1998) Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbutique. *Annales de biologie clinique* 56:305–319
- Légifrance (<http://www.legifrance.gouv.fr>) LOI n°2009-967 du 3 août 2009 - Article 23.



- Lei Y, Yin C, Li C (2006) Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum* 127:182–191
- Li L, Staden J, Jäger AK (1998) Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation* 25:81–87
- Lichtenthaler H, Wellburn R (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 603:591–592
- Lin CC, Kao CH (2002) Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 37:177–184
- Liu F, Pang SJ (2010) Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 382:82–87
- MacFarlane G., Burchett M. (2001) Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin* 42:233–240
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139–158
- Mcalpine KG, Jesson LK, Kubien DS (2008) Photosynthesis and water-use efficiency: A comparison between invasive (exotic) and non-invasive (native) species. *Austral Ecology* 33:10–19
- Meratan AA, Ghaffari SM, Niknam V (2008) Effects of salinity on growth, proteins and antioxidant enzymes in three *Acanthophyllum* species of different ploidy levels. *JSUT* 33:1–8
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem F Van (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490–498
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Breusegem F Van (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16:300–309
- Monty A, Mahy G (2009) Évolution des traits d’histoire de vie lors des invasions végétales. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 13
- Morais MC, Panuccio MR, Muscolo A, Freitas H (2012a) Salt tolerance traits increase the invasive success of *Acacia longifolia* in Portuguese coastal dunes. *Plant Physiology and Biochemistry* 55:60–65
- Morais MC, Panuccio MR, Muscolo A, Freitas H (2012b) Does salt stress increase the ability of the exotic legume *Acacia longifolia* to compete with native legumes in sand dune ecosystems? *Environmental and Experimental Botany* 82:74–79
- Muthukumarasamy M, Gupta SD, Panneerselvam R (2000) Enhancement of Peroxidase, Polyphenol Oxidase and Superoxide Dismutase Activities by Triadimefon in NaCl Stressed *Raphanus Sativus* L. *Biologia Plantarum* 43:317–320
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5:388–395
- Onema (2010) Gestion des espèces invasives



- Paradis G, Hugot L, Spinosi P (2008) Les plantes envahissantes : une menace pour la biodiversité. *Stantari*:9
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324–349
- Pinheiro C, Chaves MM (2011) Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J Exp Bot* 62:869–882
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and distributions* 6:93–107
- Rout NP, Shaw BP (2001) Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Science* 160:415–423
- Ruau B (2008) Les plantes envahissantes des corridors fluviaux : traits biologiques, impacts de *Ludwigia peploides* et *L. grandiflora* en Loire moyenne et implications pour la gestion. Université François Rabelais - Tours
- Schumacher E, Kueffer C, Tobler M, Gmür V, Edwards PJ, Dietz H (2008) Influence of Drought and Shade on Seedling Growth of Native and Invasive Trees in the Seychelles. *Biotropica* 40:543–549
- Shaikhali J, Heiber I, Seidel T, Ströher E, Hiltcher H, Birkmann S, Dietz K-J, Baier M (2008) The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biology* 8:48
- Smida I, Petit J Le, Charpy-Roubaud C (2010) Ecologie et perspectives de restauration et de valorisation d'écosystèmes envahis par des *Ludwigia* sp : Etat de l'Art. In: p 1–4
- Srivalli B, Sharma G, Khanna-Chopra R (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum* 119:503–512
- Srivastava OP, Huystee RB van (1977) An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase, and polyphenol oxidase from peanut cells. *Can J Bot* 55:2630–2635
- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* 161:613–619
- Thouvenot L (2012) Stratégie de réponse de l'espèce invasive *Ludwigia grandiflora* aux contraintes environnementales. Rennes 1
- Thouvenot L, Haury J, Thiébaud G (2012) Responses of two invasive macrophyte species to salt. *Hydrobiologia* 686:213–223
- Torres MA (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* 141:373–378
- Upadhyay RK, Panda SK (2005) Salt tolerance of two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*. *Biologia plantarum* 49:157–159
- Urquiaga I, Leighton F (2000) Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research* 33:55–64
- Vahrameev P, Nobilliaux S (2013) Liste des espèces végétales invasives de la région Centre, version 3. In: p 41 p





- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176:749–763
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH (1998) Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiol* 117:1103–1114
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14
- Zheng Y, Fung RWM, Wang SY, Wang CY (2008) Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biology and Technology* 47:151–158
- Zhu J-K (2002) Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247–273



## TABLE DES ANNEXES

<i>ANNEXE 1 - COMPOSITION EN OLIGO-ÉLÉMENTS DE LA SOLUTION NUTRITIVE UTILISÉE POUR LA CULTURE DES PLANTES MÈRES .....</i>	<i>- 43 -</i>
<i>ANNEXE 2 – DÉTAIL DE PROTOCOLES UTILISÉS.....</i>	<i>- 43 -</i>
<i>2 A) MÉTHODE DE BRADFORD .....</i>	<i>- 43 -</i>
<i>2 B) MÉTHODE ORAC (OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY).....</i>	<i>- 44 -</i>
<i>2 C) MÉTHODE TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES) .....</i>	<i>- 45 -</i>
<i>2 D) DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA GLUTATHION RÉDUCTASE (GR).....</i>	<i>- 45 -</i>
<i>2 E) DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA GLUTATHION S-TRANSFÉRISE (GST) .....</i>	<i>- 46 -</i>
<i>2 F) DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA GUAÏACOL PEROXYDASE (GPOX).....</i>	<i>- 46 -</i>
<i>ANNEXE 3 – CONCENTRATIONS EN CHLOROPHYLLE B EN FONCTION DE L'ESPÈCE, DE L'INTENSITÉ DU STRESS SALIN ET DU TEMPS D'APPLICATION .....</i>	<i>- 47 -</i>
<i>ANNEXE 4– CONCENTRATIONS EN CHLOROPHYLLE B EN FONCTION DE L'ESPÈCE, DE L'INTENSITÉ DU STRESS HYDRIQUE ET DU TEMPS D'APPLICATION.....</i>	<i>- 47 -</i>



## ANNEXE 1 - Composition en oligo-éléments de la solution nutritive utilisée pour la culture des plantes mères

Oligo-éléments		Concentration finale (en %)
Azote total		4
dont	Azote ammoniacal	2,3
	Azote uréique	1,2
Anhydride phosphorique (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )		6
Oxyde de Potassium (K <sub>2</sub> O)		8
Cuivre (Cu-EDTA)		0,002
Fer (Fe-EDTA)		0,025
Manganèse (Mn-EDTA)		0,014
Molybdène (Mo)		0,001
Zinc (Zn-EDTA)		0,004

## ANNEXE 2 – Détail de protocoles utilisés

### 2 a) Méthode de Bradford

► Quantité de solution déposée par puit selon la nature du dépôt sur microplaques 96 puits transparentes :

Type de dépôt Type de solution	Échantillon	Gamme	Blanc
Extrait végétal (en µL)	5	-	-
Point de gamme (en µL)	-	5	-
Tampon EDTA/PVP (en µL)	-	-	5
Bleu de Coomassie (en µL)	250	250	250

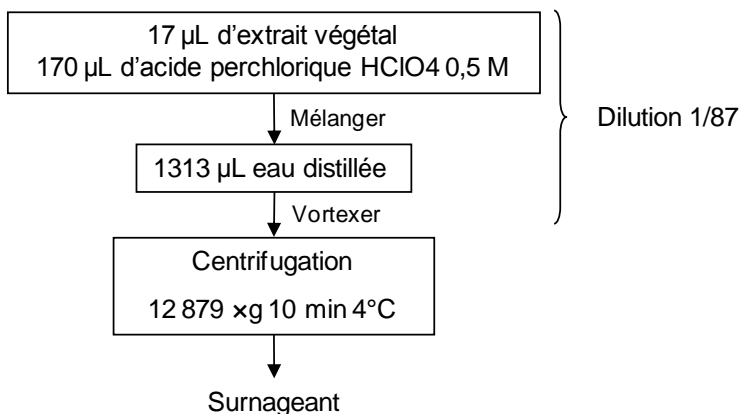
Après 5 minutes d'attente, lecture au spectrophotomètre à 595 nm

► Concentration des différents points de la gamme d'étalonnage BSA

mg.mL <sup>-1</sup>
0
0,0125
0,025
0,05
0,125
0,25



## 2 b) Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)



► Concentration des différents points de la gamme d'étalonnage Trolox

µM
0
6,25
12,5
25
37,5
50

► Quantité de solution déposée par puit selon la nature du dépôt sur microplaques 96 puits noires :

Type de dépôt Type de solution	Échantillon	Gamme	Blanc
Surnageant (en µL)	20	-	-
Point de gamme (en µL)	-	20	-
Tampon EDTA/PVP	-	-	20
Fluorescéine à 1,08 nM	200	200	200
AAPH à 63 mM (en µL)	37,5	37,5	37,5

► Lecture au spectrofluorimètre, excitation à 480 nm, émission à 520 nm  
Cinétique de 2 heures, une mesure par minute

Référence des réactifs utilisés :  
Fluorescéine : Sigma, ref 46960-25G-F  
AAPH : Wako, ref 017-21332-25 g  
Trolox : Sigma, ref 238813-1G





## 2 c) Méthode TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

8  $\mu\text{L}$  d'extrait végétal+292  $\mu\text{L}$  de tampon K 100 mM  
ou 300  $\mu\text{L}$  point de gamme MDA  
750  $\mu\text{L}$  d'un mélange (2 /1 v:v) d'acide thiobarbiturique (TBA  
0,55 mM,pH 7,4) et d'acide perchlorique à 7 % ( $\text{HClO}_4$ )

Chauffage 45 minutes à 95°C  
Refroidir à 4°C

Centrifugation  
805 xg 15 min 4°C

Récupérer 800 $\mu\text{L}$  de surnageant  
Ajouter 800 $\mu\text{L}$  de butanol

Vortexer 1 à 2 minutes

Centrifugation  
12 879 xg 15 min 4°C

Surnageant

► Concentration des  
différents points de la  
gamme d'étalonnage MDA

nM
0
2,93
5,86
11,71
23,43
46,87
93,75
187,50

Références des réactifs utilisés :  
Standard MDA : Sigma, ref 108383-100 ML  
Acide perchlorique : Sigma, ref 34288-1L-R  
TBA : Sigma, ref T5500-250G  
Butanol-1 : Merck, ref 9628-1L

► Dépôt de 200 $\mu\text{L}$  de surnageant sur microplaque 96 puits noirs  
Mesure spectrofluorimètre excitation 532 émission 553

## 2 d) Dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR)

► Quantité de solution déposée par puit selon la nature du dépôt sur microplaques 96 puits transparentes :

Type de dépôt Type de solution	Échantillon	Contrôle positif	Blanc
GSSG à 4,3 mM (en $\mu\text{L}$ )	125	125	125
Tampon phosphate de potassium 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	25	45	50
Extrait végétal (en $\mu\text{L}$ )	25	-	-
GR à 1 U.mL <sup>-1</sup> (en $\mu\text{L}$ )	-	5	
DTNB à 6 mM (en $\mu\text{L}$ )	62,5	62,5	62,5
NADPH à 2,2 mM (en $\mu\text{L}$ )	13	13	13

Références des réactifs utilisés:  
GSSG : Sigma, ref G4626  
GR : Sigma, ref G3664-100UN  
DTNB : Sigma, ref D8130  
NADPH : Sigma, ref N6505



## 2 e) Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

► Quantité de solution déposée par puit selon la nature du dépôt sur microplaques 96 puits transparentes :

Type de dépôt Type de solution	Echantillon	Gamme	Blanc
Tampon K 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	35	130	245
Extrait végétal (en $\mu\text{L}$ )	20	-	-
Gamme (en $\mu\text{L}$ )	-	20	
Tampon 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	90	-	-
CDNB à 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	5	5	5
GSH à 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	5	-	5
Tampon 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	100	100	-

Références des réactifs utilisés :  
CDNB : Sigma, ref 138630-5G  
GSH : Sigma, ref G6529-1G

► Lecture à 340 nm toutes les 20 secondes, pendant 5 minutes

## 2 f) Dosage de l'activité de la guaiacol peroxydase (GPOX)

► Quantité de solution déposée par puit selon la nature du dépôt sur microplaques 96 puits transparentes :

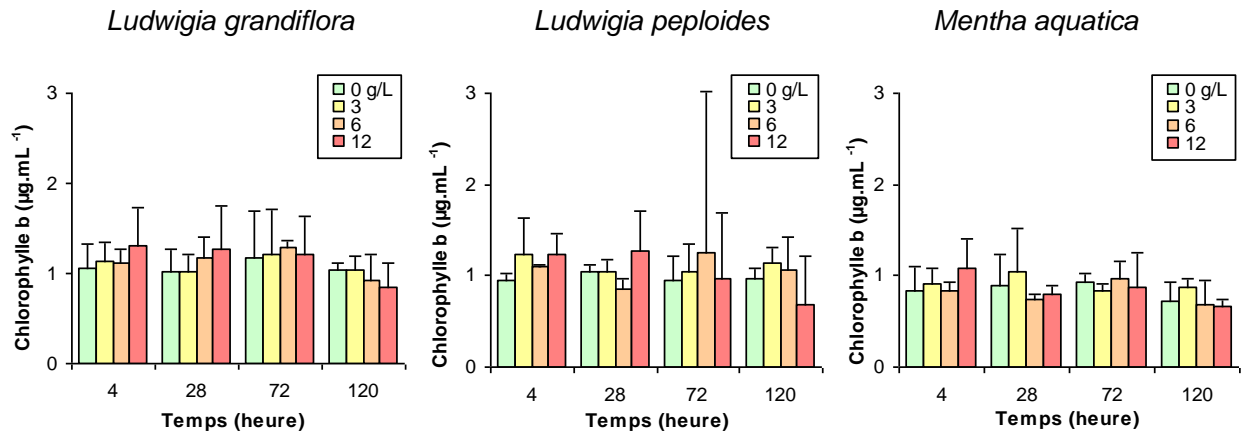
Type de dépôt Type de solution	Echantillon	Blanc	Contrôle
Tampon K 100 mM (en $\mu\text{L}$ )	240	240	240
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1% (v/v) (en $\mu\text{L}$ )	30	30	30
Guaiacol à 0,4 M (en $\mu\text{L}$ )	15	15	15
Echantillon (en $\mu\text{L}$ )	15	-	-
Tampon EDTA/PVP (en $\mu\text{L}$ )	-	15	-
Peroxydase	-	-	15

Références des réactifs utilisés :  
Guaiacol : Sigma, ref G5502-100G  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Acros organics, ref 2624460010  
Peroxydase : Sigma P 6782-5mg

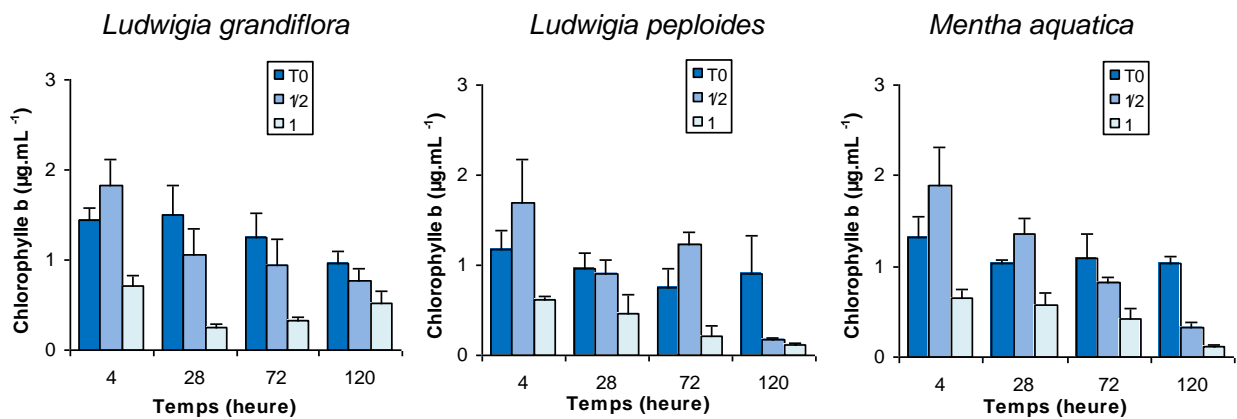
► Lecture à 470 nm toutes les 9 secondes pendant 3 minutes



### ANNEXE 3 – Concentrations en chlorophylle b en fonction de l'espèce, de l'intensité du stress salin et du temps d'application



### ANNEXE 4 – Concentrations en chlorophylle b en fonction de l'espèce, de l'intensité du stress hydrique et du temps d'application









VetAgro Sup

GILLARD Morgane, 2013, Etude des réponses des plantes invasives *Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides* sous conditions de stress hydriques et salins , 36 pages, mémoire de fin d'études, Clermont-Ferrand, 2013

**STRUCTURE D'ACCUEIL ET INSTITUTIONS ASSOCIÉES:**

- ♦ Institut national de la recherche agronomique (INRA) de Rennes, Agrocampus Ouest  
Unité Mixte de Recherche Écologie et Santé des Écosystèmes (UMR 0985 ESE)

**ENCADRANTS :**

- ♦ Maître de stage : BARLOY Dominique (Agrocampus Ouest)
- ♦ Tuteur pédagogique : DREVET Patricia (Université Blaise Pascal)

**OPTION :** Génomique, écophysiologie et productions végétales (GEPV)

**RESUMÉ**

Les invasions biologiques représentent la troisième cause de diminution de la biodiversité. Les Jussies invasives *Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides* sont deux macrophytes aquatiques invasives en France, dont l'impact économique et écologique est avéré et important. Les stratégies de lutte utilisées actuellement ne permettent pas une gestion efficace. Afin de déterminer si ces espèces présentent une plasticité plus importante que l'espèce native *Mentha aquatica*, ces trois espèces ont été soumises à des stress hydriques et salins pendant cinq jours. Des analyses biochimiques ont été conduites, dans le but d'évaluer les stratégies globales de réponse aux stress, et la mobilisation des voies antioxydantes. Les résultats ont montré des différences de réponses selon le stress et selon l'espèce. Les stress hydriques et salins ont des impacts sur l'activité photosynthétique et la production protéique, signe qu'un stress oxydant est occasionné. Face au stress salin, *L. grandiflora* et *L. peploides* mobilisent la guaiacol peroxydase, alors que *M. aquatica* utilise la glutathion réductase pour détoxifier les espèces réactives de l'oxygène. Pour l'ensemble des variables biologiques étudiées, les deux espèces invasives semblent plus plastiques que l'espèce native. Les réponses différentielles constatées entre les deux espèces invasives, à l'avantage de *L. grandiflora*, peuvent s'expliquer par le niveau de ploïdie plus important de cette dernière. Un dosage d'autres enzymes antioxydantes ou des espèces réactives de l'oxygène pourraient apporter des résultats complémentaires.

**Mots clés :** Jussies, espèces invasives, salinité, exondaison, stress oxydant, ROS, plasticité