



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Thèse présentée en vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**DISCIPLINE : ECOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITE, ECOSYSTEMES**

Soutenue publiquement le 6 novembre 2012

**REHABILITATION DES SOLS POLLUES PAR LES  
ELEMENTS TRACES METALLIQUES GRACE AUX  
BACTERIES DU SOL ASSOCIEES A LA RHIZOSPHERE DE  
*MISCANTHUS X GIGANTEUS***

**Claudia Patricia MARTINEZ CHOIS**

*Directeur : Pr. Jaïro FALLA*

*Co-encadrant scientifique : Dr. Philippe LAVAL-GILLY*

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGENIERIE RESSOURCES PROCEDES PRODUITS  
ENVIRONNEMENT**

**Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes  
CNRS UMR 7146**

*Devant le Jury d'examen composé de :*

**M. Christophe BERTSCH**, Professeur, Université de Haute-Alsace (rapporteur)

**Mme. Elise DAVID**, Maître de Conférences, Université de Reims Champagne Ardenne

**M. Jaïro FALLA**, Professeur, Université de Lorraine

**M. René GRUBER**, Professeur, Université de Lorraine

**M. Philippe LAVAL-GILLY**, Maître de Conférences, Université de Lorraine

**M. Jan Bartłomiej SKOWRONEK**, Dr. hab. Inz. Directeur de l'Institut pour l'écologie des zones industrielles (rapporteur)

*A ma grand-mère Ninfa Chaves de Chois,  
la première scientifique microbiologiste de la famille.*

*Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mes travaux de recherche ainsi que l'intérêt qu'ils ont porté à cette thématique, notamment au travers des dialogues entretenus lors de la soutenance de ma thèse. Merci au Professeur Christophe Bertsch et au Docteur Jan Bartłomiej Skowronek pour avoir analysé ce travail en tant que rapporteurs ; au Professeur René Gruber et à la Docteur Elise David pour avoir pris part à ce jury. Vos encouragements sont toujours une motivation pour la suite de mon parcours professionnel et scientifique.*

*Merci au Conseil Général de la Moselle, la Communauté d'Agglomération de Thionville-Portes de France et le Fond Européen pour le Développement Régional (FEDER) pour leurs aides précieuses au financement de cette thèse, sans laquelle ces travaux n'auraient pas eu lieu.*

*Je remercie le Lycée Agricole de Courcelles Chaussy pour sa participation à la mise en place des cultures expérimentales sur le terrain ; spécialement à Emilie Charrue.*

*Mes remerciements vont aussi au Dr. Patrick Charbonnier, Ingénieur chez ArcelorMittal Corporate Real Estate, pour sa disponibilité et son aide à l'identification des zones polluées sur les terrains de l'ancienne cokerie de Thionville.*

*Je veux également remercier Pangbo Yang pour son investissement remarquable en tant que stagiaire... toujours avec le sourire.*

*Je tiens à remercier la Universidad Autónoma de Occidente de Cali (Colombie) de m'avoir ouvert ses portes et de m'avoir donné les moyens de réaliser mes premières expériences professionnelles dans le monde de la recherche scientifique nationale et internationale. Ma formation en Aménagement de l'Environnement et des Ressources Naturelles au sein de cette admirable institution façonne ma pensée holistique et transdisciplinaire.*

*Un grand merci à mon directeur de thèse, le Professeur Jaïro Falla Angel, de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études de troisième cycle en France et d'avoir mis en avant mes compétences pour mener à bien ce projet et assumer de telles responsabilités de façon autonome. Je remercie fortement mon co-encadrant scientifique, le Docteur Philippe LAVAL-GILLY, pour son accompagnement et sa sérénité dans les moments d'inquiétudes. Merci encore à tous les deux pour votre confiance et conseils, ils me permettent de finir avec succès.*

*Merci infiniment à toute l'Equipe de Recherche et au Département de Génie Biologie pour leur disponibilité et savoir généreux dans le domaine des sciences naturelles. Aux Ladies de la technique, Sabrina Bostelle et Catherine Durandet, je vous dois tout ce que j'ai appris sur la paillasse. Ma wineussse Marielle D'Innocenzo, merci pour ton éternelle gaîté et ton soutien ; quand viendra le moment, ce sera à toi de prendre la relève. Marie Lejean, l'analyse des mécanismes de transport des*

*ETM aurait été très intéressante à faire ; mais par contre, j'ai remis en application le top #5 de la couleur grâce à toi. A Nicole Stein et Isabelle Bassompierre pour leur sourire. Merci aussi à l'artiste Pascal Picquot pour ta bonne humeur mais également pour tes talents ; j'espère t'envoyer un jour des extraits de mon carnet de voyage à vélo si possible. Amar Bennisroune merci pour tes leçons de ponctualité... désormais je suis à l'heure. A Franck Mouillebouche et Michael Schneider, grâce à vous la chimie et la microbiologie paraissent un jeu d'enfant. Frédérique Quignon, merci pour les heures de discussion captivantes en statistique. A Laurant Foucaud et à Philippe Arnoux pour leur admirable courage. Merci encore à Dominique Morlot de m'avoir transmis sa passion pour le sol, quel merveilleux cadeau !*

*Toute ma reconnaissance à l'ensemble de chercheurs, post-doctorants et doctorants que j'ai pu y rencontrer au Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE) pour les conférences données, pour leurs échanges, pour leurs réactions à mes idées, pour les discussions que nous avons pu avoir. Un spécial remerciement aux Professeurs Paule Vasseur et Pascale Bauda.*

*Aux ex-thésards... qui ne saute pas n'est pas Docteur ! Olé ! Un merci infini à Stéphane Goulaouic et Didier Techer, mes camarades d'armes du bureau et de la paillasse ; je vous garderai toujours dans mon cœur. A Karen Burga, Cyrielle Durand et Nelly Jacquet que des beaux souvenirs qui restent gravés dans mon esprit. A Nicolas Couleau et Mélanie Mazziotti qui continuent à la pipette, bon courage pour la suite ; c'est que du bonheur qui vous attend.*

*A tout le personnel de l'IUT de Thionville - Yutz, c'est grâce à leur sympathie que j'ai plus que réussi mon séjour. Merci à tous et plus spécialement à Anne Maeder, Beatrice Kedingner, Beatrice Ribère, Denise Schoumacker, Monique Ficht, Sylvie Lejeune, Valerie Forey, Vanessa Molinie, Antoine Bonnefoy, Francis Di Tomasso, Gilles Godet, Laurent Thil, Louis Schneider, Patrick Arnault, Pierre Petit .*

*Je tiens remercier mon époux bien aimé Mathieu René Hervé Carcereri, parce que cette thèse t'appartient aussi ! Même si t'insiste à le nier... C'est ton amour, soutien et patience inconditionnels qui m'ont donné la force pour reconquérir l'enthousiasme au cours de ces années de travail. Merci aussi à ma belle famille qui depuis toujours m'a fait sentir comme chez moi ; j'ai hâte de vous faire découvrir mon pays comme vous m'avez permis de connaître le charme de la France.*

*A mes parents et à toute ma famille, qui ont été inlassablement à mes côtés malgré la distance. C'est grâce à vous que j'ai appris que c'est avec persévérance que les rêves se réalisent. Merci tendrement à mon frère et son épouse pour mes deux belles nièces : Juliana y Adriana ; les deux petites bonheurs de la famille.*

# Sommaire

Sommaire .....	IV
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
1 Introduction.....	1
2 Analyse bibliographique.....	3
2.1 <i>Miscanthus x giganteus</i> .....	3
2.1.1 Caractéristiques générales.....	3
2.1.2 Utilisation.....	6
2.1.3 Influence de la culture de <i>M. x giganteus</i> sur la qualité des sols.....	7
2.1.4 <i>M. x giganteus</i> et les éléments traces métalliques.....	8
2.2 Le sol et la réhabilitation des sols pollués en éléments traces métalliques.....	10
2.2.1 Le sol : une ressource non renouvelable.....	10
2.2.2 La pollution des sols par les éléments traces métalliques.....	17
2.2.2.1 L'origine des pollutions métalliques.....	17
2.2.2.2 Formes des éléments traces métalliques dans la matrice du sol.....	18
2.2.3 La réhabilitation des friches.....	21
2.2.3.1 Les friches en France.....	21
2.2.3.2 Politique de gestion des sols pollués.....	23
2.3 La phytoremédiation.....	24
2.3.1 Concepts et principes généraux.....	24
2.3.1.1 Relatif à la phytoremédiation.....	24
2.3.1.2 Méthodes appliquées aux sols pollués en éléments traces métalliques.....	25
2.3.2 Phytoremédiation et éléments traces métalliques.....	25
2.3.2.1 Les éléments traces métalliques : indispensables ou toxiques ?.....	25
2.3.2.2 Mécanismes de détoxication chez les plantes et les bactéries.....	29
2.3.2.3 La performance des plantes.....	31
2.3.2.4 Les conditions du milieu.....	33
2.3.3 La rhizosphère.....	34
2.3.3.1 Définition de la rhizosphère.....	34
2.3.3.2 L'action racinaire sur la mobilité des éléments traces métalliques.....	35
2.3.3.3 Concernant les relations plante-bactéries.....	36
3 Objectif de la thèse.....	39

3.1	La thèse sous forme graphique .....	40
4	Matériel et méthodes.....	41
4.1	Etude en mésocosme .....	41
4.1.1	Préparation des sols .....	41
4.1.1.1	Localisation, description et historique des friches industrielles polluées.....	41
4.1.1.2	Echantillonnage et préparation des sols pollués.....	42
4.1.1.3	Préparation du sol non pollué ( <i>i.e.</i> Contrôle).....	43
4.1.2	Mise en place du mésocosme .....	44
4.1.2.1	Préparation des rhizomes de <i>M. x giganteus</i> .....	44
4.1.2.2	Présentation du plan d'expérience .....	44
4.1.3	Paramètres étudiés .....	45
4.1.3.1	Caractéristiques agronomiques des sols.....	45
4.1.3.2	Evaluation de la toxicité des sols.....	47
4.1.3.3	Dosage des éléments traces métalliques dans les sols .....	48
4.1.3.4	Mesures réalisées sur <i>M. x giganteus</i> .....	49
4.1.3.5	Etude des bactéries des sols.....	52
4.1.4	Analyse statistique .....	57
4.2	Etude <i>in situ</i> de la culture de <i>M. x giganteus</i> sur sol de friche .....	58
4.2.1	Description des parcelles expérimentales.....	58
4.2.1.1	Site 1 : ancienne cokerie.....	58
4.2.1.2	Site 2 : ancien site minier .....	59
4.2.2	Suivi et entretien des cultures.....	59
4.2.3	Traitement des données et analyse statistique .....	60
4.3	Analyse <i>in vitro</i> des bactéries associées à la rhizosphère de <i>M. x giganteus</i> en présence de deux éléments traces métalliques, Zn et Cr .....	60
4.3.1	Plans d'expérience.....	60
4.3.2	Préparation du matériel biologique .....	63
4.3.2.1	Les exsudats racinaires.....	63
4.3.2.2	Les milieux de culture bactériens.....	63
4.3.2.3	Les consortia bactériens.....	64
4.3.3	Mise en place du plan d'expérience.....	64
4.3.4	Analyse statistique .....	65
5	Résultat et discussion.....	66
5.1	Caractéristiques initiales des sols de friche utilisés .....	66

5.1.1	Paramètres agronomiques des sols de friche .....	66
5.1.2	Pollutions en éléments traces métalliques des sols de friche.....	70
5.1.3	Effets toxiques des fractions solides et liquides des sols de friche.....	72
5.2	Développement de <i>M. x giganteus</i> sur sols de friche : Etude en mésocosme .....	74
5.2.1	Production de biomasse et autres caractéristiques.....	74
5.2.2	Teneur en éléments traces métalliques dans les tissus de <i>M. x giganteus</i> après exposition aux sols de friche .....	78
5.2.3	Evolution des caractéristiques des sols de friche après 135 jours de croissance de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme.....	84
5.2.3.1	Influence de la plante sur les caractéristiques chimiques des sols de friche.....	85
5.2.3.2	L'effet de <i>M. x giganteus</i> sur la toxicité des fractions solides et liquides des sols de friche après 135 jours de croissance en mésocosme.....	91
5.2.3.3	Impacte de <i>M. x giganteus</i> sur la partition des éléments traces métalliques des sols... 94	
5.2.4	Devenir des communautés bactériennes des sols de friche après 135 jours de croissance de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme .....	98
5.3	Cultures expérimentales de <i>M. x giganteus</i> en champs .....	102
5.3.1	Développement de <i>M. x giganteus</i> sur le site de l'ancienne cokerie .....	103
5.3.2	Développement de <i>M. x giganteus</i> sur l'ancien site minier.....	107
5.4	Association des bactéries potentiellement métallorésistantes à la rhizosphère de <i>M. x giganteus</i> .....	108
5.4.1	Réponse des bactéries potentiellement métallorésistantes à la présence de <i>M. x giganteus</i> du point de vue quantitatif.....	109
5.4.2	Diversité des communautés bactériennes .....	116
6	Conclusions et perspectives .....	125
7	Bibliographie.....	129
8	Annexes .....	148
8.1	Annexe 1 : Projets européens concernant la culture de <i>Miscanthus. x giganteus</i> .....	148
8.2	Annexe 2. Résultats brutes du plan d'expérience factoriel en microplaque de la croissance bactérienne associée à la rhizosphère de <i>Miscanthus x giganteus</i> en présence de deux éléments traces métalliques, Zn et Cr.....	150

## Liste des figures

<u>Figure 1.</u> Carte du monde de l'état des sols dégradés par l'activité humaine.....	15
<u>Figure 2.</u> Disponibilité des éléments trace métalliques (ETM) dans le sol.....	19
<u>Figure 3.</u> Tableau périodique des ETM toxiques et bénéfiques et métalloïdes.....	26
<u>Figure 4.</u> Résumé des mécanismes d'actions cellulaires disponibles pour la détoxification et la tolérance des ETM chez les plantes supérieures. ....	29
<u>Figure 5.</u> Schéma de la rhizosphère, quelques interactions des facteurs abiotiques et les mécanismes de l'interface sol-solution.....	35
<u>Figure 6.</u> Processus éventuellement impliqués dans la mobilisation des ETM dans la rhizosphère par l'interaction racine-microorganismes. ....	37
<u>Figure 7.</u> Zones d'échantillonnage des sols sur les terrains de l'ancienne cokerie de Thionville. ....	43
<u>Figure 8.</u> Exemple d'une pousse de <i>M. x giganteus</i> après l'incubation des rhizomes.....	44
<u>Figure 9.</u> Culture en mésocosme de <i>M. x giganteus</i> sur les sols de friche pollués.....	45
<u>Figure 10.</u> Modèle pour la préparation des microplaques utilisées pour le test de toxicité de la fraction liquide des sols.....	48
<u>Figure 11.</u> Description de <i>M. x giganteus</i> et préparation des échantillons pour analyse.....	50
<u>Figure 12.</u> Exemple du sol rhizosphérique. ....	50
<u>Figure 13.</u> Modèle pour la préparation des microplaques utilisées pour les dénombrements des bactéries cultivables faites par analyse du NPP.....	53
<u>Figure 14.</u> Protocole d'extraction et purification de l'ADN total du sol.....	54
<u>Figure 15.</u> Parcelle expérimentale sur le terrain pour la culture de <i>M. x giganteus</i> sur sol de friche pollué (Site 1 : ancienne cokerie). ....	58
<u>Figure 16.</u> Plantation mécanique la culture expérimentale sur le terrain de <i>M. x giganteus</i> sur sol de friche pollué et amendé avec une couche superficiel de sol non pollué (Site 2 : ancien site minier). ....	59
<u>Figure 17.</u> Modèle de microplaque utilisé pour le plan factoriel.....	64
<u>Figure 18.</u> Répartition des particules < 2mm de la fraction solide des sols de friche et leur texture associée selon le « diagramme de texture » (Jamagne, 1967). ....	67
<u>Figure 19.</u> Biomasse des vers de terre après exposition à la fraction solide des sols de friche à l'état initiale.....	72

<u>Figure 20.</u> Croissance des algues après 72 h d'exposition à la fraction liquide des sols de friche à l'état initiale.....	73
<u>Figure 21.</u> Évolution de la hauteur de <i>M. x giganteus</i> tout au long de sa culture en mésocosme sur les sols de friche.....	74
<u>Figure 22.</u> Répartition de la biomasse sèche de <i>M. x giganteus</i> après 135 jours d'exposition aux sols de friche en mésocosme. ....	76
<u>Figure 23.</u> Teneur totale en ETM dans la biomasse de <i>M. x giganteus</i> après 135 jours de culture en mésocosme sur les sols de friche. ....	78
<u>Figure 24.</u> Allocation des ETM accumulés par <i>M. x giganteus</i> dans les différentes parties végétales après 135 jours de culture en mésocosme sur les sols de friche.....	82
<u>Figure 25.</u> Teneurs moyennes en cations échangeables des sols de friche à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme (triangles et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes).....	87
<u>Figure 26.</u> Teneurs moyennes en carbone organique total, azote total et rapport C:N des sols de friche à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme (triangles et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes). ....	89
<u>Figure 27.</u> Biomasse des vers de terre après exposition à la fraction solide des sols de friche à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme.....	92
<u>Figure 28.</u> Croissance des algues après 72 h d'exposition à la fraction liquide des sols de friche à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme : a) Moyenne des croissances pour toutes les concentrations testées et b) Moyenne des deux concentrations les plus fortes (triangles et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes). ....	93
<u>Figure 29.</u> Teneur en ETM totaux des sols de friche après 135 jours de culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme. ....	94
<u>Figure 30.</u> Teneur en ETM échangeables au $\text{CaCl}_2$ à 0,01 M, des sols de friche après 135 jours de culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme. ....	95
<u>Figure 31.</u> Teneur en ETM extraits au $\text{NH}_4\text{Oac}$ à 1 M par percolation, des sols de friche après 135 jours de culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme. ....	96
<u>Figure 32.</u> Teneur en ETM bioaccumulés par les vers de terre après 14 jours d'exposition aux sols de friche, à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme : a) Moyenne des teneurs en ETM bioaccumulés et b) Moyenne pour les ETM où l'effet d'au moins un des facteurs est significatif (triangle et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes). ....	97
<u>Figure 33.</u> Logarithme du nombre moyen de bactéries totales des sols de friche à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme.....	99

<u>Figure 34.</u> Bactéries des sols de friche à la fin de la culture de <i>M. x giganteus</i> en mésocosme cultivées en présence de Zn : a) Logarithme du nombre moyen de bactéries et b) Proportion des selon les nombre de bactéries totales des sols.....	100
<u>Figure 35.</u> Comparaison des profils électrophorétiques des communautés bactériennes au niveau du rhizoplans de <i>M. x giganteus</i> avec ceux des sols de friche rhizosphérique et non rhizosphérique à la fin du mésocosme : a) Identification des bandes d'intérêt et b) Dendrogramme pour illustrer la parenté entre les types d'échantillons.....	101
<u>Figure 36.</u> Pourcentage de levée de <i>M. x giganteus</i> cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1). ....	103
<u>Figure 37.</u> Hauteur de <i>M. x giganteus</i> cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1) : a) Moyenne des hauteurs et b) Moyenne des hauteurs à la fin du mois de juillet (triangle et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes). ....	104
<u>Figure 38.</u> Morphologie des tiges de <i>M. x giganteus</i> cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1) : a) Moyenne du nombre d'entrenœuds sur la tige et b) Moyenne du diamètre externe de la tige. ....	105
<u>Figure 39.</u> Pourcentage de plants de <i>M. x giganteus</i> produisant plus d'une pousse lors de sa culture en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1). ....	106
<u>Figure 40.</u> Nombre de pousses produites par <i>M. x giganteus</i> cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1). ....	106
<u>Figure 41.</u> Installation de <i>M. x giganteus</i> cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des deux premières années de croissance (Site 2) : a) Pourcentage de levée et b) hauteur initial des tiges.....	107
<u>Figure 42.</u> Aptitude à la production de pousses de <i>M. x giganteus</i> cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des deux premières années de croissance (Site 2) : a) Pourcentage des plantes produisant des nouvelles pousses et b) nombre de pousses par plant.....	108
<u>Figure 43.</u> Effet combiné des facteurs Zn <sup>2+</sup> et Cr <sup>6+</sup> sur la croissance des bactéries non rhizosphériques et rhizosphériques du sol E. ....	110
<u>Figure 44.</u> Effet des facteurs sur la croissance des bactéries rhizosphériques et du rhizoplan du sol E : a) Effet de la proximité racinaire et b) Effet combiné des facteurs Zn <sup>2+</sup> et Cr <sup>6+</sup> .....	111
<u>Figure 45.</u> Effet des facteurs sur la croissance des bactéries non rhizosphériques et rhizosphériques du sol Mix : a) ) Effet combiné des facteurs Zn <sup>2+</sup> et Cr <sup>6+</sup> et b) Effet combiné des facteurs exsudats et Zn <sup>2+</sup> . ....	112
<u>Figure 46.</u> . Effet des facteurs sur la croissance des bactéries rhizosphériques et du rhizoplan du sol Mix : a) Effet combiné des facteurs Zn <sup>2+</sup> et Cr <sup>6+</sup> et b) Effet combiné des facteurs proximité racinaire et Zn <sup>2+</sup> . ....	113

<u>Figure 47.</u> Effets des facteurs sur la croissance bactérienne du rhizoplans : a) Effet combiné des facteurs Zn <sup>2+</sup> et Cr <sup>6+</sup> et b) Effet du type de consortium. ....	115
<u>Figure 48.</u> Profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables totales (milieu BH non pollué) des sols de friche non rhizosphériques, rhizosphériques et rhizoplans, au 2 <sup>ème</sup> cycle végétal de <i>M. x giganteus</i> lors de sa culture sur le terrain. ....	117
<u>Figure 49.</u> Profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables sous pression de faible concentration de Zn ( <i>i.e.</i> modalités expérimentales du milieu Zn-Cr-), des sols de friche non rhizosphériques, rhizosphériques et rhizoplans, au 2 <sup>ème</sup> cycle végétal de <i>M. x giganteus</i> lors de sa culture sur le terrain.....	118
<u>Figure 50.</u> Profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables sous pression de forte concentration de Zn ( <i>i.e.</i> modalités expérimentales du milieu Zn+Cr-), des sols de friche non rhizosphériques, rhizosphériques et rhizoplans, au 2 <sup>ème</sup> cycle végétal de <i>M. x giganteus</i> lors de sa culture sur le terrain.....	119
<u>Figure 51.</u> Comparaison des profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables sous absence de Zn, de faible teneur en Zn et forte teneurs en Zn, des rhizoplans au 2 <sup>ème</sup> cycle végétal de <i>M. x giganteus</i> lors de sa culture sur les sols de friche sur le terrain. ....	121

## Liste des tableaux

<u>Tableau 1.</u> Type et abondance des organismes vivants dans le sol (Stengel et Gelin 1998). .....	13
<u>Tableau 2.</u> Exemples du biote du sol lié aux processus écologiques et propriétés, suivant la fonction du sol étudiée (Ritz et al. 2009).....	14
<u>Tableau 3.</u> Facteurs causaux de la dégradation des sols, exprimés en millions d’hectares de terrains affectés (Oldeman et al. 1990).....	16
<u>Tableau 4.</u> Exemples des pollutions associées aux ETM et autres métalloïdes dérivés de l’activité humaine (O’Connell et al. 2008). .....	17
<u>Tableau 5.</u> Répartition départementale des sites BASOL lorrains suivant leurs l’état.....	22
<u>Tableau 6.</u> Pourcentage des sites BASOL lorrains localisés dans le département de la Moselle suivant leur pollution en ETM.....	23
<u>Tableau 7.</u> Exemples des besoins biologiques et effets toxiques des ETM pour les végétaux. ....	27
<u>Tableau 8.</u> Exemples d’ions métalliques et leurs transporteurs au niveau des végétaux (Wu et al. 2010).....	28
<u>Tableau 9.</u> Exemples de famille des protéines importantes au transport des ETM chez les bactéries (Summers 2009). .....	30
<u>Tableau 10.</u> Plan d’expérience général portant sur trois facteurs continus ([Zn], [Cr], [Exsudats]), un facteur discret (Type de consortium) et deux niveaux ( <i>i.e.</i> 2 <sup>4</sup> ).. .....	62
<u>Tableau 11.</u> pH des sols de friche à l’état initiale. ....	68
<u>Tableau 12.</u> Capacité d’échange cationique (CEC) et teneur en cations échangeables des sols de friche à l’état initiale.....	68
<u>Tableau 13.</u> Teneur en carbone organique et azote totaux des sols de friche à l’état initiale.....	69
<u>Tableau 14.</u> Teneurs totales en ETM (mg kg <sup>-1</sup> – MS) des sols de friche à l’état initiale.....	70
<u>Tableau 15.</u> Teneurs en ETM (mg kg <sup>-1</sup> – MS) de la solution du sol ( <i>i.e.</i> extraction au CaCl <sub>2</sub> ) et potentiellement biodisponibles ( <i>i.e.</i> percolation à NH <sub>4</sub> Oac) parmi les ETM présents dans les sols de friche à l’état initiale. ....	71
<u>Tableau 16.</u> Autres caractéristiques observées sur <i>M. x giganteus</i> à la fin de sa culture en mésocosme sur les sols de friche pollués.....	75
<u>Tableau 17.</u> Indicateurs de la condition physiologique de <i>M. x giganteus</i> à la fin de sa culture en mésocosme sur les sols de friche pollués.. .....	77
<u>Tableau 18.</u> Indices de tolérance (IT) aux ETM attribués à <i>M. x giganteus</i> après 135 jours d’exposition aux sols de friche, suivant les valeurs en ETM totaux des tissus végétaux du Contrôle et des essais..	79

<u>Tableau 19.</u> Facteurs de bioaccumulation (FBA) des ETM attribués à <i>M. x giganteus</i> après 135 jours d'exposition aux sols de friche, suivant les valeurs en ETM totaux des tissus végétaux et des sols... ..	80
<u>Tableau 20.</u> Facteurs de translocation (FT) des ETM de la partie souterraine vers la partie aérienne attribués à <i>M. x giganteus</i> après 135 jours d'exposition aux sols de friche, suivant les valeurs en ETM des deux tissus végétaux.....	83
<u>Tableau 21.</u> pH des sols de friche, plantés ou pas avec <i>M. x giganteus</i> , à la fin du mésocosme. ....	85
<u>Tableau 22.</u> Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ , $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, <i>i.e.</i> non rhizosphérique - rhizosphérique) affectant la croissance bactérienne sur le sol E et « P-value » associée ; * valeur significative $P < 0,05$ . ....	109
<u>Tableau 23.</u> Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ , $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, <i>i.e.</i> rhizosphérique - rhizoplan) affectant la croissance bactérienne sur le sol E et « P-value » associée ; * valeur significative $P < 0,05$ .....	110
<u>Tableau 24.</u> Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ , $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, <i>i.e.</i> non rhizosphérique - rhizosphérique) affectant la croissance bactérienne sur le sol Mix et « P-value » associée ; * valeur significative $P < 0,05$ . ....	112
<u>Tableau 25.</u> Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ , $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, <i>i.e.</i> rhizosphérique - rhizoplan) affectant la croissance bactérienne sur le sol Mix et « P-value » associée ; * valeur significative $P < 0,05$ .....	113
<u>Tableau 26.</u> Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ , $Cr^{6+}$ , exsudats et type de consortium, <i>i.e.</i> Sol E - Sol Mix) affectant la croissance bactérienne sur le rhizoplan et « P-value » associée ; * valeur significative $P < 0,05$ .....	114

# 1 Introduction

Le sol est une ressource limitée qui fournit un soutien essentiel aux écosystèmes et à nos sociétés. Cependant, les pratiques inadéquates de gestion, comme les activités (bio)industrielles qui affectent principalement le continent européen, parviennent chaque année à la dégradation inexorable des sols. Ces terrains restent généralement à l'abandon (*i.e.* friche). Du fait des modifications physiques et chimiques spécifiques, dont l'amplitude est souvent inconnue, ces sols font partie d'une nouvelle classe de sol aujourd'hui connue sous le nom de technosols. Toutefois, avec l'émergence du développement durable, la gestion du territoire est apparue fondamentale, d'autant plus que le sol est une ressource non renouvelable qu'il convient de préserver. La réhabilitation des sites est alors indispensable, notamment dans le cas d'une détérioration chimique du sol. La détérioration chimique de type « pollution » provoquée par la présence de des éléments traces métalliques (ETM) est de grand concerne, due aux effets potentiellement toxiques (directs ou indirects) qu'ils peuvent avoir sur l'environnement et l'être humain en fonction de leur concentration, mobilité et biodisponibilité. Le traitement des pollutions inorganiques, comme celle des ETM, présente cependant des limites dues à leur persistance dans l'environnement puisqu'ils ne peuvent pas être minéralisés ni dégradés. Parmi les méthodes existantes, la phytoremédiation se présente comme une solution alternative aux techniques physiques et chimiques fréquemment appliquées qui ne tiennent pas compte de l'utilisation durable des processus écologiques du sol. Par ailleurs, tout en gardant en vue la remédiation du système, la phytoremédiation permettrait d'envisager simultanément la réactivation (ou réorientation) des fonctions des sols dégradés suivant l'espèce végétale considérée ; c'est notamment le cas des cultures aptes à la production de biomasse valorisable (*e.g.* pour la production énergétique) peuvent être utilisées. C'est ainsi que *Miscanthus x giganteus* est proposée, considérant non seulement son potentiel pour la production énergétique et sa facilité d'adaptation aux différentes conditions pédoclimatiques, mais aussi pour sa capacité à tolérer la présence des ETM. Cela étant dit, l'activité phytoremédiatrice est non seulement spécifique à l'espèce végétale utilisée (*i.e.* tolérance, accumulation et/ou translocation des ETM), mais encore

aux propriétés du sol et aux conditions environnementales qui régissent le développement des plantes.

Dans le cadre de ce travail, le potentiel de la culture de *M. x giganteus* comme alternative à la réhabilitation des sols de friche pollués en ETM est étudié suivant une approche transdisciplinaire appliquée, permettant d'intégrer les notions de prévention, évaluation des risques et d'assainissement des pollutions lors de l'implémentation des méthodes de bioremédiation. L'objectif consiste donc à déterminer la capacité de *M. x giganteus* à s'adapter à ce type de sols, tout en favorisant la consolidation des processus de bioremédiation des polluants, sans entraîner un impact négatif sur l'environnement. Pour cela, des terrains de la région de Lorraine, fortement impactés par l'activité industrielle passée, ont servi de base de cette étude. Considérant la complexité des relations sol-plante-microorganismes pour la phytoremédiation, une série d'expériences a été réalisée en se servant de différents outils d'évaluation complémentaires (*i.e.* mésocosme, terrain et *in vitro*), afin de déterminer la réponse de chaque composante et de leurs interactions et déduire ainsi la durabilité de la méthode. Différents sujets sont abordés. Tout d'abord, l'analyse physico-chimique et toxicologique des sols, afin de déterminer les conditions auxquelles *M. x giganteus* serait confrontée (soit, un scénario de friche) et d'évaluer ainsi toute modification induite par sa présence. De plus, les caractéristiques physiologiques ainsi que le devenir des ETM dans le système sol-plante seront étudiés pour connaître la performance de *M. x giganteus*. Finalement, l'analyse des bactéries du sol permettra d'élucider les associations possibles à l'égard de *M. x giganteus*, fournissant éventuellement la mise en place des mécanismes de phytoremédiation des sols pollués notamment en ETM.

## 2 Analyse bibliographique

### 2.1 *Miscanthus x giganteus*

#### 2.1.1 Caractéristiques générales

Les espèces de *Miscanthus* sont originaires des zones tropicales et subtropicales d'Asie de l'Est. Leurs distributions comprennent les îles du pacifique jusqu'aux régions montagneuses du Japon et de l'Himalaya (Greef et al. 1997). *M. x giganteus*<sup>1</sup> est introduite pour la première fois en Europe au Danemark par Aksel Olsen en 1935 (Greef et al. 1997; Clifton-Brown et al. 2001). La plus vieille culture européenne, âgée de 18 ans en 2003, se trouve au Danemark (Lewandowski et al. 2003). D'autres cultures sont aussi implantées en Allemagne, en Angleterre, en Autriche, en Espagne, en France, en Grèce, en Irlande, en Italie, en Lituanie, en Pologne et au Portugal (Scurlock 1999; Cappelletto et al. 2000; Lewandowski et al. 2000, 2003; Clifton-Brown et al. 2001; Kahle et al. 2001; Danalatos et al. 2007; Smeets et al. 2009).

*M. x giganteus*, qui appartient à la sous-famille *Andropogoneae* de la famille des *Gramineae*, semble être un hybride naturel de *Miscanthus sinensis* (diploïde,  $2n = 38$ ) et *Miscanthus sacchariflorus* (tétraploïde,  $2n = 76$ ) (Linde-Laursen 1993; Hodkinson et Renvoize 2001; Hodkinson et al. 2002; Lewandowski et al. 2003). En ce qui concerne le métabolisme, *M. x giganteus* utilise la voie de photosynthèse en  $C_4$  à enzyme malique NADP dépendante, comme le maïs par exemple (Naidu et al. 2003). Parmi les plantes en  $C_4$ , *M. x giganteus* présente une meilleure capacité d'adaptation aux conditions climatiques, notamment aux basses températures qui affectent peu son

---

<sup>1</sup> Différentes dénominations sont utilisées dans la littérature : *Miscanthus x giganteus* (abrégé : *M. x giganteus*, Mxg ou MxG), *Miscanthus 'Giganteus'*, *Miscanthus sinensis giganteus*, *Miscanthus sinensis 'Giganteus'*, *M. sinensis L. var. Giganteus*, *Miscanthus sinensis cv. giganteus*, *Miscanthus x giganteus* (Greef et Deu.), *Miscanthus x giganteus* (GREEF et DEU), *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu., *M. x giganteus* Greef et Deu., *M. x giganteus* Greef & Deuter ex Hodkinson & Renvoize, *Miscanthus* ou *miscanthus* tout simplement dans les documents concernant par exemple la production énergétique. Dans la suite de ce document, l'appellation *Miscanthus x giganteus*, soit *M. x giganteus*, sera utilisée pour se référer à la plante. Cependant, *Miscanthus* sera utilisé lorsqu'il y aura un doute sur la vraie correspondance avec *M. x giganteus*.

activité photosynthétique contrairement à *Zea mays* (Naidu et al. 2003) et une meilleure utilisation de l'eau avec des rendements supérieurs à *Spartina cynosuroides*, par exemple, pour des quantités d'eau équivalentes (Beale et al. 1999).

La culture de *M. x giganteus* est une culture pérenne, avec une durée de vie de 20 à 25 ans (Lewandowski et al. 2003). Toutefois, selon les caractéristiques climatiques, pédologiques et de relief, une période de 3 à 5 ans peut être nécessaire pour obtenir une culture de *M. x giganteus* pleinement établie (Kahle et al. 2001; Price et al. 2004; Miguez et al. 2008). Pendant la période de sénescence, l'azote (46 %), le phosphore (50 %), le potassium (30 %) et le magnésium (27 %) sont remobilisés depuis les feuilles et les tiges vers le rhizome puis sont réutilisés pour la production des nouvelles pousses au prochain cycle végétal (Beale et Long 1997; Himken et al. 1997; Jørgensen 1997; Kahle et al. 2001). Par ailleurs, la retombée des feuilles et de l'apex des tiges de *M. x giganteus* pendant la période de sénescence favorise la restitution des minéraux du sol utilisés pendant la croissance des plantes (Beale et Long 1997; Jørgensen 1997) : 94 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de potassium et 68 94 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> d'azote environ sont recyclés de la sorte dans le sol (Kahle et al. 2001). 60,7 % environ des pertes sont attribuées aux feuilles et 39,3 % environ aux tiges (Beuch et al. 2000). La décomposition des racines et des rhizomes morts contribue aussi au recyclage des nutriments dans le sol avec une mortalité de 1 à 4 % des rhizomes après 4 à 6 ans de culture pour environ 64 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de potassium et 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> d'azote (Kahle et al. 2001).

Kaack et Schwarz (2001) témoignent que la hauteur des plantes est d'environ 2 m au bout de 3 ans de culture. Nonobstant, la canopée de *M. x giganteus* peut arriver jusqu'à 3,5 ou 4 m de hauteur (Lewandowski et al. 2000, 2003). Le diamètre de la tige est de 10 mm environ (Defra 2007) et le nombre d'entrenœuds varie de 13 à 22 selon l'âge de la culture (Richter et al. 2009). D'autre part, les observations du système racinaire effectuées sur des cultures âgées aussi de 3 ans en sol sablo-limoneux indiquent la présence des racines jusqu'à 2,5 m de profondeur, avec une forte densité dans la couche superficielle du sol (de 0 à 30 cm) et un nombre majoritaire de racines entre 1 et 1,3 m de profondeur (Neukirchen et al. 1999). Cependant, sur des sols loameux grossiers, les racines grossières sont absentes à partir de 20 cm de

profondeur pour des cultures de *M. x giganteus* âgées de 9 et 16 ans (Hansen et al. 2004).

En terme de reproduction, *M. x giganteus* étant une espèce triploïde, ses graines sont stériles : la reproduction est uniquement possible grâce à la micro-propagation (*in vitro*) ou par la coupe de rhizome (macro-propagation) (Lewandowski 1998; Clifton-Brown et al. 2001). Les plantes provenant des cultures par micro-propagation développent plus de tiges mais moins fines que celles provenant de la coupe de rhizome ; néanmoins, ces différences diminuent avec l'âge de la culture (Lewandowski 1998). Il faut noter que, la mise en place de la culture en utilisant des rhizomes, en particulier en période de sénescence, est moins sensible aux conditions défavorables de croissance et favorise la survie des premiers rejets après la période hivernale (Venturi et al. 1998; Christian et al. 2009; Pyter et al. 2010).

*M. x giganteus* peut être cultivée sous différents conditions pédoclimatiques en Europe tout en gardant un rendement de production satisfaisant (9,5 à 38 t ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>). Sa productivité varie selon l'âge de la culture, la période de récolte et les conditions saisonnières (Himken et al. 1997; Jørgensen 1997; Cappelletto et al. 2000; Clifton-Brown et al. 2001; Kahle et al. 2001; Clifton-Brown et Lewandowski 2002; Danalatos et al. 2007; Christian et al. 2008). Si cette graminée s'adapte également à une large variété de sols (Cappelletto et al. 2000; Clifton-Brown et al. 2001; Kahle et al. 2001), la capacité de rétention d'eau du sol est le facteur limitant le plus important pour sa culture (Lewandowski et al. 2003; Defra 2007). Les meilleurs rendements s'obtiennent pour les cultures effectuées sur des sols ayant une bonne capacité de rétention d'eau (Lewandowski et Kicherer 1997; Kahle et al. 2001; Danalatos et al. 2007; Cosentino et al. 2007) alors que les sols sableux sont plus favorables pour la mise en place de la plantation (Lewandowski et al. 2003). Toutefois, *M. x giganteus* conserve un rendement élevé même dans des conditions très limitées de disponibilité de l'eau (Clifton-Brown et al. 2001).

Jørgensen (1997), Danalatos et collaborateurs (2007), et Christian et collaborateurs (2008) constatent que l'application de fertilisants n'affecte pas la croissance, ni la biomasse produite par *M. x giganteus*, ce dernier recyclant les nutriments lors des

phases de sénescence (Beale et Long 1997; Jørgensen 1997; Kahle et al. 2001). L'ajout de nutriment reste cependant envisageable (Cadoux et al. In Press; Lewandowski et Kicherer 1997; Kahle et al. 2001; Lewandowski et al. 2003; Christian et al. 2008).

### 2.1.2 Utilisation

Même si les premières plantes de *M. x giganteus* ont été utilisées à des fins ornementales, d'autres secteurs productifs leur ont trouvé un débouché commercial, notamment pour la fabrication des panneaux de particules (Kaack et Schwarz 2001), de géotextiles (Venturi et al. 1998) ou de pâte à papier (Cappelletto et al. 2000).

Actuellement, la culture de *M. x giganteus* a fortement augmenté en Europe depuis les années 1980 en raison de son rendement élevé et de l'utilisation de sa biomasse pour la production des agrocarburants (Clifton-Brown et al. 2001), contribuant à la diminution des émissions anthropiques en CO<sub>2</sub> (Lewandowski et al. 2003). Riche en lignine et en cellulose, *M. x giganteus* peut remplacer jusqu'à 50 % du charbon dans une centrale électrique ou une chaudière industrielle avec un bilan de carbone<sup>2</sup> globalement positif (Yuan et al. 2008) ; 22 000 tonnes de biomasse de *M. x giganteus* peuvent ainsi fournir assez d'électricité pour alimenter 2 000 foyers (Defra 2007) tout en ne produisant qu'une faible portion de cendres (Cappelletto et al. 2000). En comparaison aux autres plantes ligneuses, le bilan énergétique de *M. x giganteus* est de 250 – 550 GJ ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> contre 150 – 500 GJ ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> pour *Panicum virgatum* ou 150 – 250 GJ ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> pour *Populus*<sup>3</sup>. Par ailleurs, *M. x giganteus* présente aussi des rendements énergétiques plus élevés que ceux des cultures de plantes en C<sub>4</sub> comme le maïs (10 – 80 GJ ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>), la canne à sucre (55 – 80 GJ ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>) ou le sorgho (85 – 300 GJ ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>) (Harvey 2007).

La capacité de *M. x giganteus* à se développer sur des sols différents avec une production de biomasse importante se traduit par l'intérêt porté sur sa culture.

---

<sup>2</sup> Aussi connu comme bilan de dioxyde de carbone ; correspond à la quantité de CO<sub>2</sub> émis pendant la production et l'utilisation de la biomasse diminuée du carbone fixé par les parties aérienne et souterraine des plantes.

<sup>3</sup> Plus le bilan énergétique est élevé plus il est considéré comme économiquement et environnementalement durable.

D'une part, depuis la fin des années 1880, différents programmes européens ont souligné son attractivité dans les processus de combustion et d'autre part, *M. x giganteus* commence à apparaître comme une autre alternative à la réhabilitation des sols de friche en conservant la capacité d'utilisation de la biomasse produite, notamment dans la filière énergétique (Annexe 8.1).

### 2.1.3 Influence de la culture de *M. x giganteus* sur la qualité des sols

Globalement, d'un point de vue purement mécanique, la culture de *M. x giganteus* contribue à la réduction l'érosion des sols d'environ deux tiers ou plus (Lewandowski et al. 2003; Smeets et al. 2009).

D'un point de vue chimique, la culture de *M. x giganteus* semble être favorable à la séquestration du carbone dans le sol (Foereid et al. 2004). Hansen et collaborateurs (2004) constatent par exemple que, dans des cultures âgées de 9 et 13 ans au Danemark, 13 % et 36 %, respectivement, du carbone organique présent dans la couche superficielle du sol (0 – 20 cm de profondeur) dérivent de *M. x giganteus* et que le carbone présent entre 50 et 100 cm de profondeur proviendrait aussi *M. x giganteus* grâce au renouvellement des racines fines, la translocation des particules et la lixiviation des substances organiques depuis les couches supérieures. Par ailleurs, les résidus provenant de la biomasse aérienne constituent une source de carbone estimée à 3,1 t ha<sup>-1</sup> pour une culture de *M. x giganteus* entre 4 et 8 années de croissance (Beuch et al. 2000). Les teneurs en potassium et la capacité d'échange cationique sont aussi parfois améliorées selon la nature du sol (Beuch et al. 2000; Kahle et al. 2001). Par ailleurs, *M. x giganteus* semble s'associer avec un nouveau groupe bactérien nommé *Azospirillum doebereinae* sp. nov., capable de fixer l'azote, ce qui pourrait en partie expliquer l'absence de réponse de la plante à la fertilisation azotée (Eckert et al. 2001).

Du point de vue de la biodiversité, *M. x giganteus* favorise l'implantation de la végétation adventice en raison de sa croissance lente et sa faible densité de culture pendant les premières années d'installation (3 ans) avec toutefois une tendance à favoriser l'implantation des herbacées par rapport aux dicotylédones (Semere et Slater 2007a; b). Cette diversité favorise par la suite la présence des invertébrés,

comme les vers de terre (Felten et Emmerling 2011). *M. x giganteus* sert aussi d'abri à différentes espèces d'oiseau, non seulement pour la nidation mais aussi pour l'approvisionnement en aliments (e.g. invertébré, graines). Par ailleurs, les risques invasif restent très limités pour *M. x giganteus* de part la stérilité de ses graines et la lenteur de la croissance de son rhizome (Britt et al. 2002; Pyter et al. 2010).

#### 2.1.4 *M. x giganteus* et les éléments traces métalliques

Comme toute culture de végétaux sur des sols dégradés, l'utilisation de *M. x giganteus* doit se faire avec précaution en particulier lorsque les sols sont pollués : la dynamique des polluants vis-à-vis du sol doivent être considérée notamment ceux qui ne peuvent pas être minéralisés comme les éléments traces métalliques (ETM). D'autres risques associés à la croissance de plantes sur des sols pollués peuvent être inclus comme l'entrée des ETM dans la chaîne alimentaire (Wong 2003; Breure et al. 2008), la modification de leurs biodisponibilités et spéciation chimique en raison de l'effet de la rhizosphère au détriment des autres espèces présentes (Yang et al. 2005; Cattani et al. 2006; Kidd et al. 2009), ou la pollution des eaux souterraines due au lessivage des polluants (Ernst 1996; Yang et al. 2005; Nagendran et al. 2006; Neagoe et al. 2009).

De plus, s'agissant d'une plante dont la biomasse a vocation à être revalorisée principalement sous forme énergétique, il convient de veiller à la non remobilisation des polluants vers différents compartiments de l'environnement. La dynamique des métaux bioaccumulés doit donc être évaluée : transferts de métaux par les gaz de combustion (Britt et al. 2002) ceci même dans l'éventualité où des mesures correctives peuvent être mises en place pour limiter la diffusion des polluants (filtres en sortie d'unités de combustion par exemple) (Lewandowski et al. 2006), production de cendres contenant des ETM souvent traités par enfouissement technique (Britt et al. 2002; Johannesson et al. 2002).

Les premières études réalisées sur *M. x giganteus* en milieu hydroponique font état d'une altération de la production de biomasse aérienne (diminution de croissance de la tige principale et des tiges secondaires, augmentation du nombre de feuilles mortes) à partir 0,75 mg L<sup>-1</sup> de cadmium avec un développement végétal stoppé au-

delà de 3 mg L<sup>-1</sup> de cadmium (Arduini et al. 2004, 2006a) ou de 150 mg L<sup>-1</sup> de chrome (Arduini et al. 2006b). L'arsenic réduit aussi la capacité de croissance de *M. x giganteus* cultivé sur sols pollués ; cependant, ce phénomène est contrebalancé par les apports de carbone lors d'amendement des sols par des déchets verts (Hartley et al. 2009). Pour la partie souterraine, si des changements de la morphologie racinaire (*i.e.* diminution de la longueur, la surface et le volume, accompagné de l'augmentation du diamètre moyen des racines) sont parfois observés pour de faibles doses de cadmium ou de fortes doses de chrome ([Cd] < 0,75 mg L<sup>-1</sup> ; [Cr] > 100 mg L<sup>-1</sup>), la biomasse racinaire n'est pas affectée (Arduini et al. 2004, 2006b). Concernant d'autres effets physiologiques, l'exposition au cadmium ne fait pas varier la concentration en azote dans les différentes parties de *M. x giganteus*, contrairement au chrome qui inhibe l'absorption et translocation de l'azote dans la plante.

L'absorption du cadmium par *M. x giganteus* semble se faire par voie passive en fonction de la dose appliquée. La concentration en cadmium et sa teneur dans la plante présentent l'ordre suivant : rhizome >> racines > tige > feuilles ; avec plus de 73 % du cadmium total absorbé contenu dans la partie souterraine. L'absorption du cadmium et sa translocation vers la partie aérienne semble principalement influencée par : la biomasse aérienne, le flux de transpiration et la barrière de l'endoderme mais aussi le rhizome. En effet, les teneurs en cadmium dans la biomasse aérienne sont 10 fois plus importantes quand la masse des rhizomes passe de 5 g à 20 g.

Quant au chrome, si la quantité stockée augmente aussi avec la dose appliquée, 90 à 95 % du chrome total est principalement localisé dans la partie souterraine, le reste se répartissant dans les feuilles mortes (mécanisme de détoxification), puis les tiges et les feuilles vertes. Finalement, le taux de translocation du chrome vers la partie aérienne devient nul pour les fortes doses, ce qui laisse supposer une adaptation du métabolisme de la plante visant à réduire la translocation du Cr (chute des feuilles, mécanismes moléculaires de séquestration dans les racines).

La teneur en arsenic dans la partie aérienne des plantes reste par contre dans l'ordre de grandeur des teneurs observées sur des plantes cultivées sur des sols non pollués.

Concernant les autres ETM, Hartley et collaborateurs (2009) indiquent que les teneurs dans la partie aérienne de *M. x giganteus* en cuivre, zinc et nickel sont semblables à celle d'une plante cultivée sur sol non pollué. Cependant, 40 % de ces éléments sont liés aux carbonates présents dans les sols, ce qui limite leur mobilité et atténue les effets délétères sur le végétal. Par ailleurs, l'âge de culture peut aussi influencer l'assimilation des ETM : la teneur en Zn dans la biomasse de la plante semble diminuer avec la maturation de la culture, contrairement au Cu qui semble plutôt augmenter dans la plante au cours du temps (Jones et Walsh 2001).

La production de biomasse (*i.e.* cultures énergétiques) sur des terres dégradées ou polluées présente plusieurs avantages en tant que moyen de restauration de sites contaminés (Britt et al. 2002). Toutefois, malgré l'avancement des travaux concernant la réponse de *M. x giganteus* aux pollutions métalliques, ces études restent encore limitées. Il convient en particulier de considérer que la prévention, l'évaluation des risques et l'assainissement des pollutions du sol sont indissociables de la mise en œuvre de leur remédiation (Ernst 1996; Gupta et al. 1996; Yang et al. 2005; Nagendran et al. 2006; Neagoe et al. 2009; Prasad et al. 2010). Il est donc nécessaire, avant toute action, de procéder à l'évaluation du milieu afin de mesurer le rapport risque / bénéfice de la phytoremédiation.

## 2.2 Le sol et la réhabilitation des sols pollués en éléments traces métalliques

### 2.2.1 Le sol : une ressource non renouvelable

**Le terme « sol »** est défini de plusieurs manières selon la discipline et le contexte de l'époque. Du point de vu des géologues, le sol est considéré comme la partie superficielle des roches altérée par les agents climatiques, biologiques et anthropiques (Calvet et Mariotti 2003) ; cependant, en pédologie, le sol est « un objet naturel<sup>4</sup>, continu et tridimensionnel » formé de constituants minéraux et organiques, présents à l'état solide, liquide ou gazeux, et organisés pour former des « structures » spécifiques (Baize et al. 1992). Si la première définition accentue le

---

<sup>4</sup> C'est-à-dire, dont l'existence initiale ne dépend pas de l'être humain.

caractère évolutif et stratifié du sol et la deuxième rappelle sa propriété multiphasique ; ces définitions, bien que complémentaires, excluent l'importance des composantes biotiques (Jenny et Stuart 1984).

**Les phases solides, liquides et gazeuses** varient d'un type de sol à un autre, mais aussi au cours du temps et des épisodes climatiques. La phase solide est constituée d'une fraction minérale dont les fragments de roches et grains minéraux dépendent en taille et en nature du type et du niveau d'altération de la roche mère, et d'une fraction organique minoritaire régulièrement renouvelée. L'arrangement de cette phase solide ménage des pores, lesquels seront occupés soit par la « solution du sol » (eau et substances dissoutes), soit par une phase gazeuse (Stengel et Gelin 1998; Calvet et Mariotti 2003).

*La fraction minérale* se divise en fonction de la taille des composants. Ceux de taille supérieure à 2 mm (pierres, cailloux, graviers, etc....) sont souvent considérés comme chimiquement peu réactifs bien que ceci puisse être modulé selon la composition minéralogique, l'état d'altération et les phénomènes de météorisation accélérée de ces éléments grossiers (Ugolini et al. 1996). Par contre, ces éléments conditionnent différents phénomènes comme le drainage (Gras 1994; Brakensiek et Rawls 1994), la germination, la levée des plantules ou l'enracinement des végétaux (Gras 1994; Lucot et Gaiffe 1995).

Quant aux composants minéraux inférieurs à 2 mm, ils englobent les sables (taille entre 2 mm et 50  $\mu\text{m}$ ), les limons (taille entre 50  $\mu\text{m}$  et 2  $\mu\text{m}$ ) et les argiles (taille < 2  $\mu\text{m}$ ) (AFNOR 1996). Les sables et limons ont aussi peu de charges électriques et une faible surface spécifique ; ce sont souvent des quartz, des feldspaths ou des carbonates. Par contre, les argiles présentent une réactivité chimique importante du fait de leur structure, dont l'unité de base est un feuillet constitué par la superposition d'au moins deux couches tétraèdres de silicium ou d'octaèdres d'aluminium. Ces feuillets sont séparés par des espaces interfoliaires occupés par des cations secs ou hydratés et par de l'eau si les feuillets présentent une charge (Stengel et Gelin 1998). Les proportions relatives en sables, limons et argiles définissent la texture du sol (Jamagne 1967), laquelle détermine certaines propriétés

du sol : les sables et les limons améliorent la porosité, traduit par une augmentation de la perméabilité et les lieux aptes aux phénomènes de transport de différentes natures (eau, éléments dissous, gaz, chaleur), tandis que les argiles favorisent la rétention et l'échange des ions (Peveřill et al. 1999; Beylich et al. 2010).

*La fraction organique* fait référence aux résidus des organismes accumulés dans le sol après la mort ainsi que les produits des transformations chimiques, physiques et biologiques de la matière organique. Parmi ces produits, l'humus correspond à la matière organique du sol décomposée et non identifiable à l'œil par sa forme. Selon le procédé d'extraction utilisé, trois types de substances humiques peuvent être distingués dans l'humus : les humines (insolubles dans les alcalins et les acides), les acides humiques (solubles dans les alcalins et insolubles dans les acides) et les acides fulviques (solubles dans les alcalins et les acides) (Pavel 2003). Ces macromolécules de poids moléculaire élevé, portent une grande variété de groupements fonctionnels (carboxyles, hydroxyles, phénols) qui leur confère une capacité d'échange de cations supérieure à celle des argiles mais qui varie en fonction de l'acidité du milieu (Stengel et Gelin 1998). Les substances humiques améliorent la structure du sol en augmentant la stabilité des agrégats ce qui peut réduire les taux d'infiltration et les croûtes de battance accrue, éviter l'érosion accélérée due aux eaux de ruissellement (Piccolo et al. 1997). De plus, les substances humiques stimulent la croissance des cellules végétales et le développement de la plante. Cet effet semble essentiellement s'exercer sur les fonctions de la membrane cellulaire, favorisant l'absorption des nutriments par exemple (Nardi et al. 2002).

**Les phases liquides et gazeuses** du sol sont des indicateurs de sa fertilité physique. Leur proportion doit être équilibrée dans le sol : un stockage élevé de l'eau signifie souvent un stockage bas d'air et, en cas de saturation, entraîner une anoxie qui modifie les transformations chimiques et l'activité des organismes présents (Peveřill et al. 1999; Calvet et Mariotti 2003).

**Entre ces différentes phases**, un équilibre entre les concentrations des composés qu'elles contiennent (composés organiques volatiles, CO<sub>2</sub>, etc.) déterminera la capacité de leur diffusion (Fischer et al. 1998). Les interactions des trois phases du sol

(i.e. solides, liquides et gazeuses) donnent lieu à des nombreuses réactions chimiques essentielles aux processus naturels. L'interphase solide-liquide est le lieu des réactions d'adsorption et de désorption, de précipitation et de dissolution. Ces réactions qui peuvent se produire simultanément ou indépendamment en fonction de l'hétérogénéité du sol et des conditions du milieu, influent la richesse de la solution de sol en éléments nutritifs ou (Stengel et Gelin 1998; Peverill et al. 1999; Calvet et Mariotti 2003). Outre les réactions chimiques présentes entre les différentes phases du sol, de nombreux microorganismes sont hébergés et jouent un rôle fondamental dans la dynamique du sol (tableau 1).

Tableau 1. Type et abondance des organismes vivants dans le sol (Stengel et Gelin 1998).

	Nombre (N/g sol)	Biomasse (kg / ha)
Bactéries	$10^6 - 10^{10}$	300 – 3 000
Actinomycètes	$10^5 - 10^7$	50 – 500
Champignons	$10^4 - 10^6$	500 – 5 000
Protozoaires	$10^4 - 10^5$	7 – 200
Algues	$10^3 - 10^5$	50 – 200
Faune	$10^3 - 10^4$	500 – 2 000 (vers de terre)
La microflore peut représenter une à quelques tonnes de matière sèche par ha de terrain		

**La fraction biologique** du sol doit donc être associée aux propriétés physico-chimiques afin de déterminer la qualité du sol (Ritz et al. 2009). Cependant, les propriétés biologiques ont reçu moins d'attention, car leurs effets sont difficiles à mesurer, à prévoir, ou à quantifier (Parr et al. 1992; Breure et al. 2005).

Les organismes sont les responsables du travail du sol ainsi que de sa fertilisation : vers de terre, mycètes, bactéries, végétaux pour ne citer que quelques exemples (Oades 1993; Naidu 2008). La plupart des services écosystémiques fournis par les sols dépendent souvent des organismes qui y habitent (Tableau 2). La présence des vers de terre favorise l'aération et l'infiltration de l'eau dans le sol, ce qui bénéficie à l'activité microbienne et la croissance racinaire. De plus, en se nourrissant des déchets des végétaux présents à la surface, ils contribuent à la redistribution de la matière organique et des nutriments. Pour leur part, les bactéries et les mycètes vont

mettre à disposition : les nutriments contenus dans la matière organique (*e.g.* N, P, S, éléments en trace), les minéraux (*e.g.* K, Mg, Ca, Fe) ou les composés gazeux (*e.g.* fixation du N). Bactéries et mycètes sont les organismes les plus présents dans le sol, chaque espèce jouant un rôle particulier.

Tableau 2. Exemples du biote du sol lié aux processus écologiques et propriétés, suivant la fonction du sol étudiée (Ritz et al. 2009).

Fonction du sol	Processus écologiques et propriétés	Exemples du biote du sol lié
Production alimentaire et fibres	Cycle du C	Biomasse microbienne, méthanogènes
	Décomposition de la matière organique	Microarthropodes, champignons saprotrophes
	Cycle du N	Nitrifiants, dénitrifiants
	Cycle du P	Phosphatase, mycorhize
	Cycle du S	Bactéries réductrices de soufre Rhizobia
	Fixation de N	Structure et activité des communautés microbiennes
	Activité primaire (microbienne)	Communauté microbienne et la structure du réseau trophique
	Transferts trophiques du sol	Prédateurs, pathogènes
	Maladies et ravageurs de transmission / suppression	Mycorhizes, fixateurs d'azote
	Approvisionnement en éléments nutritifs à partir des symbioses	Vers de terre, fourmis
Redistribution par bioturbation Bio-agrégation des sols	Champignons, vers	
Interactions de l'environnement	Dégradation / immobilisation des polluants	Champignons, vers
	Rétention / libération du C	Biomasse microbienne, méthanogènes
	Rétention / libération du N	Nitrifiants, dénitrifiants
	Rétention / libération du P	Activité microbienne, mycorhizes
	Tolérance / résistance (toxines)	Structure et activité des communautés du sol
	Rétention / libération du S	Bactéries réductrices de soufre
	Redistribution par bioturbation Bio-agrégation des sols	Vers de terre, fourmis Champignons, vers
Soutient des habitats et de la biodiversité	Habitat pour les espèces rares du sol	Champignons bouchon de cire, fourmi du bois du sud
	Zone de germination des plantes	Racines des plantes, mycorhizes
	Approvisionnement en éléments nutritifs à partir des symbioses	Mycorhize
	Source de nourriture (en surface)	Champignons, insectes
	Réservoir de biodiversité des sols (taxonomie)	Espèces et diversité des sols
	Réservoir pour la biodiversité des sols (génétique)	Communauté ADN et l'ARN
	Réservoir de biodiversité des sols (fonctionnelle).	Nitrifiants, la structure trophique, vers

Les nombreuses interactions entre les éléments physico-chimiques et biologiques du sol, sa complexité structurelle et fonctionnelle ainsi que sa fragilité (European Commission 2002, 2006), ont conduit la Commission Européenne à définir le sol suivant une approche écologique et écosystémiques :

*« Le sol est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre. Il est constitué de particules minérales, de matières organiques, l'eau, l'air et les organismes vivants. Il est en fait un milieu extrêmement complexe, variable et vivant. L'interface entre la terre, l'air et l'eau, le sol est une ressource non renouvelable qui remplit de nombreuses fonctions vitales [...]. Ces fonctions sont dignes de protection en raison de leur importance socio-économique et environnementale. » (European Commission 2012)*

Cependant, l'utilisation inadaptée des terres et les pratiques inappropriées de gestion peuvent entraîner la dégradation des sols et de leurs fonctions (Figure 1), parfois amplifiée par les phénomènes naturels (facteurs topographiques, climatiques, etc.) (Ballayan 2000; Eswaran et al. 2001).

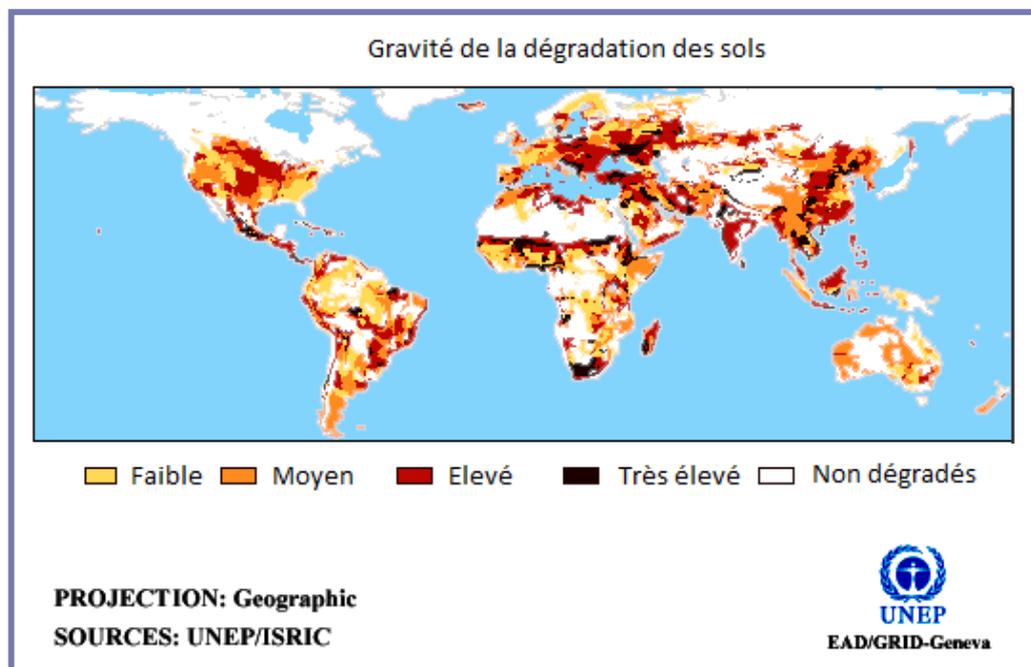


Figure 1. Carte du monde de l'état des sols dégradés par l'activité humaine.  
(Source : [http://www.grid.unep.ch/GRID\\_search\\_details.php?dataid=GNV18](http://www.grid.unep.ch/GRID_search_details.php?dataid=GNV18))

La détérioration chimique du sol (*i.e.* perte des nutriments, salinisation, pollution et acidification) couvre environ 239 Mha au niveau mondial, soit 12 % de la superficie totale affectée par la dégradation des sols d'origine anthropique. Environ 18,6 Mha des terres européennes sont détériorées par une dégradation chimique de type « Pollution » (accumulation des déchets industriels ou urbains, utilisation excessive de pesticides, acidification par les polluants atmosphériques, fumure excessive, déversements de pétrole) parmi lesquelles 4,1 Mha présentent un degré léger de dégradation, 14,3 Mha un degré modéré, 0,1 Mha sont fortement dégradées (Oldeman et al. 1990). Ces altérations réduisent la productivité et les fonctions originelles du sol et requérent parfois une intervention pour restaurer le terrain.

Le projet GLASOD (Global Assessment of Soil Degradation) proposé par le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) identifie cinq différentes causes d'intervention physique humaine entraînant la dégradation des sols : (i) la déforestation et la suppression de la végétation naturelle, (ii) le surpâturage de la végétation ou le surpâturage de la végétation par le bétail, (iii) les activités agricoles, soit une mauvaise gestion des terres agricoles, (iv) la surexploitation de la couverture végétale pour l'usage domestique, et (v) des activités (bio)industrielles menant à la pollution chimique. On note que si les activités (bio) industrielles jouent globalement un rôle mineur dans la dégradation des sols, 21 millions d'hectares se situent en Europe, sur les 23 millions d'hectares au monde, montrant l'importance sociétale des espaces dégradés sur ce continent (Tableau 3). Ceci est accentué par la localisation de ces espaces souvent positionnés à proximité des zones d'habitation jouxtant les anciens sites de développement industriel (Dyraga 2011; Fagiewicz 2011).

Tableau 3. Facteurs causaux de la dégradation des sols, exprimés en millions d'hectares de terrains affectés (Oldeman et al. 1990).

	Déforestation	Surpâturage	Mauvaise gestion agricole	Surexploitation	Activités (bio)industrielles
Afrique	66	243	121	63	+
Asie	298	197	204	46	1
S. Amérique	100	68	64	12	-
N. et C. Amérique	18	38	91	11	+
Europe	84	50	64	1	<b>21</b>
Australasie	12	83	8	-	+
<b>Monde</b>	<b>579</b>	<b>679</b>	<b>552</b>	<b>133</b>	<b>23</b>

## 2.2.2 La pollution des sols par les éléments traces métalliques

### 2.2.2.1 L'origine des pollutions métalliques

Si 99,4 % de la croûte terrestre est constitué d'éléments majeurs (*i.e.* O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P, Mn), le reste est représenté par l'ensemble des éléments traces (0,6 %). Ces éléments regroupent 68 éléments inorganiques (métaux et métalloïdes) présents normalement dans le sol en faibles concentrations, *i.e.* < 0,1 % pour chacun d'entre eux. Ces composés résultent de l'évolution géologique et pédologique du sol aboutissant à des concentrations « naturelles » dans un horizon de sol, souvent dénommées « fond pédogéochimique naturel local » (Baize 1997). Quelques sources naturelles d'émission des éléments traces métalliques (ETM) peuvent être mentionnées : les éruptions volcaniques, les incendies, les embruns océaniques (Nagajyoti et al. 2010).

Les activités humaines représentent cependant la plus forte contribution d'ETM aux pollutions métalliques (Tableau 4) (Nagajyoti et al. 2010). Les sols, « réacteurs biogéochimiques complexes » (Bourrelier et al. 1998), sont souvent les récepteurs privilégiés des pollutions, capables de devenir eux même une source de pollution en libérant les composés stockés vers les autres compartiments environnementaux (eaux de surface ou souterraines, atmosphère) exposant les organismes qu'ils abritent (Prokop et al. 2000; Ali et al. 2004) ; tout ceci est aggravé par la persistance des ETM dans l'environnement (Yang et al. 2005).

Tableau 4. Exemples des pollutions associées aux ETM et autres métalloïdes dérivés de l'activité humaine (O'Connell et al. 2008).

Industrie	ETM	Pollution résultante	Référence
Mines métallifères	Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn	Drainage miniers acides, résidus, terrils	Babich et al. (1985), Aswathanarayana (2003)
Matériaux agricoles Fertilisant	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn	Ruissellement, pollution des eaux superficielles et souterraines, bioaccumulation par les plantes	Nicholson et al. (2003) Otero et al. (2005)
Boues d'épuration engrais	Zn, Cu, Ni, Pb, Cd, Cr, As, Hg	Menace pour l'épandage des eaux souterraines et de surface	Nicholson et al. (2003) Cheung and Wong (1983) Walter et al. (2006)
Industries métallurgiques Spécialiste d'alliages et de l'acier	Pb, Mo, Ni, Cu, Cd, As, Te, U, Zn	Fabrication, l'élimination et le recyclage des métaux. Terrils de résidus miniers et des scories	Alloway and Ayres (1993) Rule et al. (2006) Cheng (2003)

Industrie	ETM	Pollution résultante	Référence
Elimination des déchets Lixiviats de décharge	Zn, Xu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg	Lixiviats de décharge, pollution des eaux souterraines et de surface	Kjeldson et al. (2002) Fernandez et al. (2005)
Electronique	Pb, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Aqueux et des déchets solides métalliques provenant de la fabrication et le recyclage de processus	Veglio et al. (2003)
Industrie des métaux de finition Galvanoplastie	Cr, Ni, Zn, Cu	Les effluents liquides des processus de placage	Castelblanque and Salimbeni (2004) Zhao et al. (1999) Alvarez-Aynuso et al. (2003)
Sources diverses Batteries	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Déchets de liquide de batterie, pollution des sols et des eaux souterraines	EU Directorate general of the Environment (2004)
Peintures et pigments	Pb, Cr, As, Ti, Ba, Zn	Déchets aqueux provenant de la manufacture, détérioration de la peinture ancienne et pollution du sol	Davis and Burns (1999) Barnes and Davis (1996) Monken (2000)

En ce qui concerne la France, les travaux réalisés par la direction de la prévention des pollutions et des risques en 1996, constatent que le plomb, le zinc, le chrome et le cuivre sont parmi les ETM les plus fréquemment présents dans les 756 sols étudiés, avec respectivement 20 %, 15 %, 15 % et 11 % des cas (Bourrelrier et al. 1998).

#### 2.2.2.2 Formes des éléments traces métalliques dans la matrice du sol

La teneur totale en ETM permet de définir l'étendue du métal et le niveau de pollution du sol, mais elle ne donne pas l'information nécessaire pour déterminer la mobilité, la biodisponibilité et finalement l'impact des éléments dans l'écosystème (Gupta et al. 1996; Michalke 2003). En effet, à la différence des polluants organiques, les ETM ne sont pas minéralisés ou dégradés pour devenir des composés moins complexes<sup>5</sup>. Cependant, leur spéciation chimique (*i.e.* forme spécifique de l'élément définie par sa structure moléculaire ou la manière dont il est complexé, ou l'état d'oxydation), leur fractionnement (*e.g.* grosseur des particules) et leur partition (*i.e.* répartition entre les phases aqueuse, solide ou gazeuse, complexés à la matière organique) dans le sol peuvent changer. Ceci conditionne les transferts des ETM dans les milieux (mobilité) ou vers les organismes (biodisponibilité) (Figure 2) (Michalke 2003; Han et al. 2003; Adriano et al. 2004; Luo et al. 2006). La mobilité est définie

<sup>5</sup> Toutefois, il existe des polluants organiques persistants (Lohmann et al. 2007)

comme l'aptitude d'un élément à passer d'un compartiment du sol où il est retenu dans un autre compartiment. Par contre, la biodisponibilité est l'aptitude d'un élément à passer d'un compartiment quelconque du sol dans un être vivant (*e.g.* bactérie, végétal, être humain). Mobilité et biodisponibilité caractérisent tous deux un potentiel de transfert plus qu'un transfert effectif (Baize 1997). Tessier et collaborateurs (1979) sont parmi les premiers à avoir étudié le partitionnement des ETM dans les différentes formes chimiques, capables d'être libérées dans la solution du sol sous différentes conditions environnementales. Ils distinguent 5 fractions : (i) la fraction échangeable, (ii) la fraction liée au carbonates, (iii) la fraction liée aux oxydes de fer et manganèse, (iv) la fraction liée à la matière organique et (v) la fraction résiduelle (Tessier et al. 1979).

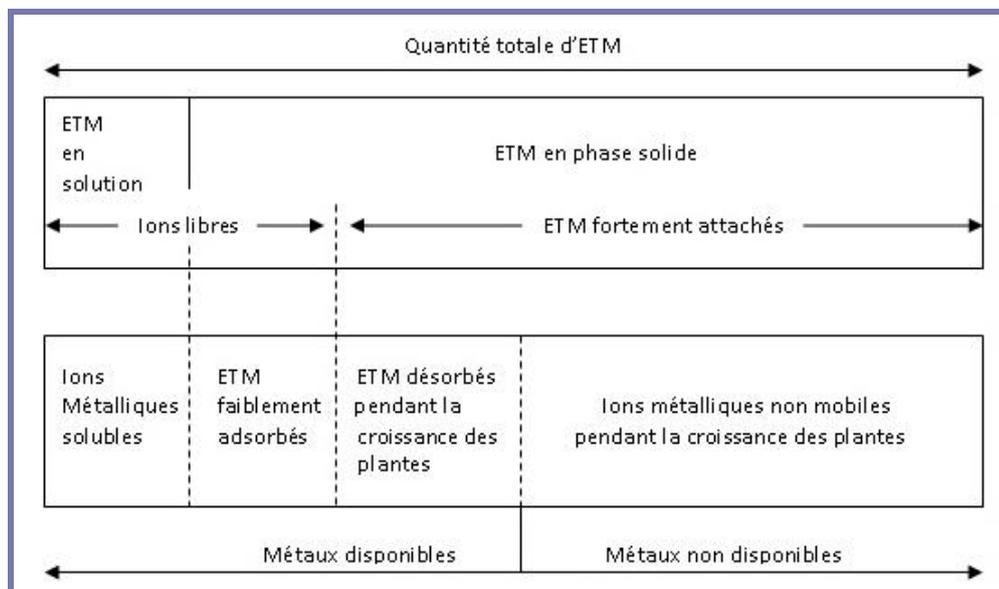


Figure 2. Disponibilité des éléments trace métalliques (ETM) dans le sol. (Tarradellas et al. 1997)

Plus globalement, les ETM sont distribués en différentes fractions dans le système sol : non labile (*i.e.* inactifs et inertes), potentiellement mobiles (*i.e.* capables de se solubiliser, biodisponibles) et mobiles (*i.e.* lessivables). Ces trois fractions demeurent dans un constant mais fragile équilibre dans le milieu, résultat des processus physico-chimiques et biochimiques inhérents de la dynamique du système sol (Gupta et al. 1996; Tarradellas et al. 1997; Bourrelier et al. 1998; Pathak et al. 2009).

Les extractions des ETM à partir des différentes fractions du sol sont souvent utilisées pour prédire la quantité d'éléments qui peut être potentiellement absorbée par les organismes exposés (Peijnenburg et al. 2007; Meers et al. 2007). Cependant, la fraction des ETM contenus dans la solution du sol, est considérée comme la principale source d'exposition des plantes et des organismes. Cette fraction mobile correspond plus particulièrement aux ETM faiblement adsorbés à la surface de la phase solide du sol (retenus par des faibles interactions électrostatiques) qui peuvent être libérées par des processus d'échange cationique qui constitue le principal facteur régulant l'exposition des éléments vivants du sol. A l'exception des argiles, qui présentent toujours une charge négative quelle que soit l'acidité du sol, celle des autres constituants peut varier. La charge des oxydes et oxyhydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse, varie selon l'acidité (*i.e.* pouvant être positive, neutre ou négative) en raison du caractère amphotère des groupements OH de surface (Brown Jr. et Calas février; Stengel et Gelin 1998; Jonušaitė et al. 2004). La présence des carbonates associée à des conditions alcalines du sol, peut contribuer à l'augmentation des phénomènes de sorption des ETM sur les particules minérales et favoriser leur précipitation (de Matos et al. 2001; Lafuente et al. 2008; Sipos et al. 2008).

La répartition des ETM dans les différentes fractions du sol est donc « éphémère ». Les substances humiques ont un rôle important dans le transport des ETM dans le sol : mobilité, concentration des ions métalliques libres dans la solution du sol et les eaux de surface ou souterraine (Campanella et al. 1995; Sauvé et al. 2000; Koopal et al. 2001; Luo et al. 2006). En effet, si les ETM sont fortement liés à la matière organique mobile, leur transport dans l'environnement est favorisé (transport colloïdal) ; dans le cas inverse (matière organique indissoluble, particules minérales, ou matière organique soluble mais liée aux particules minérales), les ETM ne seront pas mobiles. Simultanément, les matières organiques participent à la variation de la biodisponibilité des éléments suivant la force du complexe organo-minéral. Ceci peut intervenir dans des processus métaboliques comme la production des phytochélatines (Figuroa et al. 2008) ou la bioaccumulation des ETM par les vers de terre par exemple (Hobbelen et al. 2006).

L'ensemble des facteurs physico-chimiques du sol ainsi que son activité biologique conditionnent donc la dynamique des ETM, à savoir le passage des éléments liés à la phase solide vers la fraction liquide du sol ou vice-versa, et en conséquence, leur incidence dans l'écosystème (Tarradellas et al. 1997; Bourrelier et al. 1998; Hund-Rinke et Kördel 2003; Moreno-Jiménez et al. 2009). Il est nécessaire de compléter les outils physico-chimiques avec des dosages biologiques (*i.e.* organismes du sol et plantes concernés), les extractions utilisées pour l'analyse des ETM dans les différentes fractions du sol ne pouvant pas refléter la variété des processus naturels du système « sol / microorganismes / plantes » (Peijnenburg et al. 2007).

### **2.2.3 La réhabilitation des friches**

#### *2.2.3.1 Les friches en France*

Une friche est un espace laissé à l'abandon, temporairement ou définitivement, à la suite de l'arrêt d'une activité agricole, portuaire, industrielle, de service, de transformation, de défense militaire, de stockage, de transport. Ces sites ont des tailles extrêmement variables, peuvent être bâtis ou non. Ils sont souvent localisés à proximité ou dans des zones urbaines développées (Prokop et al. 2000; Thornton et al. 2007; ADEME 2010). Parmi ces friches, certaines présentent des zones polluées répertoriés dès le début des années 1978, avec l'élaboration d'inventaires nationaux des sites pollués dont BASIAS (banque de donnée d'anciens sites industriels et activités de services) et BASOL (base de données sur les sites et sols pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif) (Prokop et al. 2000). Malgré cela, ce n'est qu'à partir du début des années 1990 que les sites pollués sont pris en compte par la réglementation au travers de circulaires (*i.e.* circulaire ministérielle du 3 décembre 1993, circulaire du 3 avril 1996, circulaire 10 décembre 1999, circulaire du 8 février 2007).

En ce qui concerne la région Lorraine, région au passé industriel marqué par l'exploitation du charbon, du fer et du sel (Garcier 2005), la première étude historique réalisée par F. OGE pour l'ADEME, a permis de recenser 30 000 sites industriels potentiellement pollués (BRGM 1996). Plus récemment, les inventaires historiques des anciens sites industriels et activités de service, effectués par les

différents départements de la région, ont recensé : 5 416 sites pour le département de Meurthe-et-Moselle (BRGM 2007), 5 076 sites pour le département de la Moselle (BRGM 2006), 4 069 sites pour le département des Vosges (BRGM 2009) et 2 717 sites pour le département de la Meuse (BRGM 2010). En 2005, la liste BASIAS référence 9 sites du département de Meurthe et Moselle, 13 sites du département de la Moselle et 5 sites du département de la Meuse, l'ensemble de ces sites devant être pris en charge (*i.e.* diagnostic, surveillance, réhabilitation) par les pouvoirs publics afin de prévenir et maîtriser les risques pour l'environnement et les populations (MEDDTL 2005). La base de données BASOL liste par contre actuellement 386 sites pour la région Lorraine (MEDDTL 2012a) avec une classification en : sites mis en sécurité et/ou devant faire l'objet d'un diagnostic (blanc), site en cours d'évaluation (rouge), site en cours de travaux (orange), site traité avec surveillance et/ou restriction d'usage (bleu), et site traité et libre de toute restriction (vert) (Tableau 5).

Tableau 5. Répartition départementale des sites BASOL lorrains suivant leurs l'état.

Département	Total sites BASOL	Etat du site BASOL				
		Blanc	Rouge	Orange	Bleu	Vert
Moselle	182	14	36	26	74	22
Meurthe-et-Moselle	108	6	18	9	56	14
Vosges	70	5	12	6	32	11
Meuse	26	1	2	5	12	6

Parmi les ETM les plus observés sur les sites BASOL de la région Lorraine se trouvent le plomb (26,2 % des sites), le cuivre (21,5 % des sites), le chrome (20,7 % des sites), le zinc (17,1 % des sites), le nickel (14,2 % des sites), le cadmium (8 % des sites) ; d'autres éléments sont également observés, mais en moindre proportion, comme le mercure, le molybdène et le cobalt (avec 5,7 %, 1,0 % et 0,8 % des sites, respectivement) (MEDDTL 2012a). Plus de la moitié de ces sites sont localisés en Moselle (Tableau 6) (MEDDTL 2012b).

Tableau 6. Pourcentage des sites BASOL lorrains localisés dans le département de la Moselle suivant leur pollution en ETM.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Nb. de sites de la région Lorraine	31	80	83	55	101	66
Nb. de sites du département de la Moselle	24	48	48	38	58	36
% des sites en Moselle	77,4 %	60,0 %	57,8 %	69,1 %	57,4 %	54,5 %

Par ailleurs, il est nécessaire de noter que les pollutions sont souvent multiples, impliquant plusieurs métaux voire d'autres composés carbonés notamment. En considérant uniquement les pollutions multiples impliquant les principaux ETM (*i.e.* Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn), on retrouve 10 sites BASOL en Lorraine dont 8 se situent en Moselle. Ces sites sont classés soit en évaluation (5 sites en Moselle parmi les 5 sites lorrains), soit traités avec surveillance et/ou restriction d'usage (2 sites mosellans parmi les 4 sites présents en Lorraine), soit mis en sécurité et/ou devant faire l'objet d'un diagnostic (1 site mosellan). En incluant des polluants organiques, par exemple une pollution mixte en ETM et HAP, 112 sites sont répertoriés en Lorraine, avec 61 sites pour le département de la Moselle.

### 2.2.3.2 *Politique de gestion des sols pollués*

En France, avant les années 1990, la politique nationale s'intéressait aux sites potentiellement pollués, les cas les plus graves étant identifiés comme « points noirs » et soumis à une intervention de dépollution ou remise en état en vue du réaménagement du site (loi n°2003-699 du 30 juillet 2003, article 33). Cette politique s'est infléchie à la fin des années 1990 vers une politique de gestion des risques en fonction de l'usage : le traitement de chaque site doit dépendre de son impact effectif sur l'environnement et de l'usage auquel il est destiné, sans obligatoirement viser une dépollution systématique (circulaire du 8 février 2007). On peut remarquer que la France figure parmi les premiers pays européens (avec le Royaume-Uni et l'Allemagne) ayant mis en place des initiatives favorisant la politique régionale concernant les friches et la création de programmes spécifiques pour le recyclage des terrains abandonnés. Depuis 2002, elle adhère au projet RESCUE (Regeneration of

European Sites in Cities and Urban Environments)<sup>6</sup> qui intègre le concept de durabilité dans la réhabilitation des friches industrielles, définie alors comme « la gestion, la réadaptation et le retour à l'utilisation bénéfique des friches industrielles de manière à garantir la réalisation et la satisfaction continue des besoins humains et pour les générations futures présentes dans l'environnement sensible, économiquement viables, voies institutionnellement solide et socialement acceptable dans le contexte régional particulier » (Thornton et al. 2007).

Pour arriver à cette fin, les méthodes utilisées pour régénérer les friches industrielles sont essentiellement l'excavation et le confinement dans des lieux de stockage associés ou non à des traitements physico-chimiques. Une alternative consiste à potentialiser les fonctions du sol par voie biologique afin de promouvoir une réhabilitation durable des friches industrielles.

## 2.3 La phytoremédiation

### 2.3.1 Concepts et principes généraux

#### 2.3.1.1 Relatif à la phytoremédiation

La phytoremédiation est définie comme l'utilisation des plantes pour éliminer les polluants de l'environnement ou pour les rendre inoffensifs (Raskin et al. 1997) ; ceci intègre des processus naturels de dégradation, assimilation, métabolisation ou détoxification des métaux et des composés organiques présents.

La phytoremédiation n'est pas un nouveau concept. Dès 1855, le développement de *Viola calaminaria* et *Thlaspi alpestre var. calaminare* est reporté sur des sols riches en Zn et des concentrations « importantes » mesurées dans ses feuilles (Reeves 2006). Toutefois, le concept de remédiation des sols utilisant les plantes est proposé pour la première fois en 1980 pour l'extraction du Cd (Cunningham et al. 1995) et se démocratise dans les années 1990 (Chaney et al. 1997).

---

<sup>6</sup> Ce projet fait partie des projets de recherche dans le cadre de l'action clé IV "Villes de demain et patrimoine culturel" du programme spécifique "Énergie, environnement et développement durable" au sein du 5<sup>ème</sup> programme-cadre de la Communauté Européenne dans le domaine de la recherche, de développement technologique et de démonstration.

De nos jours, la phytoremédiation est une technique reconnue comme alternative d'assainissement aux méthodes physico-chimiques (lessivage à l'acide, incinération, électrochimie, etc.) car elle est moins invasive, préserve et restaure d'avantage la structure du sol et ses fonctions (Cunningham et al. 1995; Kidd et al. 2009; Glick 2010).

#### 2.3.1.2 *Méthodes appliquées aux sols pollués en éléments traces métalliques*

Concernant la réhabilitation des sols pollués par les ETM, les techniques de phytoremédiation font appel à trois concepts : (i) la phytostabilisation (stabilisation des ETM diminuant leur biodisponibilité) ; (ii) la phytoextraction (accumulation des ETM dans les tissus végétaux) ; et (iii) la phytovolatilisation (transformation des ETM en formes volatiles) (Raskin et al. 1997; Chaney et al. 1997; Yang et al. 2005; Glick 2010; Nagajyoti et al. 2010)<sup>7</sup>.

### 2.3.2 **Phytoremédiation et éléments traces métalliques**

#### 2.3.2.1 *Les éléments traces métalliques : indispensables ou toxiques ?*

L'impact des ETM se différencie en fonction de : leurs propriétés chimiques et celles des composés qu'ils constituent, des propriétés biologiques des organismes exposés, ainsi que de la teneur, la mobilité et la biodisponibilité de ces éléments dans le milieu (Michalke 2003; Goldhaber 2003; Clemens 2006; Nagajyoti et al. 2010).

A exception du cadmium, du mercure et du plomb, les ETM, à faible concentration, ont un rôle essentiel pour le métabolisme des organismes : on leur attribue alors le nom d'oligo-éléments (Baize 1997; Adriano et al. 2004; Tangahu et al. 2011). Les besoins physiologiques en ETM varient en fonction du règne : les végétaux requièrent B, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, et Zn (Baize 1997; Goldhaber 2003; Nagajyoti et al. 2010), alors que chez les bactéries, Fe, Mo et Mn sont des éléments importants. Par ailleurs, si le Zn, Ni, Cu, V, Co, W et Cr sont globalement des oligo-éléments importants pour les bactéries, As, Ag, Sb, Cd, Hg, Pb et U ont des fonctions bénéfiques plus limitées et sont parfois considérés comme des toxines (Nies 1999).

---

<sup>7</sup> En ce qui concerne ce manuscrit de thèse, seulement seront considérées la phytoextraction et la phytostabilisation pour la suite.

Les ETM interviennent en effet dans plusieurs fonctions biologiques, telles que la respiration, la photosynthèse, l'assimilation d'autres éléments essentiels comme l'azote ou le soufre. Les ETM peuvent aussi intervenir comme co-facteurs enzymatiques (Abdul Motalib M. 1996; Nies 1999; Goldhaber 2003; Nagajyoti et al. 2010). Parmi ces éléments, certains jouent un rôle physiologique antagoniste (Figure 3) étant à la fois toxiques lorsqu'ils se présentent à des concentrations élevées ou entraînant des problèmes nutritionnels lorsqu'ils sont en défaut (Stohs et Bagchi 1995; Briat et Lebrun 1999; Sirko et Brodzik 2000; Rout et Das 2003; Goldhaber 2003; Demirevska-Kepova et al. 2004; Nurchi et Villaescusa 2008; Nagajyoti et al. 2010; Vollenweider et al. 2011) (Tableau 7). D'autres composés sont par contre toxiques pour les organismes (Figure 3). C'est le cas du Cd qui peut interférer sur l'absorption, le transport, l'utilisation de certains éléments (Ca, Mg, P et K) ou de l'eau dans les plantes (Das et al. 1997). La spéciation chimique influence aussi la toxicité : le Cr sous la forme de Cr(VI) (oxyanion divalent chromate) est par exemple plus toxique et mobile que le cation trivalent Cr(III) et pénètre dans les cellules où il provoque des dommages sur l'ADN (Nies 1999; Ali et al. 2004). Les éléments toxiques présentent aussi des caractéristiques chimiques semblables à celles de métaux/métalloïdes essentiels ce qui facilite leurs interactions avec les molécules biologiques (Clemens 2006; Summers 2009). Il est de même pour les molécules dérivées ; par exemple, la structure du chromate ressemble à celle du sulfate ou la structure de l'arséniate à celle du phosphate (Nies 1999).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Unq	Unp	Unh	Uns	Uno	Une	Unn								

Current Opinion in Microbiology

**Figure 3.** Tableau périodique des ETM toxiques et bénéfiques et métalloïdes. *En bleu les éléments bénéfiques ; en pourpre les éléments essentiels qui peuvent être toxiques à des concentrations élevées ; en rouge les éléments toxiques ou qui ne présentent pas d'avantages pour les organismes. (Summers 2009)*

Tableau 7. Exemples des besoins biologiques et effets toxiques des ETM pour les végétaux.

ETM	Besoins et effets toxiques	Source
Cu	<p><u>Besoins :</u> Composant des constituants du donneur primaire d'électrons dans le photosystème I ; importé activement dans les chloroplastes (structure des protéines photosynthétiques et enzymes). Cofacteur de l'oxydase, mono-et-dioxygénase (e.g. l'ammoniac monooxidase, la céruloplasmine, la lysyl oxydase) et des enzymes impliquées dans l'élimination de radicaux superoxydes (e.g. superoxyde dismutase et ascorbate oxydase).</p> <p><u>Effets toxiques :</u> Inhibe la respiration. Entraine une réduction de la teneur en chlorophylle et inhibe certaines fonctions photosynthétiques sur les feuilles : dommage des chloroplastes ; bloque le transport des électrons ; régulation négative des enzymes du cycle de Calvin (diminution de la quantité et fragmentation du RubisCo). Entraine des effets négatifs sur le métabolisme de l'azote ; affecte les enzymes impliquées dans la réduction du nitrate et du métabolisme des acides aminés (réduction d'azote totale). Contribue à la mort cellulaire en activant les formes réduites de l'oxygène (production de radicaux hydroxyyles) ; stress oxydant. Effet clastogène.</p>	<p>Stohs et Bagchi 1995 Briat et Lebrun 1999 Nagajyoti et al. 2010 Demirevska- Kepova et al 2010</p>
Ni	<p><u>Besoins :</u> C'est une composante de l'uréase (enzyme qui permet à l'organisme d'utiliser l'urée comme source d'azote).</p> <p><u>Effets toxiques :</u> Effet clastogène. La déficience en Ni entraîne la nécrose à l'extrémité des feuilles (accumulation toxique de l'urée).</p>	<p>Briat et Lebrun 1999 Sirko et Brodzik 2000 Nagajyoti et al. 2010</p>
Zn	<p><u>Besoins :</u> Plusieurs enzymes en contiennent (e.g. l'anhydrase carbonique, l'alcool déshydrogénase, la superoxyde dismutase, l'ARN polymérase). Nécessaire pour maintenir l'intégrité du ribosome et les cellules membranaires. Prend part à la formation d'hydrates de carbone. Catalyse les processus d'oxydation. Rôle structurel dans nombreux facteurs de transcription et cofacteur de l'ARN polymérase.</p> <p><u>Effets toxiques :</u> Dommages sur les noyaux des cellules corticales des racines végétales. Provoque la chlorose des feuilles jeunes, qui peut s'étendre aux vieilles après l'exposition prolongée à des fortes doses. Induit la déficience en Fe due la similitude entre l'hydrate de Zn<sup>2+</sup> et les ions Fe<sup>2+</sup> (chlorose). Cause déficiences en Mn et Cu dans les parties aériennes (transfert entravé). Apparition de taches rouges-pourpres sur les feuilles (attribuées à une déficience en P) Réduction de la biomasse au niveau aérien et des racines ; provoque la sénescence.</p>	<p>Rout et Das 2003 Nagajyoti et al. 2010 Vollenweider et al. 2010</p>

Quel que soit l'organisme ou l'élément en question, les ETM doivent rentrer dans la cellule pour avoir des effets physiologiques ou toxiques (Das et al. 1997; Nies 1999). Les protéines participent activement à l'absorption et/ou l'extrusion des éléments, puisque elles sont intimement associées à la distribution des éléments organiques/inorganiques dans l'organisation cellulaire par le biais des sites de liaison et des processus de transfert aux sites de liaison. La captation sélective des éléments par les protéines peut être basée sur différentes voies : (i) la liaison à des ligands protéiques utilise la charge, la taille ou l'affinité électronique et les préférences stéréochimiques ; (ii) l'insertion dans un site de coordination de la protéine ; (iii) l'expulsion vers un compartiment cellulaire particulier par pompage suivie par (i) et (ii) (Williams et Fraústo da Silva 2000). Une série de familles de gènes impliqués dans le transport des métaux de transition sont identifiés, comme les ATPases des métaux lourds (CPx-Type), les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), les Nramps (Natural resistance associated macrophage protein), la famille des CDF (cation diffusion facilitator), la famille des ZIP (ZRT, IRT-like proteins), les cations/H<sup>+</sup> antiporteurs, les COPT1 (*i.e.* Copper transporter family) par exemple (Hall et Williams 2003). Ces transporteurs présentent des affinités pour plusieurs éléments métalliques, essentiels ou non à la plante (Tableau 8).

Tableau 8. Exemples d'ions métalliques et leurs transporteurs au niveau des végétaux (Wu et al. 2010).

Transporteur	Ion métallique
Protéine ZNT (codée par gène ZIP)	Zn <sup>2+</sup> et Cd <sup>2+</sup>
Protéines Nramps (codées par les gènes Nramps)	Cd <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> et Mn <sup>2+</sup>
Protéine codée par NtCBP4	Pb <sup>2+</sup>
Aquaglyceroprins	As <sup>3+</sup>
Transporteur du phosphate	As <sup>5+</sup>
IRT1 (régulée par la carence en fer)	Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> et Zn <sup>2+</sup>

Par ailleurs, si la cellule est confrontée à une concentration très élevée en ETM (ou à la présence des éléments non essentiels), différents mécanismes de détoxification sont utilisés pour réduire les dommages cellulaires.

### 2.3.2.2 Mécanismes de détoxification chez les plantes et les bactéries

Certaines plantes survivent sur les sols pollués (plantes tolérantes) (Tilstone et Macnair 1997; Hall 2002). Les mécanismes de détoxification peuvent être d'origine extra et/ou intracellulaire et varient suivant l'espèce ou l'écotype (Hall 2002; Yang et al. 2005; Wu et al. 2010). Les stratégies extracellulaires consistent généralement à éviter l'accumulation des ETM à l'intérieur de la cellule par obstruction de leur passage au niveau de la membrane, par efflux actif ou par association symbiotique avec des organismes capables d'accumuler les ETM à la place des végétaux (Figure 4 : 1. 2. 3. 4.).

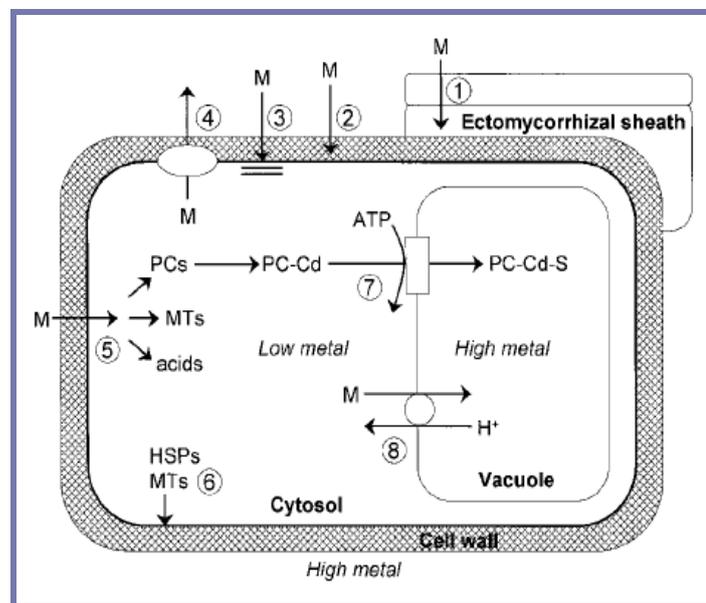


Figure 4. Résumé des mécanismes d'actions cellulaires disponibles pour la détoxification et la tolérance des ETM chez les plantes supérieures.

1. Restriction du mouvement des métaux dans les racines par les mycorrhizes ; 2. Liaison à la paroi cellulaire et aux exsudats racinaires ; 3. Réduction de l'afflux à travers la membrane plasmique ; 4. Efflux actif vers l'apoplasme ; 5. Chélation dans le cytosol par des ligands différents ; 6. Réparation et protection de la membrane plasmique, dans des conditions de stress ; 7. Transport de PC-Cd complexe dans la vacuole ; 8. Transport et l'accumulation des métaux dans la vacuole. (Hall 2002)

D'autre part, une fois à l'intérieur de la cellule, les ETM en excès ainsi que les éléments qui ne sont pas utilisés pour les besoins métaboliques, sont stockés dans la vacuole ou les plastes, par exemple, pour empêcher leur toxicité. Ceci est possible grâce à l'action de protéines et peptides spécifiques, ainsi que diverses molécules organiques (Figure 4 : 5. 7. 8.). Parmi les protéines les plus étudiés se trouvent les ferritines (spécifiques à la détoxification du fer chez les plantes (Briat et Lebrun 1999)),

les métallothionéines (MTs) et les phytochélatines (PCs)<sup>8</sup> ainsi que certains acides aminés et leurs dérivés qui sont aussi des agents chélateurs importants des ETM.

Quant aux bactéries, les facteurs de résistance aux métaux peuvent être soit plasmidiques, soit chromosomiques (Andreoni et al. 2003; Nies 2003; Ianeva 2009). Trois mécanismes sont employés pour résister aux ETM : (i) la diminution de l'élément par efflux (extrusion active de l'ion de la cellule) ; (ii) les cations peuvent être isolés en formant des complexes avec des molécules contenant des liaisons thiol ; (iii) certains ions métalliques peuvent être réduits à un état d'oxydation moins toxique (Nies 1999, 2003; Summers 2009). La résistance et l'homéostasie des ETM impliquent souvent la combinaison de deux ou trois de ces mécanismes. De plus, le même mécanisme peut être efficace pour plusieurs éléments (Tableau 9).

Tableau 9. Exemples de famille des protéines importantes au transport des ETM chez les bactéries (Summers 2009).

Famille	Regulateur	ETM	Exemples des composants des mécanismes de défense
ArsR repressors	ArsR	As(III/V), Sb(III/V)	ArsA, ATP-dependent As(III) efflux pump; ArsB, As(III) membrane translocase; ArsC, As(V) reductase; ArsD, As(III) chaperone.
	CadC	Cd(II), Pb(II), Zn(II)	CadA, Cpx-type ATP-dependent efflux pump
	CmtR	Cd(II), Pb(II)	CmtA, P1-type efflux ATPase
	BxmR	Cu(I), Ag(I), Zn(II), Cd(II)	Bxa1, P-type ATPase efflux pump; BmtA, metallo-thionein
MerR repressor-activators	MerR	Hg(II), RHg(I)	MerP, periplasmic Hg(II) binding; MerT, C, F, Hg(II) uptake; MerB, RHg(I) protonolysase; MerA, flavin, disulfide Hg(II) oxidoreductase; MerD, anti-activator of MerR; MerE, possible uptake of RHg(I)
	CadR	Cd(II)	CadA, Cd(II) ATPase efflux pump
	PbrR	Pb(II)	PbrA, P-type Pb(II) efflux ATPase PbrB, integral membrane protein, PbrC, signal peptidase, PbrD, Pb(II) sequestration
Two-component sensor-responders	SilRS	Ag(I)	SilE, periplasmic Ag(I) binding protein; SilP, P-type ATP-dependent efflux pump; SilCBA, Chemiosmotic RND cation/anion antiporter
	SO2426	Cr(III/VI)	ChrA, CHR-family chromate efflux; ChrR, Cr(VI) reductase; ChrC, B, F, superoxide dismutases
ECF-sigma factor	CnrHXY	Co(II), Ni(II)	CnrCBAT, Co(II)/Ni(II) trans-envelope RND-type efflux pump

<sup>8</sup> Les PCs sont des MTs de classe III, composées de trois acides aminés : acide glutamique (Glu), cystéine (Cys) et Glycine (Gly). Les PCs sont produites par synthèse enzymatique, tandis que les MTs sont codé par les gènes. (Yang et al. 2005)

Certes, la capacité à résister aux pollutions métalliques est indispensable à la survie des organismes impliqués dans la phytoremédiation ; cependant, d'autres conditions ou situations doivent être considérées pour assurer l'applicabilité des méthodes de phytoremédiation.

### 2.3.2.3 *La performance des plantes*

La relation entre la tolérance, l'accumulation et la répartition des ETM dans la plante est très variable (Tilstone et Macnair 1997). En effet, les plantes peuvent être (Baker 1987; Prasad et al. 2010) :

- ☞ *indicatrices*. L'absorption et la translocation des ETM reflètent la concentration des polluants dans le sol et les plantes présentent des symptômes visibles d'intoxication ;
- ☞ *accumulatrices*. L'absorption et la translocation des ETM reflètent la concentration des polluants dans le sol, mais les plantes ne présentent pas de symptômes toxiques ;
- ☞ *excluanes*. L'absorption des ETM toxiques est restreinte sur une large gamme de concentration dans les sols ;
- ☞ *hyperaccumulatrices*. La concentration des ETM représente au minimum 1 % de la matière sèche (Ni et Zn le plus souvent).

En ce qui concerne la phytoextraction, les plantes hyperaccumulatrices présentent un grand intérêt. Lorsqu'elles sont cultivées sur des sols très riches en ETM, la partie aérienne de ces plantes peut contenir des fortes teneurs en ETM, soit : > 100 mg de Cd kg<sup>-1</sup>, > 1000 mg de Co, Cr, Ni, Pb ou Cu kg<sup>-1</sup>, > 10 000 mg de Zn ou Mg kg<sup>-1</sup> (valeurs exprimés en matière sèche) (Baker 1987; Dahmani-Muller et al. 2000; Liang et al. 2009). Des phénomènes complexes interviennent suivant plusieurs étapes, comme par exemple : (a) le transport des ETM à travers la membrane plasmique des cellules racinaires ; (b) le chargement du xylème et la translocation ; et (c) la détoxification et séquestration des ETM (Yang et al. 2005). Cependant, si la phytoextraction est une méthode très séduisante, elle présente plusieurs limites et inconvénients. Les

végétaux concernés ne produisent souvent qu'une faible biomasse : de longues périodes sont donc requises pour l'élimination des ETM qui ne concerne de plus généralement qu'un seul ETM (Ernst 2005; Van Nevel et al. 2007; Liang et al. 2009). D'autre part, la phytoextraction semble mieux adaptée pour l'assainissement des zones à pollutions diffuses et à concentrations relativement faibles et superficielles (Kidd et al. 2009). Enfin, l'utilisation de la biomasse polluée après récolte reste problématique (Sas-Nowosielska et al. 2004; Lievens et al. 2008; Stals et al. 2010; Abhilash et Yunus 2011).

**En revanche, la phytostabilisation concerne les plantes tolérantes à la présence des ETM et qui sont capables de restreindre le passage des ETM présents au niveau racinaire vers les parties aériennes (comportement d'exclusion) (Kidd et al. 2009). C'est un traitement *in situ* des pollutions, auquel plusieurs bénéfices sont attribués : réduction des risques occasionnés par l'entrée des ETM dans la chaîne alimentaire (Li et al. 2007) ; amélioration des teneurs en éléments nutritifs dans le sol (Wong 2003) ; stabilisation chimique et mécanique des polluants dans le sol induisant la prévention contre l'érosion provoqué par la pluie ou le vent (Conesa et al. 2007) ; embellissement du paysage (Sleegers 2010) ; restauration de la biodiversité (Wong 2003) ; amélioration de la fonctionnalité des sols (*i.e.* augmentation de la biomasse et respiration microbienne ou de l'activité enzymatique impliquée dans les cycles biogéochimiques des éléments) (Kumpiene et al. 2009). La phytostabilisation semble aussi plus adaptée aux pollutions inorganiques immobiles des sols et des grandes surfaces polluées (Cunningham et al. 1995). Enfin, cette méthode est considérée comme une option appropriée pour la remédiation des sols avec de fortes pollutions et des contaminations multi-élémentaires (Kidd et al. 2009).**

Cela étant dit, l'activité phytoremédiatrice est non seulement spécifique à l'espèce végétale utilisée (*i.e.* tolérance, accumulation et/ou translocation des ETM), mais encore aux propriétés du sol et aux conditions environnementales qui régissent le développement des plantes. Dans certains cas, des plantes natives du site peuvent être considérées. Autrement, ce sont des plantes commerciales aux performances connues qui seront employées. Celles-ci doivent cependant être testées au préalable

pour juger de leur adaptation aux conditions défavorables présentes sur le site (O'Dell et al. 2007). Quant au choix de la méthode à appliquer (*i.e.* phytoextraction, phytostabilisation), il sera basé sur une analyse approfondie des conditions du sol et des pollutions répertoriées (Nessner Kavamura et Esposito 2010).

#### 2.3.2.4 *Les conditions du milieu*

Connaitre les caractéristiques spécifiques du sol est fondamental, d'autant plus que les sols des friches industrielles ont souvent subi des modifications physiques et chimiques conduisant leur classification sous le nom de « Technosol » (Rossiter 2007). Les conditions agronomiques et environnementales doivent en effet être propices à la croissance du végétal retenu ou dans les limites de tolérance spécifiques à l'espèce utilisée (Cunningham et al. 1995; Barceló et Poschenrieder 2002; Liang et al. 2009; Kidd et al. 2009; Nessner Kavamura et Esposito 2010; Tangahu et al. 2011).

Les cultures *in situ* permettent ainsi d'analyser la réponse des végétaux en tenant compte de la distribution souvent très variable et hétérogène des polluants et des caractéristiques physico-chimiques du sol (Cameron 1992) ainsi que l'impact des conditions climatiques régionales (*i.e.* température, précipitation, ensoleillement, humidité, vitesse du vent) (Clive A. 2002; Tangahu et al. 2011). Il faut remarquer que ces études montrent que la phytostabilisation est l'option la plus réaliste, même si toutes les catégories de phytoremédiation sont applicables (Kidd et al. 2009).

Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques du sol (granulométrie, pH, présence de matière organique, CEC, etc.) vont également participer au succès de la phytoremédiation, compte tenu de leurs relations avec la biodisponibilité et mobilité des ETM (*cf.* section 2.2.2.2) qui influencent par la suite sur la performance des plantes (Khan 2005). Le vieillissement des pollutions (*i.e.* aging) peut aussi avoir une influence sur la stabilisation des polluants dans le sol réduisant la mobilité et biodisponibilité des ETM dans le milieu (Lock et Janssen 2003a; Breure et al. 2005). Il en est de même des pollutions multiples en ETM qui peuvent perturber l'accumulation, la tolérance ou le lieu de stockage des polluants dans les tissus de la plante (Weis et al. 2004; Markert 2007) et des pollutions organiques que l'on

retrouve parfois simultanément avec les ETM. Certains ETM peuvent en effet agir en synergie avec des polluants organiques, occasionnant un stress et l'inhibition des enzymes de détoxification (Verkleij et al. 2009).

Finalement, les conditions pédologiques et environnementales vont constituer une limite ou au contraire stimuler les processus de bioremédiation et conditionner la méthode de phytoremédiation. Ces processus sont intimement liés aux relations existantes entre le sol, le développement racinaire et les microorganismes associés et donc à la rhizosphère (Adriano et al. 2004; Sparks 2005; Weixin 2009).

### **2.3.3 La rhizosphère**

#### *2.3.3.1 Définition de la rhizosphère*

Le terme rhizosphère est utilisé pour la première fois par Hiltner (1904), pour faire référence à l'interaction entre différentes bactéries et les racines d'une légumineuse (Gregory 2006). Sa définition de rhizosphère est centrée sur l'idée que la nutrition des plantes est considérablement influencée par la composition microbienne de la rhizosphère (Hartmann et al. 2007).

Aujourd'hui, la rhizosphère fait référence au volume de sol autour des racines vivantes, qui est influencé par l'activité des racines. En fonction de l'activité examinée (exsudation de composés réactifs, respiration, absorption des nutriments plus ou moins mobiles et de l'eau) l'extension radiale de la rhizosphère peut varier de moins du  $\mu\text{m}$  à une échelle supérieure au cm. Cette zone d'influence diffère aussi dans le temps (Gregory 2006; Hinsinger et al. 2009).

Il faut noter que l'effet rhizosphérique varie selon les espèces de plante (différences de sécrétions, stratégie d'acquisition des éléments nutritifs, architecture du système racinaire) et le type de sol. La connaissance des dynamiques associées à la rhizosphère (*i.e.* relations plante-sol-microorganismes) est fondamentale pour optimiser la performance de la phytoremédiation ainsi que pour fournir les outils nécessaires à la bonne gestion des processus (Nowack et al. 2006).

### 2.3.3.2 L'action racinaire sur la mobilité des éléments traces métalliques

L'impact des racines sur les facteurs abiotiques et les mécanismes ayant lieu au niveau de l'interphase liquide-solide du sol, joue un rôle essentiel sur la mobilisation ou l'immobilisation des éléments présents dans la rhizosphère, qu'ils soient indispensables ou non à la croissance de la plante. (Figure 5).

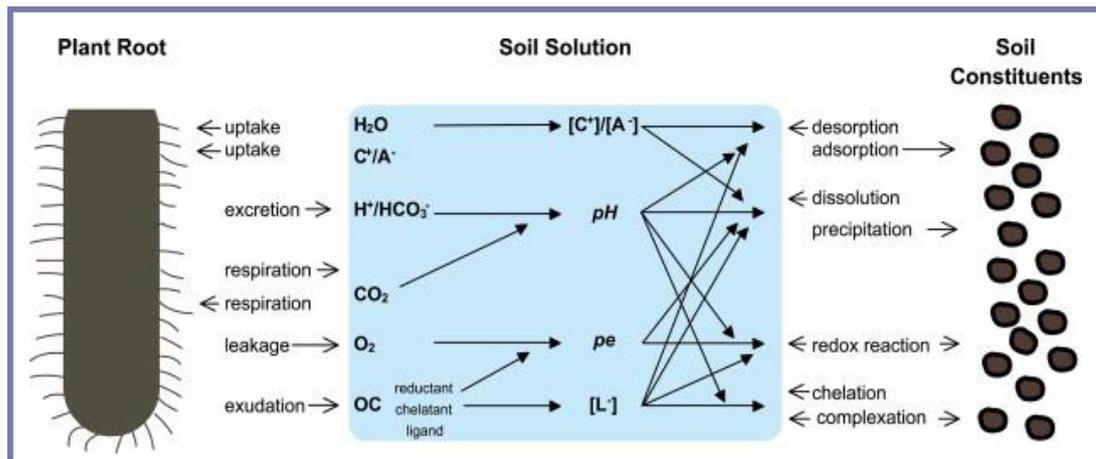


Figure 5. Schéma de la rhizosphère, quelques interactions des facteurs abiotiques et les mécanismes de l'interface sol-solution.

*OC : carbone organique ;  $C^+$  : cation ;  $A^-$  : anion ;  $L^-$  : ligand ;  $pe$  : potentiel redox. (Adriano et al. 2004)*

Les ETM présents dans la solution du sol (*i.e.* ions libres, ions chélatés) peuvent se déplacer avec l'eau du sol (flux massique) que la plante absorbe pour sa transpiration. Si le taux d'absorption est supérieur aux taux d'arrivée par convection, une zone de déplétion apparaît autour de la racine qui entraîne la formation d'un gradient de concentration promouvant la diffusion des éléments du sol vers la racine (Das et al. 1997).

Les racines influencent aussi activement le pH de leur environnement immédiat. Si la libération de  $H^+$  ou de  $HCO_3^-$  augmente la disponibilité du potassium et du phosphore, respectivement (Jungk et Claassen 1986; Ehlken et Kirchner 2002), une variation du pH du sol peut également profiter à la mobilité d'autres éléments comme les ETM (Kidd et al. 2009). Le comportement des ETM dans le système sol-plante est aussi soumis à des mécanismes d'inhibition en fonction des ions présents (Ehlken et Kirchner 2002).

D'autre part, la qualité et la quantité des rhizodépôts (*i.e.* la somme de carbone libéré par les racines dans la rhizosphère) est déterminante pour la solubilisation des éléments du sol. Ces sécrétions peuvent influencer le comportement des éléments nutritifs et des ETM (*i.e.* augmenter ou réduire leur disponibilité), en affectant directement les réactions d'acidification, de chélation, de précipitation, d'oxydo-réduction, ou indirectement à travers leurs effets sur l'activité microbienne, les propriétés physiques et chimiques de la rhizosphère ainsi que la croissance de la racine (Barceló et Poschenrieder 2002; Tao et al. 2005; Nowack et al. 2006; Kidd et al. 2009). Les rhizodépôts peuvent globalement être regroupés en cinq catégories : (i) les exsudats (acides aminés, acides carboxyliques de faible poids moléculaire, sucres et composés phénoliques simples et flavonoïdes), (ii) les sécrétions (ectoenzymes et polymères de hydrates de carbone), (iii) les mucilages végétaux (hydrates de carbone et de débris cellulaires), (iv) mucigel (hydrates de carbone et de débris cellulaires), et (v) les lysats racinaires (flavanones, composés phénoliques et débris cellulaires) (Leake et al. 2006; Kidd et al. 2009).

### 2.3.3.3 *Concernant les relations plante-bactéries*

Les végétaux sont sensibles à la composition du sol mais aussi à la microflore de la rhizosphère puisqu'elle peut conditionner, entre autres, la capacité d'exploration des plantes pour les éléments nutritifs (Hartmann et al. 2007). En effet, la structure et les fonctions des assemblages microbiens influencés par les exsudats racinaires, participent aux transformations biochimiques diverses ayant lieu dans la rhizosphère, y compris les réactions d'oxydo-réduction et la spéciation chimique des éléments (Kozdrój et van Elsas 2000; Adriano et al. 2004; Khan 2005). D'autre part, il faut noter que la dynamique même des populations bactériennes dans le voisinage immédiat des racines des plantes (*i.e.* rhizosphère) est modifiée. La concentration bactérienne est typiquement de 10 à 1000 fois supérieures à la concentration du sol (Glick 2010). Toutefois, s'il existe une augmentation remarquable de la densité bactérienne, celle-ci peut varier suivant les populations bactériennes, la croissance de la plante et le site sur la racine (Duineveld et al. 1998). Il peut avoir également un impact sur la diversité microbienne, soit une diminution de la diversité phylogénétique lorsque l'on se

rapproche des racines, *i.e.* entre le sol non rhizosphérique, le sol rhizosphérique, le rhizoplan et l'endorhizosphère (Marilley et Aragno 1999).

Si les études concernant les interactions microorganismes- plante durant les cinquante dernières années ont porté sur les relations plante-pathogène, depuis 10 ans, l'écologie des microorganismes rhizosphériques s'intéresse à leur participation à différents types de processus de dépollution (Nessner Kavamura et Esposito 2010). Les études les plus anciennes se sont surtout focalisées sur l'utilisation des bactéries du sol comme un traitement complémentaire dans la phytoremédiation, en particulier pour favoriser la croissance végétale, *i.e.* plant growth-promoting bacteria (PGPB). Cependant, d'autres approches plus récentes considèrent que les microorganismes améliorent aussi la biodisponibilité des ETM dans le sol (Figure 6) (Glick 2010).

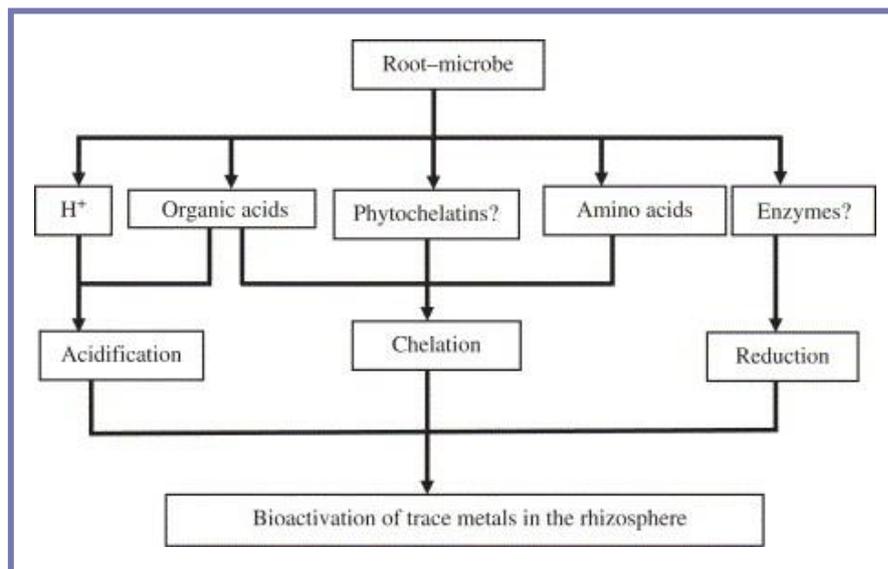


Figure 6. Processus éventuellement impliqués dans la mobilisation des ETM dans la rhizosphère par l'interaction racine-microorganismes. (Yang et al. 2005)

En revanche, les bactéries peuvent également participer à la séquestration des ETM contenus dans le sol. Celle-ci est médiée par deux processus : (i) la sorption (*i.e.* biosorption) par la biomasse microbienne et leurs sous-produits, et (ii) l'absorption physiologique à travers des voies métaboliques actives ou passives (Adriano et al. 2004; Febrianto et al. 2009).

Si les microorganismes peuvent avoir un double rôle vis-à-vis de la dynamique des ETM dans la rhizosphère et que les associations microbiennes sont plante-dépendantes, les processus de phytoremédiation mis en place ne peuvent pas être préétablies (*i.e.* sous-entendus une éventuelle phytostabilisation ou phytoextraction). L'application de techniques de dépollution végétale nécessite donc une étude situationnelle et transdisciplinaire préalable afin d'établir l'efficacité de la méthode ainsi que l'évaluation des risques écologiques en cas d'effets indésirables (Norton et al. 1992; Gupta et al. 1996; Prasad et al. 2010).

### 3 Objectif de la thèse

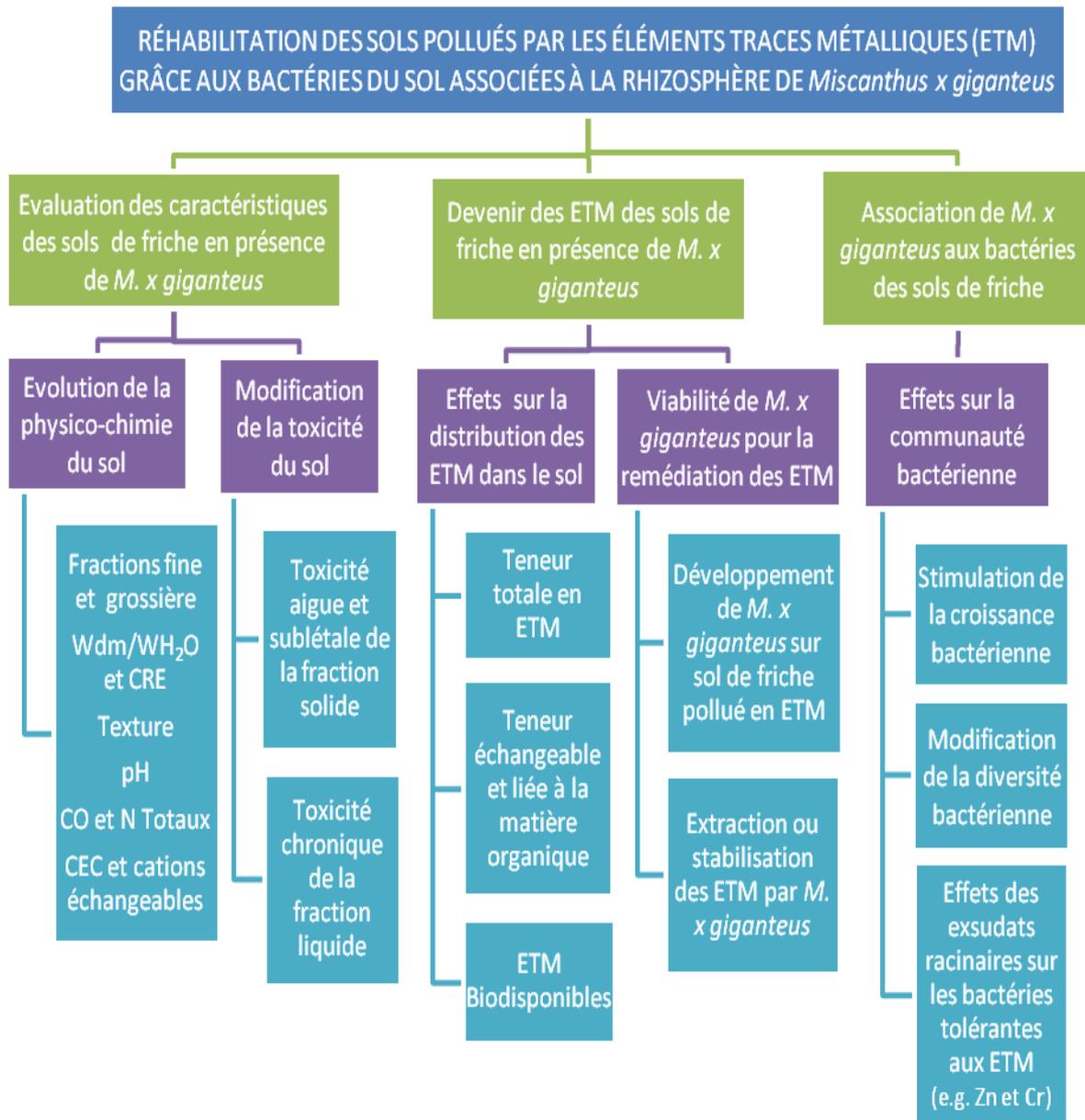
Le sol est un système dynamique, complexe et vivant, indispensable au développement des activités humaines. Cependant, l'utilisation inadaptée des terres et les pratiques inappropriées peuvent en altérer les fonctions. S'agissant d'une ressource non renouvelable, les nouvelles politiques de gestion s'engagent à récupérer les sols impactés afin de protéger l'environnement et éviter les risques sanitaires. C'est notamment le cas de l'Europe et plus particulièrement, du département de la Moselle qui, du fait de son activité industrielle passée, est fortement impacté par la présence de sols ayant des pollutions de type inorganique ou mixte (inorganiques et organiques).

Dans ce contexte, la phytoremédiation est une solution permettant de restaurer les structures et les fonctions du sol. La culture de *M. x giganteus* est proposée pour remédier les pollutions inorganiques des sols de friche, considérant non seulement son adaptation à différentes conditions pédoclimatiques et son potentiel à résister à la présence des ETM ; *M. x giganteus* possède aussi un intérêt économique, sa biomasse étant valorisable. Toutefois, différents aspects concernant le végétal (agronomie, physiologie, etc.) et le sol (microbiologie, hydrogéologie, etc.) doivent être examinés avant la généralisation de cette méthode, afin d'assurer sa durabilité et d'en évaluer les limites (risques potentiels, effets indésirables) permettant ainsi une gestion responsable de l'environnement.

L'objectif de cette thèse consiste donc à déterminer la capacité de *M. x giganteus* à s'adapter aux sols de friche pollués en ETM, tout en favorisant la consolidation des processus de bioremédiation des polluants, sans entraîner un impact négatif sur l'environnement. Tout d'abord, l'analyse physico-chimique et toxicologique des sols sera réalisée, afin de déterminer les conditions auxquelles *M. x giganteus* serait confrontée et d'évaluer toute modification due à la présence de la plante. De plus, les caractéristiques physiologiques ainsi que le devenir des ETM dans le système sol-plante seront étudiés pour connaître la performance de *M. x giganteus*. Finalement, l'analyse des bactéries du sol permettra d'élucider les associations possibles à l'égard de la

plante, éventuellement indispensables à la mise en place et au succès des mécanismes de phytoremédiation des sols pollués spécialement par les ETM.

### 3.1 La thèse sous forme graphique



## 4 Matériel et méthodes

### 4.1 Etude en mésocosme

Le mésocosme est un outil de recherche qui permet d'évaluer le devenir et les effets des xénobiotiques à différents niveaux d'organisation biologique (population, communauté et écosystème) tenant en considération que les conditions physiques, chimiques et/ou biologiques façonneraient le résultat final de l'expérience (Boyle et Fairchild 1997). Cet outil permet aussi d'étudier la performance des espèces et leur influence sur la structure et fonctionnement de l'écosystème, *i.e.* identifier et quantifier les changements sur la bioaccumulation ou la biodisponibilité de l'élément polluant (Caquet 2002).

Un mésocosme est réalisé en laboratoire (pour contrôler cependant les conditions climatiques) afin d'étudier le potentiel de *M. x giganteus* pour la réhabilitation des sols pollués en ETM, en utilisant des sols de friche de la région. Une évaluation transversale des différents composants du système « sol » (*i.e.* sol – plante – microorganismes) permettra de définir leurs relations (réciproques) et leur implication dans le devenir des pollutions.

#### 4.1.1 Préparation des sols

##### 4.1.1.1 Localisation, description et historique des friches industrielles polluées

Les sols de friche utilisés pour le mésocosme proviennent d'une ancienne cokerie<sup>9</sup> située en Moselle (région Lorraine, France). A la fin de l'exploitation, en 1974, le site de 11 ha est complètement démantelé (MEDDTL 2011). Aujourd'hui, des remblais recouvrent l'ensemble de la surface ; soit, des débris de matériaux (*e.g.* blocs de maçonnerie), de laitiers (*i.e.* sous-produits de la métallurgie contenant des oxydes métalliques), des terres. Cette crasse prend en masse par endroit. De plus, l'épaisseur des remblais varie souvent : de 3 à 5 m sur le site de la cokerie, excepté le long du CD 953 (*i.e.* route départementale) et sous l'emprise des hauts fourneaux où

---

<sup>9</sup> Usine qui comporte des fours à chambres de grande capacité, dans lesquels on fabrique du coke métallurgique, et dont les sous-produits (goudrons, benzols, gaz divers) sont la base de la carbochimie.

elle n'est que de 1,5 à 2 m (à savoir que au niveau des hauts fourneaux il y a localement des surépaisseurs atteignant les 4 m) ; le reste de la zone ouest à une faible profondeur (0,5 – 1,5 m). (Clement 1989).

Les études réalisés par le Bureau de Recherche Géologiques et Minières (BRGM) à la fin des années 1980 et au début des années 1990, identifient une pollution en hydrocarbures associée, dans tous les cas analysés, à une pollution en phénols et/ou en ETM ainsi qu'en cyanures, bien que de façon moins systématique. Cependant, alors que les ETM sont répartis sur l'ensemble du site, deux foyers distincts sont délimités pour la pollution en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). D'autre part, ces polluants sont entraînés par les eaux d'infiltration et passent dans la nappe phréatique qui est drainée par la Moselle à l'aval du ruisseau de Veymerange (facteur de dilution de l'ordre de 4 à 5000). Des processus d'atténuation naturelle des polluants organiques sont aussi identifiés (*i.e.* dégradation par la flore bactérienne) (Clement 1989; Chaussidon 1990).

La dernière campagne d'étude réalisée en 2004 (rapport ANTEA 35295/B) confirme la persistance des polluants détectés auparavant, mais délimite et définit de manière plus précise les pollutions présentes. C'est cette étude qui servira de base à l'identification des parcelles expérimentales (Figure 7).

#### 4.1.1.2 *Echantillonnage et préparation des sols pollués*

Deux lieux d'échantillonnage sont choisis sur la friche, en fonction des zones identifiées par l'étude de 2004 (rapport ANTEA 35295/B), pour obtenir deux types de sols : un sol pollué uniquement par les ETM (Sol E) et un sol avec une pollution mixte en ETM et HAP (Sol Mix) (Figure 7). Sur chaque zone, des parcelles de 16 m<sup>2</sup> sont délimitées pour l'échantillonnage des sols suivant la norme NF X 31-100 (AFNOR 1996). Les sols sont prélevés au niveau de la couche superficielle, soit, entre 0 et environ 30 cm de profondeur ; pour chaque zone, les échantillons prélevés sont rassemblés pour homogénéisation et obtention d'un échantillon global par type de sol.

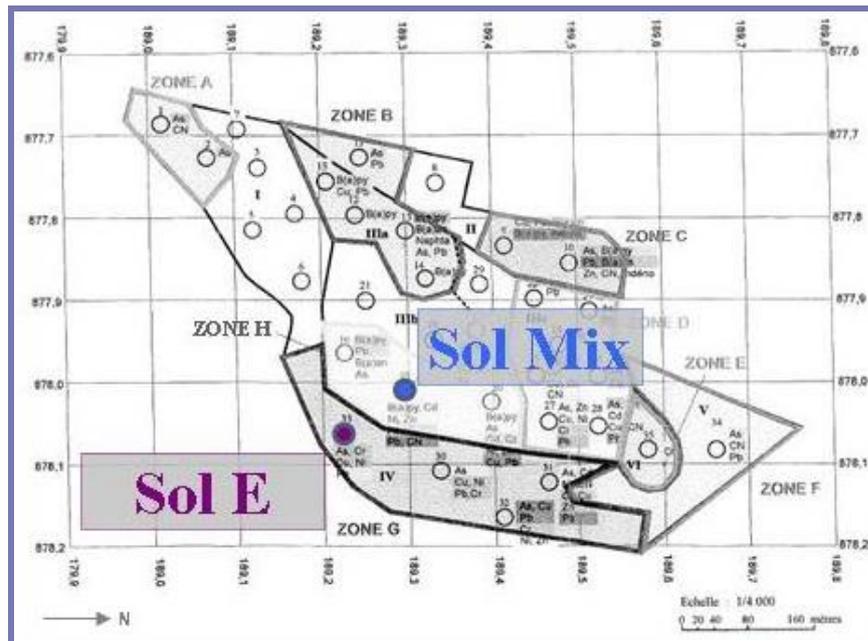


Figure 7. Zones d'échantillonnage des sols sur les terrains de l'ancienne cokerie de Thionville.

Les sols sont préparés au laboratoire suivant la norme NF X 31-101 (AFNOR 1996). Après séchages à l'air ambiant, les mottes sont émiettées et les restes de végétaux sont retirés. Le poids total est déterminé ainsi que le poids des fractions fines et grossières isolées après tamisage à 2 mm. Seule la fraction fine est conservée pour la mise en place des cultures expérimentales. Des sous-échantillons de sol homogènes sont alors préparés à l'aide d'un répartiteur mécanique afin de procéder aux analyses physico-chimiques initiales des sols et la mise en place du mésocosme.

#### 4.1.1.3 Préparation du sol non pollué (i.e. Contrôle)

Un sol non pollué est préparé selon les caractéristiques du sol ISO utilisé pour les tests d'écotoxicité, i.e. 70 % de sable et de 2,5 % de carbone organique.

Pour sa préparation, du sol standard A3 stérile (Landwirtschaftliche Untersuchungs – und Forsschungsanstalt Speyer, France) est mélangé à du sable de quartz stérile (20 min à 120 °C) préalablement neutralisé (traitement acide-base avec HCl à 0,2 M et NaOH à 0,2 M avec un rinçage à l'eau distillée entre l'acide et la base jusqu'à atteindre un pH neutre (Leon Morales et al. 2007)) et de la sphaigne stérile (20 min à 120 °C) (tamisée à 2mm) suivant un ratio de 55 : 42,5 : 2,5.

Ce sol non pollué sera utilisé comme « Contrôle ».

## 4.1.2 Mise en place du mésocosme

### 4.1.2.1 Préparation des rhizomes de *M. x giganteus*

Les mottes de rhizomes de *M. x giganteus*, fragments ayant une taille d'environ 100 mm (Christian et al. 2009) et provenant d'une culture âgée de 8 ans (récupérés au mois d'octobre), sont nettoyés à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de sol et les débris végétaux. Ils sont ensuite plongés 5 minutes dans une solution de NaOCl à 4 % pour stérilisation puis immédiatement rincés avec de l'eau distillée stérile (Ebrahim 2004). Les rhizomes sont incubés en conditions contrôlées (*i.e.* 20 °C, 95 % d'humidité et un cycle lumière / obscurité de 16 h / 8 h) dans du sable de quartz neutre et stérile (Arduini et al. 2004).

Après deux mois d'incubation, le rhizome mère est découpé en gardant entre 2 et 3 unités de formation de rhizome de chaque côté de la pousse (Figure 8). Ces pousses viables garantiront le démarrage des cultures tout en minimisant l'impact des réserves en nutriments du rhizome, celles-ci ayant été consommées lors de la phase d'incubation.

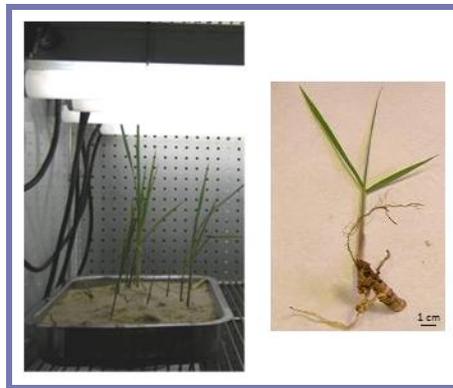


Figure 8. Exemple d'une pousse de *M. x giganteus* après l'incubation des rhizomes.

Chaque rhizome de *M. x giganteus* doté de sa pousse est pesée (g) et sa tige mesurée (cm) pour définir l'état initial des individus ( $t_0$ ) au début de la culture expérimentale.

### 4.1.2.2 Présentation du plan d'expérience

Les rhizomes munis de leur pousse sont transférées dans les sols (Contrôle, sol E, sol Mix) pour la mise en place de la culture expérimentale en mésocosme. En parallèle, des pots témoins sont réalisés pour les sols de friche à partir des mêmes sols (sol E,

sol Mix) sans aucune plantation ; ces pots suivront les mêmes traitements que les pots plantés. Cinq répétitions sont préparées pour chaque modalité.

Pour réaliser les plantations, des tubes de polychlorure de vinyle (PVC) sont découpés pour obtenir des colonnes de 8 cm de diamètre et 20 cm de hauteur. Chaque colonne est remplie avec 850 g de sol sec. Les sols sont humidifiés à 60 % de la capacité de rétention d'eau la veille de la plantation. La culture est conduite pendant 135 jours sous conditions contrôlées (24 °C et cycle lumière / obscurité de 16 h / 8 h). Les plantes sont arrosées tous les 3 jours pour conserver l'humidité du sol (Figure 9).

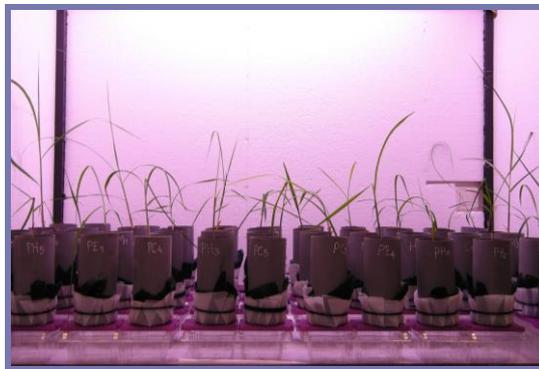


Figure 9. Culture en mésocosme de *M. x giganteus* sur les sols de friche pollués.

### 4.1.3 Paramètres étudiés

#### 4.1.3.1 Caractéristiques agronomiques des sols

La **granulométrie** est déterminée par tamisage et sédimentation d'après la norme NF X 31-107 (AFNOR 1996) : après l'élimination de la matière organique à l'aide de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$  à 35 %), les particules de sol sont mises en suspension utilisant de l'hexamétaphosphate de sodium ( $(NaPO_3)_6$  à  $150\text{ g L}^{-1}$ ) en milieu ammoniacal. Ensuite, les sables grossiers ( $200\text{ }\mu\text{m} < SG < 2\text{ mm}$ ) et sables fins ( $50\text{ }\mu\text{m} < SF < 200\text{ }\mu\text{m}$ ) sont séparés par tamisage, tandis que les limons grossiers ( $20\text{ }\mu\text{m} < LG < 50\text{ }\mu\text{m}$ ), les limons fins ( $2\text{ }\mu\text{m} < LF < 20\text{ }\mu\text{m}$ ) et les argiles ( $A < 2\text{ }\mu\text{m}$ ) présents dans le filtrat sont mesurés pendant la sédimentation des particules dans une colonne d'eau (1 L) à partir des trois échantillons (25 mL) prélevés à l'aide de la pipette de Robinson. Finalement, la **texture** du sol est définie suivant le diagramme des textures d'après la proportion de sables, limons et argiles (Jamagne 1967).

La **teneur en eau** est déterminée par gravimétrie en séchant un échantillon de sol (10 g) à l'étuve (105 °C) jusqu'à atteindre le poids constant (NF X 31-102) (AFNOR 1996). Cette mesure permet de corriger ou rapporter au poids sec tous les résultats analytiques.

La **capacité de rétention d'eau (CRE)** est estimée à partir d'un échantillon de sol (100 g) préalablement séché (105 °C jusqu'à poids constant) puis saturé avec de l'eau distillée pendant 1 h. Après une nuit d'égouttage par gravité, la différence entre le poids sec initial et le poids final définissent la CRE.

En ce qui concerne les analyses chimiques du sol, le **pH** est mesuré dans trois solutions de sol préparées soit avec de l'eau distillée ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) soit avec du chlorure de potassium à 1 M ( $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ), soit avec du chlorure de calcium à 0,01 M ( $\text{CaCl}_2$ ), suivant un ratio sol : solution de 1 : 5 (v/v) après agitation rotatif (15 tpm ; 1 h puis repos 2 h) (NF X 31-117) (AFNOR 1996).

La teneur en **carbone organique total (COT)** est déterminée suivant la méthode de Walkley-Black (Walkley et Black 1934) après broyage des sols à 200  $\mu\text{m}$  suivant la norme NF X31-412 (AFNOR 1996). Une oxydation sulfochromique de la matière organique est d'abord effectuée puis l'excès de bichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  à 8 %) est titré avec du sel de Mohr ( $\text{FeSO}_4, (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, 6 \text{H}_2\text{O}$  à 78,4  $\text{g L}^{-1}$ ).

La teneur en **azote totale (NT)** est mesurée suivant la méthode Kjeldahl modifiée décrite dans la norme NF X 31-111 (AFNOR 1996). L'azote du sol est minéralisé sous forme d'ion ammonium qui est distillé puis récupéré dans une solution d'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  à 20  $\text{g L}^{-1}$ ). Un titrage est effectué à l'aide d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,01 M).

Pour l'analyse de la **capacité d'échange cationique (CEC)** de l'acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Oac}$  à 1 M) percole à travers un échantillon de sol en utilisant d'une colonne de percolation. Le sol est récupéré et les ions ammonium échangés sont extraits à l'aide d'une solution de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$  à 1 M) puis dosés par distillation au kjeldahl (NF X 31-130) (AFNOR 1996).

Pour le dosage des **cations échangeables ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ )**, les percolâts de sol ayant servi à l'analyse de la CEC sont récupérés puis dilués au demi avant dosage à l'aide du spectrophotomètre d'absorption atomique. Le calcium et le magnésium sont dosés en absorption tandis que le potassium et le sodium sont mesurés en émission (NF X 31-130 et NF X 31-108) (AFNOR 1996).

La présence de **carbonates de calcium et de magnésium** est mise en évidence par l'apparition d'effervescence suite à l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl à 12 M) NF X 31-107 (AFNOR 1996).

#### 4.1.3.2 *Evaluation de la toxicité des sols*

Du fait de la partition et de la mobilité des ETM dans la matrice du sol, l'analyse de la toxicité est faite sur deux fractions particulièrement impliquées : fraction solide et fraction liquide.

La **toxicité de la fraction solide** est évaluée suivant la norme NF X 31-251 (AFNOR 1995) en utilisant des lots de 10 vers juvéniles (*i.e.* vers sans clitellum et un poids individuel de  $200 \pm 50$  mg) de l'espèce *Eisenia fetida*. Les vers sont exposés 14 jours à 200 g de sol (sol E, sol Mix et Contrôle) dans des conditions contrôlées : 24 °C, 95 % d'humidité relative et un cycle de cycle lumière / obscurité de 16 h / 8 h. La mortalité est évaluée après 7 et 14 jours d'exposition aux sols. L'appréciation de la réponse tactile des vers après 14 jours d'exposition est utilisée pour compléter l'analyse et classer les vers comme : (i) sensibles, (ii) moribonds (flaccides et/ou qui répondent tardivement aux stimulations avec la pince) ou (iii) morts (Eom et al. 2007; van Herwijnen et al. 2007). Enfin, les ETM accumulés par les vers de terre après 14 jours d'exposition aux sols pollués sont aussi analysés pour avoir une estimation biologique de la teneur en ETM biodisponibles présents dans les différents sols (Hobbelen et al. 2006; van Herwijnen et al. 2007). Après avoir laissé dépurier les vers pendant une nuit pour éliminer les restes de sols de leur tube digestif, ils sont séchés à 60°C et la matière sèche mesurée. La minéralisation est réalisée dans 5 mL d'acide nitrique à 15,8 M et les ETM sont dosés par spectrophotomètre d'absorption atomique avec une flamme d'air-acétylène (Varian ESPECTRAA 55). Le matériel de référence certifié

GBW07405 est utilisé pour contrôler de la qualité de l'extraction et de corriger les valeurs selon le rendement d'extraction obtenu.

Quant à la **toxicité de la fraction liquide**, elle est mesurée au moyen de micro-algues (Ouvrard et al. 2011). Des suspensions de sol sont préparées avec de l'eau ultra pure stérilisée (20 min à 120 °C) suivant un ratio sol : eau de 1 : 5 (m/v). Les suspensions de sol sont agitées avec un agitateur rotatif (15 tpm ; 1 h), puis les surnageants sont centrifugés (20 min ; 3600 x g). La croissance des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapita* est analysée conformément à la norme NF T 90-375 (AFNOR 1998). Chaque puits d'une microplaque (P96) reçoit 225 µL de la suspension de sol diluée avec le milieu de culture des algues et 25 µL de suspension algale (*i.e.* culture d'algues de 72 h de croissance, ayant une  $DO_{665}$  d'environ 0,387, afin d'obtenir une concentration de  $10^5$  cellules / mL dans chaque puits). Une microplaque est préparée pour chaque échantillon de sol testé. Les algues sont incubées pendant 72 h à 24 °C sous éclairage permanent. Différentes concentrations de la suspension de sol sont testées (de 90 % à 0 %) et 6 puits par dilution sont préparés (Figure 10). L'absorbance est mesurée à 630 nm après 24 h et 72 h d'exposition. Une solution standard de bichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$  à 2 mg L<sup>-1</sup>) est utilisée comme contrôle.

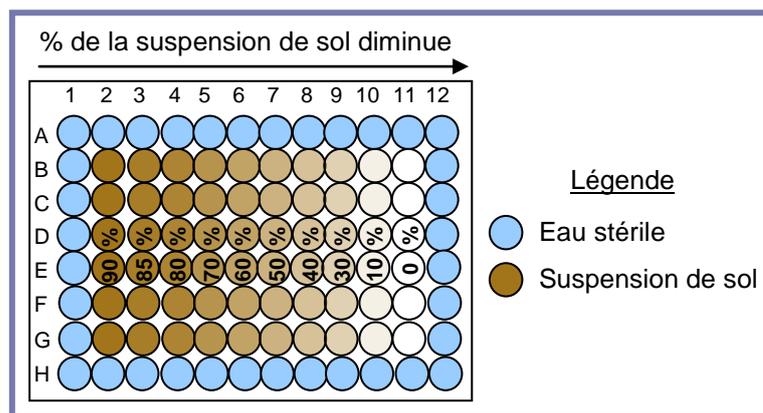


Figure 10. Modèle pour la préparation des microplaques utilisées pour le test de toxicité de la fraction liquide des sols.

#### 4.1.3.3 Dosage des éléments traces métalliques dans les sols

Le Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn sont analysés dans les différentes fractions de la matrice du sol pour déterminer la dynamique des ETM ainsi que les modifications possibles

provoqués par la présence de *M. x giganteus*. Après des extractions spécifiques des ETM totaux – échangeables – oxydables (potentiellement biodisponible), les ETM sont dosés par spectrophotomètre d'absorption atomique avec une flamme d'air-acétylène (Varian ESPECTRAA 55).

En ce qui concerne **la teneur totale de chaque ETM**, une attaque à l'eau régale, soit un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique (21 mL de HCl à 12 M et 7 mL de HNO<sub>3</sub> à 15,8 M), est appliquée pour les extraire du sol (NF X 31-415) préalablement broyé à 200 µm suivant la norme NF X 31-412 (AFNOR 1996). Après minéralisation, les échantillons sont filtrés (disque de microfibre de verre : Whatman GF/B, porosité de 1 µm).

Les **ETM échangeables** sont déterminés dans une solution de sol préparée avec du chlorure de calcium à 0,01 M (ETM<sub>échang</sub>) (Gleyzes et al. 2002; Feng et al. 2005b; Hobbelen et al. 2006; Meers et al. 2007; Hao et al. 2008) dont la force ionique est jugée comparable à celle observée naturellement dans le sol (Shuman 1990 cité par Hao et al. 2008). La solution de sol est préparée suivant un ratio sol : solution de 1 : 2 (m/v) agitée avec un agitateur rotatif (15 tpm ; 1 h puis repos 2 h). Le surnageant est filtré à l'aide d'un disque de microfibre de verre : Whatman GF/B, porosité de 1 µm (Feng et al. 2005a; Meers et al. 2007).

D'autre part, **la fraction oxydable des ETM** dans le sol peut être étudiée en utilisant le NH<sub>4</sub>Oac à 1 M comme agent extracteur pour les éléments liés aux carbonates et à la matière organique. Ces ETM considérés comme mobilisables représentent les ETM potentiellement biodisponibles (Campanella et al. 1995; Gupta et al. 1996; Meers et al. 2007; Pathak et al. 2009).

#### 4.1.3.4 *Mesures réalisées sur M. x giganteus*

**Au début de la culture**, la biomasse fraîche de chaque plant est mesurée. Les végétaux ne pouvant être sacrifiés, leur biomasse sèche est estimée en corrigeant la biomasse fraîche par l'humidité moyenne des plants Contrôles, relevée à la fin de période expérimentale.

**En cours de culture**, la hauteur (cm) des plantes mesurée du sol jusqu'au dernier entrenœud présent sur la tige, est suivie régulièrement (Figure 11) (Lewandowski 1998; Clifton-Brown et al. 2001; Kaack et Schwarz 2001; Clifton-Brown et Lewandowski 2002; Christian et al. 2008; Richter et al. 2009; Pyter et al. 2010).

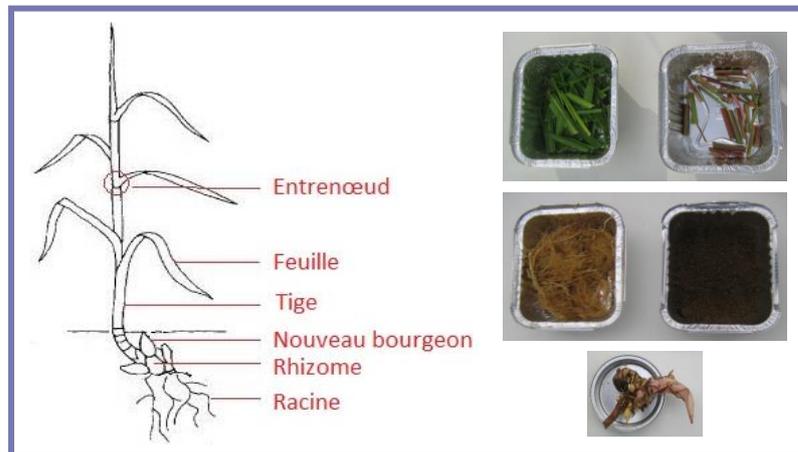


Figure 11. Description de *M. x giganteus* et préparation des échantillons pour analyse.

**À la fin de la période d'exposition**, chaque plante est déterrée. Seul le sol adhérent ou maintenu par le système racinaire après avoir secoué la plante est préservé. Le système racinaire et le rhizome sont ensuite séparés du sol rhizosphérique (Figure 12). Un échantillon de sol rhizosphérique est conservé (-20 °C) pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques.



Figure 12. Exemple du sol rhizosphérique.

Le nombre de nouveaux bourgeons sur le rhizome et le nombre d'entrenœuds sur la tige sont notés. Tige, feuilles, racines et rhizome sont séparés puis pesés pour déterminer la biomasse fraîche. Un échantillon de feuille de chaque plante (environ 0,5 g de matière fraîche) est congelé dans l'azote liquide avant analyse de la teneur en chlorophylle. De même, un échantillon des racines est conservé (-20 °C) pour l'analyse des populations bactériennes. Après séchage des différentes fractions des

végétaux (60°C jusqu'à poids constant) (Figure 11), la teneur en eau est alors calculée et le diamètre externe des tiges mesuré (Lewandowski 1998; Clifton-Brown et al. 2001; Kaack et Schwarz 2001; Clifton-Brown et Lewandowski 2002; Christian et al. 2008; Richter et al. 2009; Pyter et al. 2010).

A partir des pesées, sont calculés :

☞ le *taux relatif de croissance* (TRC) des plantes (Arduini et al. 2004) :

$$\text{TRC} = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

où,

$W$  est la biomasse sèche au début ( $W_1$ ) et à la fin ( $W_2$ ) de la culture  
 $t_1-t_2$  est la durée de la période

☞ le *ratio entre la biomasse aérienne sèche totale et la biomasse souterraine sèche totale* (A/S) (Morishita et Boratynskil 1992; Yeh et al. 2000; Audet et Charest 2008).

La quantité de chlorophylle totale, chlorophylle a et chlorophylle b est mesurée par macération de 50 mg de feuilles, dépourvue des veines et finement coupées, dans 8 mL de N, N-Diméthylformamide pendant 7 jours, sous agitation constante, à 4 °C et totale obscurité. L'absorbance est mesurée à 664 nm, 647 nm et 750 nm (Inskeep et Bloom 1985; MacFarlane et Burchett 2001; Macinnis-Ng et Ralph 2002) et la concentration des pigments (mg / L) est déterminée suivant la formule du coefficient d'extinction proposé par Inskeep et Bloom (1985), après la correction des valeurs par soustractions de l'absorbance à 750 nm (Macinnis-Ng et Ralph 2002) :

☞ *Chlorophylle totale* :  $\text{Chl Tot} = 17,90_{A_{647}} + 8,08_{A_{664}}$

☞ *Chlorophylle a* :  $\text{Chl a} = 12,70_{A_{664}} - 2,79_{A_{647}}$

☞ *Chlorophylle b* :  $\text{Chl b} = 20,70_{A_{647}} - 4,62_{A_{664}}$

Ensuite, ces valeurs sont reportées au  $\text{mg kg}^{-1}$  de matière sèche pour déterminer la teneur en chlorophylle dans les feuilles des plantes.

Finalement, la teneur en ETM de chaque partie de *M. x giganteus* (i.e. feuilles, tige, racines, et rhizome) est mesurée après broyage (1 mm). Le Zn et le Cu sont analysés

par spectroscopie d'émission à plasma inductif (ICP-AES), tandis que le Cd, Cr, Ni, et Pb sont analysés par spectrométrie de masse (ICP-MS) (INRA, US 1118 USRAVE, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon CEDEX, France) ; les résultats sont reportés au mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche. Le matériel de référence certifié GBW07405 (feuilles d'épinard polluées en ETM) est utilisé pour contrôler de la qualité de l'extraction et corriger les valeurs selon le rendement d'extraction obtenu. Ces concentrations permettent de calculer le facteur de bioaccumulation (FBA) caractéristique de l'absorption des ETM par les végétaux et le facteur de translocation (FT) pour déterminer les capacités de transfert des ETM de la partie souterraine vers la partie aérienne de la plante (Lebeau et al. 2008; Audet et Charest 2008; Liang et al. 2009) :

$$\text{Facteur de bioaccumulation : } FBA_{\text{ETM}} = \frac{[ETM]_{\text{plante}}}{[ETM]_{\text{sol}}}$$

$$\text{Facteur de translocation : } FT_{\text{ETM}} = \frac{[ETM]_{\text{aérienne}}}{[ETM]_{\text{souterraine}}}$$

Enfin, l'indice de tolérance (IT), parfois appelé facteur d'enrichissement, permettra de définir la forte tolérance des plantes aux ETM (Mingorance et al. 2007; Yadav et al. 2009) :

$$\text{Indice de tolérance : } IT_{\text{ETM}} = \frac{[ETM]_{\text{essai}}}{[ETM]_{\text{contrôle}}}$$

#### 4.1.3.5 Etude des bactéries des sols

Les techniques conventionnelles de la microbiologie pasteurienne et les approches moléculaires sont utilisées en combinaison (Brightwell et al. 2006; Burmølle et al. 2009) pour le dénombrement des bactéries cultivables (*i.e.* nombre plus probable en microplaque – NPP) et l'analyse de la diversité bactérienne des sols (*i.e.* PCR-TTGE). Ces analyses sont appliquées pour l'ensemble des sols (*i.e.* sols rhizosphériques et sols non rhizosphériques) et la surface des racines (analyse du rhizoplan).

Les dénombrements des **bactéries cultivables** sont réalisés en utilisant les bactéries extraites à partir d'une suspension de sol : 5 g de sol sont ajoutés dans 45 mL de pyrophosphate de sodium (NaPP à 1 g L<sup>-1</sup>), contenant 75 g de billes de verre (1 mm)

préalablement stérilisées (20 min à 120 °C). La suspension est incubée (25 °C ; 1 h ; agitation orbitale 200 tpm) puis laissée au repos (30 min) pour permettre la sédimentation des particules de sol et des billes. La solution mère est réalisée par prélèvement de 1 mL de surnageant mélangé à 9 mL d'eau physiologique (NaCl à 8,5 g L<sup>-1</sup>). La solution mère est ensuite diluée en cascade par pas de 1/10<sup>ème</sup> jusqu'à une dilution de 10<sup>-4</sup> en utilisant de l'eau physiologique. Ces dilutions (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>) sont inoculées dans les microplaques (P96) contenant un milieu de culture trypticase soja dilué au 10<sup>ème</sup> (TS/10) stérile (20 min à 120°C) et supplémenté en cycloheximide (100 µg mL<sup>-1</sup>) préalablement stérilisé (filtration à 0,22 µm) pour éviter la croissance des eucaryotes. Chaque puits contient 200 µL de milieu de culture et 25 µL de dilution de sol. Seize puits sont inoculés par dilution en alternant des puits sans inoculum (*i.e.* remplacé par de l'eau ultra pure stérile) pour éviter toute contamination et normaliser les résultats entre les microplaques (Figure 13). Un milieu TS/10 pollué en Zn<sup>2+</sup> (ajout sous forme de nitrate de zinc pour atteindre une concentration finale d'environ 3 mmol L<sup>-1</sup>) est aussi préparé pour le comptage des bactéries résistantes. Les microplaques sont ensuite incubés 15 jours à 24°C avant la lecture des résultats (Duineveld et al. 1998; Kozdrój et van Elsas 2000; Andreoni et al. 2003; Dell'Amico et al. 2008).

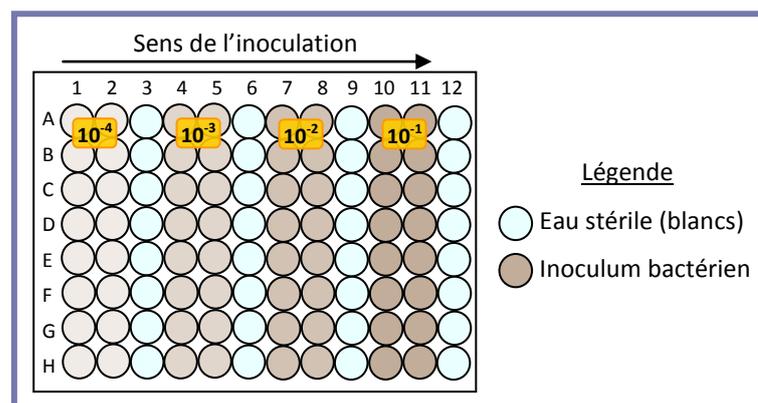


Figure 13. Modèle pour la préparation des microplaques utilisées pour les dénombrements des bactéries cultivables faites par analyse du NPP.

A la fin de l'incubation, l'absorbance est mesurée à 600 nm. Les puits dont la DO est supérieure à la valeur moyenne des blancs plus trois fois son écart type sont considérés comme positifs. L'interprétation statistique, le **calcul du NPP** et l'intervalle de confiance (à 95 % près), sont faites suivant le Manuel Analytique

Bactériologique (BAM) (Garthright et Blodgett 2003; Blodgett 2010). Les résultats sont ensuite rapportés au Log (nb bactéries / g de sol sec).

Quant à l'analyse moléculaire, elle débute par l'extraction et la purification de l'ADN total (Figure 14).

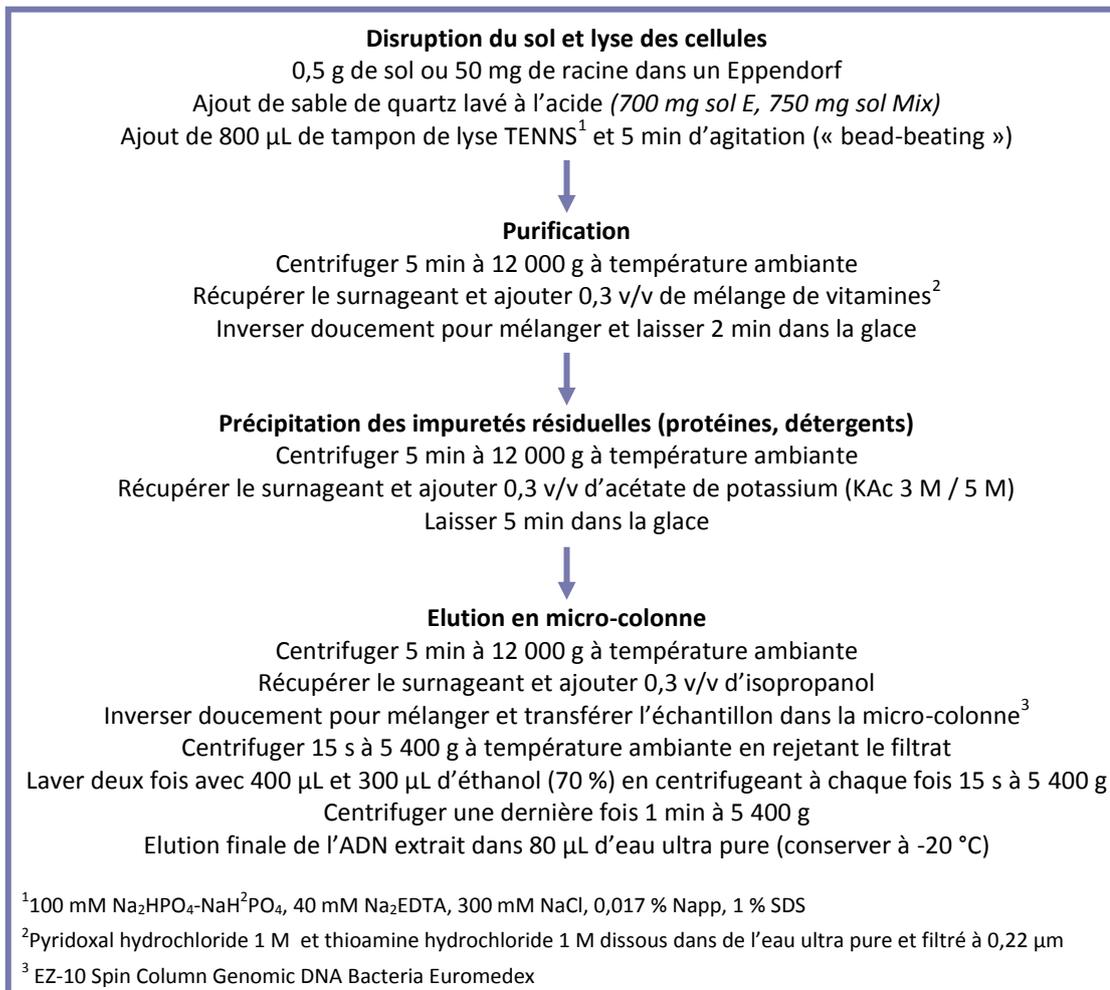


Figure 14. Protocole d'extraction et purification de l'ADN total du sol.  
(d'après Técher et al. 2010)

La **qualité de l'extraction** est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (à 0,8 %) coloré à l'aide de Gelred avant sa polymérisation pour la visualisation de l'ADN sous rayonnement UV : 5 µL d'ADN sont mélangés à 4 µL de tampon de charge (1x DNA Loading Dye), puis ils sont mis à migrer pendant 45 min sous une tension de 120 V dans une solution de Tris, Borate, EDTA (TBE) à 1 X. Un marqueur de poids moléculaire (1 kpb) est utilisé comme référence pour confirmer la taille du fragment d'ADN extrait. De plus, la concentration d'ADN (ng µL<sup>-1</sup>) ainsi que sa pureté dans

l'échantillon sont déterminées par mesure des absorbances à 260 nm, 280 nm et 230 nm. Alors que l'absorbance à 260 nm sera employée pour calculer la concentration d'ADN, un rapport  $DO_{260} / DO_{280}$  compris entre 1,8 et 2 permettra de vérifier une éventuelle contamination protéique et un rapport  $DO_{260} / DO_{230}$  compris entre 1,7 et 2,3 indiquera une absence de dégradation de l'ADN et de saccharides (Etienne 2006). Le calcul de la concentration d'ADN est utilisé pour homogénéiser le volume spécifique d'extrait d'ADN de chaque échantillon pour la suite de l'analyse : la concentration la plus faible sera retenue pour calculer les taux de dilutions.

Ensuite, la région variable V3 de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) est amplifiée par **polymérisation en chaîne (PCR)** à partir de l'extrait d'ADN purifié, en utilisant le couple d'amorces spécifiques à la position 341-534 dans la séquence d'*Escherichia coli*, le fragment d'ADN à amplifier faisant environ 200 pb. Les amorces utilisées sont :

- 341F : 5' CACGGGGGGGCCTACGGGAGGCA GCAG 3'. Le GC-clamp (*i.e.* séquence de 40 pb riche en guanine (G) et cytosine (C)) est ajouté pour éviter la séparation complète du double brin d'ADN durant l'analyse par électrophorèse à gradient temporelle de température (TTGE) ;
- 534R : 5' ATTACCGCGGTGCTGG 3'.

La réaction a lieu dans 50  $\mu$ L d'une solution composée de :

- ☞ 20,2  $\mu$ L d'un *mélange de mix PCR* permettant d'atteindre au final 1 X de tampon PCR (sans magnésium ni détergent), 25 pmol de chaque amorce oligonucléotidique (341 F-GC et 534R), mix dNTP contenant 200  $\mu$ M de chaque désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate) et dTTP (désoxy thymine tri-phosphate), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,04 mg  $L^{-1}$  d'albumine de sérum bovin (BSA) et une unité de *Taq* polymérase (Técher et al. 2010) ;
- ☞ 29,8  $\mu$ L d'une *solution composée de l'extrait d'ADN* de chaque échantillon dilué avec de l'eau ultra pure stérile pour homogénéiser les concentrations en fonction des mesures de DO à 260 nm des produits d'extraction.

Les cycles de PCR comprennent :

- (i) une étape de dénaturation initiale de 5 min à 94 °C ;
- (ii) une série de 19 cycles de : 30 s de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation à 63 °C (avec une diminution de 1 °C tous les 2 cycles jusqu'à atteindre 54 °C) et 40 s d'élongation à 72 °C ;
- (iii) une série de 15 cycles de : 30 s de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation à 54 °C et 30 s d'élongation à 72 °C
- (iv) une élongation finale de 5 min à 72 °C
- (v) la stabilisation de la température à 4°C.

La vérification des amplifications est faite par électrophorèse sur gel d'agarose (à 1,5 %) coloré à l'aide de Gelred avant sa polymérisation pour la visualisation de l'ADN sous rayonnement UV : 5 µL de produit PCR sont mélangés à 4 µL de tampon de charge (1x DNA Loading Dye), puis ils sont mis à migrer pendant 45 min sous une tension de 110 V dans une solution de Tris, Borate, EDTA (TBE) à 1 X. Un marqueur de poids moléculaire de 100 pb est utilisé comme référence pour confirmer la taille des fragments d'ADN amplifiés.

Afin d'obtenir le profil électrophorétique de la communauté bactérienne, une **analyse par Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE)** est faite (Dcode Universel Mutation Detection System, BioRad) pour séparer les brins d'ADN de même taille, après amplification PCR, dans un gel d'acrylamide/bisacrylamide (à 6 %), en ajustant la concentration d'urée à 8 M pour abaisser la température de dénaturation (soit, 6 mL de Acrylamide/Bis à 40 %, 1 mL de 50x TAE, 19,2 g de urée, 40 µL de TEMED, 400 µL d'ammonium persulfate à 10 % et de l'eau ultra pure stérile pour ajuster à un volume total de 40 mL). Le gradient de température est réglé pour augmenter de 57 °C à 67 °C en 5 h (*i.e.* palier de température de 2 °C h<sup>-1</sup>) et l'électrophorèse est faite à 110 V dans une solution de Tris, acétate, EDTA (TAE) à 1,25 X. Entre 12,5 µL et 15 µL de produit de PCR sont mélangés à 12 µL de tampon de charge (0,05 % de bleu de bromophénol, 0,05 % et 70 % de glycérol) avant la déposition des échantillons dans les puits du gel. Les gels sont révélés grâce à une solution de nitrate d'argent (1 % de HNO<sub>3</sub> et 0,1 % AgNO<sub>3</sub>, bain de 7 min, 3 rinçages à

l'eau ultra pure). Une solution de formaldéhyde (2 % NaOH, 0,04 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> supplémentés de 3 mL de HCOH/L à 37 %) est utilisée pour le développement avec arrêt par rinçage à l'eau ultra pure selon l'appréciation du manipulateur.

Sur un profil électrophorétique d'une communauté bactérienne, chaque bande représente en théorie une population (bactérienne) homogène pouvant correspondre à une espèce (Roudière et al. 2007). Afin de systématiser les critères de connaissance de bandes, les gels sont analysés au moyen du logiciel Quantity one v.4 (Biorad). Ensuite sont calculés :

☞ l'indice de similitude (S) pour comparer les profils (De Fede et al. 2001) :

$$S = \frac{2 * n_{ab}}{n_a + n_b}$$

où,

$n_{ab}$  est le nombre de bandes que les deux profils partagent  
 $n_a$  et  $n_b$  est le total du nombre de bandes du profil a et b

☞ la distance ou différence (D) entre les profils (De Fede et al. 2001) :

$$D = 1 - S$$

Un dendrogramme est donc élaboré suivant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) pour regrouper les profils électrophorétiques des communautés bactériennes obtenues suivant leur degré de similitude.

#### 4.1.4 Analyse statistique

La comparaison de deux petits échantillons (*i.e.*  $n < 30$ ) sera réalisée au moyen du test de Student (*i.e.* t-test) après avoir vérifié la normalité de la distribution correspondante.

Quant à la comparaison de groupes d'échantillons multiples, elle sera réalisée au moyen d'une analyse de variance après vérification de la normalité des populations. En cas d'hypothèse de différence significative suite à l'analyse, les tests de Holm-Sidak seront mis en œuvre, soit pour comparer des groupes par rapport à une série témoin, soit pour comparer tous les groupes entre eux.

L'ensemble des tests statistiques est réalisé avec un risque  $\alpha < 0,05$ .

## 4.2 Etude *in situ* de la culture de *M. x giganteus* sur sol de friche

Les études de laboratoire ont ensuite été complétées par une étude expérimentale en milieu naturel. Deux sites ont été employés afin de refléter au mieux les différentes situations rencontrées en Lorraine : le premier est le site correspondant aux prélèvements de sols ayant servi au mésocosme (cf. section 4.1.1.2) ; le second est un ancien site minier recouvert d'une couche de sol en protection, isolant les polluants dans des couches plus profondes.

### 4.2.1 Description des parcelles expérimentales

#### 4.2.1.1 Site 1 : ancienne cokerie

En octobre 2008, une culture expérimentale a été mise en place sur la friche industrielle de l'ancienne cokerie de Thionville. Sur les deux zones préalablement utilisées pour la réalisation de l'étude en mésocosme (Figure 7) des parcelles de 16 m<sup>2</sup> (4 m x 4 m) sont installées : une parcelle pour le sol E, une parcelle pour le sol Mix. Après avoir complètement désherbé chaque parcelle, seize mottes de rhizome de *M. x giganteus* sont plantées (fragments de 10 à 15 cm), à environ 20 cm de profondeur ; soit avec une densité de 1 rhizome / m<sup>2</sup> (Huisman et Kortleve 1994; Clifton-Brown et al. 2001; Lewandowski et al. 2003; Defra 2007; Christian et al. 2008; Pyter et al. 2010). Chaque parcelle est accompagnée d'une parcelle témoin non plantée qui est aussi désherbée au moment des plantations (Figure 15).



Figure 15. Parcelle expérimentale sur le terrain pour la culture de *M. x giganteus* sur sol de friche pollué (Site 1 : ancienne cokerie).

#### 4.2.1.2 Site 2 : ancien site minier

Une deuxième culture expérimentale de *M. x giganteus* est lancée fin Juin 2009, sur les terrains en friche de l'ancienne mine de fer (fermée depuis 1952) de la commune de Fontoy (département de la Moselle). La mise en place des mottes de rhizomes est effectuée de façon mécanique sur une zone d'environ 150 m<sup>2</sup> avec une densité de plantation d'environ 2 rhizomes par m<sup>2</sup> (Figure 16). Il faut noter que la totalité de la zone est recouverte d'une couche superficielle (environ 70 cm) de sol non pollué afin d'isoler le sol potentiellement pollué répondant ainsi aux obligations réglementaires. 8 parcelles de 16 m<sup>2</sup> sont délimitées pour le suivi de la croissance des plantes.



Figure 16. Plantation mécanique la culture expérimentale sur le terrain de *M. x giganteus* sur sol de friche pollué et amendé avec une couche superficielle de sol non pollué (Site 2 : ancien site minier).

#### 4.2.2 Suivi et entretien des cultures

Dès la première année de croissance (2009), les cultures sont suivies régulièrement avec le relevé de la levée de la culture, la hauteur des plantes (du sol au premier entrenœud), le nombre de pousses par rhizome et le nombre de plantes produisant plus d'une pousse (exprimé en %) (Lewandowski 1998; Clifton-Brown et al. 2001; Kaack et Schwarz 2001; Clifton-Brown et Lewandowski 2002; Christian et al. 2008; Richter et al. 2009; Pyter et al. 2010). Ces relevés sont complétés dès la deuxième année par le nombre d'entrenœuds et le diamètre externe (mesuré sur la coupe au raz du sol) (Lewandowski 1998; Clifton-Brown et al. 2001; Kaack et Schwarz 2001;

Clifton-Brown et Lewandowski 2002; Christian et al. 2008; Richter et al. 2009; Pyter et al. 2010).

Si le contrôle des herbes adventices n'est indispensable que pendant la première année de culture de *M. x giganteus* (Himken et al. 1997; Lewandowski et al. 2003), un désherbage manuel est maintenu durant les trois premières années de culture pour s'assurer de l'absence de compétition avec d'autres végétaux autochtones.

#### **4.2.3 Traitement des données et analyse statistique**

La comparaison de deux petits échantillons (*i.e.*  $n < 30$ ) sera réalisée au moyen du test de Student (*i.e.* t-test) après avoir vérifié la normalité de la distribution correspondante.

Quant à la comparaison de groupes d'échantillons multiples, elle sera réalisée au moyen d'une analyse de variance après vérification de la normalité des populations. En cas d'hypothèse de différence significative suite à l'analyse, les tests de Holm-Sidak seront mis en œuvre pour comparer tous les groupes entre eux.

L'ensemble des tests statistique est réalisé avec un risque  $\alpha < 0,05$ .

### **4.3 Analyse *in vitro* des bactéries associées à la rhizosphère de *M. x giganteus* en présence de deux éléments traces métalliques, Zn et Cr**

#### **4.3.1 Plans d'expérience**

Une série de plans d'expériences factoriels complets est réalisée pour mettre en évidence l'effet de *M. x giganteus*, en utilisant des exsudats racinaires de *M. x giganteus* et suivant la proximité racinaire, sur la croissance et diversité des bactéries potentiellement résistantes aux ETM natives des sols de friche cultivées en pression métallique (Zn et Cr). Plusieurs situations et arguments sont considérés pour définir les différents plans factoriels et facteurs utilisés.

Le premier type de facteurs susceptibles d'influencer la croissance bactérienne correspond aux deux ETM (*i.e.* Zn et Cr) principalement présents sur les parcelles expérimentales utilisées pour l'étude en mésocosme (*i.e.* sol E et sol Mix). Ces

parcelles contiennent en effet des teneurs d'ETM différentes et leur biodisponibilité y est aussi différente comme le montre les analyses physico-chimiques réalisées par ailleurs. Ces métaux seront donc employés en combinaison, leur l'interaction pouvant entraîner différents effets sur les microorganismes du sol, notamment le développement de populations différentes (Whitacre 2011). D'autre part, le Zn est un oligoélément pour les plantes qui peut devenir toxique à des concentrations élevées (Broadley et al. 2007) et son transfert vers la partie aérienne de *M. x giganteus* est différent selon le type de sol utilisé. Quant au Cr il n'est en revanche pas indispensable pour les végétaux, sa forme hexavalente (plus mobile que le Cr<sup>3+</sup>) provoquant de plus souvent des dommages sur l'ADN (Labra et al. 2004).

Le second type de facteur pouvant influencer la croissance bactérienne réside dans leur capacité à utiliser les exsudats racinaires produits par *M. x giganteus*. Certaines bactéries favorisées par la présence de la plante pourraient de plus participer à la biodisponibilité et mobilité des ETM dans le sol (Khan 2005; Kidd et al. 2009). Des exsudats racinaires extraits en phase aqueuse (cf. section 4.3.2.1) à partir de plantes cultivées dans du sable de quartz en l'absence de pollution sont utilisés.

Finalement, la diversité de la communauté bactérienne peut changer d'un sol à l'autre selon les variables édaphiques spécifiques à chacun (e.g. granulométrie, pH, éléments minéraux, composés organiques) (Fierer et Jackson 2006). Cette diversité native peut être modifiée sous l'influence de la plante (Badri et al. 2009), ce qui est déterminant pour l'interaction plante-microorganismes inhérente aux processus de phytoremédiation (Yang et al. 2005). De plus, les rhizodépôts racinaires peuvent interagir directement avec les ETM en favorisant ou, au contraire, en inhibant leur biodisponibilité (présence de phytochélatines par exemple (Clemens 2006)), entraînant aussi des modifications des communautés de microorganismes du sol (Bååth 1989). Le dernier facteur sera donc représenté par la nature du consortium bactérien utilisé et sa proximité avec la zone d'influence des racines de *M x giganteus*.

Les plans factoriels complets préparés sont donc des plans à 4 facteurs ([Zn], [Cr], Exsudats, Type de consortium) et 2 niveaux, soit des plans de type 2<sup>4</sup> (Tableau 10).

Tableau 10. Plan d'expérience général portant sur trois facteurs continus ([Zn], [Cr], [Exsudats]), un facteur discret (Type de consortium) et deux niveaux (*i.e.* 2<sup>4</sup>). Le type de consortium employé (A ou B) correspond aux consortia issus du rhizoplan, de la rhizosphère ou de la zone non rhizosphérique des sols E ou Mix. Les consortiums comparés seront précisés conjointement avec les résultats. Les concentrations retenues pour les ETM correspondent à la concentration maximale rencontrée dans les sols (« +1 ») et à la fraction potentiellement biodisponible (« -1 ») (*cf.* section 5.2.3.3).

Combinaison	Facteurs			
	[Zn]	[Cr]	[Exsudats]	Type de consortium
1	-1	-1	-1	A
2	+1	-1	-1	A
3	-1	+1	-1	A
4	+1	+1	-1	A
5	-1	-1	+1	A
6	+1	-1	+1	A
7	-1	+1	+1	A
8	+1	+1	+1	A
9	-1	-1	-1	B
10	+1	-1	-1	B
11	-1	+1	-1	B
12	+1	+1	-1	B
13	-1	-1	+1	B
14	+1	-1	+1	B
15	-1	+1	+1	B
16	+1	+1	+1	B

Niveau « -1 »	0,26 mmol L <sup>-1</sup>	0,06 mmol L <sup>-1</sup>	0,0062 mg L <sup>-1</sup>	A
Niveau « +1 »	3,21 mmol L <sup>-1</sup>	12,21 mmol L <sup>-1</sup>	0,0620 mg L <sup>-1</sup>	B

La réponse considérée (Y) est la concentration bactérienne standardisée mesurée par la technique du NNP (appliquée à la mesure de DO à 600 nm) après 15 jours de culture (pour le calcul *cf.* 4.1.4.5). Après lecture, les réplicats positifs mélangés par type de traitement et conservés (-20 °C) pour les analyses de la diversité bactérienne.

L'étude de la diversité bactérienne est basée sur l'extraction de l'ADN total au moyen du EZ-10 Spin Column Genomic DNA-Kit bacteria sample (BioBasic Inc.): une digestion et lyse cellulaire est faite (20 min à 55 °C) à l'aide d'une solution enrichie en protéinase K puis l'ADN est récupéré en utilisant une micro-colonne dotée d'une membrane de silice. L'analyse de l'ADN génomique bactérien (*i.e.* PCR-TTGE) est identique à celle indiquée dans la section 4.1.4.5.

La croissance bactérienne en absence des ETM (*i.e.* NPP total) est déterminée pour normaliser les données de la croissance par combinaison testée et permettre ainsi

l'analyse des effets des facteurs sans le biais lié au nombre de bactéries présent dans le sol.

## 4.3.2 Préparation du matériel biologique

### 4.3.2.1 *Les exsudats racinaires*

Les exsudats racinaires sont extraits des racines portées par des rhizomes de *M. x giganteus* après 2 mois de culture dans du sable de quartz stérile. Les racines sont mises à diffuser dans de l'eau distillée stérile pendant 2 h qui est filtrée à l'aide d'un disque de microfibre de verre : Whatman GF/B, porosité de 1  $\mu\text{m}$ . Le filtrat est ensuite lyophilisé sous forme de poudre puis conservé en ampoule scellée.

Les solutions d'exsudats racinaires sont préparées dans l'eau ultra pure stérile avant d'être ajoutées dans les puits d'une microplaque pour les concentrations désirées, à savoir 0,0062 mg mL<sup>-1</sup> (Niveau « -1 », concentration finale) et 0,062 mg mL<sup>-1</sup> (Niveau « +1 », concentration finale).

### 4.3.2.2 *Les milieux de culture bactériens*

Le milieu minimum Bushnell-Haas (BH) est utilisé afin de pouvoir contrôler la source de carbone disponible pour la croissance bactérienne. Il est préparé de telle façon que la concentration finale du milieu BH dans chaque puits soit respectée ; à savoir :

Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	0,2368 g L <sup>-1</sup>
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	0,0237 g L <sup>-1</sup>
Phosphate de monopotassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,1842 g L <sup>-1</sup>
Dipotassium hydrogénophosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,1842 g L <sup>-1</sup>
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	1,1842 g L <sup>-1</sup>
Chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> )	0,0592 g L <sup>-1</sup>
Chlorure de sodium (NaCl)	10,0658 g L <sup>-1</sup>

Le milieu BH reçoit ensuite les ETM en fonction des concentrations souhaitées (c.f. Tableau 10) sous forme de nitrate de zinc (*i.e.* Zn<sup>2+</sup>) et de bichromate de potassium (*i.e.* Cr<sup>6+</sup>). Après l'ajout, le pH est ajusté à 7,5 ; les milieux sont finalement stérilisés par filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.3 Les consortia bactériens

Des échantillons de sol non rhizosphérique, sol rhizosphérique et de racines sont récupérés des deux parcelles expérimentales de *M. x giganteus* (i.e. sol E et sol Mix) au début du mois de novembre 2010 (soit, au 2<sup>ème</sup> cycle de croissance de la plante). Six prélèvements sont faits par type d'échantillon ; les 6 prélèvements sont mélangés pour homogénéisation. Une suspension bactérienne est faite pour chaque type de sol (cf. section 4.1.3.5). Pour la préparation des échantillons de rhizoplan, une suspension bactérienne est réalisée à partir de 3 g de racines de prise d'essai traités comme les sols (cf. section 4.1.3.5). Puis les dilutions en cascade sont préparées pour chaque suspension (i.e.  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ).

#### 4.3.3 Mise en place du plan d'expérience

Une microplaque est préparée pour chaque dilution par type d'échantillon. Huit puits sont inoculés par condition expérimentale ; quatre puits sont laissés sans inoculum (i.e. blanc) (Figures 17). Chaque puits contient : 190  $\mu$ L de milieu de culture, 10  $\mu$ L de source de carbone (i.e. exsudats) et 25  $\mu$ L de dilution de sol (i.e. inoculum bactérien ; ou d'eau ultra pure stérile dans le cas du blanc).

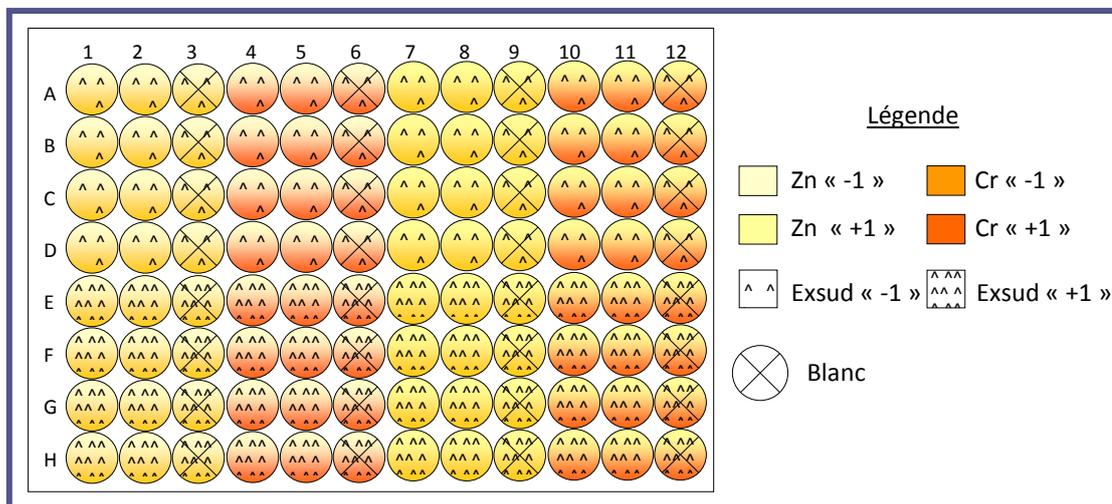


Figure 17. Modèle de microplaque utilisé pour le plan factoriel.

En ce qui concerne l'analyse du NPP total (i.e. milieu BH sans ETM), la même configuration est utilisée pour la préparation des microplaques.

#### 4.3.4 Analyse statistique

Une fois l'expérience réalisée, la réponse ( $y$  = croissance bactérienne) est modélisée en fonction des facteurs (*i.e.* Zn, Cr, exsudats et proximité racinaire) pour le sol E ou Mix. La modélisation permet de définir les coefficients des différents facteurs, ou de leurs combinaisons (en se limitant aux combinaisons d'ordre deux), traduisant leurs effets sur la réponse. Parmi l'ensemble des coefficients calculés, les coefficients significatifs sont déterminés à partir de « Prob.>|t| » pour une « P-value » < 0,05. En cas d'effet significatif, des graphiques représentant la croissance bactérienne en fonction de l'expression de ce(s) facteur(s) seront tracés, pour préciser la façon dont il(s) affecte(nt) la croissance.

La même démarche est appliquée pour la modélisation de la croissance bactérienne du rhizoplan des deux sols (Sol E et Mix) en fonction des facteurs : Zn, Cr, exsudats.

## 5 Résultat et discussion

### 5.1 Caractéristiques initiales des sols de friche utilisés

#### 5.1.1 Paramètres agronomiques des sols de friche

La caractérisation physico-chimique des sols permet de définir les conditions agronomiques auxquelles les plantes seront exposées. Ces connaissances préalables détermineront les chances d'implantation et de survie des rhizomes de *M. x giganteus*. Parmi les paramètres étudiés, la texture des sols, dont dépendront la dynamique de l'eau, la mobilité des nutriments (les ETM inclus), le développement racinaire et la respiration (Calvet 2003) sont définies.

L'analyse des sols utilisés (sols E et Mix) de l'ancienne cokerie de Thionville montre, tout d'abord, une quantité élevée en éléments grossiers (de 62 à 63 % de la masse totale des deux sols) classés dans la catégorie des cailloux (*i.e.* fragments de 2 à 7,5 cm) est observée lors de la séparation des fractions fine et grossière des sols. Cette proportion, supérieure à 60 %, lui attribue le qualificatif de « caillouteux » qui devra être ajouté au moment de définir la texture du sol selon Baize (2000). Cependant, celui-ci n'accompagne pas la classification texturale du sol dans le cas du mésocosme puisque seule la fraction fine (< 2 mm) est utilisée. L'analyse granulométrique de la fraction fine (< 2 mm) a dévoilé une différence dans la proportion des argiles, limons et sables entre les deux sols, aboutissant ainsi à des textures dissemblables (Figure 18). Le sol de la friche (ancienne cokerie de Thionville) présentant une pollution majoritaire en ETM (sol E) est constitué principalement des sables fins et grossiers (plus de 70 %), avec une texture associée à celle des sols sable-limoneux, d'après le diagramme de texture proposé par Jamagne (1967). En revanche, le sol présentant une pollution mixte en ETM et HAP (sol Mix) contient principalement des limons fins et des argiles (plus de 50 %) : sa texture correspond à celle des sols limon sablo-argileux.

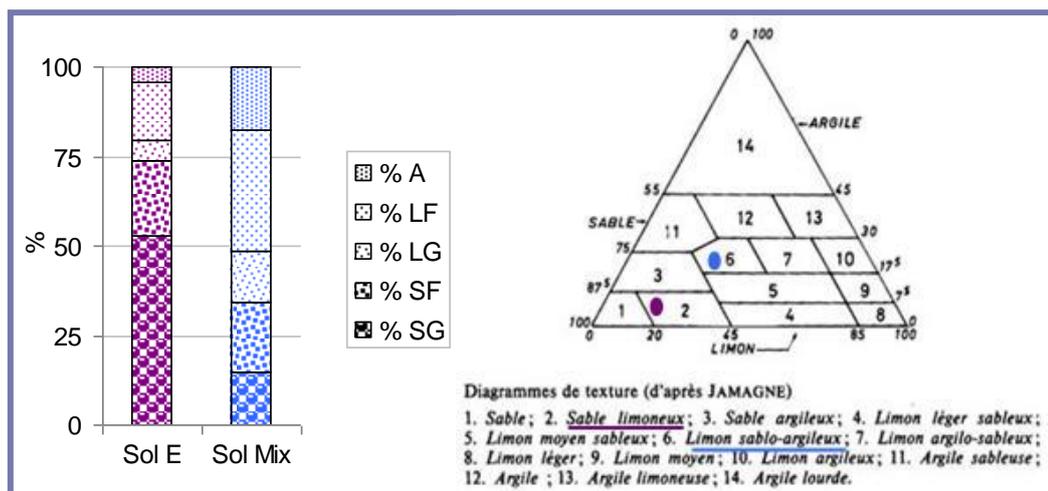


Figure 18. Répartition des particules < 2mm de la fraction solide des sols de friche et leur texture associée selon le « diagramme de texture » (Jamagne, 1967). (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; A : Argiles ; LF : limons fins ; LG limons grossiers ; SF : sables fins ; SG : sables grossiers ; moyenne pondérée à 100 % ; n = 3).

Ces résultats laissent présumer que le sol E serait plus perméable tandis que le sol Mix aurait tendance à retenir plus d'eau. Ceci est confirmé par les valeurs obtenues pour la capacité de rétention d'eau. Dans notre cas, le sol Mix retient 1,5 fois plus d'eau que le sol E. **Les deux textures observées sont adaptées aux besoins agronomiques de *M. x giganteus*** ; toutefois le sol E serait plus favorable à la mise en place de la culture tandis que le sol Mix serait préférable en terme de rendement à long terme (Lewandowski et al. 2003).

Ces sols montrent également des différences au niveau des caractéristiques chimiques. Tout d'abord, les résultats du pH (Tableau 11) permettent de classer ces deux sols parmi les sols alcalins, *i.e.*  $7,3 < \text{pH} < 9,1$  selon Cameron (1992), le sol Mix étant légèrement plus basique que le sol E. Les deux sols sont aussi dominés par la présence des carbonates de sodium, de calcium et de magnésium (réaction positive à l'acide chlorhydrique), entraînant une déficience en nutriments comme le montrent les mesures de pH-CaCl<sub>2</sub> ( $> 7,6$ ) et de pH-H<sub>2</sub>O ( $> 8$ ) ; et sous ces conditions, seules les plantes tolérantes à l'alcalinité peuvent survivre (Peverill et al. 1999). Finalement, le pH interfère aussi sur la solubilité chimique des ETM avec notamment une faible mobilité pour les sols alcalins et une augmentation de l'effet lié au vieillissement des pollutions (Peverill et al. 1999; Lock et Janssen 2003b; Kirkham 2006).

**Tableau 11.** pH des sols de friche à l'état initiale. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 3 ; comparaison des sols E et Mix par type de pH [t-test ( $\alpha < 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative]).

Sol	pH-H <sub>2</sub> O	pH-KCl	pH-CaCl <sub>2</sub>
Sol E	8,21 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	8,00 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	7,48 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
Sol Mix	8,41 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	8,01 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	7,96 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>

Si le pH joue un rôle important pour déterminer la solubilité et réactivité des éléments présents dans le sol (e.g. Al, Mn, Cd et autres ETM), la capacité des sols à les retenir est déterminée par la capacité d'échange cationique (CEC) et la teneur en cations échangeables (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) (Peverill et al. 1999; Hund-Rinke et Kördel 2003). Les deux sols ont une CEC élevée (CEC > 20 cmol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>), leur attribuant une forte capacité à retenir les éléments et les lie étroitement, y compris les ETM (Tableau 12). Les CEC des sols E et Mix sont comparables malgré leur différence de texture ce qui est contraire aux observations de Cameron (1992) qui indique que des sols présentant des fortes teneurs en argiles ont tendance à avoir des CEC élevées, contrairement à ceux de textures sableuses qui ont plutôt des CEC faibles. Cette capacité peut toutefois varier selon la nature de l'élément absorbé, de la nature et la quantité de l'absorbant et le lessivage (Cameron 1992; Marx et al. 1999).

**Tableau 12.** Capacité d'échange cationique (CEC) et teneur en cations échangeables des sols de friche à l'état initiale. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 3 ; comparaison des sols E et Mix par type d'analyse [t-test ( $\alpha < 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative]).

Sol	CEC (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	Ca (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	Mg (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	Na (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	K (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )
Sol E	19,16 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	0,288 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,247 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,027 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,063 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Sol Mix	23,92 $\pm$ 13,92 <sup>a</sup>	0,390 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,376 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,058 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,097 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>

En revanche, des différences entre les deux sols sont observées, notamment pour les cations échangeables, avec une teneur plus élevée en Mg, Na et K dans le sol Mix. Malgré cette différence, leur concentration reste toujours faible selon les concentrations limites fixées par Marx et collaborateurs (1999), à savoir : Ca < 0,5 cmol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>, K < 0,4 cmol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> et Mg < 0,5 cmol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>. Bien que, les ratios K : Mg et Ca : Mg soient supérieurs à 0,1 et 0,2 respectivement, la croissance des plantes est supposée ne pas être inhibée sur les sols étudiés (Conesa et al. 2007). De plus, la

présence de sodium ne présentera pas de caractère nuisible car il n'occupe pas plus de 10 % de la CEC des sols de friche (Marx et al. 1999).

Quant à la présence de carbone organique totale et d'azote total (Tableau 13), leur teneur est équivalente dans les sols de friche, entraînant un ratio C:N comparable, compris entre 42 et 49. Théoriquement, lorsque le ratio C:N est supérieur à 30, les microorganismes hétérotrophes sont limités en azote, d'où l'utilisation de sources exogène telles que le  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  pour la décomposition de la matière organique (Kaye et Hart 1997). Les plantes absorbent principalement l'azote du sol sous la forme d'ion minéraux nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Morot-Gaudry 1997). Il peut donc y avoir une compétition entre les plantes et les microorganismes hétérotrophes pour ce nutriment. Nonobstant, l'interprétation de ce ratio est sujette à caution du fait des variations temporelles de la température et de l'humidité du sol qui affectent la dynamique de la biomasse microbienne dont l'activité participe à la transformation de l'azote du sol (Bengtsson et al. 2003).

Tableau 13. Teneur en carbone organique et azote totaux des sols de friche à l'état initiale. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; COT : carbone organique total ; NT : azote total ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 3).

Sol	COT (%)	NT (%)	C:N
Sol E	10,90 $\pm$ 1,85	0,23 $\pm$ 0,02	49,08 $\pm$ 12,02
Sol Mix	7,80 $\pm$ 2,34	0,19 $\pm$ 0,01	41,97 $\pm$ 14,03

La qualité du sol est déterminante pour la mise en place des cultures de végétaux. Bien que **les conditions agronomiques des deux sols de friche ne soient pas optimales** au regard de celles qui caractérisent les sols agricoles, *M. x giganteus* est reconnue pour être très efficace quant à l'utilisation des nutriments et ses capacités d'adaptation à une large gamme de sols (Beale et Long 1997; Jørgensen 1997; Kahle et al. 2001). En conséquence, la composition en éléments nutritifs et la fertilité de ces deux sols ne devrait pas nuire à l'implantation du végétal mais pourraient cependant légèrement influencer sa croissance. D'autre part, les **caractéristiques physico-chimiques des sols laissent supposer une immobilisation des ETM au niveau de la matrice du sol** (pH et CEC élevés, présence d'argiles, de limons, de carbonates et des composés organiques), ce qui réduirait l'exposition des plantes à

ces polluants, favorisant ainsi leur développement. La mesure du niveau de pollution en ETM des sols ainsi que leur mobilité et biodisponibilité permettront non seulement de vérifier cette hypothèse mais aussi de pouvoir suivre leur évolution en présence de *M. x giganteus*.

### 5.1.2 Pollutions en éléments traces métalliques des sols de friche

L'analyse des ETM totaux dans les deux sols de friche (Tableau 14) ont permis de confirmer d'une part, qu'ils contiennent des teneurs très élevées par rapport à la vibrisse supérieure<sup>10</sup> du contenu en ETM des sols Français provenant des horizons de surface labourés (Baize et al. 2007) et d'autre part, que les concentrations dans les sols varient suivant l'élément et le lieu d'échantillonnage sur le terrain de la friche considéré. Il apparaît que **le sol E est majoritairement pollué par Cr et Cu alors que le sol Mix l'est par Cd, Pb et Zn**. L'ensemble des ETM est cependant présent dans les deux sols.

Tableau 14. Teneurs totales en ETM ( $\text{mg kg}^{-1}$  – MS) des sols de friche à l'état initiale. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP); Vibrisse supérieure : calculée à partir des sols labourés français (Baize et al. 2007) ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 3$  ; comparaison des sols E et Mix par ETM [t-test ( $\alpha < 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative]).

Sol	Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ – MS)	Cr ( $\text{mg kg}^{-1}$ – MS)	Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ – MS)	Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$ – MS)	Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ – MS)	Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ – MS)
Sol E	15,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	<b>412,4 <math>\pm</math> 14,3<sup>a</sup></b>	<b>872,2 <math>\pm</math> 74,6<sup>a</sup></b>	71,0 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	2 172 $\pm$ 234 <sup>a</sup>	1 660 $\pm$ 194 <sup>a</sup>
Sol Mix	<b>20,2 <math>\pm</math> 0,6<sup>b</sup></b>	95,5 $\pm$ 8,7 <sup>b</sup>	267,1 $\pm$ 5,9 <sup>b</sup>	68,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	<b>10 696 <math>\pm</math> 2 674<sup>b</sup></b>	<b>5 185 <math>\pm</math> 117<sup>b</sup></b>
Vibrisse supérieure	0,80	91,8	33,3	50,3	52,4	122,5

De plus, des variations en ETM totaux sont observables dans le temps, en comparaison aux valeurs mesurées en ETM totaux en 2004 (rapport ANTEA 35295/B), à savoir : pour le sol E une pollution  $< 0,01$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$ , 1800 mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$ , 640 mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$ , 590 mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$ , 220 mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$ , 660 mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  et aucune trace de HAP, tandis que le sol Mix montrait une pollution de 11 mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$ , 140 mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$ , 260 mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$ , 76 mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$ , 10 000 mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$ , 7 700 mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  et

<sup>10</sup> Valeur définie statistiquement et égale à la valeur du troisième quartile d'une population plus 1,5 fois la distance interquartile. Toute valeur qui lui est supérieure est jugée comme « anormale » ou « aberrante » par rapport à la population étudiée.

environ 38,31 mg de HAP kg<sup>-1</sup>. Malgré ces différences, la proportion des pollutions en ETM entre les deux sols continue à suivre les mêmes tendances qu'auparavant, à savoir : le sol E est plus pollué en Cr et Cu, alors que le sol Mix a une pollution plus importante en Cd, Pb et Zn ; le Ni est la seule exception, avec des concentrations semblables pour les deux sols.

L'analyse des ETM totaux dans les sols est complétée par les analyses de la solution du sol (*i.e.* extraction au CaCl<sub>2</sub> à 0,01 M) et des éléments potentiellement biodisponibles (*i.e.* percolation à l'NH<sub>4</sub>Oac à 1 M), l'ensemble représentant les éléments capables d'interagir avec les organismes en cas d'expositions (Tableau 15). Ainsi, le Cd est absent dans la fraction liquide mais serait éventuellement biodisponible dans les deux sols en quantités similaires. Par contre, le Cr et le Zn sont présents dans la solution de sol et sous forme biodisponible ; ils se retrouvent à des concentrations comparables pour les deux sols, excepté le Zn dont les concentrations échangeables varient entre les deux sols. Le Cu reste présent sous forme biodisponible dans les deux sols, la concentration dans le sol Mix étant plus faible que celle du sol E. Le Ni semble être immobile dans les sols puisqu'il n'est pas détecté dans aucune des circonstances. Enfin, même si des interférences empêchent le dosage de la forme biodisponible du Pb, ce dernier est présent en quantité équivalentes dans les solutions des deux sols.

**Tableau 15.** Teneurs en ETM (mg kg<sup>-1</sup> – MS) de la solution du sol (*i.e.* extraction au CaCl<sub>2</sub>) et potentiellement biodisponibles (*i.e.* percolation à NH<sub>4</sub>Oac) parmi les ETM présents dans les sols de friche à l'état initial. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; nd : non détectable ; NA : non analysé ; moyenne ± écart-type ; n = 3 ; comparaison des sols E et Mix par ETM par type d'extraction [t-test ( $\alpha < 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative]).

ETM	Extraction au CaCl <sub>2</sub> à 0,01 M		Percolation au NH <sub>4</sub> Oac à 1 M	
	Sol E (mg kg <sup>-1</sup> – MS)	Sol Mix (mg kg <sup>-1</sup> – MS)	Sol E (mg kg <sup>-1</sup> – MS)	Sol Mix (mg kg <sup>-1</sup> – MS)
Cd	nd	nd	0,097 ± 0,065 <sup>a</sup>	0,153 ± 0,073 <sup>a</sup>
Cr	0,036 ± 0,62 <sup>a</sup>	0,089 ± 0,154 <sup>a</sup>	0,124 ± 0,167 <sup>a</sup>	0,327 ± 0,566 <sup>a</sup>
Cu	0,188 ± 0,004	Nd	0,842 ± 0,083 <sup>a</sup>	0,213 ± 0,125 <sup>b</sup>
Ni	Nd	Nd	Nd	Nd
Pb	0,163 ± 0,094 <sup>a</sup>	0,220 ± 0,089 <sup>a</sup>	NA	NA
Zn	0,103 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,142 ± 0,021 <sup>b</sup>	6,145 ± 4,887 <sup>a</sup>	11,886 ± 7,817 <sup>a</sup>

S'il existe effectivement une fraction mobile et biodisponible des ETM dans les sols, ces valeurs restent très inférieures aux concentrations totales indiquant que les ETM se trouvent principalement immobilisés dans la matrice solide des deux sols de friche. Cependant, la distribution des éléments dans les fractions non labiles est dans un constant mais fragile équilibre inhérent à la dynamique du sol qui se traduit par un passage des éléments entre les différentes phases en fonction des variations de milieu. De plus, si les ETM potentiellement disponibles sont complexés à la matière organique et non aux carbonates, les organismes seront plus vulnérables à leur présence, comme c'est le cas des vers de terre (Hobbelen et al. 2006). Il convient donc, non seulement d'évaluer les concentrations chimiques des éléments dans les sols mais aussi leur impact écotoxicologique au moyen d'organismes cibles, afin d'avoir une représentation plus complète de l'état des sols avant toute intervention.

### 5.1.3 Effets toxiques des fractions solides et liquides des sols de friche

En ce qui concerne la fraction solide du sol, la toxicité est déterminée au travers de l'exposition des vers de terre juvéniles d'*E. fetida*. Si un effet toxique aigu des deux sols est exclu, aucun d'eux n'ayant provoqué la mort des vers durant les périodes testées, les réductions significatives de biomasse par rapport au Contrôle (*i.e.*  $t_7$  et  $t_{14}$ ), mettent en évidence un effet sous-létal des sols de friche. Cet impact est statistiquement comparable pour les deux sols (Figure 19).

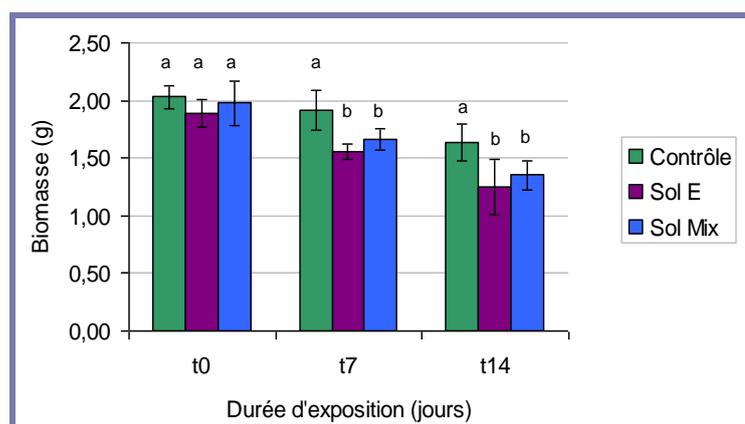
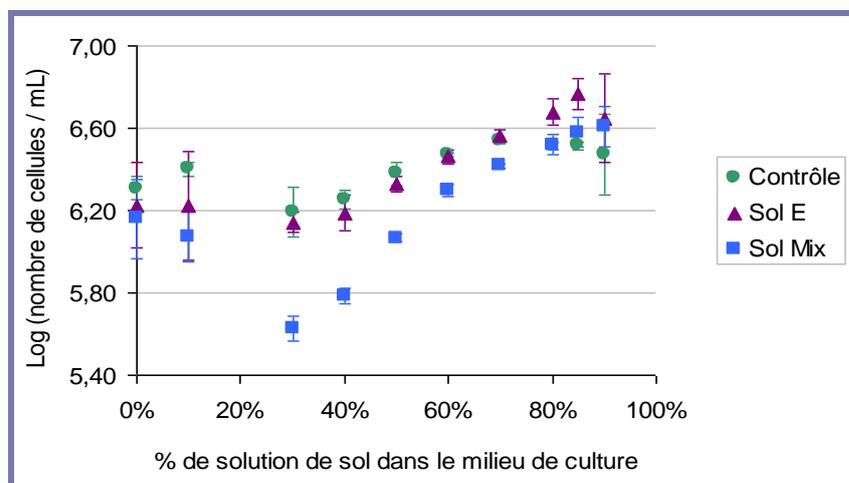


Figure 19. Biomasse des vers de terre après exposition à la fraction solide des sols de friche à l'état initiale.

Contrôle : sol non pollué ; sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP). Moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=5$  ; comparaison des sols E, Mix et Contrôle pour chaque temps d'exposition [ANOVA ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak entre paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Ces résultats sont confortés par l'analyse de la réaction tactile des vers qui indique que 48 % des vers pour le sol E et 54 % des vers pour le sol Mix sont à l'état « moribond » après 14 jours d'exposition, valeurs statistiquement supérieures à celles obtenues pour le Contrôle (16 % de vers moribonds).

En revanche, la fraction liquide du sol évaluée par le biais de la croissance algale, ne présente pas de caractère écotoxique, en comparaison au Contrôle, et ceci quelque soit le sol considéré (Figure 20). Toutefois, on peut noter une différence de la croissance des algues exposées à des dilutions de 30 % à 50 % du sol Mix.



**Figure 20.** Croissance des algues après 72 h d'exposition à la fraction liquide des sols de friche à l'état initiale.

*Contrôle : sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne ± écart-type ; n = 5.*

Pour conclure, **les analyses de la toxicité des fractions solides et liquides des deux sols de friche montrent que les sols ne présentent pas une toxicité aigüe sur les organismes. Cependant, des effets sous-létaux sont observés pour les fractions solides des sols et pas pour les fractions liquides, ce qui pourrait être lié à la partition des ETM dans les matrices des sols de friche (i.e. moins échangeables mais potentiellement biodisponibles).**

## 5.2 Développement de *M. x giganteus* sur sols de friche : Etude en mésocosme

### 5.2.1 Production de biomasse et autres caractéristiques

Tout d'abord, tous les plants de *M. x giganteus* se sont développés après 135 jours d'exposition aux sols de friche, les réserves nutritives du rhizome ayant été consommées dans la phase d'incubation préalable à la culture. Ceci conforte non seulement les indications d'autres équipes quant à la facilité de *M. x giganteus* de s'adapter à des sols aux caractéristiques agronomiques différentes, mais suppose aussi une capacité de la plante à tolérer les conditions défavorables à la croissance (milieu alcalin, pauvre en nutriments, etc.). Nonobstant, certaines caractéristiques physiologiques de *M. x giganteus* pourraient être perturbées selon le type de sol de friche où elle est cultivée.

Pour ce qui est de la hauteur, seules les plantes exposées au sol Mix sont significativement plus petites à la fin de la culture (Figure 21) avec une vitesse moyenne de croissance de  $0,18 \pm 0,04$  cm/jour en comparaison aux vitesses de croissance du Contrôle et du sol E, soit  $0,31 \pm 0,09$  cm/jour et  $0,25 \pm 0,04$  cm/jour, respectivement.

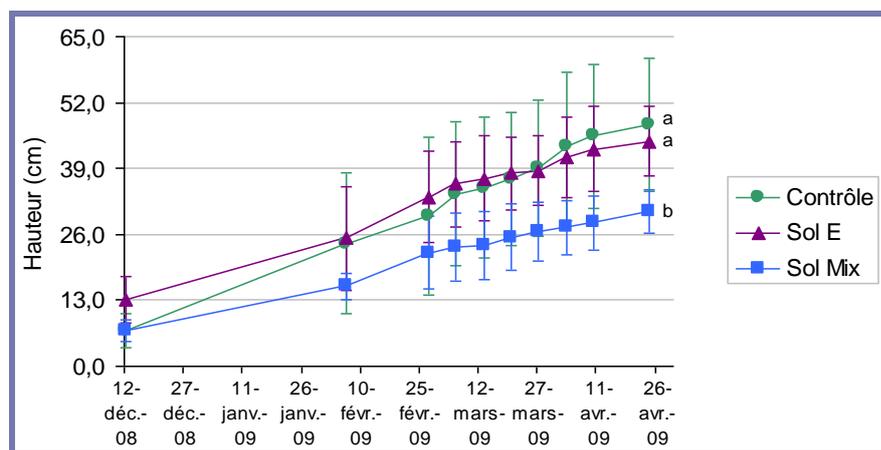


Figure 21. Évolution de la hauteur de *M. x giganteus* tout au long de sa culture en mésocosme sur les sols de friche.

Contrôle : sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 5$  [ANOVA ( $P < 0,05$ ) puis Holm-Sidak entre paires ( $\alpha > 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

La hauteur atteinte par *M. x giganteus* sur le sol Contrôle et le sol E (d'environ 45 cm) après 135 jours de croissance (*i.e.* 4,5 mois) est comparable à celle des essais en

Angleterre et dans le sud-ouest de l'Allemagne réalisés en plein champs sur des sols agricoles, pour lesquels des hauteurs moyennes varient de 43 cm pour 7 mois à 51 cm pour 5 mois de culture respectivement, lors de la première année de culture (Lewandowski 1998; Christian et al. 2008). Il faut noter que, malgré les similitudes entre le Contrôle et le sol E, leurs courbes se croisent en arrivant au dernier mois d'exposition (le Contrôle prenant l'avantage) sans toutefois qu'une différence significative ne soit notée. Il serait intéressant d'élargir la durée de culture afin de vérifier le maintien ou non de la similitude de croissance de *M. x giganteus* sur ces sols. Par ailleurs, le nombre d'entrenœuds sur la tige (tableau 16) qui est seulement diminué lors de l'exposition de la plante au sol Mix, confirme ces différences de taille, le nombre d'entrenœuds des plantes cultivées sur le Contrôle et le sol E restent comparables et en accord avec les valeurs reportées par Kaack et Schwarz (2001) pour des cultures de *M. x giganteus* en champ (12 entrenœuds au moment de la sénescence). Quant aux autres paramètres inhérents au développement du végétal (diamètre externe des tiges et nombre de nouveaux bourgeons sur le rhizome), ils sont comparables sur l'ensemble des sols utilisés (tableau 16). Le nombre de nouveaux bourgeons sur le rhizome témoigne d'une propagation active de *M. x giganteus* sur les sols de friche.

**Tableau 16.** Autres caractéristiques observées sur *M. x giganteus* à la fin de sa culture en mésocosme sur les sols de friche pollués. (Contrôle : sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5 ; comparaison entre Contrôle, sol E et Sol Mix [ANOVA ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak entre paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative]).

	Contrôle	Sol E	Sol Mix
Entrenœuds sur la tige (nombre)	13,60 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>	11,80 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 2,24 <sup>b</sup>
Diamètre externe de la tige (mm)	4,2 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	2,24 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>
Nouveaux bourgeons sur le rhizome (nombre)	4,40 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup>	4,20 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	3,40 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>

D'autre part, la production de biomasse sèche totale de *M. x giganteus* n'est perturbée par aucun des sols de friche, en comparaison au Contrôle et sur la durée de culture considérée malgré la hauteur plus réduite des végétaux cultivés sur le sol Mix. Il en est de même pour sa répartition dans les différentes parties de la plante (Figure 22).

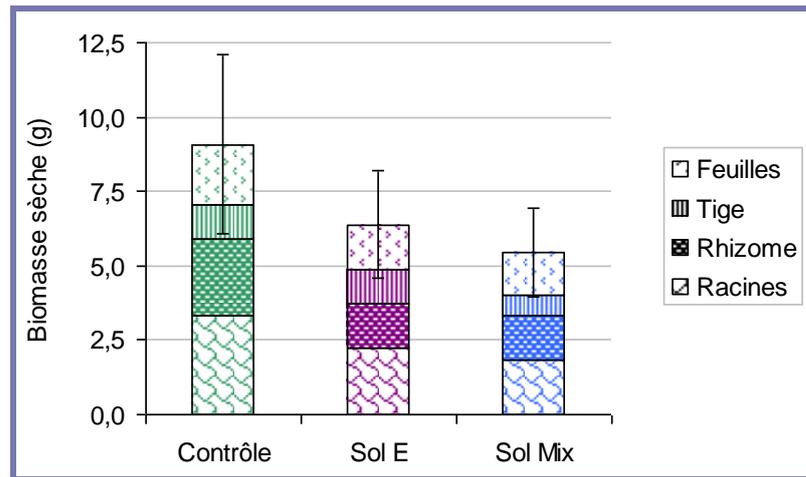


Figure 22. Répartition de la biomasse sèche de *M. x giganteus* après 135 jours d'exposition aux sols de friche en mésocosme.

Contrôle : sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne de 5 répétitions et l'écart-type correspond à celui de la biomasse sèche totale.

**Ces résultats sont importants pour la viabilité de la culture de *M. x giganteus* lors de la réhabilitation des sols de friche, considérant que la biomasse des feuilles et des tiges sont d'intérêt pour la production (énergétique), tandis que les rhizomes et les racines assurent la mise en place de la culture.**

Les mesures réalisées sont complétées par le calcul du taux relatif de croissance (TRC) en matière sèche. Toutes les plantes ont produit des quantités similaires de biomasse avec respectivement  $7,52 \pm 3,44 \text{ mg g}^{-1} \text{ j}^{-1}$  pour le Contrôle,  $8,09 \pm 2,46 \text{ mg g}^{-1} \text{ j}^{-1}$  pour le sol E et  $5,36 \pm 1,17 \text{ mg g}^{-1} \text{ j}^{-1}$  pour le sol Mix. En conséquence, **la relation entre la croissance et la production de biomasse de *M. x giganteus* ne varie pas en réponse aux changements des conditions du milieu où elle est cultivée.**

Le rapport des biomasses aériennes et souterraines (A/S), ne révèle pas non plus de différence significative entre les plantes exposées aux sols de friche ( $0,75 \pm 0,19$  et  $0,68 \pm 0,17$  pour le sol E et le sol Mix, respectivement) et le Contrôle ( $0,55 \pm 0,18$ ). **Les sols de friche n'ont pas perturbé la répartition de la biomasse dans la plante. Les rapports A/S sont tous inférieurs à 1, dénotant le développement de la partie souterraine ce qui suggère une bonne implantation de *M. x giganteus* ainsi qu'une rhizosphère importante ; les composantes aérienne et racinaires participent par**

ailleurs à la restitution des nutriments dans le sol comme la matière organique par exemple (Cheng et Kuzyakov 2005).

Si la morphologie générale des plants n'est pas perturbée après 135 jours d'exposition aux sols de friche, l'analyse de certaines conditions physiologiques des plantes peut donner d'autres indications additionnelles de la réponse de *M. x giganteus* à ces sols (Tableau 17). Une exposition élevée en ETM peut inhiber la consommation d'eau par les racines et limiter le flux entre le xylème et le phloème (Kholodova et al. 2011) ; ces cas de figure observés chez de nombreuses espèces ne se présentent pas ici, aucune différence entre la teneur en eau des plantes cultivées sur les sols de friche et celle du Contrôle n'ayant pu être déterminée. De même, les teneurs en chlorophylle contenues dans les feuilles de *M. x giganteus*, qui peuvent être utilisées comme système d'alerte précoce pour détecter des effets toxiques liés à l'accumulation des ETM dans les plantes avant la manifestation de symptômes visibles de phytotoxicité (Mendelssohn et al. 2001; Macinnis-Ng et Ralph 2002; Manios et al. 2003), ainsi que le ratio chl a / chl b, restent invariables pour les végétaux exposés aux deux sols de friche par rapport au Contrôle.

**Tableau 17.** Indicateurs de la condition physiologique de *M. x giganteus* à la fin de sa culture en mésocosme sur les sols de friche pollués. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5).

		Contrôle	Sol E	Sol Mix
Teneur en eau dans la plante (%)		55,9 $\pm$ 9,4	60,2 $\pm$ 2,2	61,3 $\pm$ 2,7
Contenu en chlorophylle (Chl) des feuilles (mg g <sup>-1</sup> MS)	Chl totale	3,53 $\pm$ 1,45	3,64 $\pm$ 1,03	3,82 $\pm$ 1,69
	Chl a	2,86 $\pm$ 1,18	2,97 $\pm$ 0,84	2,99 $\pm$ 1,36
	Chl b	0,67 $\pm$ 0,27	0,67 $\pm$ 0,19	0,83 $\pm$ 0,37
Ratio Chl a / Chl b		4,27 $\pm$ 0,06	4,39 $\pm$ 0,09	3,52 $\pm$ 0,92

**Les taux de chlorophylle et les flux d'eau n'étant pas entravés, plusieurs options de tolérance à l'exposition aux ETM sont envisageables pour *M. x giganteus* :** (i) elle pourrait être capable d'accumuler les ETM disponibles dans les sols, ou (ii) elle pourrait faire partie des plantes excluantes. Cependant, une teneur faible en ETM disponible dans le sol peut accélérer la croissance des plantes et augmenter le contenu de chlorophylle au lieu de l'inhiber (Manios et al. 2003) ; ce qui pourrait expliquer les teneurs comparables en chlorophylle entre les plantes, étant donné que

la disponibilité des ETM dans les deux sols de friche est limitée (cf. section 5.1.2). Par ailleurs, certaines plantes hypertolérantes sont capables de séquestrer les ETM aux niveaux des racines, en protégeant ainsi les cellules des feuilles (Verkleij et al. 2009). En conséquence, il est nécessaire d'analyser les tissus de *M. x giganteus* pour déterminer s'il y a effectivement un transfert des ETM du sol vers la plante.

### 5.2.2 Teneur en éléments traces métalliques dans les tissus de *M. x giganteus* après exposition aux sols de friche

Après 135 jours de culture en mésocosme, les quantités de Cr et de Ni mesurés dans les tissus de *M. x giganteus* sont comparables à celles du Contrôle quelque soit le type de sol considéré. Cependant, les contenus en Cd, Zn et Pb sont significativement plus élevés dans les plantes cultivées sur les deux sols de friche en comparaison à celles du Contrôle. Par contre, les plantes exposées au sol E présentent plus de Cu que celles cultivées dans les autres sols (Figure 23). Les concentrations de Cd restent très faibles ( $< 1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ ) dans les tissus végétaux comparais aux autres éléments, notamment le Zn et le Pb qui sont mesurés en fortes concentrations ( $451,55 \pm 52,82 \text{ mg de Pb kg}^{-1} \text{ MS}$  ;  $294,49 \pm 10,15 \text{ mg de Zn kg}^{-1} \text{ MS}$ ) dans les végétaux exposés au sol Mix.

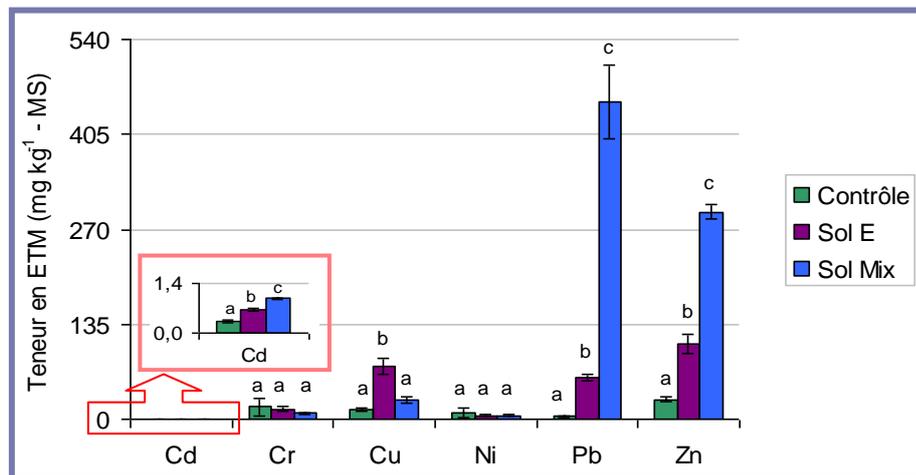


Figure 23. Teneur totale en ETM dans la biomasse de *M. x giganteus* après 135 jours de culture en mésocosme sur les sols de friche.

Contrôle : sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 5$  ; comparaison des sols E, Mix et Contrôle par ETM [ANOVA ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak entre paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Ces résultats sont en accord avec les teneurs observées en ETM (*i.e.* partition) au niveau des deux sols de friche, où le sol Mix a présenté plus de Cd, Pb et Zn totaux que le sol E. Le Zn possède aussi une meilleure solubilité dans ce sol. Quant au Cu, il est uniquement soluble sur le sol E et sa biodisponibilité y est aussi supérieure expliquant son meilleur transfert vers les végétaux. D'autre part, si le Cr est plus mobile dans les deux sols de friche que le Cd, aucune différence de concentration de Cr n'est mesurable en comparaison du témoin. Ceci coïncide avec les conclusions des études réalisées par Arduini et collaborateurs qui supposent une absorption par voie passive du Cd (Arduini et al. 2004, 2006b) alors que l'absorption du Cr est limitée par le métabolisme de la plante (Arduini et al. 2006b).

Il apparaît donc que *M. x giganteus* soit capable non seulement de se développer sur les sols de friche sans altération ni de sa productivité et ni de sa physiologie (*cf.* section 5.2.1) mais aussi de tolérer la présence de pollutions métalliques. En effet, le calcul de l'indice de tolérance pour chacun des ETM (IT)<sup>11</sup> permet de conclure que ***M. x giganteus* est fortement tolérante à la présence du Pb > Zn > Cu > Cd et peut s'adapter à des pollutions multimétalliques** (Tableau 18).

Tableau 18. Indices de tolérance (IT) aux ETM attribués à *M. x giganteus* après 135 jours d'exposition aux sols de friche, suivant les valeurs en ETM totaux des tissus végétaux du Contrôle et des essais. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne ± écart-type ; n = 5).

Sol	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Sol E	<b>2,06 ± 0,15</b>	0,83 ± 0,16	<b>5,57 ± 0,85</b>	0,50 ± 0,09	<b>14,83 ± 1,26</b>	<b>3,80 ± 0,47</b>
Sol Mix	<b>3,00 ± 0,07</b>	0,48 ± 0,08	<b>2,04 ± 0,29</b>	0,52 ± 0,08	<b>113,25 ± 13,25</b>	<b>10,39 ± 0,36</b>

D'autre part, pour déterminer si les plantes sont « accumulatrices », « indifférentes » ou « excluantes », le facteur de bioaccumulation (FBA)<sup>12</sup> est calculé pour chaque ETM. Dans le cas du mésocosme, malgré les teneurs observées pour certains ETM dans les tissus de *M. x giganteus* cultivée sur les deux sols de friche, aucun des FBA n'est supérieur de 1 (Tableau 19).

<sup>11</sup> IT : indice de tolérance ; une valeur supérieur à 2 indique une forte tolérance de la plante à l'élément considéré (Mingorance et al. 2007) ;  $IT_{ETM} = [ETM]_{essais} / [ETM]_{Contrôle}$ .

<sup>12</sup> FBA : facteur de bioaccumulation ; plante accumulatrice (FBA > 1), plante indifférente (FBA = 1) ou plante excluante (FBA < 1) (Baker 1987) ;  $BFA_{ETM} = [ETM]_{plante} / [ETM]_{sol}$ .

Tableau 19. Facteurs de bioaccumulation (FBA) des ETM attribués à *M. x giganteus* après 135 jours d'exposition aux sols de friche, suivant les valeurs en ETM totaux des tissus végétaux et des sols. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5).

Sol	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Sol E	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00
Sol Mix	0,05 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00

*M. x giganteus* peut donc être classée parmi les plantes capables d'exclure les ETM dans nos conditions expérimentales d'après les résultats obtenus. Cependant, certains auteurs considèrent qu'il est nécessaire de faire une réévaluation des critères utilisés pour qualifier la valeur FBA attribué aux plantes, puisqu'elle peut diminuer avec l'augmentation des teneurs en ETM dans le sol, non seulement pour les plantes hyperaccumulatrices, mais aussi pour les non hyperaccumulatrices. Ceci implique une interprétation attentive des résultats, considérant que l'efficacité de la performance -pour dépollué- des plantes dépend finalement du FBA ainsi que de la production de biomasse ; et dans certains cas, les plantes non hyperaccumulatrices auront un meilleur potentiel pour la remédiation des pollutions surtout si les FBA restent constant malgré la variation des pollutions du sol (e.g. *N. tabacum* contre *T. caerulescens* et *A. halleri* dans la phytoextraction du Cd) (Branquinho et al. 2007; Liang et al. 2009). Il se pourrait par conséquent que les FBA obtenus pour *M. x giganteus* lors de sa culture en mésocosme soient défavorisés par les fortes pollutions en ETM totaux dans les deux sols de friche (avec une FBA < 0,1) et que la culture de *M. x giganteus* soit, au contraire, très favorable à la remédiation puisque malgré la faiblesse des valeurs de FBA ils sont comparables pour les deux sols (tout ceci avec l'avantage d'une production en biomasse aussi maintenue). De plus, même si les teneurs dans les tissus végétaux ne représentent pas au minimum 1 % de la matière sèche de la plante comme pour les plantes hyperaccumulatrices, les concentrations relevées ne peuvent pas être négligées pour certains ETM. En effet, alors que les teneurs en Cd – Cr – Ni peuvent être qualifiées de traces (concentration inférieure à 10 mg kg<sup>-1</sup> (Duffus 2002; Nagajyoti et al. 2010)), les concentrations de Cu, Pb et Zn sont significatives (Figure 23). En conséquence, la capacité de *M. x giganteus* à accumuler les ETM n'est pas écartée sans que toutefois elle puisse être classée en

tant que plante hyperaccumulatrice pour ces métaux. Un faible FBA mais une accumulation non négligeable des ETM rappelle les observations d'Arduini et collaborateurs (Arduini et al. 2006a; 2006b), l'absorption du Cu, du Pb et du Zn par la plante pourrait alors se faire par la même voie (passive) que le Cd. Ces observations, complétées par l'absence de symptômes précoces de toxicité sur les plantes, suggèrent **une capacité de *M. x giganteus* à accumuler ces ETM et à mettre en œuvre des processus de détoxification conduisant à leur immobilisation dans les tissus.**

L'analyse de l'allocation des ETM accumulés dans les différentes parties de la plante montre que les teneurs contenues dans les racines de *M. x giganteus* sont considérablement plus élevées que celle des autres parties (rhizome, tige et feuilles) pour tous les ETM mesurés après expositions aux sols de friche (Figure 24). De même que lors de la détermination des teneurs totales, les teneurs en Pb, Zn et Cd sont aussi significativement plus importantes dans les racines des plantes exposées aux sols Mix et le Cu est plus concentré pour les plants cultivés sur le sol E. La présence des ETM dans les autres parties végétales (*i.e.* rhizome, tige et feuilles) varie selon l'élément considéré, à exception du Cd dont les concentrations restent comparables à celles des Contrôles. Les rhizomes contiennent plus de Cu lorsqu'ils sont cultivés sur le sol E, alors que l'exposition aux deux sols de friche augmente significativement les contenus en Zn dans les rhizomes comparé au Contrôle. Les quantités de Zn et le Pb des tiges sont significativement plus fortes que celles du Contrôle quelque soit le sol de friche utilisé, la teneur en Pb étant plus forte pour les tiges provenant du sol Mix. Finalement, si le Zn est le seul élément observé au niveau des feuilles, il n'est significativement plus élevé que le Contrôle que pour le sol Mix. **Tous les ETM se trouvent majoritairement stockés dans les parties souterraines, notamment au niveau des racines indiquant que la phytostabilisation pourrait être le principal mécanisme de détoxification de *M. x giganteus*.**

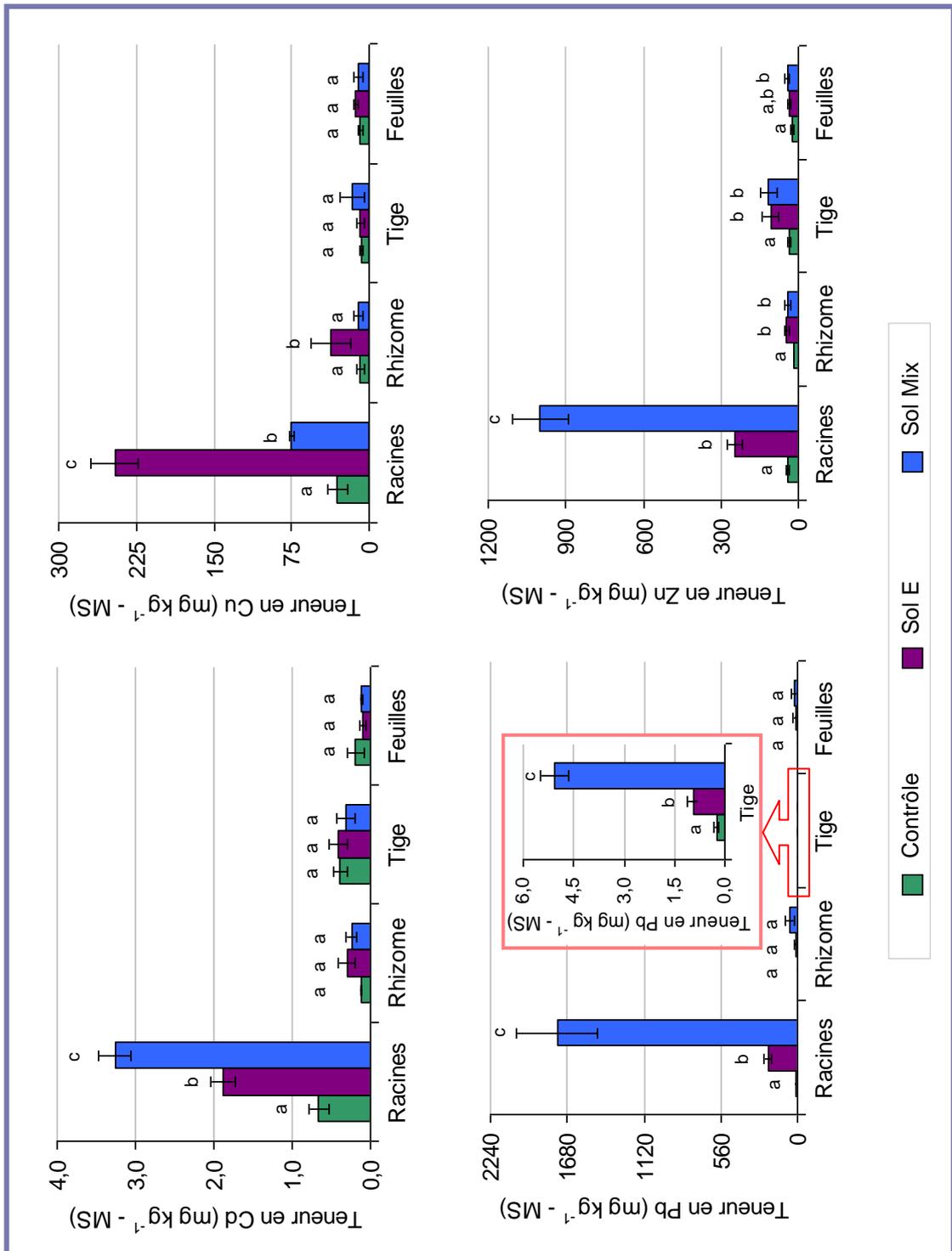


Figure 24. Allocation des ETM accumulés par *M. x giganteus* dans les différentes parties végétales après 135 jours de culture en mésocosme sur les sols de friche. Contrôle : sol non pollué ; sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte en ETM et HA ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n=5 ; comparaison des sols E, Mix et Contrôle par ETM pour chaque partie végétale [ANOVA ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak entre paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Afin d'estimer la capacité de *M. x giganteus* à transférer les ETM vers les parties aériennes, les facteurs de translocations (FT)<sup>13</sup> sont calculés. L'ensemble des FT restent toujours < 1 quelque soit le ETM considéré (Tableau 20). **Même si *M. x giganteus* accumule certains ETM comme Cu – Pb – Zn, ceux-ci sont stabilisés au niveau racinaires et peu transférés vers les parties aériennes dans nos conditions expérimentales.**

Tableau 20. Facteurs de translocation (FT) des ETM de la partie souterraine vers la partie aérienne attribués à *M. x giganteus* après 135 jours d'exposition aux sols de friche, suivant les valeurs en ETM des deux tissus végétaux. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne ± écart-type ; n = 5).

Sol	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Sol E	0,23 ± 0,08	0,13 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,51 ± 0,15
Sol Mix	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,31 ± 0,19	0,36 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,05

Différents études montrent que, sur des terrains miniers ou en friche présentant une pollution forte et variée en ETM, la plupart des espèces qui s'installent après une revégétalisation naturelle, sont des herbacées, notamment des plantes à rhizomes et appartenant à la même famille que *M. x giganteus* (*Gramineae*, aussi connu sous le nom de *Poaceae*) (Remon et al. 2005; Li et al. 2007). Par ailleurs, les résultats obtenus pour *M. x giganteus* lors de sa culture sur les sols de friche sont conformes avec ceux observés pour d'autres graminées comme *Festuca rubra* L. cv. *Merlin* ou *Lolium perenne* (ou Ryegrass) (Broadley et al. 2007; Bidar et al. 2007). D'autre part, *Lygeum spartum* L. accumule aussi le Cd, le Cu, le Pb et le Zn majoritairement au niveau racinaire, mais les plantes cultivées à partir de rhizomes présentent des teneurs moins élevées que celles qui poussent à partir de graines (Conesa et al. 2007). Il pourrait y avoir une éventuelle diminution de l'efficacité de *M. x giganteus* à accumuler les ETM en raison de sa reproduction (stricte) par la coupe de rhizome ; toutefois, les études d'Arduini et collaborateurs (2006) contrarient ceci, car une augmentation de la taille du rhizome est favorable à l'absorption du Cd. Une telle situation doit être de toute façon vérifiée pour le reste des ETM. Quant à l'exclusion des ETM des parties aériennes, elle pourrait être due, comme chez *Agrostis tenuis*, à

<sup>13</sup> FT : facteur de translocation ; détermine l'habilité de la plante à transférer les ETM de la partie souterraine vers la partie aérienne ;  $TF = [ETM]_{aérienne} / [ETM]_{souterraine}$ .

leur immobilisation au niveau de la membrane des cellules racinaires avec la contribution de microorganismes du sol (Wainwright et Woolhouse 1977; Griffioen et al. 1994; Dahmani-Muller et al. 2000). L'analyse des microorganismes de la rhizosphère est par conséquent nécessaire pour déterminer les associations possibles entre de *M. x giganteus* et la microflore du sol afin de déterminer leur influence sur la capacité d'implantation du végétal sur ces sols dégradés mais aussi sur leur capacité à fixer les ETM au niveau racinaire.

***M. x giganteus* peut donc être utilisée pour la réhabilitation des sols de friche pollués en ETM, où un double bénéfice peut être envisagé : la phytostabilisation des pollutions métalliques et la production d'une biomasse aérienne utilisable due à la faible translocation des ETM vers ces parties de la plante qui diminue les risques lors de sa valorisation.** Il convient cependant de vérifier l'innocuité des parties revalorisés (Lievens et al. 2008; Stals et al. 2010; Sas-Nowosielska 2011) et des feuilles généralement laissées au sol, en fonction du type de sol et, en particulier, en fonction de la quantité et biodisponibilité des ETM présents. Pour ce qui est des parties souterraines, les résultats obtenus montrent que l'extraction des rhizomes ainsi que des racines associées est nécessaire. De plus, les plantes tolérantes avec une grande capacité à immobiliser les ETM dans leurs tissus racinaires pourraient avoir à renouveler plus souvent les parties les plus actives de leur biomasse souterraine, par rapport aux plantes non-tolérantes dans des sols normaux (Das et al. 1997); il conviendra donc de prendre en considération le renouvellement racinaire au moyen d'études menées sur du plus long terme, ce dernier pouvant entraîner une remobilisation des ETM auparavant immobilisés. **Une évaluation des impacts doit donc être réalisée à court et long terme.**

### 5.2.3 Evolution des caractéristiques des sols de friche après 135 jours de croissance de *M. x giganteus* en mésocosme

A la fin du mésocosme, les caractéristiques des sols de friche échantillonnés au niveau de la rhizosphère de *M. x giganteus* sont comparées avec celles des sols provenant des pots non plantés.

### 5.2.3.1 Influence de la plante sur les caractéristiques chimiques des sols de friche

Si de nombreux phénomènes (physiques, chimiques et biologiques) successifs et simultanés au sein du sol entraînent la modification de ces caractéristiques, celles-ci ne varient pas toutes de la même façon en fonction du temps. Certaines évoluent suffisamment lentement pour être considérées comme constantes à l'échelle humaine (c'est souvent le cas de la composition granulométrique<sup>14</sup>), tandis que d'autres peuvent le faire rapidement (Calvet et Mariotti 2003). Par conséquent, seuls les paramètres chimiques sont considérés pour l'analyse du sol.

En ce qui concerne le pH des sols de friche (Tableau 21), ils sont toujours classés comme étant alcalins, le sol Mix étant encore légèrement plus basique que le sol E d'après la différence significative observée entre les deux sols pour le pH-KCl. D'autre part, **la croissance de *M. x giganteus* n'a modifié le pH des sols dans aucun des cas.** En effet, généralement si les plantes sont capables de modifier le pH du sol grâce à la libération des ions H<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> par les racines afin de mobiliser les éléments nutritifs, ceci n'est perceptible que très proche de la surface racinaire (e.g. 2 mm) (Jungk et Claassen 1986; Ehlken et Kirchner 2002; Cervantes et al. 2011; Blossfeld et al. 2011).

Tableau 21. pH des sols de friche, plantés ou pas avec *M. x giganteus*, à la fin du mésocosme. (Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne ± écart-type ; n= 5 ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante pour chacun des pH [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative]).

	Sol E		Sol Mix	
	Non planté	Planté	Non planté	Planté
pH-H <sub>2</sub> O	8,13 ± 0,15 <sup>a</sup>	8,16 ± 0,22 <sup>a</sup>	8,25 ± 0,08 <sup>a</sup>	8,22 ± 0,09 <sup>a</sup>
pH-KCl	8,07 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,95 ± 0,18 <sup>a</sup>	8,16 ± 0,05 <sup>b</sup>	8,16 ± 0,18 <sup>b</sup>
pH-CaCl <sub>2</sub>	7,67 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,68 ± 0,17 <sup>a</sup>	7,75 ± 0,22 <sup>a</sup>	7,84 ± 0,18 <sup>a</sup>

Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Beuch et collaborateurs (2000) où aucun effet n'était remarqué sur le pH des sols agricoles ayant une texture sableuse ou limoneuse (comme celles du sol E et du sol Mix respectivement), pour des cultures de *M. x giganteus* âgées de 6 à 8 ans.

<sup>14</sup> Excepté en cas d'une dégradation physique attribuée à l'activité humaine (Calvet 2003).

Au bout de 135 jours de croissance, la culture de *M. x giganteus* ne modifie pas la CEC des sols de friche (sol E non planté  $13,59 \pm 1,16 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$  et planté  $13,47 \pm 0,96 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ ; sol Mix non planté  $21,99 \pm 1,08 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$  et planté  $21,82 \pm 0,66 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ ), ce qui est en accord avec les données pédologiques usuelles qui considèrent que la CEC d'un sol est relativement constante dans le temps (Marx et al. 1999). Pourtant, Beuch et collaborateurs (2000) avaient observé une augmentation de la CEC pour des sols acides. ***M. x giganteus* n'aurait pas une influence sur la CEC des sols alcalins** (comme c'est le cas des deux sols de friche). Cependant, une vérification doit être envisagée à plus long terme ou pour des sols ayant un pH plus basique qui rend beaucoup moins favorable la mobilité et disponibilité des nutriments. D'autre part, en comparaison des résultats obtenus lors de l'analyse agronomique à l'état initial où les deux sols présentaient une CEC d'environ  $20 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ , la CEC des sols Mix (planté ou non) est significativement plus élevée, à la fin du mésocosme, que celle des sols E. Il est important de noter que cette nouvelle valeur attribuée au sol E le classe parmi ceux ayant une CEC « moyenne », soit des sols capables de retenir naturellement des cations (comme les polluants métalliques) contre une perte rapide par lessivage ; ces cations restant alors biodisponibles dans le sol (Cameron 1992).

Par ailleurs, la teneur en cations échangeables des sols de friche à la fin du mésocosme serait influencée par la présence de *M. x giganteus* selon l'élément considéré avec une diminution globale hormis dans le cas du Na (Figure 25). Pour le Ca et le Mg, l'effet de la plante dépendra du type de sol, avec la diminution significativement de ces deux éléments dans le sol Mix en présence du végétal, contrairement au sol E pour lequel aucune variation n'est observée. Il faut noter que les teneurs atteintes par le Ca et le Mg tendent à se rapprocher pour les sols plantés (même si Mg est toujours plus élevé pour le sol Mix).

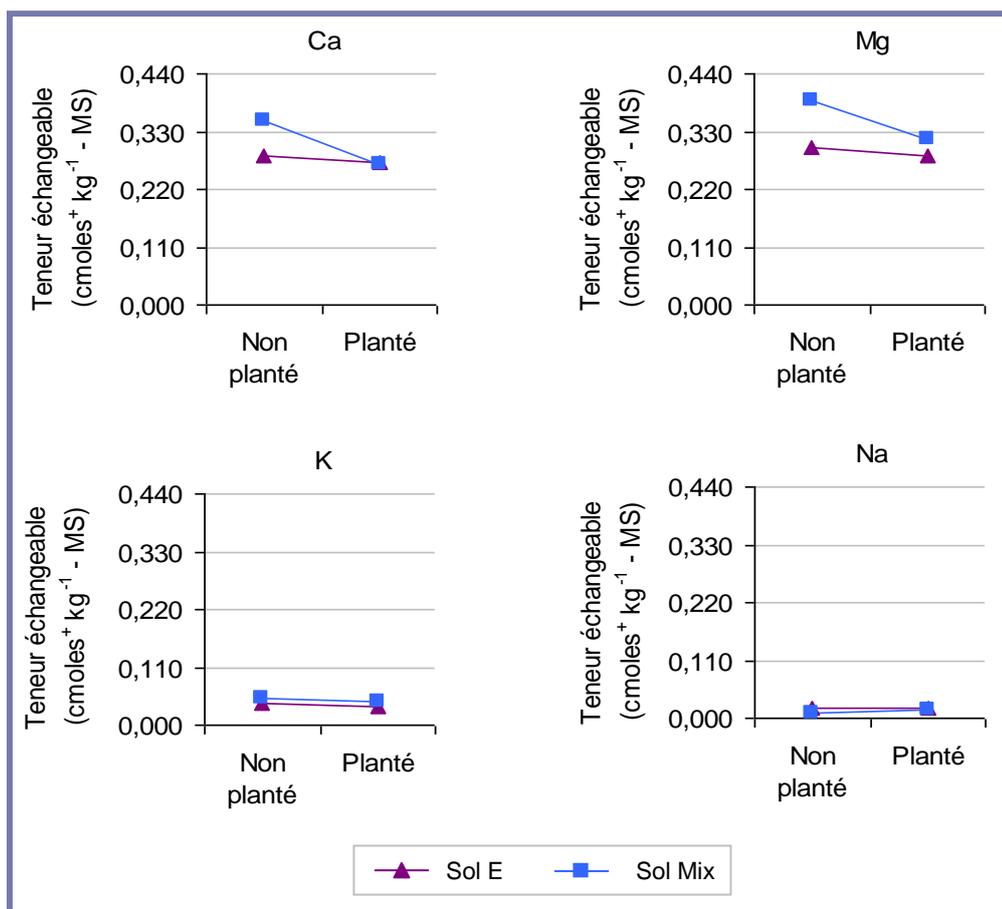


Figure 25. Teneurs moyennes en cations échangeables des sols de friche à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme (triangles et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes).

Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne ; n = 5.

Le Ca assure la stabilité des membranes cellulaires, permet l'élongation et la division cellulaires et joue un rôle déterminant par rapport à l'adaptation aux réponses environnementales des plantes (Hirschi 2004). Quant au Mg, c'est un constituant essentiel de la chlorophylle (Sarkar et al. 1994), qui peut également contribuer à la tolérance au stress toxique (Bose et al. 2011). Or, la biomasse ainsi que les autres caractéristiques mesurées de *M. x giganteus* ne sont pas perturbées après 135 jours de culture (cf. section 5.2.1). Il semble donc d'une part que *M. x giganteus* n'a pas des exigences fortes en Ca et Mg comme le montre sa culture et d'autre part, que les diminutions observées dans le sol Mix pourraient contribuer à lutter contre le stress provoqué par la forte présence des ETM combinés aux HAP (cf. section 5.2.2). La poursuite de l'étude sur des périodes plus longue permettrait de vérifier si un point d'équilibre est atteint tant au niveau du sol que la croissance de *M. x giganteus*.

Concernant le K, la présence de *M. x giganteus* après 135 jours de culture entraîne sa diminution significative quel que soit le sol de friche ; les teneurs demeurant significativement plus importantes dans les sols Mix (planté ou non planté) comparativement aux sols E. Le K, cation le plus abondant dans les cellules des plantes (10 % de la matière sèche) intervient dans le maintien général de l'appareil photosynthétique et le tropisme des plantes. Cependant, le stress métallique peut conduire à une déficience en perturbant son absorption et son transport, ce qui provoque, entre autres, la réduction de la translocation du carbone fixé (Szczerba et al. 2009). Ces résultats pourraient indiquer des besoins particuliers en K, dont elle semble moins dépendante contrairement à d'autres graminées comme le maïs (Beale et Long 1997), lors de la culture de *M. x giganteus* sur des sols de friche de ce type.

Finalement, le Na n'est pas significativement modifié par la présence de la plante. Cet élément, indispensable uniquement sous forme de traces (Blumwald et al. 2000), n'est donc pas un facteur limitant le développement de *M. x giganteus* sur le long terme ni à l'implantation ultérieure des végétaux de remplacement. Il faut noter qu'à la différence des autres cations étudiés, la teneur en Na dans les sols E (planté ou non planté) est significativement plus élevée que celles des sols Mix.

**Les réductions de Ca, de Mg et de K dans les sols de friche plantés avec *M. x giganteus* mettent en évidence son interaction avec le milieu et les besoins nutritionnels contribuant probablement à son bon développement, même en présence d'un stress lié à la pollution des sols.** De plus, la teneur en éléments nutritifs dans les deux sols de friche est, en général, faible, ce qui ne perturbe en rien la croissance de *M. x giganteus*. Ceci confirme que *M. x giganteus* est très efficace quant à l'utilisation des nutriments. Ceux-ci pourront alors être restitués pour partie pendant la période de sénescence à la fois au niveau du rhizome mais aussi au niveau du sol avec la chute du feuillage (Beale et Long 1997; Kahle et al. 2001). Cependant, même si une fertilisation ne semble pas nécessaire au vu de ces résultats, certains auteurs préconisent qu'une fertilisation est nécessaire lorsque la teneur en nutriments dans le sol est très faible soit pour améliorer le rendement de la culture de *M. x giganteus* (Lewandowski et Kicherer 1997; Kahle et al. 2001; Lewandowski et al. 2003), soit pour éviter l'épuisement des réserves du sol dans le temps (Christian et

al. 2008). **Un monitoring des nutriments est donc indispensable pour assurer la bonne performance des plantes (notamment pour le K)** lors de la culture généralisée de *M. x giganteus* sur ces sols de friche, ou d'autres sols ayant des caractéristiques semblables.

Afin de vérifier si, comme sur les sols agricoles, *M x giganteus* participe de façon active à l'augmentation du carbone organique (Beuch et al. 2000; Kahle et al. 2001; Hansen et al. 2004; Foereid et al. 2004) et d'évaluer son potentiel de restauration au travers de l'accumulation de nutriments dans le sol (Freitas et al. 2004; Yang et al. 2010); le carbone organique total, l'azote total et le rapport C:N ont été analysés pour les deux sols de friche à la fin du mésocosme (Figure 26).

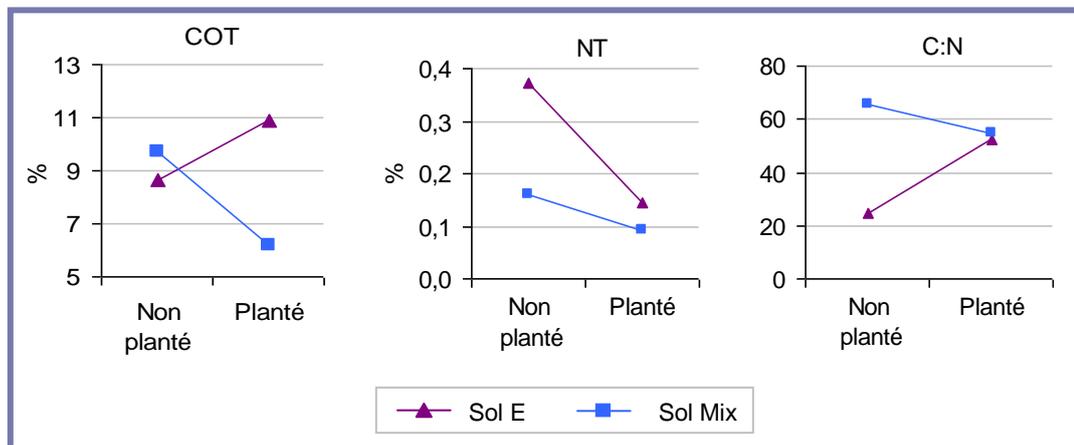


Figure 26. Teneurs moyennes en carbone organique total, azote total et rapport C:N des sols de friche à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme (triangles et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes).

Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; COT : carbone organique total ; NT : azote total ; moyenne ; n = 5.

Si les deux sols de friche non plantés contenaient des quantités équivalentes en COT, *M. x giganteus* modifie différemment cette teneur au bout de 135 jours de croissance selon le type de sol sur lequel elle est cultivée : **augmentation significative du COT dans le sol E en présence de la plante mais diminution significative pour le sol Mix**. Les résultats observés sur le sol E, de texture sableuse, confirme ceux de Kahle et collaborateur (2001) qui avaient constaté que la culture de *M. x giganteus* sur des sols ayant ce type de texture conduisait à l'augmentation de leurs contenus en COT. Par contre, au lieu d'un faible accroissement du COT observé par Kahle et collaborateur (2001), la culture menée en mésocosme sur le sol Mix de

texture plus d'argileuse et limoneuse présentent une diminution. Cette diminution pourrait être liée d'une part à une modification des rhizodépôts racinaires du fait de la texture plus fine du sol comme Kahle et collaborateurs (2001) l'ont noté, mais aussi à la consommation d'un carbone exsudé plus facilement assimilable pour les microorganismes contribuant à la dégradation des HAP par cométabolisme par exemple (Técher et al. 2011, 2012).

Par ailleurs, l'effet de *M. x giganteus* sur **la teneur en NT des sols de friche ne suit pas la même dynamique que celle du COT, puisqu'elle diminue significativement en présence de la plante quelque soit le sol de friche utilisé.** Ce phénomène est probablement lié au développement végétal qui est principalement déterminé par l'azote qui stimule l'absorption des autres éléments nutritifs du sol (N'Dayegamiye et al. 2007). Il faut remarquer que les teneurs en NT des sols E (plantés ou non) sont plus élevées que celles des sols Mix en fin de mésocosme contrairement aux observations à l'état initial où les valeurs mesurées étaient comparables. Cette différence (état initial, état final) est probablement liée à la différence des communautés bactériennes des deux sols.

Le rapport C:N est ensuite calculé à partir des mesures obtenues (*i.e.* COT, NT) : ce rapport est, en effet, habituellement utilisé comme indicateur de la qualité de la matière organique du sol, puisqu'il est lié à la vitesse de décomposition et au taux auquel les nutriments organiques sont minéralisés pour devenir disponibles pour la réabsorption par les végétaux (Yamakura et Sahunalu 1990). **La comparaison des rapports C:N des deux sols de friche montre une influence significative de *M. x giganteus* après 135 jours de croissance seulement sur le sol E.** Pour ce sol, la présence de la plante augmente le rapport, s'éloignant encore plus des valeurs moyennes internationales (*i.e.* C:N entre 9.8 et 17.5) (Kirkby et al. 2011) et suggère que cette manque d'azote pourrait limiter la bonne décomposition de la matière organique, d'où une carence pour les besoins des microorganismes et des végétaux. Cette augmentation est probablement liée à une forte production de rhizodépôts traduits par l'augmentation du COT dans le cas du sol E. Par contre, le rapport C:N du sol Mix ne varie pas en présence de la plante malgré la diminution du COT et du NT dans le sol. La valeur de ce rapport étant comparable à celle du sol E planté, suggère

l'atteinte d'un point d'équilibre. L'activité microbienne pourrait retirer un profit (ou non) de la présence de *M. x giganteus* en fonction du type de sol. L'analyse des bactéries des sols de friche à la fin du mésocosme permettra de vérifier les différentes hypothèses émises quant à l'effet de la plante sur la microflore des sols.

**De manière générale, les caractéristiques du sol qui pourraient participer fortement à la mobilité des ETM dans les sols de friche (pH, CEC) ne sont pas modifiées par la présence de *M. x giganteus*.** Cependant, d'autres caractéristiques plus associées à la fertilité du sol, mais qui pourraient aussi intervenir dans la biodisponibilité et la toxicité des éléments polluants dans le sol, seront influencées par la plante selon le type de sol de friche utilisé. Considérant que l'évolution de ces sols témoigne des diverses relations qui peuvent avoir lieu entre la plante, le sol et les (micro)organismes lors de la mise en place des processus de phytoremédiation, il serait nécessaire de faire non seulement un suivi à long terme de la culture pour assurer la durabilité de la méthode, mais aussi de réaliser une étude plus complète du système en incluant d'autres aspects comme la toxicité, le devenir des pollutions, les microorganismes.

#### *5.2.3.2 L'effet de *M. x giganteus* sur la toxicité des fractions solides et liquides des sols de friche après 135 jours de croissance en mésocosme*

Après avoir montré l'impact de la culture de *M x giganteus* sur les propriétés physico-chimiques du sol, le comportement des composés polluants peut s'en trouver modifié et la toxicité du sol altérée.

Concernant **la fraction solide** des sols de friche à la fin du mésocosme, aucune toxicité aigue des vers de terre ne peut être mesurée après 14 jours d'exposition. Cependant, des effets sub-létaux sont toujours provoqués par les deux sols de friche, traduits par la diminution significative de la biomasse des vers de terre en comparaison au Contrôle, après 7 et 14 jours d'exposition aux sols, que ce soit en présence ou absence de la plante (Figure 27). De plus, cet effet est significativement plus important pour les sols Mix planté ou non avec *M. x giganteus*. Cette observation est différente de celles réalisées à l'état initial des sols (*cf.* section 5.1.3), où la toxicité sub-létale était comparable pour ces deux sols de friche.

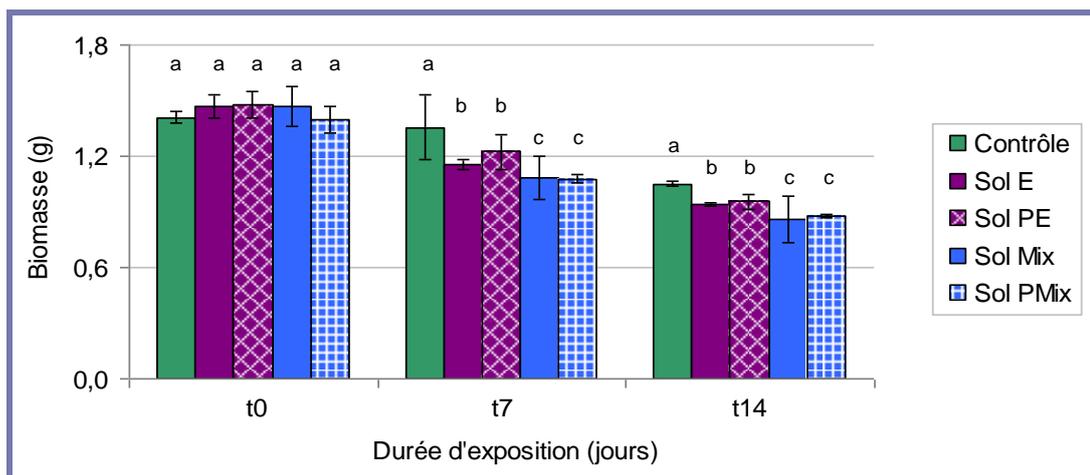


Figure 27. Biomasse des vers de terre après exposition à la fraction solide des sols de friche à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme.

Contrôle : sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; P : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 5$  ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante à chaque période d'analyse (t0, t7 et t14) [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Cependant, les niveaux critiques de polluants métalliques qui présentent des effets toxiques sur le biote et l'environnement peuvent souvent être liés à la CEC (CEC élevée plus étroitement liée à des effets toxiques, Cameron 1992) ; une toxicité supérieure du sol Mix pourrait être expliquée étant donné que sa CEC à la fin du mésocosme est aussi plus élevée que celle du sol E. Il s'agirait donc d'une évolution naturelle différente des sols au fil du temps, probablement lié à l'arrosage au cours de la période de culture. **La présence de *M. x giganteus* ne modifie pas la toxicité sub-létale de la fraction solide des deux sols de friche après 135 jours de croissance.** Toutefois, le sol n'est pas constitué uniquement d'une fraction solide, mais aussi d'une fraction liquide qui est en permanente interaction avec la phase solide et la plante, conduisant à une redistribution des éléments (adsorption, désorption, etc) ; il est donc nécessaire d'étudier également la solution du sol afin d'avoir un aperçu plus complet de la toxicité du système « sol ».

La croissance des algues exposées à la fraction liquide des deux sols de friche non planté est comparable à celle du Contrôle ; cependant, les algues exposées à des concentrations supérieures à 85 % de solution des sols plantés présentent une

croissance plus faible que les Contrôle bien que la CL<sub>50</sub><sup>15</sup> 72h ne soit pas atteinte (Figure 28a).

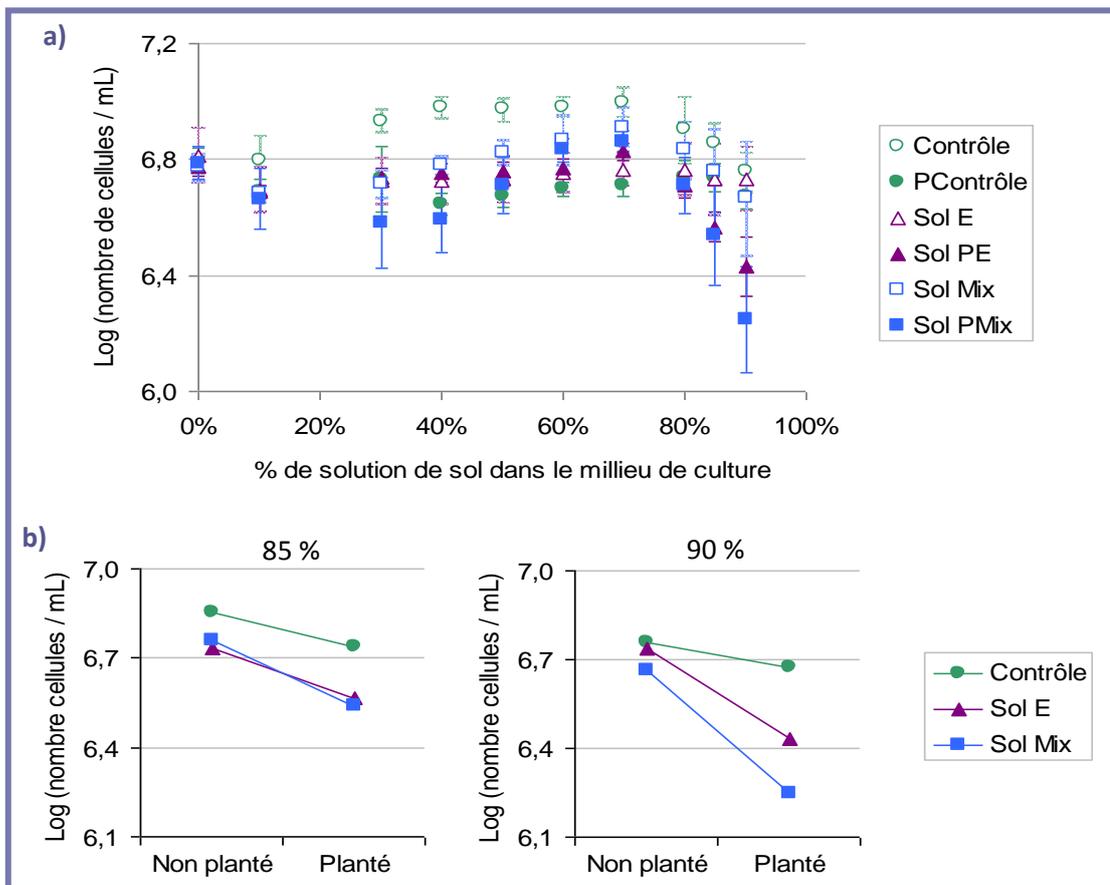


Figure 28. Croissance des algues après 72 h d'exposition à la fraction liquide des sols de friche à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme : **a)** Moyenne des croissances pour toutes les concentrations testées et **b)** Moyenne des deux concentrations les plus fortes (triangles et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes).  
*Contrôle* : sol non pollué ; *Sol E* : sol de friche – pollution en ETM ; *sol Mix* : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; *P* : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 5$ .

Cet impact est aussi plus important selon le type de sol, la toxicité du sol Mix planté étant significativement plus élevée que celle du sol E planté (Figure 28b). **Si la toxicité de la fraction solide du sol n'est pas impactée par la culture de *M. x giganteus*, la toxicité de la fraction liquide des deux sols de friche est en légère augmentation.** Ces résultats confirment qu'il est non seulement nécessaire de connaître l'état initial du système (sol) mais qu'il faut aussi suivre son évolution, en considérant plus particulièrement les premières phases du processus de

<sup>15</sup> La CL<sub>50</sub> c'est la « concentration létale » d'un produit (chimique) qui tue 50 % de la population d'essais dans un temps donné.

phyto-rémediation qui pourraient soumettre le système à des perturbations (Neagoe et al. 2009), pour maîtriser les risques inhérents à toute technique de rémediation. Sachant que la plante était capable d'accumuler certains ETM présents dans le sol, cette variation sur la toxicité pourrait être le résultat d'une modification de la partition des ETM des sols lors de la croissance des plantes.

### 5.2.3.3 Impacte de *M. x giganteus* sur la partition des éléments traces métalliques des sols

La partition des ETM dans les sols de friche a été évaluée au travers de l'analyse des ETM totaux (Figure 29), échangeables et potentiellement biodisponibles.

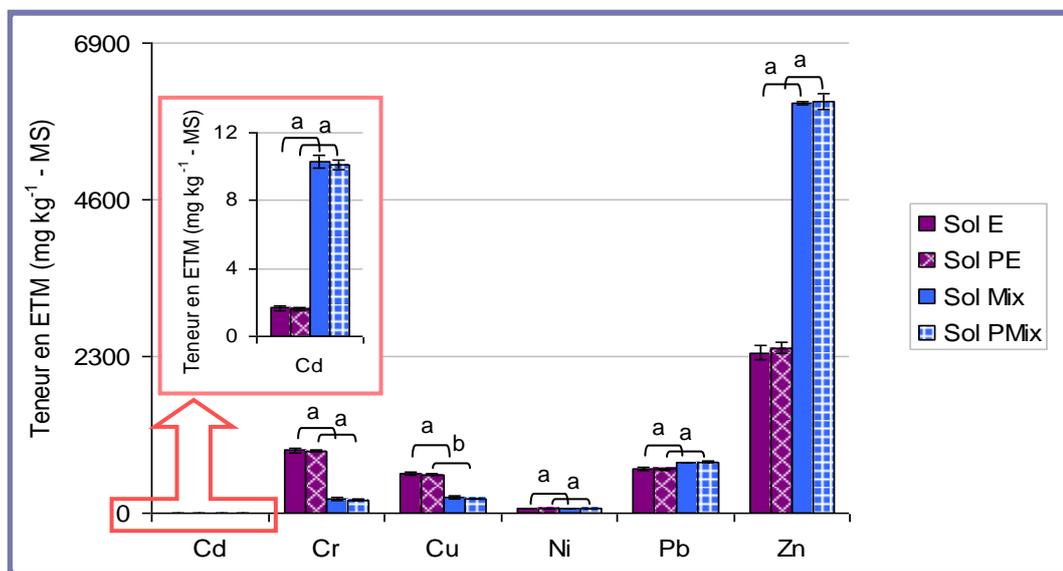


Figure 29. Teneur en ETM totaux des sols de friche après 135 jours de culture de *M. x giganteus* en mésocosme.

Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; P : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5 ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante pour chaque ETM [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Les variations, par rapport à la situation initiale, observées pour les teneurs en ETM totaux des sols non plantés sont probablement dues au traitement imparti aux sols pendant la période de culture (e.g. lixiviation ou lessivage à cause de l'arrosage des pots). Quant à la présence de *M. x giganteus*, elle n'a pas modifié la teneur en ETM totaux dans les deux sols de friche après 135 jours de croissance en mésocosme ; d'ailleurs, l'incidence d'une couverture végétale sur les concentrations totales en polluants dans un sol (expérience sur le terrain) n'est pas remarquée, même après 4 ans de culture (Ouvrard et al. 2011). Cependant, dans le cas du Cu, un effet de la

plante est mis en évidence, traduit par la diminution significative de sa teneur totale dans les sols de  $404,3 \pm 5,7$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  pour les sols non plantés vers  $386,5 \pm 4,5$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  pour les sols plantés, de façon globale et indépendamment du type de sol utilisé pour la culture. Toutefois, les fractions solubles et potentiellement biodisponibles en ETM dans les sols pourraient être plus sensibles aux variations, certaines études montrant une meilleure corrélation de ces fractions avec la dynamique des ETM dans le système sol (Gupta et al. 1996; Bourrelier et al. 1998; Michalke 2003; Feng et al. 2005a; Hobbelen et al. 2006; Meers et al. 2007).

En ce qui concerne les ETM échangeables au  $\text{CaCl}_2$  à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme (Figure 30), le Cd et le Ni ne sont pas détectés dans les sols analysés (*idem.* état initial des sols). De plus, la présence de la plante ne modifie pas la teneur des ETM échangeables, excepté le Cu qui diminue de façon significative sous l'influence de la plante mais uniquement lorsqu'elle est cultivée sur le sol Mix. En général, le Cr et le Zn sont présents dans des quantités comparables dans les deux fractions liquides des sols de friche, tandis que le Pb est plus concentré dans celles du sol Mix et le Cu plus élevée dans celles du sol E.

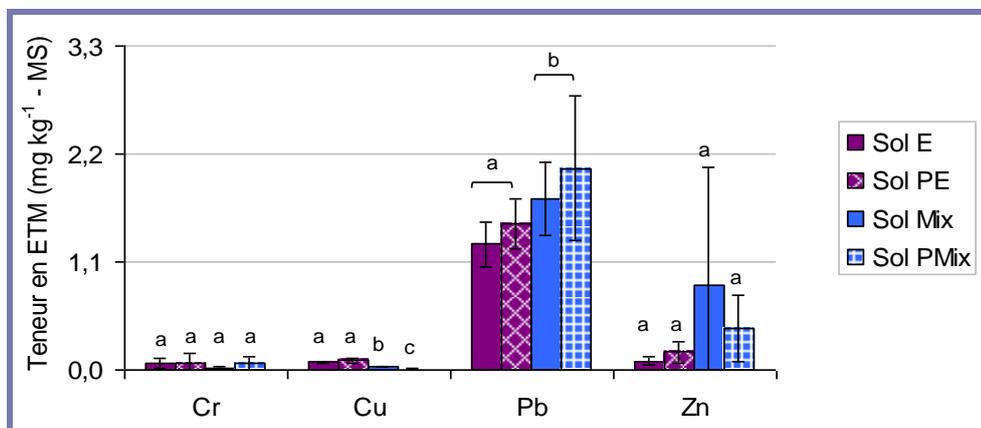


Figure 30. Teneur en ETM échangeables au  $\text{CaCl}_2$  à 0,01 M, des sols de friche après 135 jours de culture de *M. x giganteus* en mésocosme.

Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; P : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5 ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante pour chaque ETM [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Pour les ETM potentiellement biodisponibles (*i.e.* percolation au  $\text{NH}_4\text{Oac}$ ) (Figure 31), le seul élément influencé par la croissance de *M. x giganteus* est à nouveau le

Cu dont la teneur oxydable n'augmente que pour le sol Mix. D'autre part, le Cr est disponible à des concentrations comparables pour les deux sols de friche, à la différence de la disponibilité du Zn qui est plus élevée dans le sol Mix et du Cu qui est plus concentré dans le sol E. Le Cd et le Ni ne sont pas présents sous des formes biodisponibles.

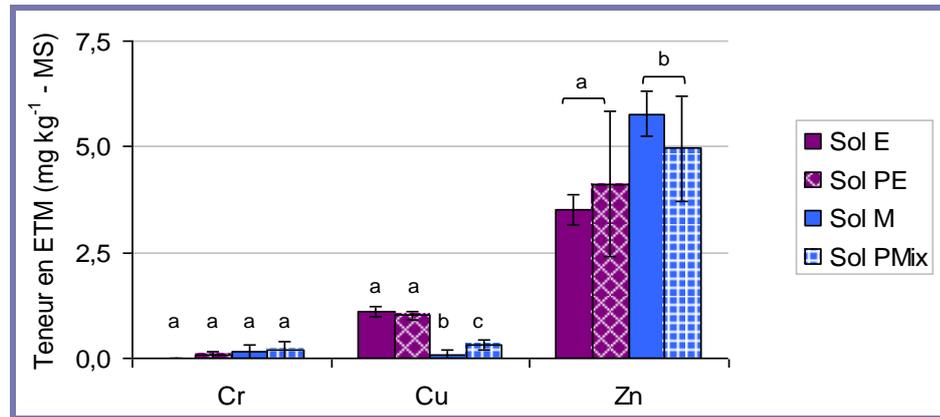


Figure 31. Teneur en ETM extraits au  $\text{NH}_4\text{Oac}$  à 1 M par percolation, des sols de friche après 135 jours de culture de *M. x giganteus* en mésocosme.

*Sol E* : sol de friche – pollution en ETM ; *sol Mix* : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; *P* : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 5$  ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante pour chaque ETM [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

***M. x giganteus* ne semble pas modifier la partition du Cr – Pb – Zn – Cd – Ni, Cd et Ni n'étant par ailleurs pas biodisponibles ou échangeables dans les sols considérés, pendant la période d'essai, au contraire du Cu dont les concentrations sont altérées sur le sol de friche pollué par les ETM et les HAP (i.e. sol Mix).** La dynamique observée pour le Cu échangeable dans le sol Mix pourrait être associée à une mobilité restreinte des ETM dans la colonne de sol. Cependant, considérant que celle-ci est accompagnée d'une augmentation de la fraction biodisponible (qui peut être en l'occurrence liée à la matière organique) et que la toxicité de la fraction liquide des deux sols est accentuée avec la présence de *M. x giganteus* (cf. section 5.2.3.2), un changement de la spéciation des ETM pourrait être envisageable à travers la formation des complexes organométalliques stimulée par l'activité de la plante comme le suggèrent Renella et collaborateurs (2004).

Une éventuelle augmentation de la biodisponibilité alors qu'il n'y a pas de modification apparente de la teneur dans les différents fractions du sol souligne

l'intérêt de compléter les analyses physico-chimiques, qui ne peuvent pas simuler tous les processus naturels qui se déroulent dans le système, par des dosages biologiques (Peijnenburg et al. 2007). A ce sujet, les teneurs en ETM accumulés par les vers de terre de *E. fetida* ayant servi à déterminer la toxicité des fractions solides des sols de friche ont été mesurées ; à savoir, après 14 jours d'exposition aux sols à la fin du mésocosme, puis épuration pendant une nuit.

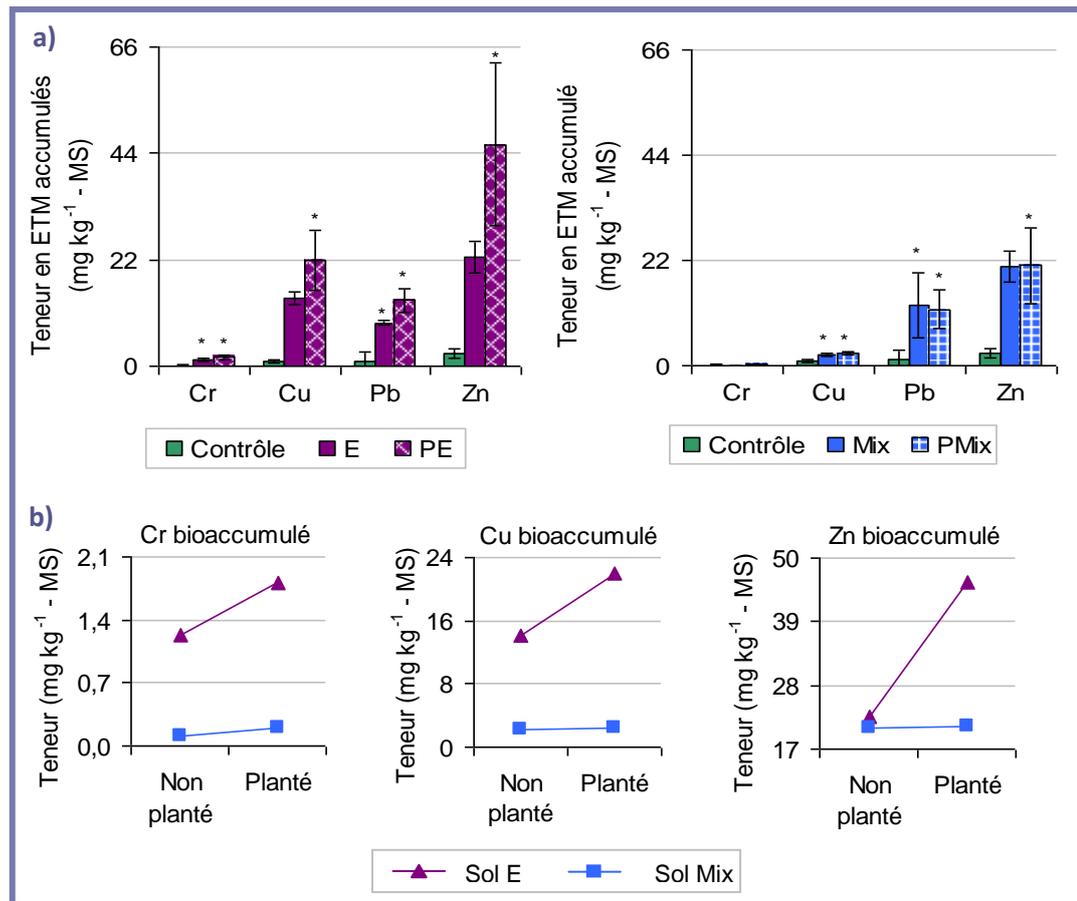


Figure 32. Teneur en ETM bioaccumulés par les vers de terre après 14 jours d'exposition aux sols de friche, à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme : **a)** Moyenne des teneurs en ETM bioaccumulés et **b)** Moyenne pour les ETM où l'effet d'au moins un des facteurs est significatif (triangle et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes).

Contrôle : Sol non pollué ; Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; P : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5 ; comparaison des groupes par rapport au Contrôle pour chaque ETM [ANOVA ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak vs Contrôle ( $\alpha > 0.05$ ) ; \* : différence significative].

Tout d'abord, lorsque les concentrations moyennes en ETM accumulés par les vers de terre exposés aux sols de friche sont comparées à celles du Contrôle (Figure 32a), les vers exposés aux sols E (planté et non planté) accumulent le Cr et le Pb, alors que

le Cu et le Zn, ne sont accumulés qu'en présence de la plante. Quant aux vers de terre exposés aux sols Mix, la présence de la plante n'influence pas la non accumulation du Cr, ni l'accumulation du Cu et du Pb. Par contre, le Zn est significativement accumulé lorsque le sol est cultivé. Ensuite, lorsque les deux sols de friche sont comparés pour définir une relation possible entre l'accumulation des ETM par les vers, le type de sol et la présence *M. x giganteus* (Figure 32b), seules le Cr et le Cu révèlent une augmentation significative liée à l'effet de la plante, indépendamment du type de sol de friche utilisée, au contraire du Zn dont l'accumulation apparaît comme plutôt dépendante du type de sol. Ces différences d'accumulation sont à rapprocher des études de Kidd et collaborateurs (2009) et Briat et Lebrun (1999) qui montrent que certains sols, notamment pour des sols calcaires, les graminées sont capables de sécréter des phytosiderophores au niveau de la rhizosphère capables de solubiliser non seulement le Fe mais aussi d'autres micronutriments comme le Mn, Cu et Zn, pour lutter contre la déficience en éléments nutritifs (Briat et Lebrun 1999; Kidd et al. 2009). Les résultats obtenus en mésocosme suggèrent que **la croissance de *M. x giganteus* rend les ETM plus biodisponibles dans les sols de friche, plus particulièrement le Cu, en moindre proportion le Cr et probablement le Zn. De plus, les fortes teneurs en ETM accumulés au niveau racinaire suggèrent qu'ils seraient absorbés par la plante soit pour ses besoins physiologiques soit pour subir une détoxification facilitant son développement sur les sols pollués.** Toutefois, il faut prendre en compte le fait que les variations de la biodisponibilité des ETM dans les deux sols pourraient également modifier les populations microbiennes au niveau de la rhizosphère de *M. x giganteus*.

#### 5.2.4 Devenir des communautés bactériennes des sols de friche après 135 jours de croissance de *M. x giganteus* en mésocosme

Les résultats obtenus montrent que la culture de *M. x giganteus* sur les deux sols de friche conduit à la modification de certaines caractéristiques des sols, notamment la biodisponibilité des ETM (cf. sections 5.2.3.1 et 5.2.3.3). Ces modifications suggèrent le développement d'une activité rhizosphérique importante, où les microorganismes jouent un rôle prépondérant ; les communautés bactériennes des sols de friche

(planté ou non) à la fin du mésocosme sont donc étudiées quantitative et qualitativement.

Du point de vue quantitatif, l'analyse du NPP (Figure 33) a révélé que le nombre de bactéries totales présentes dans les deux sols de friche non planté sont comparables, suggérant la présence d'une microflore adaptée aux conditions des sols et aux polluants dérivés de l'activité industrielle passée.

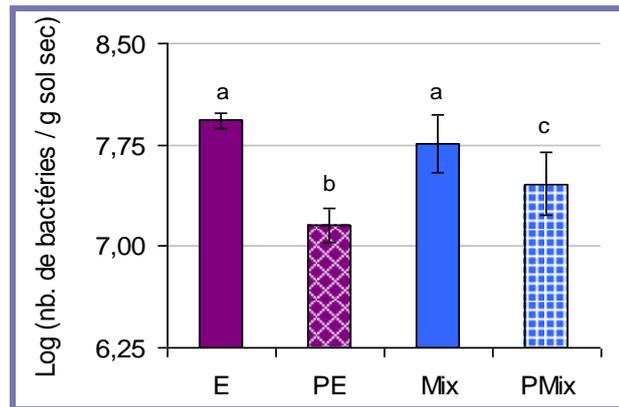


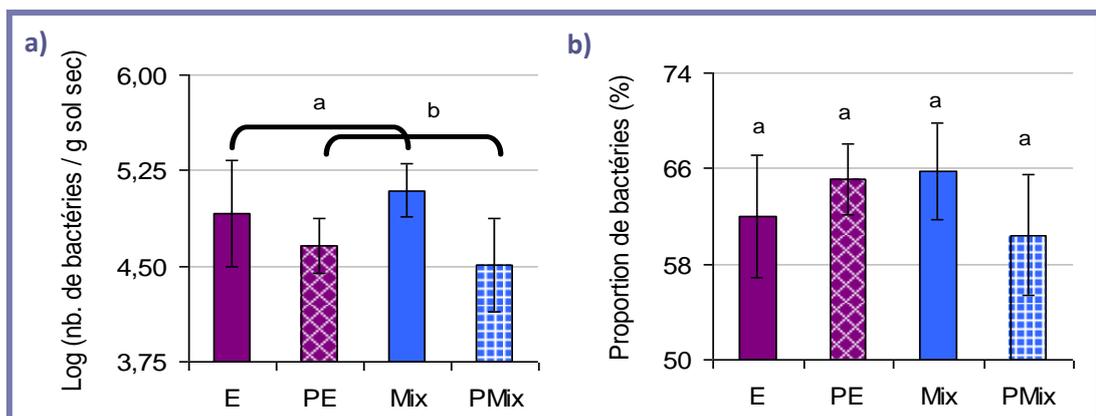
Figure 33. Logarithme du nombre moyen de bactéries totales des sols de friche à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme.

Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; P : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5 ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

Par contre, la présence de *M. x giganteus* provoque une diminution de la croissance bactérienne, celle-ci étant plus importante pour le sol E que pour le sol Mix (Figure 33) bien que les résultats relatifs aux mesures du COT, NT et leur rapport C:N suggéraient l'atteinte d'un point d'équilibre pour les deux sols sous par la présence de *M. x giganteus*, ceci plus particulièrement pour le sol E (cf. section 5.2.3.1). Cependant, une forte teneur en COT associé à une faible teneur en NT (ce qui est le cas du sol E) conduit aussi à une valeur élevée inusuelle du rapport C:N, correspondant à l'humification de la matière organique occasionnée par une activité microbienne faible ou perturbée (Remon et al. 2005). Cette activité microbienne réduite pourrait être occasionnée par l'augmentation des complexes organométalliques résultant de la production de rhizodépôts. Ceux-ci modifient la biodisponibilité comme le montre l'évolution de la toxicité de la fraction liquide (cf. section 5.2.3.2) et de la partition des ETM dans le sol (cf. section 5.2.3.3). En effet, le

toxicité des ETM dans le sol conduit généralement à une modification du nombre de microorganismes, de leur diversité et de leur activité, ce qui peut inhiber par la suite la décomposition de la matière organique du sol et les processus de minéralisation de l'azote (Bååth 1989; Gupta et al. 1996; Balabane et al. 1999; Wong 2003).

Cependant, certaines bactéries sont capables de survivre sous l'impact des ETM, grâce à l'activation de mécanismes de détoxification adaptés (cf. section 2.3.2.2). Ainsi, la quantification des bactéries résistantes au Zn, diminuant en présence de la plante indépendamment du type de sol de friche utilisée (Figure 34a), montre aussi que leur proportion vis-à-vis du nombre total de bactéries reste dans tous les cas équivalent (Figure 34b). **Ces résultats suggèrent que *M. x giganteus* pourrait favoriser les bactéries métallorésistantes au détriment des autres bactéries du sol.**



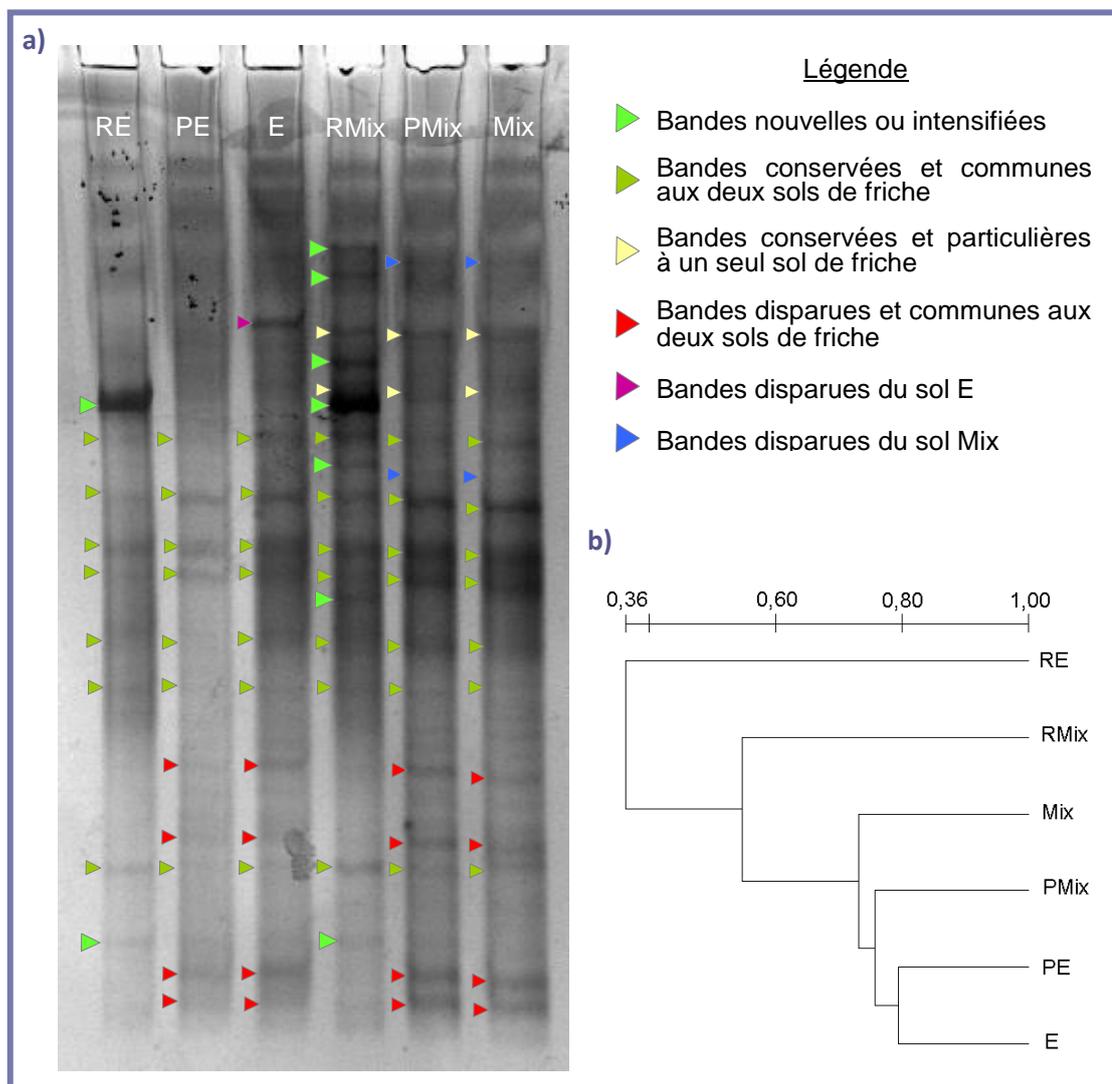
**Figure 34.** Bactéries des sols de friche à la fin de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme cultivées en présence de Zn : **a)** Logarithme du nombre moyen de bactéries et **b)** Proportion selon le nombre de bactéries totales des sols.

*Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; P : planté avec *M. x giganteus* ; moyenne  $\pm$  écart-type ; n = 5 ; comparaison entre les types de sol et la présence de la plante [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].*

L'analyse moléculaire a permis de visualiser la diversité des communautés bactériennes natives des deux sols de friche (i.e. sols non rhizosphériques : E et Mix), ainsi que leur devenir sous l'influence de *M. x giganteus* après 135 jours de culture en mésocosme (i.e. sols rhizosphériques : PE et PMix ; rhizoplans : RE et RMix).

Tout d'abord, si certaines populations bactériennes natives ne sont pas perturbées par la présence de la plante, des différences entre les communautés bactériennes

sont observables en fonction de la distance racinaire, traduit par l'apparition, intensification ou, au contraire, disparition de bandes sur les profils (Figure 35a).



**Figure 35.** Comparaison des profils électrophorétiques des communautés bactériennes au niveau du rhizoplas de *M. x giganteus* avec ceux des sols de friche rhizosphérique et non rhizosphérique à la fin du mésocosme : **a)** Identification des bandes d'intérêt et **b)** Dendrogramme pour illustrer la parenté entre les types d'échantillons.

*Sol E* : sol de friche – pollution en ETM ; *sol Mix* : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; *P* : planté avec *M. x giganteus* ; *R* : rhizoplan.

Le sol Mix possède des phylotypes spécifiques (2 bandes) probablement liés à la présence conjointe des ETM et HAP. La sélection de phylotypes bactériens (apparition et disparition de bandes) est principalement perceptible au niveau du rhizoplan. L'apparition de nouveaux phylotypes est plus marquée pour le sol Mix que le sol E avec 7 nouvelles bandes contre 2 bandes, respectivement. Les rhizomes ayant été stérilisés lors de la préparation des plants pour la mise en place du mésocosme,

**les « nouvelles » espèces seraient natives dans le sol, mais probablement en faible quantité, leur développement serait alors favorisé par les racines.** Certains phylotypes disparaissent au contraire avec la proximité racinaire avec 6 bandes pour le sol Mix, dont 2 spécifiques et 5 pour le sol E dont 1 spécifique. *M. x giganteus* opère donc une sélection bactérienne répondant à la double contrainte de pollution des sols et de compatibilité avec la rhizosphère.

L'influence de *M. x giganteus* sur la structure des communautés bactérienne est mise en évidence par l'étude de la parenté des profils bactériens (Figure 35b). **Les communautés des rhizoplans apparaissent comme étant plus éloignées de celles des sols d'origine mais proches entre elles,** ce qui confirme l'adaptation des bactéries natives des sols à *M. x giganteus* indépendamment du type du sol de friche, **suggérant une réorganisation des communautés bactériennes sous la présence de *M. x giganteus*, notamment pour le sol Mix.**

### 5.3 Cultures expérimentales de *M. x giganteus* en champs

Les résultats obtenus lors de la culture de *M. x giganteus* en mésocosme ont permis de recréer une représentation de la réponse du système « sol » (malgré sa complexité) montrant que la plante serait capable non seulement de s'adapter aux sols de friche pollués (ETM et HAP) et ayant des conditions défavorables à la croissance des plantes, mais aussi d'interagir avec le milieu pour mettre en place des processus de phytostabilisation des ETM au travers de l'accumulation de ces éléments au niveau des parties souterraines de la plante. Ces mécanismes d'adaptation impliquent probablement la collaboration avec les communautés bactériennes qui pourraient être à l'origine de légères modifications de la biodisponibilité des ETM et de la toxicité des sols. Cependant, des essais en milieu naturel sont nécessaires avant le déploiement de la culture de *M. x giganteus* à grande échelle. En effet, ces essais permettront d'intégrer d'autres conditions du scénario réel des sols, comme la variabilité des conditions climatiques régionales (*i.e.* température, précipitation, ensoleillement, humidité, vitesse du vent) qui impactent aussi la viabilité et durabilité de la méthode (Clive A. 2002; Tangahu et al. 2011), mais également du fait que le mésocosme est limité dans la durée et à la fraction fine des

sols. Des cultures de *M. x giganteus in situ* ont donc été réalisées sur deux friches différentes : la première correspondante à l'ancienne cokerie d'où ont été prélevés les sols du mésocosme et la deuxième correspondante à un ancien site minier.

### 5.3.1 Développement de *M. x giganteus* sur le site de l'ancienne cokerie

Deux parcelles ont été installées sur ce site d'expérimentation en concordance avec les prélèvements réalisés pour la mise en place du mésocosme : la première placée sur la zone ayant une pollution en ETM (Sol E) et la deuxième sur la zone à pollution mixte en ETM et HAP (sol Mix) ; le suivi a été fait sur trois cycles végétaux successifs dès la mise en place de la culture.

*M. x giganteus* est capable de pousser sur les sols E et Mix confirmant les résultats obtenus avec le mésocosme. Le pourcentage de levée est plus important pour les rhizomes plantés sur le sol E que sur le sol Mix. Par ailleurs, le taux de levée semble diminuer régulièrement au cours des trois premières années de culture sur le sol Mix alors qu'il se stabilise à environ 60 % dès la seconde année pour le sol E (Figure 36).

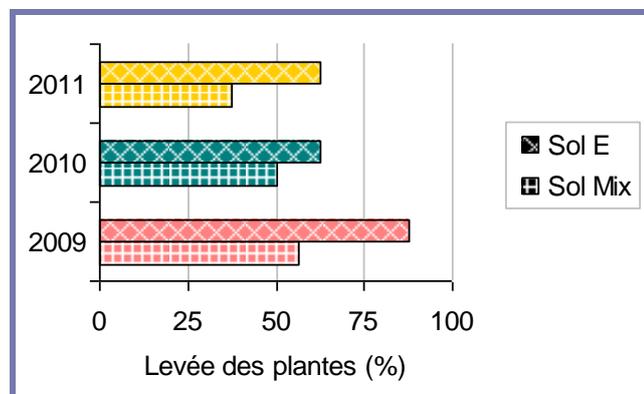
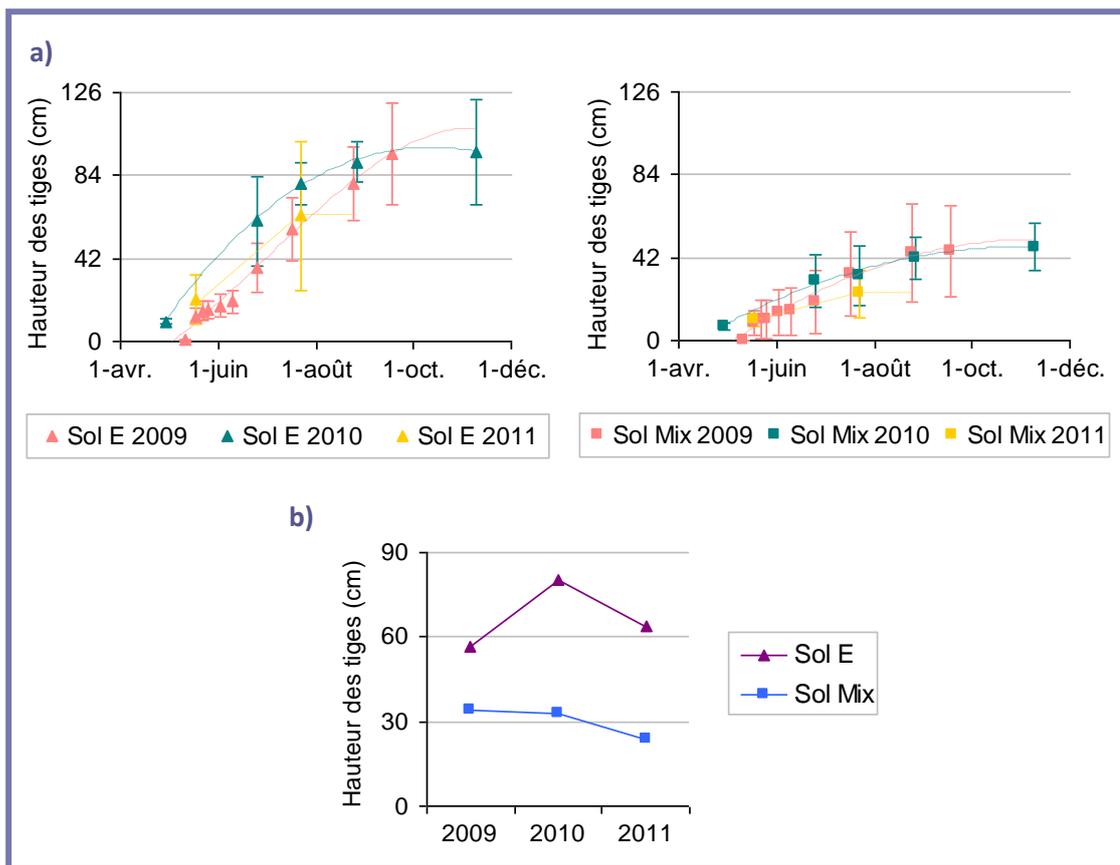


Figure 36. Pourcentage de levée de *M. x giganteus* cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1).  
Sol E : parcelle à pollution en ETM ; sol Mix : parcelle à pollution mixte (ETM et HAP).

La hauteur des tiges de *M. x giganteus* présente aussi des différences entre les deux parcelles. Les plantes cultivées sur le sol E mesurent environ 100 cm de hauteur, tandis que les tiges des plantes du sol Mix n'atteignent qu'environ 40 cm à la fin de la période de croissance (Figure 37a). En fait, la hauteur des plantes du sol E est déjà significativement supérieure à celle du sol Mix vers la fin du mois de Juillet (Figure 37b).

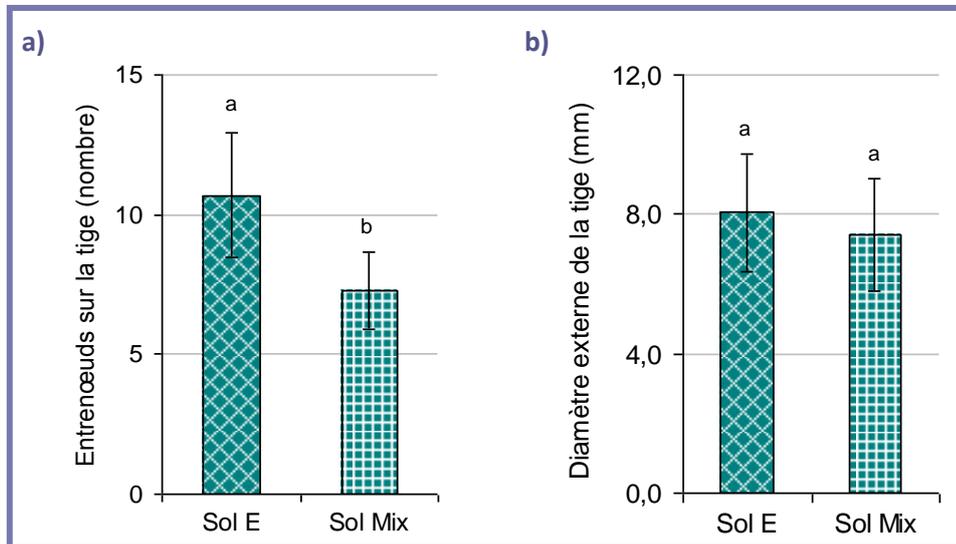


**Figure 37.** Hauteur de *M. x giganteus* cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1) : **a)** Moyenne des hauteurs et **b)** Moyenne des hauteurs à la fin du mois de juillet (triangle et carrés) et représentation graphique de l'ANOVA à 2 facteurs (lignes).

*Sol E* : parcelle à pollution en ETM ; *sol Mix* : parcelle à pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 16$ .

La mesure du sol Mix concorde cependant avec celles relevées lors des premières années de plantation en parcelle agricole où des tailles de l'ordre de 42 cm ont été relevées (Lewandowski 1998). S'agissant d'une culture pérenne de plante à rhizome, les succès de la première année de croissance pourraient être liés aux réserves nutritives stockées par la plante. Il convient donc de comparer les croissances sur friches avec celles obtenues sur parcelles agricoles sur plusieurs années. En effet, la taille des tiges augmente avec les cycles végétaux, atteignant 182 cm au bout de 2 ans de croissance et 193 cm pour la 3<sup>ème</sup> année en sol agricole (Lewandowski 1998). L'ensemble des résultats obtenus pour la friche montre que les hauteurs de tiges restent comparables à celles de la première année de culture. La différence de la hauteur entre les deux sols est confirmée par le nombre d'entrenœuds en plus faible nombre pour le sol Mix que sur le sol E, ce dernier restant similaire à celui observé

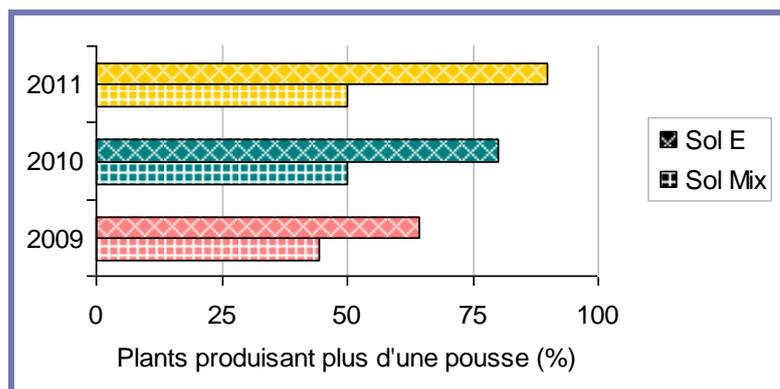
sur parcelles agricoles (Figure 38a) (Kaack et Schwarz 2001). Quant au diamètre externe des tiges (Figure 38b), il reste comparable entre les deux types de sols et avec celui de parcelles agricoles âgées de deux ans (Lewandowski, 1998).



**Figure 38.** Morphologie des tiges de *M. x giganteus* cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1) : **a)** Moyenne du nombre d'entrenœuds sur la tige et **b)** Moyenne du diamètre externe de la tige. Sol E : parcelle à pollution en ETM ; sol Mix : parcelle à pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 16$  ; comparaison des sols E et Mix [t-test ( $\alpha < 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

**Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en mésocosme sur ces deux sols de friche, qui montraient une hauteur et un nombre d'entrenœuds réduit pour les tiges de *M. x giganteus* cultivée sur le sol Mix par rapport au sol E, mais le diamètre des tiges restait comparable.**

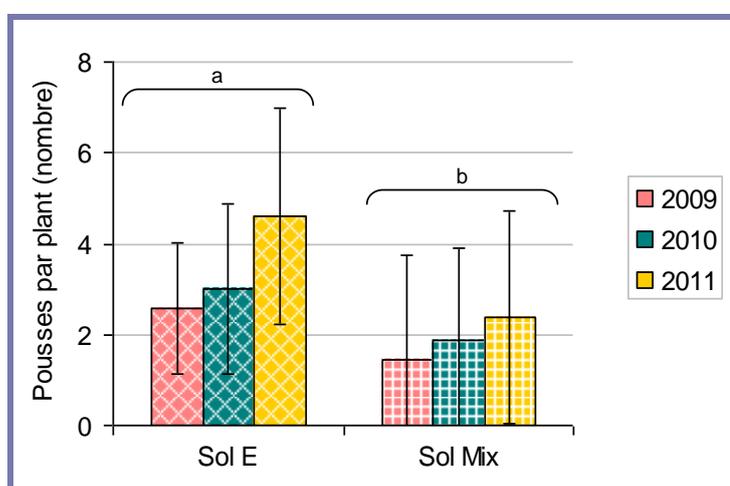
Par contre, si la taille des plants semble se stabiliser, 50 % au moins des rhizomes produisent plus d'une pousse (exprimé en pourcentage par rapport au nombre total de plants sur chaque parcelle), ce nombre étant toujours plus important pour le sol E et en augmentation avec le nombre de cycles végétaux (Figure 39).



**Figure 39.** Pourcentage de plants de *M. x giganteus* produisant plus d'une pousse lors de sa culture en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1).

*Sol E : parcelle à pollution en ETM ; sol Mix : parcelle à pollution mixte (ETM et HAP).*

De même, le nombre de pousses par plant de *M. x giganteus* est en général supérieur pour le sol E par rapport au sol Mix ; ce nombre étant comparable pour les plantes de chaque parcelle pour les trois ans de culture (Figure 40). **Ces deux résultats suggèrent une reproduction active de *M. x giganteus* sur ces deux sols de friche et, en conséquence, la croissance et propagation du rhizome (notamment pour le sol E).**



**Figure 40.** Nombre de pousses produites par *M. x giganteus* cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des trois premières années de croissance (Site 1).

*Sol E : parcelle à pollution en ETM ; sol Mix : parcelle à pollution mixte (ETM et HAP) ; moyenne ± écart-type ; n = 16 ; comparaison entre les types de sol et l'année de croissance de la plante [ANOVA à 2 facteurs ( $P < 0.05$ ) puis Holm-Sidak par paires ( $\alpha > 0.05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].*

Si *M. x giganteus* est capable de se développer sur un terrain de friche très hétérogène quant à la distribution et type de pollutions présentes, mais sous l'influence *a priori* des mêmes conditions climatiques, elle semble mieux s'installer sur les sols E, qui possède une pollution uniquement métallique où prédominent le Cr, le Cu et le Ni. D'autre part, **la croissance positive des pousses, malgré la réduction du taux de levée initial des plantes, indique un établissement correct des plantes installées suggérant la présence d'un système souterrain adapté à la phytostabilisation des pollutions et la restauration des caractéristiques (agronomiques) des sols.** Des études complémentaires sur le devenir des sols au sein de la rhizosphère et en profondeur de la colonne de sol soumise à l'influence de *M. x giganteus* s'avèrent nécessaires afin de déterminer l'impact de la culture.

### 5.3.2 Développement de *M. x giganteus* sur l'ancien site minier

Le suivi de *M. x giganteus* sur ce site montre une très bonne installation de la culture, avec un pourcentage de levée supérieur à 75 % pour les deux premières années de croissance (Figure 41a). De plus, la hauteur des plantes augmente pour la deuxième année de culture (Figure 41b).

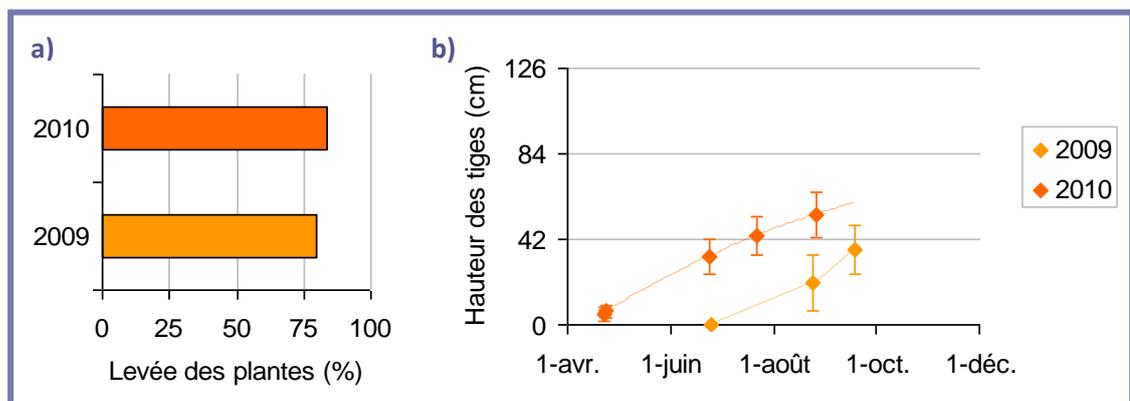


Figure 41. Installation de *M. x giganteus* cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des deux premières années de croissance (Site 2) : **a)** Pourcentage de levée et **b)** hauteur initial des tiges.

Moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 30$ .

La production de pousses augmente aussi, traduite par un pourcentage croissant de plantes capables de produire plus d'une pousse (Figure 42a) avec un nombre significativement plus élevé de pousses par plant (Figure 42b).

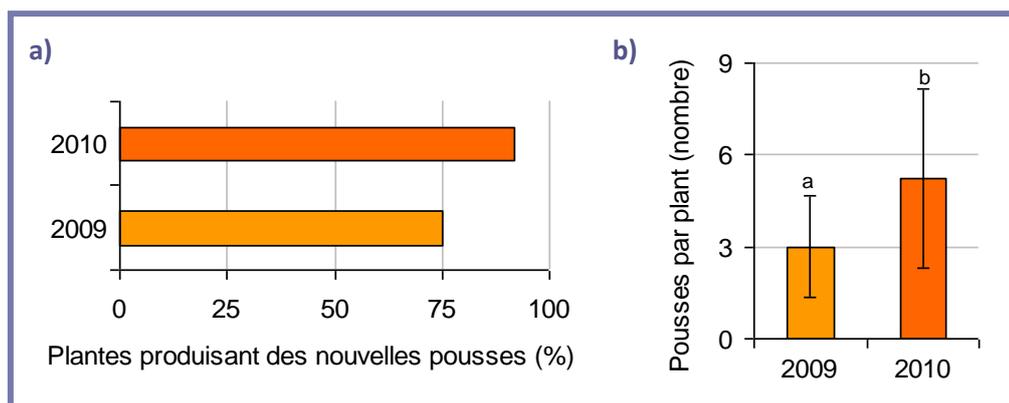


Figure 42. Aptitude à la production de pousses de *M. x giganteus* cultivée en parcelle expérimentale sur le terrain en friche, au cours des deux premières années de croissance (Site 2) : a) Pourcentage des plantes produisant des nouvelles pousses et b) nombre de pousses par plant.

Moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n = 3$  ; comparaison des deux années [t-test ( $\alpha < 0,05$ ) ; mêmes lettres : pas de différence significative].

**L'addition d'une couche superficielle de sol non pollué peut donc profiter à la mise en place de la culture de *M. x giganteus* sur des sols de friche dans le cas de sols pollués.** Cet effet est sans doute lié à une profondeur effective qui n'atteint pas encore la couche de sol pollué. Des analyses devront par contre être effectuées en profondeur pour déterminer l'impact de la plante sur le devenir des pollutions du sol.

#### 5.4 Association des bactéries potentiellement métallorésistantes à la rhizosphère de *M. x giganteus*

L'analyse de *M. x giganteus in situ* sur le site de l'ancienne cokerie témoigne qu'elle est capable de s'adapter à des conditions pédoclimatiques particulières (technosols présentant des pollutions inorganiques et organiques du nord-est de la France), avec une meilleure implantation et développement sur le sol pollué majoritairement en ETM qu'en pollution mixte en ETM et HAP (cf. section 5.3.1). De plus, la culture en mésocosme de *M. x giganteus* sur ces deux mêmes sols suggère, d'une part, que la croissance bactérienne au sein de la rhizosphère serait potentiellement résistante à la présence des ETM et d'autre part, une réorganisation des communautés bactériennes sous l'influence de la plante avec l'apparition de nouveaux phylotypes bactériens au niveau du rhizoplan (cf. section 5.2.4). Une étude *in vitro* est donc conduite pour étudier l'adaptation des communautés bactériennes (nombre et diversité) capables de se développer sous pression des ETM en utilisant comme

source nutritive les exsudats racinaires produits par *M. x giganteus* (extraits des racines de plantes cultivées en absence de polluants), à travers une série de plans d'expériences en microplaques. Des échantillons de sols non rhizosphériques, sols rhizosphériques et rhizoplans issus des cultures de *M. x giganteus* après de 2 ans de croissance sur les sols de friche E et Mix (site de l'ancienne cokerie) ont été utilisés.

#### 5.4.1 Réponse des bactéries potentiellement métallorésistantes à la présence de *M. x giganteus* du point de vue quantitatif

En premier lieu, l'exploitation des résultats sera faite pour chaque sol de friche séparément, afin de déterminer la réponse intrinsèque des communautés bactériennes de chacun en fonction de la proximité racinaire (Tableaux 22 à 25 et Figures 43 à 46).

Concernant le sol E, les différences de croissance bactérienne observées lors de la comparaison du *sol non rhizosphérique et rhizosphérique*, en fonction de la présence de  $Zn^{2+}$ , du  $Cr^{6+}$ , des exsudats racinaires et de la proximité racinaire, est attribuée uniquement à la présence des ETM dans le milieu de culture, l'effet du  $Zn^{2+}$  étant plus important, suivi de celui du  $Cr^{6+}$  et de leur effet combiné (Tableau 22). Les autres facteurs, dont la présence des exsudats, ne sont pas déterminants pour la croissance.

Tableau 22. Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, *i.e.* non rhizosphérique - rhizosphérique) affectant la croissance bactérienne sur le sol E et « P-value » associée ; \* valeur significative  $P < 0,05$ .

Facteur	Coefficients	Prob.> t
$Zn^{2+}$	<b>-0,08375</b>	<b>0,0009*</b>
$Cr^{6+}$	<b>-0,07125</b>	<b>0,0018*</b>
$Zn^{2+} * Cr^{6+}$	<b>0,06375</b>	<b>0,0030*</b>
Exsudats * Distance racinaire	-0,02875	0,0600
$Cr^{6+} * Exsudats$	0,0275	0,0684
$Cr^{6+} * Distance racinaire$	-0,02	0,1529
Distance racinaire	-0,015	0,2621
$Zn^{2+} * Distance racinaire$	-0,01	0,4380
$Zn^{2+} * Exsudats$	-0,005	0,6911
Exsudats	-0,0025	0,8415

L'effet combiné significatif entre la présence du  $Zn^{2+}$  et du  $Cr^{6+}$  est traduit par une diminution accentuée du nombre de bactéries avec l'augmentation de la concentration des ETM dans le milieu de culture (Figure 43).

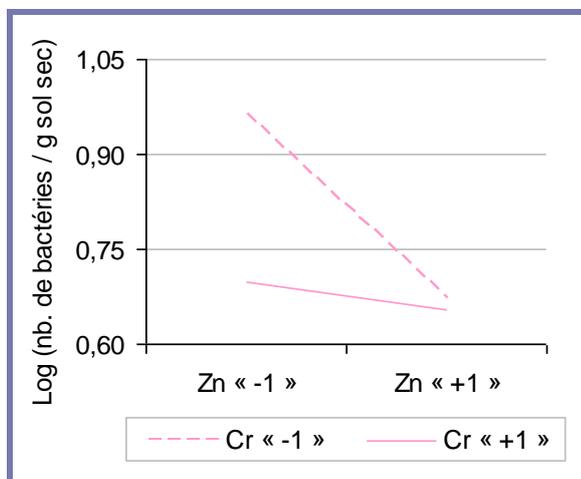


Figure 43. Effet combiné des facteurs  $Zn^{2+}$  et  $Cr^{6+}$  sur la croissance des bactéries non rhizosphériques et rhizosphériques du sol E.

Cependant, quand la croissance bactérienne du *sol rhizosphérique* est comparée à celle du *rhizoplan* en fonction des mêmes facteurs ( $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats racinaires et proximité racinaire), l'effet de la proximité racinaire devient prépondérant devant la présence des deux ETM qui continuent à influencer le développement microbien (Tableau 23).

Tableau 23. Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, *i.e.* rhizosphérique - rhizoplan) affectant la croissance bactérienne sur le sol E et « P-value » associée ; \* valeur significative  $P < 0,05$ .

Facteur	Estimation	Prob.> t
<b>Distance racinaire</b>	<b>-0,064375</b>	<b>0,0017*</b>
<b><math>Zn^{2+}</math></b>	<b>-0,060625</b>	<b>0,0023*</b>
<b><math>Cr^{6+}</math></b>	<b>-0,054375</b>	<b>0,0037*</b>
<b><math>Zn^{2+} * Cr^{6+}</math></b>	<b>0,041875</b>	<b>0,0108*</b>
Exsudats * Distance racinaire	0,024375	0,0697
$Cr^{6+} * Exsudats$	0,014375	0,2329
$Zn^{2+} * Distance racinaire$	-0,013125	0,2704
$Zn^{2+} * Exsudats$	-0,006875	0,5451
$Cr^{6+} * Distance racinaire$	0,003125	0,7799
Exsudats	0,001875	0,8665

Le nombre de bactéries augmente au niveau du rhizoplan (Figure 44a), malgré l'effet combiné du  $Zn^{2+}$  et du  $Cr^{6+}$  qui accentue la diminution de la croissance bactérienne (Figure 44b). D'autre part, l'augmentation de la teneur en exsudats racinaires dans le milieu de culture n'affecte en aucun cas la croissance bactérienne sous la pression des ETM.

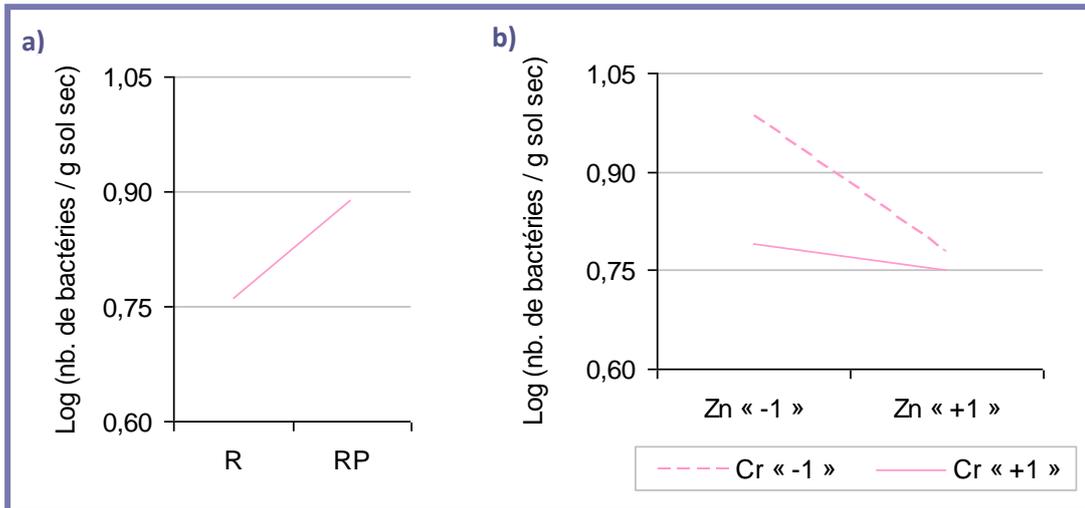


Figure 44. Effet des facteurs sur la croissance des bactéries rhizosphériques et du rhizoplan du sol E : **a)** Effet de la proximité racinaire et **b)** Effet combiné des facteurs  $Zn^{2+}$  et  $Cr^{6+}$ .  
R : sol rhizosphérique ; RP : rhizoplan.

Considérant que les bactéries du rhizoplan sont plus aptes à se développer en présence des ETM, il peut être supposé que **les conditions du sol E pourraient influencer la qualité des rhizodépôts produits par *M. x giganteus*, qui seraient capables d'opérer une sélection des bactéries les plus aptes à résister aux ETM. Cette sélection peut être vérifiée par l'identification des populations bactériennes concernées.**

Dans le cas du sol Mix, les différences entre les sols non rhizosphériques et rhizosphériques, en fonction de la présence de  $Zn^{2+}$ , du  $Cr^{6+}$ , des exsudats racinaires et de la proximité racinaire, sont attribuées non seulement à la présence des ETM mais aussi à l'interaction significative du  $Zn^{2+}$  avec la teneur en exsudats racinaires dans le milieu de culture (Tableau 24). Ainsi, si le nombre de bactéries diminue avec l'augmentation des concentrations en polluants (Figure 45a), **l'augmentation de la teneur en exsudats dans le milieu accentue l'effet inhibiteur du  $Zn^{2+}$ , contrairement aux faibles concentrations de  $Zn^{2+}$  pour lesquelles les exsudats stimuleraient la**

**croissance bactérienne (Figure 45b).** Un effet antagoniste des exsudats est donc observé en fonction de la concentration en  $Zn^{2+}$  sur ce consortium bactérien.

Tableau 24. Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, *i.e.* non rhizosphérique - rhizosphérique) affectant la croissance bactérienne sur le sol Mix et « P-value » associée ; \* valeur significative  $P < 0,05$ .

Facteur	Estimation	Prob.> t
$Zn^{2+}$	-0,07375	<,0001*
$Zn^{2+} * Cr^{6+}$	0,065	<,0001*
$Cr^{6+}$	-0,0575	<,0001*
$Zn^{2+} * Exsudats$	-0,01125	0,0278*
$Zn^{2+} * Distance\ racinaire$	0,005	0,2308
Exsudats* Distance racinaire	0,005	0,2308
Distance racinaire	0,0025	0,5255
Exsudats	-0,00125	0,7470
$Cr^{6+} * Distance\ racinaire$	-0,00125	0,7470
$Cr^{6+} * Exsudats$	0	1,0000

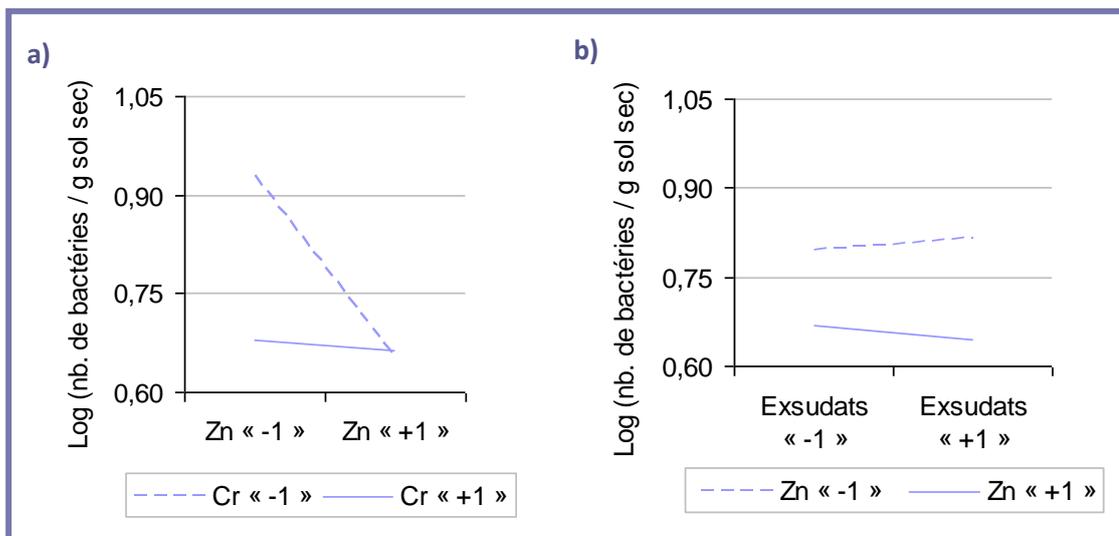


Figure 45. Effet des facteurs sur la croissance des bactéries non rhizosphériques et rhizosphériques du sol Mix : a) ) Effet combiné des facteurs  $Zn^{2+}$  et  $Cr^{6+}$  et b) Effet combiné des facteurs exsudats et  $Zn^{2+}$ .

Quant à la comparaison entre *le sol rhizosphérique et le rhizoplan* du sol Mix en fonction des mêmes facteurs ( $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats racinaires et proximité racinaire), les différences de la croissance bactérienne indiquent, à nouveau, un effet significatif des ETM contrebalancé par l'effet combiné entre la plante et le  $Zn^{2+}$ , celui-ci n'étant observable qu'en fonction de la distance racinaire (Tableau 25). De plus, la diminution du nombre de bactéries lorsque la concentration de  $Zn^{2+}$  augmente a lieu

seulement en présence d'une faible teneur en  $\text{Cr}^{6+}$  (Figure 46a). Enfin, les bactéries du rhizoplan sont capables de se développer en présence de  $\text{Zn}^{2+}$ , quelque soit sa concentration dans le milieu de culture malgré la toxicité de cet élément (Figure 46b).

Tableau 25. Coefficients des facteurs ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ , exsudats et distance racinaire, *i.e.* rhizosphérique - rhizoplan) affectant la croissance bactérienne sur le sol Mix et « P-value » associée ; \* valeur significative  $P < 0,05$ .

Facteur	Estimation	Prob.> t
$\text{Zn}^{2+} * \text{Cr}^{6+}$	0,065625	<,0001*
$\text{Zn}^{2+}$	-0,065625	<,0001*
$\text{Cr}^{6+}$	-0,060625	<,0001*
Distance racinaire	-0,046875	<,0001*
$\text{Zn}^{2+} * \text{Distance racinaire}$	-0,013125	0,0235*
$\text{Zn}^{2+} * \text{Exsudats}$	-0,009375	0,0699
Exsudats * Distance racinaire	-0,005625	0,2264
$\text{Cr}^{6+} * \text{Exsudats}$	0,005625	0,2264
$\text{Cr}^{6+} * \text{Distance racinaire}$	0,004375	0,3325
Exsudats	-0,000625	0,8842

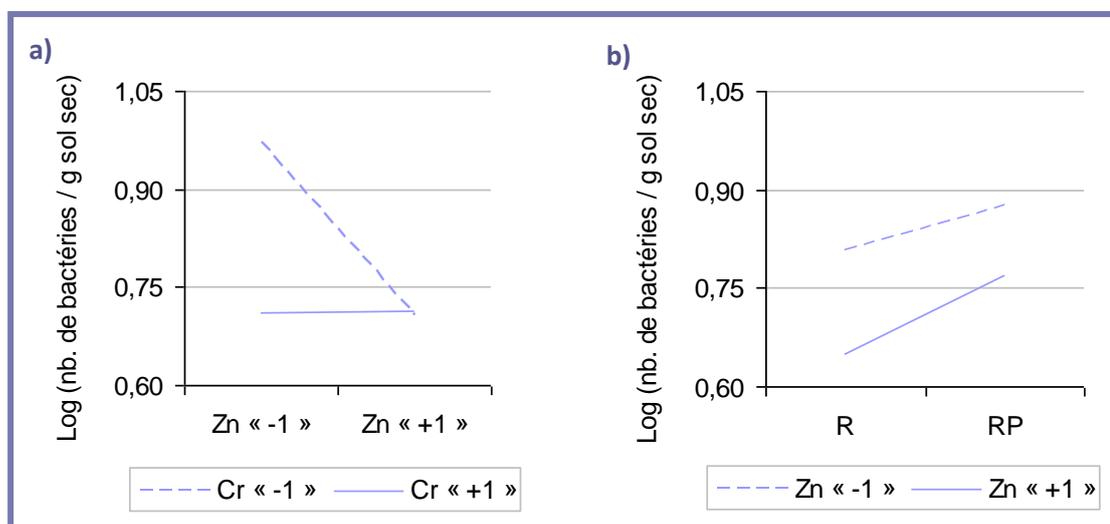


Figure 46. . Effet des facteurs sur la croissance des bactéries rhizosphériques et du rhizoplan du sol Mix : a) Effet combiné des facteurs  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Cr}^{6+}$  et b) Effet combiné des facteurs proximité racinaire et  $\text{Zn}^{2+}$ .

R : sol rhizosphérique ; RP : rhizoplan.

La relation probable des bactéries au niveau du rhizoplan qui pourrait être le résultat d'une modification des rhizodépôts soumis à l'influence des pollutions par les ETM (le sol Mix présentant une teneur en  $\text{Zn}^{2+}$  totale plus élevée), conduit à une

meilleure résistance du consortium à cet élément ( $Zn^{2+}$ ). Par ailleurs, il n'y a pas d'effet additif de la toxicité liée à l'ajout du  $Cr^{6+}$  pour la croissance des bactéries associée aux rhizoplan du sol Mix, probablement du fait de l'utilisation du système de détoxification/résistance déjà induit par le  $Zn^{2+}$ . Ces deux mécanismes devront être vérifiés par l'identification des bactéries présentes et leur aptitude à cette résistance.

Ces résultats montrent que, dans nos conditions expérimentales, les bactéries des deux sols de friche ayant subi une préselection due à la présence de la plante (*i.e.* après 2 cycles végétaux), seraient plus aptes à la résistance aux ETM avec une relation qui semble être plus importante pour celles provenant du sol Mix traduit par des effets combinés plante-ETM significatifs. Toutefois, la comparaison de la croissance bactérienne entre les deux types de consortium (*i.e.* sol E et sol Mix) au niveau du rhizoplan permettrait de confirmer les différences sur leur adaptation sous les mêmes conditions de sélection (*i.e.* analyse de la croissance des bactéries des rhizoplans en fonction du  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats racinaires et type de consortium). La différence de la croissance bactérienne est non seulement liée à un effet significatif des concentrations en ETM auxquelles les organismes seraient exposés, mais aussi à l'origine du consortium microbien (*i.e.* racines des plantes cultivées sur le sol E ou sur le sol Mix) (Tableau 26).

Tableau 26. Coefficients des facteurs ( $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ , exsudats et type de consortium, *i.e.* Sol E - Sol Mix) affectant la croissance bactérienne sur le rhizoplan et « P-value » associée ; \* valeur significative  $P < 0,05$ .

Facteur	Estimation	Prob.> t
$Cr^{6+}$	-0,06125	0,0002*
$Zn^{2+}$	-0,05	0,0005*
$Zn^{2+} * Cr^{6+}$	0,05	0,0005*
<b>Consortium</b>	<b>-0,03375</b>	<b>0,0029*</b>
Exsudats * Consortium	0,01375	0,0791
Exsudats	-0,00875	0,2204
$Cr^{6+} * Consortium$	-0,00375	0,5747
$Zn^{2+} * Consortium$	-0,0025	0,7057
$Cr^{6+} * Exsudats$	0,00125	0,8494
$Zn^{2+} * Exsudats$	0	1,0000

De plus, à la différence des sols non rhizosphériques et rhizosphériques, il n'y a pas d'effet additifs des toxicités du  $Zn^{2+}$  et du  $Cr^{6+}$  (Figure 47a). D'autre part, le nombre de bactéries du rhizoplan des plantes cultivées sur le sol E est plus important que celui des celles cultivées sur le sol Mix quelque soit la teneur en ETM dans le milieu de culture (Figure 47b).

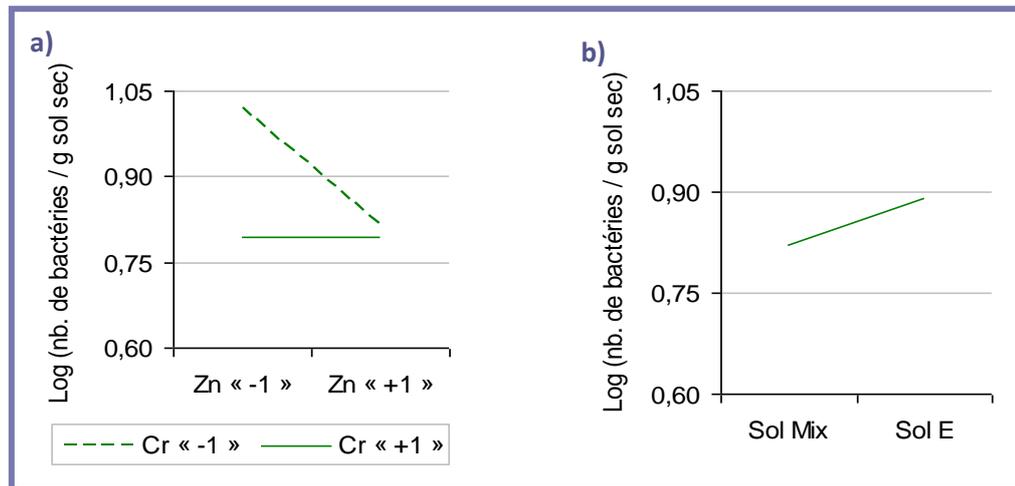


Figure 47. Effets des facteurs sur la croissance bactérienne du rhizoplans : a) Effet combiné des facteurs  $Zn^{2+}$  et  $Cr^{6+}$  et b) Effet du type de consortium.

Ces résultats suggèrent que **les mécanismes de détoxification du  $Zn^{2+}$  des bactéries associés aux rhizoplan, donc à *M. x giganteus*, pourraient aussi être utiles à la détoxification du  $Cr^{6+}$** . De plus, Shen et collaborateurs (2006) constatent que pour des sols présentant des pollutions en HAP, les ETM peuvent pénétrer plus facilement dans les cellules microbiennes et affecter leurs fonctions comme c'est le cas du Zn sur l'activité uréasique (Shen et al. 2006). **La croissance plus importante des bactéries du sol E pourrait donc être le résultat d'une microflore soumise à une pression polluante moins importante de ce sol qui ne contient pas de HAP contrairement au sol Mix (cf. 5.1.2)**. D'autre part, les exsudats racinaires utilisés pour enrichir le milieu de culture qui sont extraits de plantes cultivées en absence de polluants métalliques, n'ont pas eu un effet significatif (combiné ou non à d'autres facteurs) sur la croissance bactérienne. L'effet de la présence de *M. x giganteus* dépendant strictement de la proximité racinaire et du type de sol de friche laisse supposer que **les rhizodépôts produits par la plante sont modifiés suivant les caractéristiques du sol et les pollutions associées**. Luo et al. (2008) ont ainsi montré

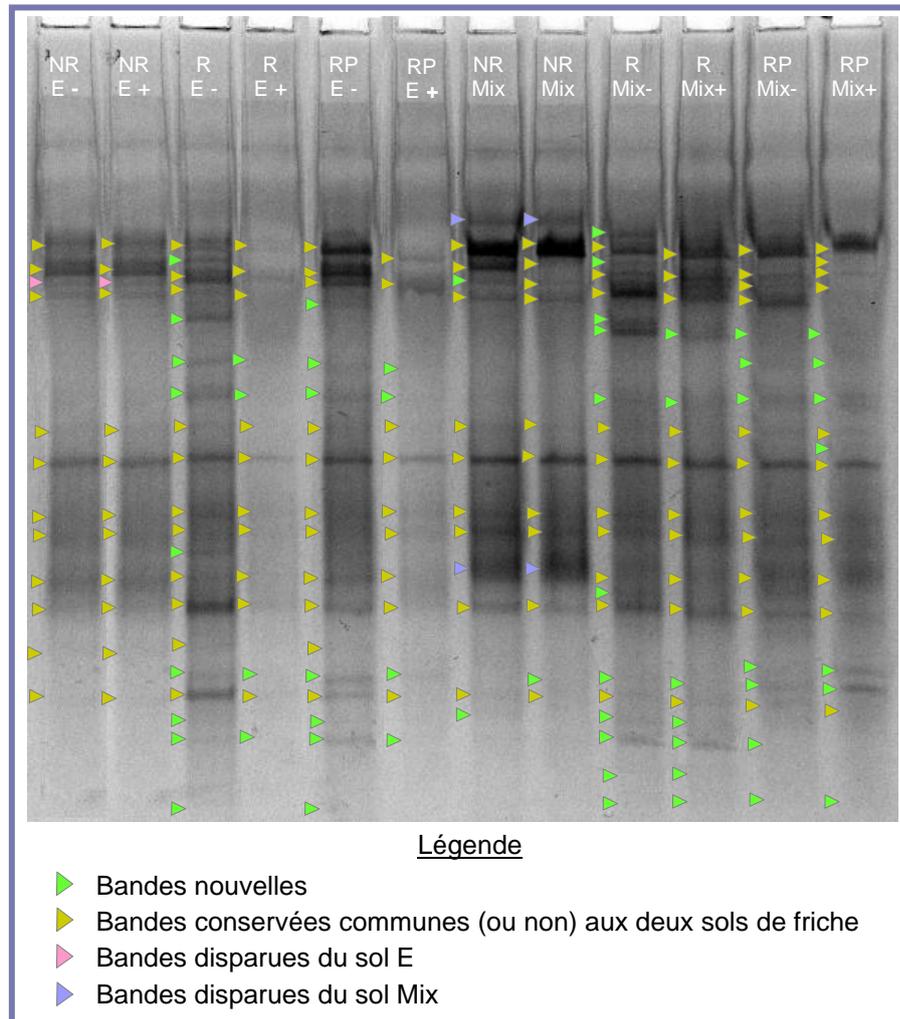
que les exsudats de *Hordeum vulgare* L. cv. *Jian 4*, cultivée en carence de Fe, augmentent la biodisponibilité d'autres ETM (Cu, Pb, Zn Cd et Fe) en comparaison de conditions dites « normales », ce qui pourrait indirectement modifier l'activité microorbiennne du sol (Luo et al. 2008). **En conséquence, il serait intéressant d'étudier la composition des exsudats de végétaux cultivés sur sols contaminés et de vérifier l'incidence de modifications observées sur les populations bactériennes.**

#### 5.4.2 Diversité des communautés bactériennes

L'analyse quantitative a montré que la présence de *M. x giganteus* favoriserait, dans nos conditions expérimentales, la croissance des bactéries potentiellement métallorésistantes sous l'effet de la proximité racinaire. Toutefois, si la stimulation est valable pour les deux sols de friche, avec une croissance généralement plus importante pour le sol E au niveau du rhizoplan, les bactéries du sol Mix présentent des relations particulières avec le Zn. Cette relation s'exprimant à la fois pour l'utilisation des exsudats et pour la proximité racinaire, l'impact de *M. x giganteus* sur la diversité des communautés bactériennes capables de se développer sous pression de cet élément est étudié. Pour cela, les échantillons des modalités expérimentales correspondantes aux trois niveaux de pollution en Zn (*i.e.* milieu BH non pollué, milieu Zn-Cr- et milieu Zn+Cr-) sont soumis à l'analyse moléculaire.

Concernant la diversité des bactéries totales (Figure 48), non seulement les phylotypes natifs de chacun des sols de friche non plantés sont globalement conservés en présence de *M. x giganteus* (seule une bande est perdue pour le sol E et deux bandes pour le sol Mix) mais un effet positif est observé en proximité de la racine, traduit par l'augmentation de la diversité microbienne des deux sols. Ceci est principalement notable pour les profils électrophorétiques des communautés bactériennes des sols rhizosphériques. Ceux-ci présentent un nombre plus élevé de nouvelles bandes, avec un effet de la plante plus accentué pour le sol Mix que pour le sol E (8 bandes pour la modalité «R E -» contre 11 bandes pour la modalité «R Mix -»). De plus, la plupart des nouvelles bandes semblent être communes aux deux sols de friche. Cependant, si la proximité racinaire profite à la diversité microbienne, il n'en est pas de même pour les exsudats racinaires. **Les bactéries natives des sols de**

friche s'adaptent donc à la présence de *M. x giganteus* qui permet d'améliorer la diversité de la communauté microbienne.



**Figure 48.** Profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables totales (milieu BH non pollué) des sols de friche non rhizosphériques, rhizosphériques et rhizoplans, au 2<sup>ème</sup> cycle végétal de *M. x giganteus* lors de sa culture sur le terrain.  
*Sol E* : sol de friche – pollution en ETM ; *sol Mix* : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; *NR* : sol non rhizosphérique ; *R* : sol rhizosphérique ; *RP* : rhizoplan ; signes « -/+ » niveau d'exsudats racinaires.

Quant aux bactéries cultivées sous une faible pression de Zn<sup>16</sup> (Figure 49), le sol Mix présente une diversité plus importante que le sol E et davantage capable d'utiliser les exsudats racinaires de *M. x giganteus* comme source nutritive. Toutefois, la perte de bandes en fonction de la proximité racinaire est aussi plus importante pour ce sol, contrairement au sol E où la communauté microbienne reste plus stable.

<sup>16</sup> Soit la teneur moyenne potentiellement biodisponibles de Zn dans les sols de friche selon l'analyse des ETM accumulés par les vers de terre (cf. section 5.2.3.3).

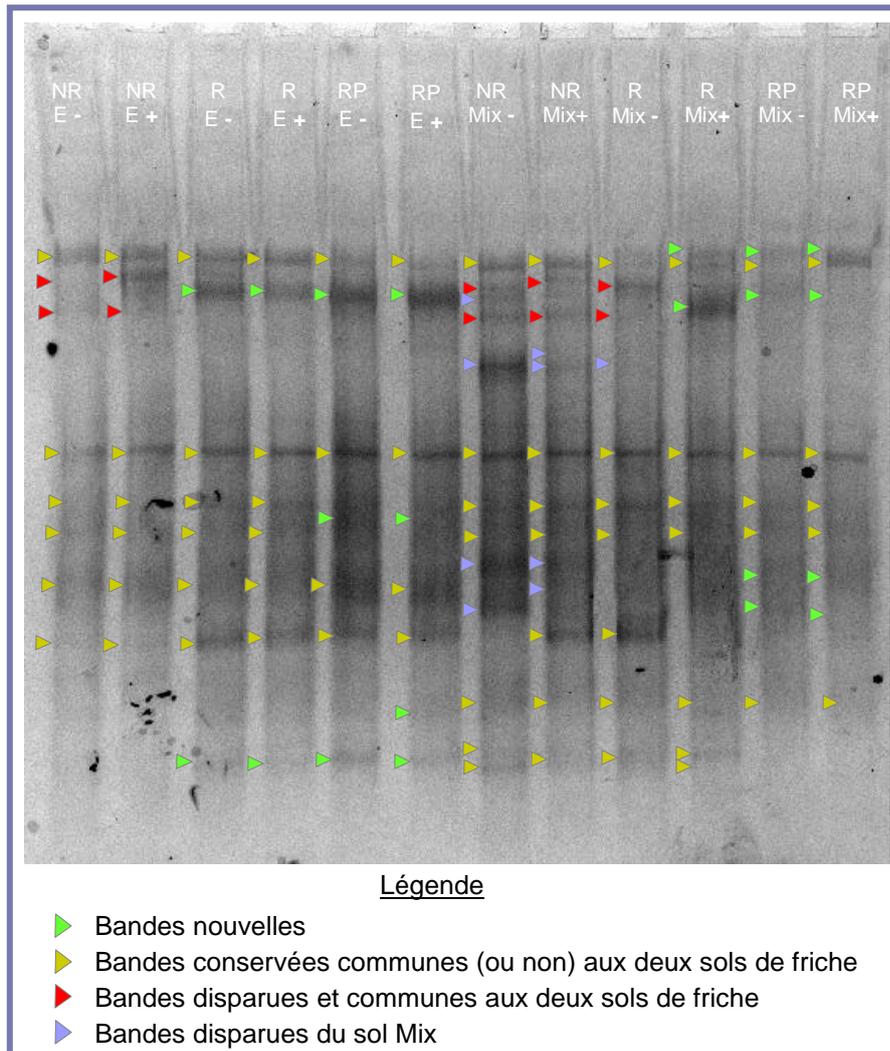


Figure 49. Profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables sous pression de faible concentration de Zn (*i.e.* modalités expérimentales du milieu Zn-Cr-), des sols de friche non rhizosphériques, rhizosphériques et rhizoplans, au 2<sup>ème</sup> cycle végétal de *M. x giganteus* lors de sa culture sur le terrain.

*Sol E* : sol de friche – pollution en ETM ; *sol Mix* : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; *NR* : sol non rhizosphérique ; *R* : sol rhizosphérique ; *RP* : rhizoplan ; signes « -/+ » niveau d'exsudats racinaires.

Cependant, les deux sols présentent le même nombre de nouvelles bandes associées directement au rhizoplan, mais elles seraient particulières à chaque sol comme l'indique la position relative des bandes sur les profils électrophorétiques. Une augmentation de la teneur en exsudats racinaires serait également favorable à cette diversité, avec l'apparition d'une nouvelle bande au niveau du rhizoplan du sol E (*i.e.* modalité «RP E +») et d'une autre bande pour le sol rhizosphérique Mix (*i.e.* modalité «R Mix +»). **La présence de *M. x giganteus* participerait donc aussi à l'enrichissement de la diversité de la communauté bactérienne des sols de friche**

capable de se développer sous la présence du Zn potentiellement biodisponible dans les sols, cette association étant particulière à chaque sol.

Par ailleurs, le sol E présente une diversité bactérienne originale plus importante que le sol Mix lorsque la concentration du Zn augmente dans le milieu de culture<sup>17</sup> (Figure 50).

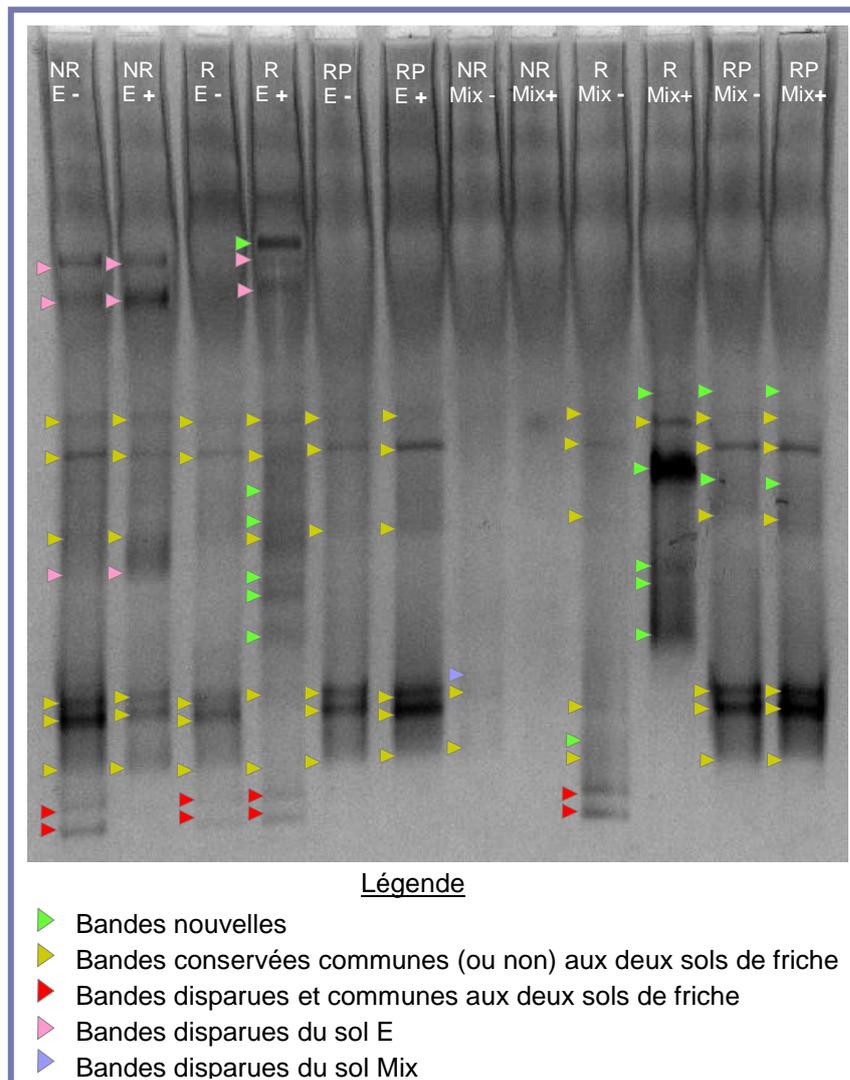


Figure 50. Profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables sous pression de forte concentration de Zn (*i.e.* modalités expérimentales du milieu Zn+Cr-), des sols de friche non rhizosphériques, rhizosphériques et rhizoplans, au 2<sup>ème</sup> cycle végétal de *M. x giganteus* lors de sa culture sur le terrain.

*Sol E* : sol de friche – pollution en ETM ; *sol Mix* : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; *NR* : sol non rhizosphérique ; *R* : sol rhizosphérique ; *RP* : rhizoplan ; signes « -/+ » niveau d'exsudats racinaires.

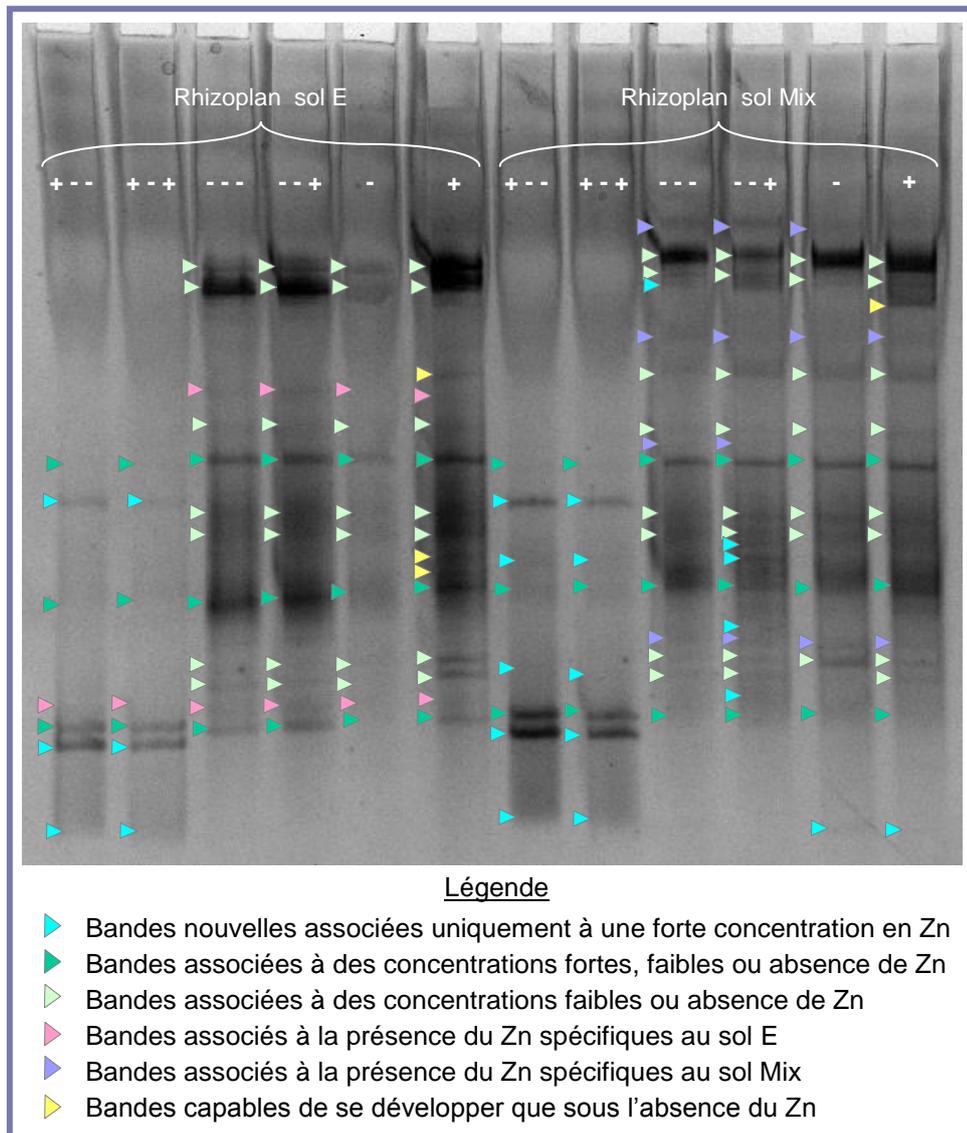
<sup>17</sup> Soit l'équivalent à la teneur moyenne totale de Zn dans les sols de friche (cf. section 5.2.3.3).

Cependant, l'influence de *M. x giganteus* est plus favorable pour le développement de la microflore du sol Mix comme le montre l'apparition de nouvelles bandes au niveau du rhizoplan de ce sol, contrairement au sol E où aucune nouvelle bande n'a été observée. Les nouvelles bandes du rhizoplan seraient spécifiques au sol Mix. L'incidence de ces modifications en termes de phylotype sur la diversité des communautés bactériennes devra être analysée après clonage et séquençage.

Toutefois, c'est au niveau des bactéries des sols rhizosphériques exposées à une forte dose en exsudats racinaires comme source nutritive que le plus grand nombre de nouvelles bandes est aperçu pour les deux sols de friche, à savoir 6 nouvelles bandes pour le sol E (*i.e.* modalité «R E +») contre 5 nouvelles bandes pour le sol Mix (*i.e.* modalité «R Mix +») parmi lesquelles 3 bandes seraient potentiellement communes aux deux sols. Il faut noter que dans le cas du sol rhizosphérique Mix, l'augmentation de la teneur en exsudats réduit considérablement la diversité du sol, au contraire de la diversité du sol rhizosphérique E qui est conservée et même stimulée. **Ces résultats suggèrent que les composés secrétés par la plante profiteraient à la croissance de bactéries fortement tolérantes au Zn, ces bactéries pouvant s'associer aux racines de *M. x giganteus* lors de sa culture sur le sol E ou au sol Mix (ce dernier ayant une diversité plus importante). De plus, si les exsudats racinaires de *M. x giganteus* semblent profiter à la diversité microbienne capable de se développer sous une forte pression au Zn, l'interaction de *M x giganteus* avec le sol pollué, en particulier dans le cas du sol Mix, pourrait conduire à une modification des exsudats racinaires aboutissant à la sélection de communautés spécifiques mises en évidence par l'apparition de nouvelles bandes. Les bandes associées aux rizoplans étant différentes à celles apparues sous l'influence des exsudats racinaires suggère qu'il conviendrait d'utiliser des exsudats racinaires provenant de plantes exposées aux pollutions désirées pour avoir une meilleure représentation de l'effet qu'ils provoqueraient sur la croissance bactérienne.**

Finalement, lorsque les bactéries présentes au niveau des rizoplans de *M. x giganteus* cultivées sur les deux sols de friche sont comparées vis-à-vis de la présence du Zn (Figure 51), il apparaît que la plupart des phylotypes ne seraient capables de se développer qu'en présence de faibles teneurs en Zn (*i.e.* modalités «- - -» et «- - +»).

Pour les bactéries adaptées à une forte concentration de Zn, les deux sols semblent partager la plupart des phylotypes existants indépendamment de la teneur en exsudats utilisés (*i.e.* modalités «+ - -» et «+ - +»). Les nouvelles bandes sont cependant spécifiques à chaque sol avec deux bandes additionnelles sur le sol Mix apparaissant uniquement sous une forte pression du Zn.



**Figure 51.** Comparaison des profils électrophorétiques des communautés bactériennes cultivables sous absence de Zn, de faible teneur en Zn et fortes teneurs en Zn, des rhizoplas au 2<sup>ème</sup> cycle végétal de *M. x giganteus* lors de sa culture sur les sols de friche sur le terrain. Sol E : sol de friche – pollution en ETM ; sol Mix : sol de friche – pollution mixte (ETM et HAP) ; 1<sup>er</sup> signe « -/+ » : niveau de Zn ; 2<sup>ème</sup> signe « -/+ » : niveau de Cr ; 3<sup>ème</sup> signe « -/+ » : niveau d'exsudats racinaires.

De plus, si la communauté bactérienne du sol Mix est plus diversifiée que celle du sol E, elle semble principalement adaptée aux faibles teneurs en Zn ; ceci peut être le

résultat d'une biodisponibilité du Zn légèrement plus importante pour le sol Mix que pour le sol E même si la teneur biodisponible dans les deux sols reste limitée (cf. section 5.2.3.3). D'autre part, l'effet stimulant des exsudats racinaires sur la croissance bactérienne est différent pour les deux sols : leur présence semble plus profitable aux bactéries non aptes à la présence du Zn du sol E (i.e. modalité « + »), tandis que sur le sol Mix l'effet des exsudats agit plutôt sur les bactéries capables de se développer sous une faible teneur en Zn (i.e. modalité « - - + »).

***M. x giganteus* établirait alors des associations spécifiques avec les bactéries capables de se développer sous la pression du Zn biodisponible dans les sols de friche. Quant aux phylotypes bactériens potentiellement résistants au Zn (qui supportent les concentrations totales de Zn présents dans le sol), la stimulation serait comparable pour les deux sols de friche, avec une diversité qui semble être globalement identique. Par ailleurs, considérant la faible réponse des bactéries du sol E aux exsudats racinaires provenant de plantes cultivées en l'absence de polluants, il est possible que l'association entre les microorganismes et la plante puisse être le résultat d'une adaptation des rhizodépôts racinaires de *M. x giganteus* suivant les conditions du sol, comme l'ont montré Luo *et al.* (2008) pour *Hordeum vulgare L. cv. Jian 4*.**

Kozdrój et van Elsas (2000) montrent que l'ajout des exsudats racinaire artificiels de maïs (i.e. ARE : artificial root exudates ; un mélange de sucres, acides organiques et acides aminés qui simulent la composition des exsudats racinaires produit par cette plante) sur la microflore de sols pollués en ETM provenant des zones industrielles de la région de Silesia (Pologne) peut entraîner une modification des espèces dominantes et de la diversité, qui serait même différente en fonction de la quantité de ARE utilisés. De plus, si une différence au niveau des pollutions en ETM ne perturberait pas le nombre de bactéries cultivables, ce n'est pas de même lors de la présence des ARE. Cette variation (diminution), serait probablement due à un changement de la biodisponibilité des ETM dans les sols. Concernant la diversité microbienne, l'ajout de ARE induit le développement de bactéries connues pour leur capacité à résister aux ETM dans les sols (e.g. *Arthrobacter oxydans*) (Kozdrój et van Elsas 2000). En effet, d'autres études montrent que la densité des bactéries

cultivables fortement tolérantes aux métaux extraites des sols miniers pollués, seraient plus importante au niveau de la rhizosphère de plantes pseudométallophytes, comme la graminée *Festuca rubra* excluante des ETM (Becerra-Castro et al. 2012) ; la présence de ces bactéries est en plus associée avec une augmentation de la disponibilité des ETM dans le sol. Dans d'autres cas, la biosorption des ETM par les bactéries (aux parois cellulaires ou au polysaccharides extracellulaires par exemple) peut diminuer l'absorption des éléments par la plante (mécanisme aussi impliqué dans la phytostabilisation) (Cervantes et al. 2001; Khan 2005; Febrianto et al. 2009; Kidd et al. 2009), mais changer le mode d'exposition aux ETM d'autres organismes du sol (nématode, protozoaire) par rapport à un contact direct avec la solution du sol (Giller et al. 1998). L'étude en mésocosme montre qu'il n'y a pas un changement de la mobilité mais une accumulation des ETM par les vers de terre accentuée sous la présence de *M. x giganteus* (cf. 5.2.3.3), dans ce cas, les bactéries potentiellement résistantes aux ETM et stimulées par la présence de *M. x giganteus* seraient capables d'immobiliser les ETM. Par ailleurs, certaines bactéries métallorésistantes stimulées au niveau de la rhizosphère ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes (*i.e.* PGPR), favorisant ainsi la phytostabilisation (*i.e.* couverture végétale en bonne santé dans une courte période de temps, réduction du stress lié aux ETM) ou la phytoextraction (*i.e.* avec une bonne production de biomasse ou une augmentation de la teneur en ETM accumulés) (Rajkumar et Freitas 2008; Dell'Amico et al. 2008; Becerra-Castro et al. 2012). Il serait intéressant de déterminer effectivement si les bactéries associées à *M. x giganteus* ont aussi cette aptitude, confirmant par la suite le succès de l'installation de la culture. De même, la croissance de bactéries HAP dégradantes capables de résister à la présence des ETM peut être stimulées sous l'effet des plantes (Roy et al. 2005) ; ceci suggère que les phylotypes bactériens spécifiques du sol Mix (ayant une pollution mixte en ETM et HAP) apparus en présence de *M. x giganteus* seraient éventuellement des bactéries ayant l'aptitude à dégrader les HAP, jouant ainsi un double rôle pour la phytoremédiation de ce type de sols de friche. Finalement, les associations rhizosphériques dépendront de l'espèce végétale utilisée, le type de sol et le niveau de pollution, affirmant que les sols pollués sont des systèmes d'une complexité encore plus élevée (Belén Hinojosa et al. 2010) d'où l'importance d'un

suivi particulier lors de la mise en place des techniques de phytoremédiation ; surtout étant conscient que les communautés microbiennes (fortement impliquées dans différentes fonctions du sol tant du point de vue agronomique comme pour la transformation et mobilité des ETM (Adriano et al. 2004)) sont potentiellement altérées, les communautés initiales présentes dans les sols non plantés n'étant pas forcément récupérées dans le temps (Gremion et al. 2004).

## 6 Conclusions et perspectives

Consciente du besoin de proposer des alternatives à la réhabilitation durable des friches industrielles polluées en ETM, une étude sur la capacité d'adaptation de *M. x giganteus* aux sols pollués tout en favorisant le processus de bioremédiation et la protection de l'environnement, a été réalisée. Des sols de la région lorraine fortement touchés par des pollutions multimétalliques ont servi de scénario pour la mise en place des expériences où les trois composantes principales et indissociables du système ont été abordées : (i) la plante, avec l'analyse du développement physiologique de *M. x giganteus* et sa participation dans le devenir des pollutions métalliques, (ii) le sol, dont les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques ont été déterminées afin d'évaluer toute modification provoquée par la présence du végétal, et (iii) les communautés bactériennes des sols, et plus particulièrement celles associées à la rhizosphère de *M. x giganteus* susceptibles d'entreprendre des mécanismes de phytoremédiation des ETM. Ce travail est réalisé en considérant la complexité du système en utilisant plusieurs scénarii : *in vitro* (conditions multifactorielles artificielles), mésocosme en laboratoire (conditions pseudocontrôlées) et milieu naturel (variations environnementales naturelles).

Les résultats ont montré que *M. x giganteus* est capable de se développer sur des sols de friche ayant des conditions agronomiques non optimales pour la croissance des plantes (alcalins, faibles en nutriments...), présentant des pollutions multimétalliques ou mixtes en ETM et HAP et présentant une toxicité sub-létale, mesurée sur ver de terre, ceci malgré la faible biodisponibilité et mobilité de polluants inorganiques dans les sols.

L'activité végétale peut être à l'origine d'une association de la plante avec les bactéries du sol tolérantes aux ETM au détriment des autres bactéries présentes, avec notamment le développement de nouvelles communautés bactériennes dont la diversité est spécifique à chaque sol. Toutefois, la majorité des phylotypes favorisés par la présence de la plante et ayant potentiellement une forte résistance au Zn, semble être communes aux deux sols utilisés (E et Mix). Les mécanismes de détoxification seraient soit utiles pour la tolérance à d'autres ETM, comme le Cr, soit stimulateur

d'autres mécanismes de résistance. Seule l'identification par séquençage des membres des communautés observées permettra d'estimer avec précision la diversité bactérienne, considérant que l'hétérogénéité des copies de l'ADNr 16S peut entraîner une surestimation des espèces bactériennes (Roudière et al. 2007), mais aussi parce que l'intensité de certains bandes peut être associée à la présence de plusieurs espèces ayant des séquences d'ADNr similaire (Kozdrój et van Elsas 2000). L'analyse de l'expression des gènes de résistance aux ETM aiderait à mieux élucider les mécanismes utilisés par les bactéries associées, ainsi qu'à confirmer la participation de ces nouvelles communautés microbiennes à la phytostabilisation des pollutions dans le sol (Ianeva 2009). Il serait aussi intéressant de déterminer l'aptitude de ces bactéries à promouvoir la croissance des plantes permettant par la suite le succès de l'installation de la culture, leur faculté à dégrader des polluants organiques comme les HAP ainsi que leur impact sur les cycles biogéochimiques des éléments et le fonctionnement des sols. Une compréhension écologique de la façon dont interagissent les contaminants, les fonctions des écosystèmes et les communautés biologiques à long terme est nécessaire pour une bonne gestion de ces écosystèmes fragilisés par la présence des métaux (Epelde et al. 2010).

Considérant que les ectomicorhizes participent souvent à la détoxification des ETM chez les végétaux (Hall 2002), il serait aussi intéressant d'étudier si des telles relations se sont établies lors de la culture sur les sols de friche pollués. Les microorganismes originaires de ce type de sols, capables de s'adapter et de s'associer à la plante, pourraient être étudiés dans l'intérêt d'assister et/ou optimiser les processus de phytoremédiation au travers des méthodes de bioaugmentation (Lebeau et al. 2008).

Il est aussi possible que les rhizodépôts produits par la plante soient adaptés suivant les conditions du sol utilisé pour sa culture (notamment le type de pollution) entraînant le développement d'une communauté bactérienne particulière. Des analyses de composition des exsudats racinaires extraits de plantes ayant été soumises au stress métallique pourrait donc être envisagées (Bais et al. 2006; Figueroa et al. 2008). Leur utilisation lors des études concernant les relations microbiennes associées à la rhizosphère permettrait de mieux rendre compte des relations « plante / microorganisme » des sols.

Enfin, la biomasse produite et sa répartition sur les différentes parties végétales semblent être équivalentes indépendamment du type de sol. Ceci s'accompagne d'une propagation active de la plante et d'une rhizosphère apparemment importante. Cependant, la réduction de la hauteur pour les végétaux exposés à des pollutions mixtes (observée en mésocosme et confirmé sur le terrain) laisse supposer des dissemblances possibles pour le rendement de la culture de façon locale sur le terrain. Finalement, l'addition d'une couche superficielle de sol non pollué peut profiter à l'installation de la culture pour ainsi améliorer sa performance lors du contact avec les sols de friche pollués. Quant à la capacité phytoremédiatrice, la plante n'a pas présenté de signes précoces de toxicité associés à la présence des ETM lors de son exposition aux sols de friche pollués. Ainsi, cette graminée est non seulement capable de tolérer la présence des ETM (soit le  $Pb > Zn > Cu > Cd$ ) mais elle a l'aptitude de les accumuler et de les phytostabiliser principalement au niveau des racines. Par contre, si un faible transfert des éléments vers les parties aériennes a été observé, notamment pour le Zn, il serait probablement dû la diffusion passive des polluants. Par conséquent, la culture de *M. x giganteus* aurait un double bénéfice pour la réhabilitation des sols de friche pollués en ETM : la phytostabilisation des pollutions métalliques et la production d'une biomasse aérienne utilisable, la translocation limitée des ETM diminuant les risques de remobilisation des polluants lors de sa valorisation. Toutefois, il conviendra toujours de vérifier l'innocuité des parties revalorisées (Lievens et al. 2008; Stals et al. 2010; Sas-Nowosielska 2011) ainsi que leur qualité, notamment en cas de combustion. De même, d'autres types de sols (notamment à pH acide) devraient faire l'objet d'étude pour déterminer la versatilité de la plante pour la phytoremédiation des sols. Finalement, si les feuilles (généralement laissées au sol) peuvent participer à la réduction de l'érosion du sol et limiter le transport de particules polluées dans l'air, il est nécessaire de surveiller les risques sur la sécurité sanitaire spécialement lors des périodes de récolte mécanique (e.g. envol de poussières).

D'autre part, la plante n'altère pas les caractéristiques du sol qui pourraient participer fortement à la mobilité des ETM (pH, CEC). Toutefois, les variations des caractéristiques liées à la fertilité du sol, de la toxicité et de l'accumulation des ETM par d'autres organismes, bien que elle ne provoque pas de modifications de la partition des ETM

dans les sols, attestent de l'interaction de la plante avec le milieu de culture qui rendrait les éléments potentiellement plus disponibles (particulièrement le Cu < Cr < Zn). Des études à court et long terme permettront de vérifier si cette disponibilité est déterminée par les besoins physiologiques de la plante (détoxification facilitant son implantation sur les sols pollués) entraînant la restauration des caractéristiques agronomiques des sols. Le renouvellement racinaire et du rhizome pourrait aussi entraîner une remobilisation des ETM. Par ailleurs, une caractérisation plus complète de la spéciation des ETM serait utile pour déterminer avec plus de certitude l'impact des éléments *sensu stricto* (e.g. le Cr) ou leur affinité avec les différentes fractions du sol (e.g. carbonates, oxydes, matière organique...) (Bruemmer et al. 1986; Bravin et al. 2010). L'analyse en profondeur de la colonne du sol impacté par la présence de la plante, ou de la chaîne alimentaire associée à sa culture, permettrait aussi d'éliminer des risques possibles de mobilisation des polluants métalliques vers d'autres compartiments de l'environnement.

## 7 Bibliographie

Abhilash, P.C., Yunus, M., 2011. Can we use biomass produced from phytoremediation? *Biomass and Bioenergy* 35, 1371-1372.

ADEME, A. de l'Environnement et de la M. de l'Energie, 2010. Friches urbaines.

Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J., Bolan, N.S., 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122, 121-142.

AFNOR, 1995. Essais écotoxicologiques environnement recueil de normes françaises. Association française de normalisation (AFNOR), Paris.

AFNOR, 1996. Qualité des sols environnement. Association française de normalisation (AFNOR), Paris.

AFNOR, 1998. NF T 90-375 Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique des eaux par inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*).

Ali, N.A., Ater, M., Sunahara, G.I., Robidoux, P.Y., 2004. Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 363-374.

Andreoni, V., Colombo, M., Colombo, A., Vecchio, A., Finoli, C., 2003. Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. *Annals of microbiology* 53, 135-148.

Arduini, I., Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A., 2006a. Response of miscanthus to toxic cadmium applications during the period of maximum growth. *Environmental and Experimental Botany* 55, 29-40.

Arduini, I., Masoni, A., Ercoli, L., 2006b. Effects of high chromium applications on miscanthus during the period of maximum growth. *Environmental and Experimental Botany* 58, 234-243.

Arduini, I., Masoni, A., Mariotti, M., Ercoli, L., 2004. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environmental and Experimental Botany* 52, 89-100.

Audet, P., Charest, C., 2008. Allocation plasticity and plant-metal partitioning: Meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environmental Pollution* 156, 290-296.

Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 335-379.

Badri, D.V., Weir, T.L., van der Lelie, D., Vivanco, J.M., 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 642-650.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 233-266.

Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols : France.

Baize, D., 2000. Guide des analyses en pédologie. INRA.

Baize, D., Girard, M.-C., Association française pour l'étude du sol, 1992. Référentiel pédologique : principaux sols d'Europe.

Baize, D., Saby, N., Deslais, W., Bispo, A., Feix, I., 2007. Analyses totales et pseudo-totales d'éléments en traces dans les sols—Principaux résultats et enseignements d'une collecte nationale. *Etude et Gestion des Sols* 13, 181–200.

Baker, A.J.M., 1987. METAL TOLERANCE. *New Phytologist* 106, 93-111.

Balabane, M., Faivre, D., van Oort, F., Dahmani-Muller, H., 1999. Mutual effects of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metallophyte grassland. *Environmental Pollution* 105, 45-54.

Ballayan, D., 2000. Soil degradation - Chapter Biodiversity & Land degradation. In: ESCAP environment statistics course, FAO, Rome,.

Barceló, J., Poschenrieder, C., 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48, 75-92.

Bardos, R.P., Andersson-Sköld, Y., Keuning, Z., Polland, M., Suer, P., Track, T., 2009. REJUVENATE - Crop Based Systems for Sustainable Risk Based Land Management for Economically Marginal Degraded Land. European Research Area Network (ERA-Net) Sustainable management of soil and groundwater under the pressure of soil pollution and soil contamination (SNOWMAN).

Beale, C.V., Long, S.P., 1997. Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus × giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy* 12, 419-428.

Beale, C.V., Morison, J.I.L., Long, S.P., 1999. Water use efficiency of C4 perennial grasses in a temperate climate. *Agricultural and Forest Meteorology* 96, 103-115.

Becerra-Castro, C., Monterroso, C., Prieto-Fernández, A., Rodríguez-Lamas, L., Loureiro-Viñas, M., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2012. Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant–microorganism–rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 217–218, 350-359.

Belén Hinojosa, M., Carreira, J.A., García-Ruíz, R., Rodríguez-Maroto, J.M., Daniell, T.J., Griffiths, B.S., 2010. Plant treatment, pollutant load, and soil type effects in rhizosphere ecology of trace element polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 970-981.

Bengtsson, G., Bengtson, P., Månsson, K.F., 2003. Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 143-154.

Beuch, S., Boelcke, B., Belau, L., 2000. Effect of the Organic Residues of *Miscanthus × giganteus* on the Soil Organic Matter Level of Arable Soils. *Journal of Agronomy and Crop Science* 184, 111-120.

Beylich, A., Oberholzer, H.-R., Schrader, S., Höper, H., Wilke, B.-M., 2010. Evaluation of soil compaction effects on soil biota and soil biological processes in soils. *Soil and Tillage Research* 109, 133-143.

- Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P., 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147, 546-553.
- Blodgett, R., 2010. Bacteriological Analytical Manual (BAM) - BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. Site web : <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm#references> [dernière actualisation : 10/31/2011].
- Blossfeld, S., Gansert, D., Thiele, B., Kuhn, A.J., Lösch, R., 2011. The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of *Juncus* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1186-1197.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P., 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465, 140-151.
- Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., 2011. Role of Magnesium in Alleviation of Aluminium Toxicity in Plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2251-2264.
- Bourrelier, P.-H., Berthelin, J., Pedro, G., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces les risques et leur gestion. Tec & doc Lavoisier, Paris Londres New York.
- Boyle, T.P., Fairchild, J.F., 1997. The Role of Mesocosm Studies in Ecological Risk Analysis. *Ecological Applications* 7, 1099-1102.
- Brakensiek, D.L., Rawls, W.J., 1994. Soil containing rock fragments: effects on infiltration. *CATENA* 23, 99-110.
- Branquinho, C., Serrano, H.C., Pinto, M.J., Martins-Loução, M.A., 2007. Revisiting the plant hyperaccumulation criteria to rare plants and earth abundant elements. *Environmental Pollution* 146, 437-443.
- Bravin, M.N., Michaud, A.M., Larabi, B., Hinsinger, P., 2010. RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. *Environmental Pollution* 158, 3330-3337.
- Breure, A.M., Groot, M., Eijsackers, H.J.P., 2008. System-oriented ecotoxicological research: Which way to go? *Science of The Total Environment* 406, 530-536.
- Breure, A.M., Mulder, C., Römbke, J., Ruf, A., 2005. Ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 211-229.
- BRGM, 1996. Service public du BRGM. Rapport annuel 1995. Rapport BRGM R 38897, 69 p.
- BRGM, 2007. Inventaire historique d'anciens sites industriels et activités de service dans le département de Meurthe-et-Moselle - Préambule départemental - Services des actions régionales - Servive géologique régional Lorraine. 54500 Vandoeuvre-les-Nancy (France).
- BRGM, 2009. Inventaire historique d'anciens sites industriels et activités de service dans le département des Vosges - Préambule départemental - Services des actions régionales - Servive géologique régional Lorraine. 54500 Vandoeuvre-les-Nancy (France).

BRGM, 2010. Inventaire historique d'anciens sites industriels et activités de service dans le département de la Meuse - Préambule départemental - Services des actions régionales - Service géologique régional Lorraine. 54500 Vandoeuvre-les-Nancy (France).

Briat, J.-F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322, 43-54.

Brightwell, G., Boerema, J., Mills, J., Mowat, E., Pulford, D., 2006. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox(TM) belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 47-53.

Britt, C., Bullard, M., Hickman, G., Johnson, P., King, J., Nicholson, F., Nixon, P., Smith, N., 2002. Bioenergy crops and bioremediation-a review. Final Report.

Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677-702.

Brown Jr., G.E., Calas, G., février. Environmental mineralogy – Understanding element behavior in ecosystems. *Comptes Rendus Geoscience* 343, 90-112.

Bruemmer, G.W., Gerth, J., Herms, U., 1986. Heavy metal species, mobility and availability in soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149, 382-398.

Burmølle, M., Johnsen, K., Al-Soud, W.A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2009. The presence of embedded bacterial pure cultures in agar plates stimulate the culturability of soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 79, 166-173.

Cadoux, S., Riche, A.B., Yates, N.E., Machet, J.-M., In Press. Nutrient requirements of *Miscanthus x giganteus*: Conclusions from a review of published studies. *Biomass and Bioenergy* In Press, Corrected Proof.

Calvet, R., 2003. Le sol : propriétés et fonctions. Tome 2, Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales. ed. France agricole, DUNOD, Paris, France.

Calvet, R., Mariotti, A., 2003. Le sol : propriétés et fonctions. Tome 1, Constitution, structure, phénomènes aux interfaces.

Cameron, R.E., 1992. Guide to site and soil description for hazardous waste site characterization. Volume 1: Metals. Environmental Protection Agency EPA/600/4-91/029.

Campanella, L., D'Orazio, D., Petronio, B.M., Pietrantonio, E., 1995. Proposal for a metal speciation study in sediments. *Analytica Chimica Acta* 309, 387-393.

Cappelletto, P., Mongardini, F., Barberi, B., Sannibale, M., Brizzi, M., Pignatelli, V., 2000. Papermaking pulps from the fibrous fraction of *Miscanthus x Giganteus*. *Industrial Crops and Products* 11, 205-210.

Caquet, T., 2002. Use of aquatic mesocosms in ecotoxicology: State of the art and perspectives. *Radioprotection* 37, 5.

Carton, S., Tristan, D., Guibout, F., Lapiere, O., 2008. Intérêt et potentialités de la production de *Miscanthus*- Faisabilité du développement des cultures énergétiques en Île de France. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, Ferme Expérimentale AgroParisTech Projet Grignon Energie Positive 78850 THIVERVAL-GRIGNON.

- Cattani, I., Fragoulis, G., Boccelli, R., Capri, E., 2006. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64, 1972-1979.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 335-347.
- Cervantes, A.M., Conesa, H.M., González-Alcarez, M.N., Álvarez-Rogel, J., 2011. Mobilisation of AS and trace metals in saline, acidic Sopolic Technosols: the role of the rhizosphere and flooding conditions. *Journal of Soils and Sediments* 11, 800-814.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 279-284.
- Chaussidon, C., 1990. Etude de pré-faisabilité des travaux de biotraitement des pollutions rencontrées sur les sites de cokerie de THIONVILLE (57) et MICHEVILLE (54). Bureau de Recherches Géologiques et Minières -Service Géologique Regional Lorraine, Rue du Parc de Brabois - 54500 Vandœuvre-les-Nancy.
- Cheng, W., Kuzyakov, Y., 2005. Root effects on soil organic matter decomposition. *AGRONOMY* 48, 119.
- Christian, D.G., Riche, A.B., Yates, N.E., 2008. Growth, yield and mineral content of *Miscanthus × giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial Crops and Products* 28, 320-327.
- Christian, D.G., Yates, N.E., Riche, A.B., 2009. Estimation of ramet production from *Miscanthus × giganteus* rhizome of different ages. *Industrial Crops and Products* 30, 176-178.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Clement, C., 1989. Etude de faisabilité de travaux de biotraitement des pollutions rencontrées sur les sites de cokerie de thionville et Micheville (57). Bureau de Recherches Géologiques et Minières - Service Géologique Regional Lorraine, Rue du Parc de Brabois - 54500 Vandœuvre-les-Nancy.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., 2002. Screening *Miscanthus* genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy* 16, 97-110.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., Teixeira, F., 2001. Performance of 15 *Miscanthus* Genotypes at Five Sites in Europe. *Agronomy Journal* 93, 1013-1019.
- Clive A., E., 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38, 225-231.
- Conesa, H.M., Robinson, B.H., Schulin, R., Nowack, B., 2007. Growth of *Lygeum spartum* in acid mine tailings: response of plants developed from seedlings, rhizomes and at field conditions. *Environmental Pollution* 145, 700-707.
- Coombs, J., 2007. Building the european knowledge based bio-economy - the impact of « non-food » research (1988 to 2008).

- Cosentino, S.L., Patan , C., Sanzone, E., Copani, V., Foti, S., 2007. Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu. in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products* 25, 75-88.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13, 393-397.
- Dahmani-Muller, H., van Oort, F., G lie, B., Balabane, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109, 231-238.
- Danalatos, N.G., Archontoulis, S.V., Mitsios, I., 2007. Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus x giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass and Bioenergy* 31, 145-152.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution* 98, 29-36.
- Defra, 2007. *Planting and Growing Miscanthus (for Applicants to Defra's Energy Crops Scheme)*.
- Dell'Amico, E., Mazzocchi, M., Cavalca, L., Allievi, L., Andreoni, V., 2008. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiological Research* 163, 671-683.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., H lzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* 52, 253-266.
- Duffus, J.H., 2002. « HEAVY METALS »—A MEANINGLESS TERM? *Pure Appl. Chem* 74, 793–807.
- Duineveld, B.M., Rosado, A.S., van Elsas, J.D., van Veen, J.A., 1998. Analysis of the Dynamics of Bacterial Communities in the Rhizosphere of the *Chrysanthemum* via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Substrate Utilization Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4950-4957.
- Dyraga, A., 2011. Postindustrial greenery in the context of the silesian agglomeration cities'spatial policy. In: *Ustro  (Poland)*,.
- Ebrahim, M.K.H., 2004. Comparison, determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of in vitro cultured calla explants. *Scientia Horticulturae* 101, 305-313.
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A., 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 17 -26.
- Ehlken, S., Kirchner, G., 2002. Environmental processes affecting plant root uptake of radioactive trace elements and variability of transfer factor data: a review. *Journal of Environmental Radioactivity* 58, 97-112.
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 190-205.

- Epelde, L., Becerril, J.M., Barrutia, O., González-Oreja, J.A., Garbisu, C., 2010. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environmental Pollution* 158, 1576-1583.
- Ernst, W.H.O., 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Ernst, W.H.O., 2005. Phytoextraction of mine wastes - Options and impossibilities. *Chemie der Erde - Geochemistry* 65, 29-42.
- Eswaran, H., Lal, R., Reich, P., others, 2001. Land degradation: an overview. *Responses to Land degradation*, 20–35.
- Etienne, J., 2006. *Biochimie génétique, biologie moléculaire*. Elsevier Masson.
- European Commission, 2002. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Towards a Thematic Strategy for Soil Protection COM(2002) 179 final. Bruxelles.
- European Commission, 2006. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the protection of soil and amending Directive 2004/35/EC COM(2006) 232 final 2006/0086 (COD). Bruxelles.
- European Commission, 2012. Soil - Environment - European Commission. Site web : [http://ec.europa.eu/environment/soil/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/soil/index_en.htm) [dernière actualisation : 11/04/2012].
- Fagiewicz, K., 2011. Environmental and landscape criteria for development of post-mining sites structure (on example of Adamowskie brown coal basin). In: *Ustroń (Poland)*,.
- Febrianto, J., Kosasih, A.N., Sunarso, J., Ju, Y.-H., Indraswati, N., Ismadji, S., 2009. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials* 162, 616-645.
- De Fede, K.L., Panaccione, D.G., Sextone, A.J., 2001. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG® community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1555-1562.
- Felten, D., Emmerling, C., 2011. Effects of bioenergy crop cultivation on earthworm communities-A comparative study of perennial (*Miscanthus*) and annual crops with consideration of graded land-use intensity. *Applied Soil Ecology* 49, 167-177.
- Feng, M.-H., Shan, X.-Q., Zhang, S.-Z., Wen, B., 2005a. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59, 939-949.
- Feng, M.-H., Shan, X.-Q., Zhang, S., Wen, B., 2005b. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, and NaNO<sub>3</sub> extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137, 231-240.
- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 626 -631.

- Figuerola, J.A.L., Wrobel, K., Afton, S., Caruso, J.A., Felix Gutierrez Corona, J., Wrobel, K., 2008. Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* 70, 2084-2091.
- Fischer, U., Hinz, C., Schulin, R., Stauffer, F., 1998. Assessment of nonequilibrium in gas–water mass transfer during advective gas-phase transport in soils. *Journal of Contaminant Hydrology* 33, 133-148.
- Foerid, B., de Neergaard, A., Høgh-Jensen, H., 2004. Turnover of organic matter in a *Miscanthus* field: effect of time in *Miscanthus* cultivation and inorganic nitrogen supply. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1075-1085.
- Freitas, H., Prasad, M.N.V., Pratas, J., 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International* 30, 65-72.
- Garcier, R., 2005. La pollution industrielle de la Moselle française. Naissance, développement et gestion d'un problème environnemental, 1850-2000 (Thèse). Université Lumière - Lyon II – UFR de Géographie, Histoire, Histoire de l'Art et Tourisme.
- Garthright, W., Blodgett, R., 2003. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. *Food Microbiology* 20, 439-445.
- Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389-1414.
- Gleyzes, C., Tellier, S., Astruc, M., 2002. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21, 451-467.
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28, 367-374.
- Goldhaber, S.B., 2003. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38, 232-242.
- Gras, R., 1994. Sols caillouteux et production végétale. INSERM, Paris, France.
- Greef, J.M., Deuter, M., Jung, C., Schondelmaier, J., 1997. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44, 185-195.
- Gregory, P.J., 2006. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science* 57, 2-12.
- Gremion, F., Chatzinotas, A., Kaufmann, K., Von Sigler, W., Harms, H., 2004. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 273-283.
- Griffioen, W., Ietswaart, J., Ernst, W., 1994. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. *Plant and Soil* 158, 83-89.
- Gupta, S.K., Vollmer, M.K., Krebs, R., 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *Science of The Total Environment* 178, 11-20.

- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1 -11.
- Hall, J.L., Williams, L.E., 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54, 2601 -2613.
- Han, F.X., Banin, A., Kingery, W.L., Triplett, G.B., Zhou, L.X., Zheng, S.J., Ding, W.X., 2003. New approach to studies of heavy metal redistribution in soil. *Advances in Environmental Research* 8, 113-120.
- Hansen, E.M., Christensen, B.T., Jensen, L.S., Kristensen, K., 2004. Carbon sequestration in soil beneath long-term *Miscanthus* plantations as determined by <sup>13</sup>C abundance. *Biomass and Bioenergy* 26, 97-105.
- Hao, X.-Z., Zhou, D.-M., Chen, H.-M., Dong, Y.-H., 2008. Leaching of Copper and Zinc in a Garden Soil Receiving Poultry and Livestock Manures from Intensive Farming. *Pedosphere* 18, 69-76.
- Hartley, W., Dickinson, N.M., Riby, P., Lepp, N.W., 2009. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environmental Pollution* 157, 2654-2662.
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2007. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7-14.
- Harvey, J., 2007. A versatile solution-growing *Miscanthus* for bioenergy. *Renewable Energy World* 10, 86.
- van Herwijnen, R., Laverge, T., Poole, J., Hodson, M.E., Hutchings, T.R., 2007. The effect of organic materials on the mobility and toxicity of metals in contaminated soils. *Applied Geochemistry* 22, 2422-2434.
- Himken, Lammel, J., Neukirchen, D., Olf, H., Olf, H.W., 1997. Cultivation of *Miscanthus* under west European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. *Plant and Soil* 189, 117-126.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321, 117-152.
- Hirschi, K.D., 2004. The Calcium Conundrum. Both Versatile Nutrient and Specific Signal. *Plant Physiol.* 136, 2438-2442.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144, 639-646.
- Hodkinson, T.R., CHASE, M.W., RENVOIZE, S.A., 2002. Characterization of a Genetic Resource Collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany* 89, 627 -636.
- Hodkinson, T.R., Renvoize, S., 2001. Nomenclature of *Miscanthus xgiganteus* (Poaceae). *Kew Bulletin* 56, 759-760.

- Huisman, W., Kortleve, W.J., 1994. Mechanization of crop establishment, harvest, and post-harvest conservation of *Miscanthus sinensis* Giganteus. *Industrial Crops and Products* 2, 289-297.
- Hund-Rinke, K., Kördel, W., 2003. Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability:: experimental methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 52-62.
- Ianeva, O.D., 2009. [Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals]. *Mikrobiol. Z.* 71, 54-65.
- Inskeep, W.P., Bloom, P.R., 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology* 77, 483.
- Jamagne, M., 1967. Bases et techniques d'une cartographie des sols. *Annales de Géographie* 18, 477-478.
- Jenny, H., Stuart, K., 1984. My friend the soil. *Journal of Soil and Water Conservation* 39, 158-161.
- Johannesson, M., Anhedén, M., Arrhenius, E., Dahl, J., Ericson, S., Hindreson, A., Nielson, B., Obernberger, I., Riddell-Black, D., 2002. The Market Implication of Integrated Management for Heavy Metals Flows for Bioenergy Use in the European Union. Kalmar University Department of Biology and Environmental Science Environmental Science Section, SE-391 82 Kalmar, SWEDEN.
- Jones, M.B., Walsh, M., 2001. *Miscanthus* for energy and fibre. Earthscan.
- Jonušaitė, A., Štrimaitytė, V., Denafas, G., 2004. Heavy Metals Mobilization from Ash of Biofuel and Burnable Waste. *Environmental Research, Engineering and Management* 3, 29-36.
- Jørgensen, U., 1997. Genotypic variation in dry matter accumulation and content of N, K and Cl in *Miscanthus* in Denmark. *Biomass and Bioenergy* 12, 155-169.
- Jungk, A., Claassen, N., 1986. Availability of phosphate and potassium as the result of interactions between root and soil in the rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149, 411-427.
- Kaack, K., Schwarz, K.-U., 2001. Morphological and mechanical properties of *Miscanthus* in relation to harvesting, lodging, and growth conditions. *Industrial Crops and Products* 14, 145-154.
- Kahle, P., Beuch, S., Boelcke, B., Leinweber, P., Schulten, H.-R., 2001. Cropping of *Miscanthus* in Central Europe: biomass production and influence on nutrients and soil organic matter. *European Journal of Agronomy* 15, 171-184.
- Kaye, J.P., Hart, S.C., 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* 12, 139-143.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 355-364.
- Kholodova, V., Volkov, K., Abdeyeva, A., Kuznetsov, V., 2011. Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany* 71, 382-389.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C., 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 67, 243-259.

- Kirkby, C.A., Kirkegaard, J.A., Richardson, A.E., Wade, L.J., Blanchard, C., Batten, G., 2011. Stable soil organic matter: A comparison of C:N:P:S ratios in Australian and other world soils. *Geoderma* 163, 197-208.
- Kirkham, M.B., 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137, 19-32.
- Koopal, L.K., van Riemsdijk, W.H., Kinniburgh, D.G., 2001. Humic matter and contaminants. General aspects and modeling metal ion binding. *Pure and Applied Chemistry* 73, 2005-2016.
- Kozdrój, J., van Elsas, J.D., 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1405-1417.
- Kratz, B., 2006. La valorisation énergétique du miscanthus giganteus.
- Kumpiene, J., Guerri, G., Landi, L., Pietramellara, G., Nannipieri, P., Renella, G., 2009. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 115-119.
- Labra, M., Grassi, F., Imazio, S., Di Fabio, T., Citterio, S., Sgorbati, S., Agradi, E., 2004. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere* 54, 1049-1058.
- Lafuente, A.L., González, C., Quintana, J.R., Vázquez, A., Romero, A., 2008. Mobility of heavy metals in poorly developed carbonate soils in the Mediterranean region. *Geoderma* 145, 238-244.
- Leake, J.R., Ostle, N.J., Rangel-Castro, J.I., Johnson, D., 2006. Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> pulse-labelling in an upland grassland. *Applied Soil Ecology* 33, 152-175.
- Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* 153, 497-522.
- Leon Morales, C.F., Strathmann, M., Flemming, H.-C., 2007. Influence of biofilms on the movement of colloids in porous media. Implications for colloid facilitated transport in subsurface environments. *Water Research* 41, 2059-2068.
- Lewandowski, I., 1998. Propagation method as an important factor in the growth and development of *Miscanthus x giganteus*. *Industrial Crops and Products* 8, 229-245.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Scurlock, J.M.O., Huisman, W., 2000. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy* 19, 209-227.
- Lewandowski, I., Kicherer, A., 1997. Combustion quality of biomass: practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. *European Journal of Agronomy* 6, 163-177.
- Lewandowski, I., Schmidt, U., Londo, M., Faaij, A., 2006. The economic value of the phytoremediation function - Assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* spp). *Agricultural Systems* 89, 68-89.

- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., Christou, M., 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 25, 335-361.
- Li, M.S., Luo, Y.P., Su, Z.Y., 2007. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environmental Pollution* 147, 168-175.
- Liang, H.-M., Lin, T.-H., Chiou, J.-M., Yeh, K.-C., 2009. Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. *Environmental Pollution* 157, 1945-1952.
- Lievens, C., Yperman, J., Vangronsveld, J., Carleer, R., 2008. Study of the potential valorisation of heavy metal contaminated biomass via phytoremediation by fast pyrolysis: Part I. Influence of temperature, biomass species and solid heat carrier on the behaviour of heavy metals. *Fuel* 87, 1894-1905.
- Linde-Laursen, I., 1993. Cytogenetic analysis of *Miscanthus 'Giganteus'*, an interspecific hybrid. *Heritas* 119, 297-300.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2003a. Influence of aging on metal availability in soils. *Rev Environ Contam Toxicol* 178, 1-21.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2003b. Influence of ageing on zinc bioavailability in soils. *Environmental Pollution* 126, 371-374.
- Lucot, E., Gaiffe, M., 1995. Méthode pratique de description des sols forestiers caillouteux sur substrat calcaire. *Etude et Gestion des Sols* 2, 91-104.
- Luo, C., Shen, Z., Li, X., 2008. Root Exudates Increase Metal Accumulation in Mixed Cultures: Implications for Naturally Enhanced Phytoextraction. *Water, Air, & Soil Pollution* 193, 147-154.
- Luo, X.-S., Zhou, D.-M., Liu, X.-H., Wang, Y.-J., 2006. Solid/solution partitioning and speciation of heavy metals in the contaminated agricultural soils around a copper mine in eastern Nanjing city, China. *Journal of Hazardous Materials* 131, 19-27.
- MacFarlane, G.R., Burchett, M.D., 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.
- Macinnis-Ng, C.M.O., Ralph, P.J., 2002. Towards a more ecologically relevant assessment of the impact of heavy metals on the photosynthesis of the seagrass, *Zostera capricorni*. *Marine Pollution Bulletin* 45, 100-106.
- Manios, T., Stentiford, E.I., Millner, P.A., 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecological Engineering* 20, 65-74.
- Marilley, L., Aragno, M., 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology* 13, 127-136.
- Markert, B., 2007. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21, 77-82.

Marx, E.S., Hart, J., Stevens, R.G., 1999. Soil test interpretation guide. Oregon State University Extension Service, Corvallis, Oregon.

de Matos, A.T., Fontes, M.P.F., da Costa, L.M., Martinez, M.A., 2001. Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. *Environmental Pollution* 111, 429-435.

MEDDTL, 2005. Liste des sites archivés sur BASIAS - Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement. Site web : <http://basol.ecologie.gouv.fr/accueil.php>.

MEDDTL, -M. de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement, 2011. Ancienne cokerie de Thionville. BASOL - Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement. Site web : [http://basol.ecologie.gouv.fr/fiche.php?page=1&index\\_sp=57.0015](http://basol.ecologie.gouv.fr/fiche.php?page=1&index_sp=57.0015) [dernière actualisation : 20/02/2012].

MEDDTL, 2012a. Recherche cartographique par régions - BASOL - Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement. Site web : <http://basol.ecologie.gouv.fr/recherche.php?carte=2&region=lor> [dernière actualisation : 23/01/2012].

MEDDTL, 2012b. Recherche cartographique par département - BASOL - Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement. Site web : <http://basol.ecologie.gouv.fr/recherche.php?carte=1&dept=57> [dernière actualisation : 23/01/2012].

Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 385-396.

Mendelssohn, I.A., McKee, K.L., Kong, T., 2001. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. *Environmental and Experimental Botany* 46, 263-275.

Michalke, B., 2003. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 122-139.

Miguez, F.E., Villamil, M.B., Long, S.P., Bollero, G.A., 2008. Meta-analysis of the effects of management factors on *Miscanthus x giganteus* growth and biomass production. *Agricultural and Forest Meteorology* 148, 1280-1292.

Mingorance, M.D., Valdés, B., Oliva, S.R., 2007. Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions. *Environment International* 33, 514-520.

Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Manzano, R., Carpena-Ruiz, R.O., Gamarra, R., Esteban, E., 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Materials* 162, 854-859.

Morishita, T., Boratynskil, J.K., 1992. Accumulation of Cadmium and Other Metals in Organs of Plants Growing around Metal Smelters in Japan. *Soil science and plant nutrition* 38, 781-785.

Morot-Gaudry, J.-F., 1997. Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Editions Quae.

- N'Dayegamiye, A., Giroux, M., Gasser, M.O., 2007. La contribution en azote du sol reliée à la minéralisation de la MO : facteur climatique et régions agricoles influençant les taux de minéralisation d'azote. In: CRAAQ (Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec) et l'Ordre des agronomes du Québec (OAQ), Drummondville, p. 10.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8, 199-216.
- Nagendran, R., Selvam, A., Joseph, K., Chiemchaisri, C., 2006. Phytoremediation and rehabilitation of municipal solid waste landfills and dumpsites: A brief review. *Waste Management* 26, 1357-1369.
- Naidu, S., 2008. *International Encyclopaedia of Agricultural Science and Technology: Soils and composts*. Mittal Publications.
- Naidu, S.L., Moose, S.P., AL-Shoaibi, A.K., Raines, C.A., Long, S.P., 2003. Cold Tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: Adaptation in Amounts and Sequence of C4 Photosynthetic Enzymes. *Plant Physiol.* 132, 1688-1697.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1527-1536.
- Neagoe, A., Merten, D., Iordache, V., Büchel, G., 2009. The effect of bioremediation methods involving different degrees of soil disturbance on the export of metals by leaching and by plant uptake. *Chemie der Erde - Geochemistry* 69, Supplement 2, 57-73.
- Nessner Kavamura, V., Esposito, E., 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances* 28, 61-69.
- Neukirchen, D., Himken, M., Lammel, J., Czipionka-Krause, U., Olf, H.-W., 1999. Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *European Journal of Agronomy* 11, 301-309.
- Van Nevel, L., Mertens, J., Oorts, K., Verheyen, K., 2007. Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution* 150, 34-40.
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 730-750.
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313-339.
- Norton, S.B., Rodier, D.J., van der Schalie, W.H., Wood, W.P., Slimak, M.W., Gentile, J.H., 1992. A framework for ecological risk assessment at the EPA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1663-1672.
- Nowack, B., Mayer, K., Oswald, S., van Beinum, W., Appelo, C., Jacques, D., Seuntjens, P., Gérard, F., Jaillard, B., Schnepf, A., Roose, T., 2006. Verification and intercomparison of reactive transport codes to describe root-uptake. *Plant and Soil* 285, 305-321.
- Nurchi, V.M., Villaescusa, I., 2008. Agricultural biomasses as sorbents of some trace metals. *Coordination Chemistry Reviews* 252, 1178-1188.

- O'Connell, D.W., Birkinshaw, C., O'Dwyer, T.F., 2008. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology* 99, 6709-6724.
- O'Dell, R., Silk, W., Green, P., Claassen, V., 2007. Compost amendment of Cu-Zn minespoil reduces toxic bioavailable heavy metal concentrations and promotes establishment and biomass production of *Bromus carinatus* (Hook and Arn.). *Environmental Pollution* 148, 115-124.
- Oades, J.M., 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* 56, 377-400.
- Oldeman, L.R., Hakkeling, R.T.A., Sombroek, W.G., 1990. World map of the status of human-induced soil degradation: an explanatory note.
- Ouvrard, S., Barnier, C., Bauda, P., Beguiristain, T., Biache, C., Bonnard, M., Caupert, C., Cébron, A., Cortet, J., Cotelle, S., Dazy, M., Faure, P., Masfaraud, J.F., Nahmani, J., Palais, F., Poupin, P., Raoult, N., Vasseur, P., Morel, J.L., Leyval, C., 2011. In Situ Assessment of Phytotechnologies for Multicontaminated Soil Management. *International Journal of Phytoremediation* 13, 245-263.
- Parr, J. f., Papendick, R. i., Hornick, S. b., Meyer, R. e., 1992. Soil Quality: Attributes and Relationship to Alternative and Sustainable Agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 5-11.
- Pathak, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., 2009. Bioremediation of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management* 90, 2343-2353.
- Pavel, J., 2003. Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A* 983, 1-18.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Zablotskaja, M., Vijver, M.G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 163-179.
- Peever, K.I., Sparrow, L.A., Reuter, D.J., 1999. Soil analysis: an interpretation manual. Csiro Publishing.
- Piccolo, A., Pietramellara, G., Mbagwu, J.S.C., 1997. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma* 75, 267-277.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H., Fraenzle, S., Wuenschmann, S., Markert, B., 2010. Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environmental Pollution* 158, 18-23.
- Price, L., Bullard, M., Lyons, H., Anthony, S., Nixon, P., 2004. Identifying the yield potential of *Miscanthus x giganteus*: an assessment of the spatial and temporal variability of *M. x giganteus* biomass productivity across England and Wales. *Biomass and Bioenergy* 26, 3-13.
- Prokop, G., Schamann, M., Edelgaard, I., Gentile, A.R., Agency, E.E., 2000. Management of contaminated sites in Western Europe. Office for official publications of the European communities, Copenhagen [Denmark]; Luxembourg ; Lanham MD.
- Pyter, R.J., Dohleman, F.G., Voigt, T.B., 2010. Effects of rhizome size, depth of planting and cold storage on *Miscanthus x giganteus* establishment in the Midwestern USA. *Biomass and Bioenergy* 34, 1466-1470.

- Rajkumar, M., Freitas, H., 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71, 834-842.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 221-226.
- Reeves, R., 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants. *Phytoremediation of metal-contaminated soils*, 25–52.
- Remon, E., Bouchardon, J.-L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J.-C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137, 316-323.
- Richter, G.M., Murphy, R.J., Riche, A.B., Umer, M.B., Castle, M., 2009. Modelling the interaction between rhizome and aboveground growth dynamics of *Miscanthus x giganteus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153, S229.
- Riddell-Black, D., 2000. *Bioremediation and Economic Renewal of Industrially Degraded Land by Biomass Fuel Crops (BIORENEW)*.
- Ritz, K., Black, H.I.J., Campbell, C.D., Harris, J.A., Wood, C., 2009. Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators* 9, 1212-1221.
- Rossiter, D.G., 2007. Classification of Urban and Industrial Soils in the World Reference Base for Soil Resources. *Journal of Soils and Sediments* 7, 96-100.
- Roudière, L., Lorto, S., Tallagrand, E., Marchandin, H., Jeannot, J.-L., Jumas-Bilak, E., 2007. Empreinte moléculaire des communautés bactériennes et hétérogénéité intraspécifique de l'ADNr 16S : est-il raisonnable d'occulter le problème ? *Pathologie Biologie* 55, 434-440.
- Rout, G.R., Das, P., 2003. Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23, 9.
- Roy, S., Labelle, S., Mehta, P., Mihoc, A., Fortin, N., Masson, C., Leblanc, R., Châteauneuf, G., Sura, C., Gallipeau, C., Olsen, C., Delisle, S., Labrecque, M., Greer, C.W., 2005. Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. *Plant Soil* 272, 277-290.
- Sarkar, D., Sharma, A., Talukder, G., 1994. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 318, 239-247.
- Sas-Nowosielska, A., 2011. Sorbing water geocomposites - innovative techniques improving plants vegetation. In: *Ustroń (Poland)*.
- Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Malkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J.M., Krynski, K., 2004. Phytoextraction crop disposal--an unsolved problem. *Environmental Pollution* 128, 373-379.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E., 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1125-1131.
- Scurlock, J.M.O., 1999. *Miscanthus: A review of European experience with a novel energy crop*. Oak Ridge National Lab., TN (US).

- Semere, T., Slater, F.M., 2007a. Ground flora, small mammal and bird species diversity in miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) and reed canary-grass (*Phalaris arundinacea*) fields. *Biomass and Bioenergy* 31, 20-29.
- Semere, T., Slater, F.M., 2007b. Invertebrate populations in miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) and reed canary-grass (*Phalaris arundinacea*) fields. *Biomass and Bioenergy* 31, 30-39.
- Shen, G., Lu, Y., Hong, J., 2006. Combined effect of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on urease activity in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 474-480.
- Sipos, P., Németh, T., Kis, V.K., Mohai, I., 2008. Sorption of copper, zinc and lead on soil mineral phases. *Chemosphere* 73, 461-469.
- Sirko, A., Brodzik, R., 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1189-1195.
- Slegers, F., 2010. Phytoremediation as Green Infrastructure and a Landscape of Experiences. In: *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy*. p. 13.
- Smeets, E.M.W., Lewandowski, I.M., Faaij, A.P.C., 2009. The economical and environmental performance of miscanthus and switchgrass production and supply chains in a European setting. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 1230-1245.
- Sparks, D.L., 2005. Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces. *Elements* 1, 193 -197.
- Stals, M., Carleer, R., Reggers, G., Schreurs, S., Yperman, J., 2010. Flash pyrolysis of heavy metal contaminated hardwoods from phytoremediation: Characterisation of biomass, pyrolysis oil and char/ash fraction. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 89, 22-29.
- Stengel, P., Gelin, S., 1998. *Sol : interface fragile*. INRA Editions, Paris, France.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321-336.
- Summers, A.O., 2009. Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Current Opinion in Microbiology* 12, 138-144.
- Szczerba, M.W., Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2009. K<sup>+</sup> transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology* 166, 447-466.
- Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 2011, 1-31.
- Tao, S., Liu, W.X., Chen, Y.J., Cao, J., Li, B.G., Xu, F.L., 2005. Chapter 10 - Fractionation and bioavailability of copper, cadmium and lead in rhizosphere soil. In: *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*. Elsevier, Amsterdam, p. 313-336.
- Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D., 1997. *Soil Ecotoxicology*. CRC-Press.
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M., Muanda, F., Dicko, A., Rejšek, K., Falla, J., 2011. Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of The Total Environment* 409, 4489-4495.

Técher, D., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Bennasroune, A., Foucaud, L., Falla, J., 2010. Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. *Separation and Purification Technology* 75, 81-86.

Técher, D., Philippe, L.-G., Sonia, H., Amar, B., Claudia, M.-C., Marielle, D., Jairo, F., 2012. Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: A microcosm study. *Industrial Crops and Products* 36, 276-281.

Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844-851.

Thornton, G., Franz, M., Edwards, D., Pahlen, G., Nathanail, P., 2007. The challenge of sustainability: incentives for brownfield regeneration in Europe. *Environmental Science & Policy* 10, 116-134.

Tilstone, G., Macnair, M., 1997. The Consequence of Selection for Copper Tolerance on the Uptake and Accumulation of Copper in *Mimulus guttatus*. *Annals of Botany* 80, 747-751.

Ugolini, F., Corti, G., Agnelli, A., Piccardi, F., 1996. Mineralogical, physical, and chemical properties of rock fragments in soil. *Soil Science* 161, 521.

Venturi, P., Huisman, W., Molenaar, J., 1998. Mechanization and Costs of Primary Production Chains for *Miscanthus x giganteus* in The Netherlands. *Journal of Agricultural Engineering Research* 69, 209-215.

Verkleij, J.A.C., Golan-Goldhirsh, A., Antosiewicz, D.M., Schwitzguébel, J.-P., Schröder, P., 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67, 10-22.

Vollenweider, P., Bernasconi, P., Gautschi, H.-P., Menard, T., Frey, B., Günthardt-Goerg, M.S., 2011. Compartmentation of metals in foliage of *Populus tremula* grown on soils with mixed contamination. II. Zinc binding inside leaf cell organelles. *Environmental Pollution* 159, 337-347.

Wainwright, S.J., Woolhouse, H.W., 1977. Some Physiological Aspects of Copper and Zinc Tolerance in *Agrostis Tenuis* Sibth.: Cell Elongation and Membrane Damage. *J. Exp. Bot.* 28, 1029-1036.

Walkley, A., Black, I.A., 1934. An Examination of Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Sci.* 37, 29-37.

Weis, J.S., Glover, T., Weis, P., 2004. Interactions of metals affect their distribution in tissues of *Phragmites australis*. *Environmental Pollution* 131, 409-415.

Weixin, C., 2009. Rhizosphere priming effect: Its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C-N budgets. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1795-1801.

Whitacre, D.M., 2011. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer e-books, New York, NY : Springer Science+Business Media, LLC.

Williams, R.J.P., Fraústo da Silva, J.J.R., 2000. The distribution of elements in cells. *Coordination Chemistry Reviews* 200-202, 247-348.

Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775-780.

Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., Ruan, C., 2010. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials* 174, 1-8.

Yadav, S.K., Juwarkar, A.A., Kumar, G.P., Thawale, P.R., Singh, S.K., Chakrabarti, T., 2009. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource Technology* 100, 4616-4622.

Yamakura, T., Sahunalu, P., 1990. Soil Carbon/Nitrogen Ratio as a Site Quality Index for Some South-East Asian Forests. *Journal of Tropical Ecology* 6, 371-377.

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 339-353.

Yang, S.-X., Liao, B., Li, J., Guo, T., Shu, W.-S., 2010. Acidification, heavy metal mobility and nutrient accumulation in the soil-plant system of a revegetated acid mine wasteland. *Chemosphere* 80, 852-859.

Yeh, D., Lin, L., Wright, C., 2000. Effects of mineral nutrient deficiencies on leaf development, visual symptoms and shoot-root ratio of *Spathiphyllum*. *Scientia Horticulturae* 86, 223-233.

Yuan, J.S., Tiller, K.H., Al-Ahmad, H., Stewart, N.R., Stewart Jr, C.N., 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in Plant Science* 13, 421-429.

Zehnder, B., 2008. Du *Miscanthus* sur les terres polluées de Metaleurop. *echo62 le Pas-de-Calais en ligne*.

## 8 Annexes

### 8.1 Annexe 1 : Projets européens concernant la culture de *Miscanthus. x giganteus*

#### Programme européen JOULE

Un projet international financé par le programme européen JOULE a débuté en 1989, avec l'objectif d'étudier le potentiel de *M. x giganteus* à produire de la biomasse au nord de l'Europe. Les pays concernés furent : le Danemark, l'Allemagne, l'Irlande et le Royaume Uni. (Lewandowski et al. 2000)

#### Programme européen AIR

A travers le programme européen AIR (Agriculture and Agro-Industry including Fisheries Programme of Research and Technological Development, 1990-1994), un budget de 32 364 KECU<sup>18</sup> est destiné pour l'étude de *M. x giganteus* en tant que matériel de construction, dont 3 800 KECU sont procurés par la Commission Européenne (Coombs 2007). Un nouveau projet international a permis en 1993 d'étendre les cultures de *M. x giganteus* vers les pays du sud (Grèce, Italie, Espagne) (Lewandowski et al. 2000).

#### Le projet BIORENEW

Dans le cadre programme Environnement et Climat de la DG XII de la Commission Européenne, le projet BIORENEW a débuté en mars 1998 (Contract No. ENV4-CT97\_0610) pour examiner l'utilisation potentielle de cultures consacrées à la fabrication d'agrocaburants pour la bioremédiation et renouvellement économique des territoires dégradés par l'industrie (particulièrement ceux pollués par les éléments traces métalliques). Ce projet participe notamment à l'amélioration de l'environnement et contribue à la régénération économique des zones souffrant le déclin industriel. Des essais de dépistage sont entrepris sur le terrain au Royaume-Uni, la Suède et l'Espagne. Parmi les espèces étudiées pour l'extraction des éléments

---

<sup>18</sup>

Soit 1 KECU = 1000 European Currency Unit

traces métalliques (*i.e. Salix, Eucalyptus, Phalaris* et *Miscanthus*), 10 clones de *Miscanthus* ont été suivis. (Riddell-Black 2000; Britt et al. 2002)

### Projet REJUVENATE

Sous l'égide du projet SNOWMAN (Sustainable maNagement of sOil and groundWater under the pressure of soil pollution and soil contaMinAtion) du 6ème programme-cadre de la Commission Européenne, une étude documentaire est réalisée par quatre organisations du Royaume-Uni, la Suède, aux Pays-Bas et en Allemagne : le projet REJUVANATE (2008-2009). Ce projet a évalué aussi l'opportunité potentielle d'utiliser des terres marginales ou dégradées (*i.e.* friches industrielles et autres terres précédemment développés ou pollués) pour la production de biomasse; biomasse qui pourrait être éventuellement utilisée pour la production d'énergie, de combustibles ou comme fourrage. Cette initiative a envisagé également l'utilisation du compost et d'autres matières organiques recyclées, dans l'intérêt de déterminer si elles jouaient un rôle important dans l'amélioration des sols et de gestion nécessaires aux cultures. Les résultats montrent que s'il avait été possible de cultiver *Miscanthus*, elle aurait été la culture la plus attrayante financièrement. (Bardos et al. 2009)

### Projet bioénergie et sols pollués (France)

En France, des essais de *Miscanthus* sont suivis par l'INRA de Versailles (2006-2011) sur petites parcelles dans des zones polluées par des boues industrielles à Pierrelaye. Ceci fait parti du projet de biomasse financé par le Conseil Régional d'île de France et conduits par la chambre interdépartementale d'agriculture de l'Île-de-France, sur la thématique bioénergie et sols pollués. (Carton et al. 2008)

D'autre part, au printemps de l'année 2006 à Petite-Rosselle, 5 000 rhizomes de *M. x giganteus* sont mis à terre dans les sols pollués aux abords du carreau minier Wendel à Petite-Rosselle (Kratz 2006). En mai 2007, la communauté d'agglomération d'Hénin-Carvin a aussi mise en place une culture de *M. x giganteus* à Noyelles-Godault (Pas-de-Calais) ; la plantation d'environ 6 ha a été réalisée sur des terrains pollués par l'ex-fonderie Metaleurop Nord (Carton et al. 2008; Zehnder 2008).

## 8.2 Annexe 2. Résultats brutes du plan d'expérience factoriel en microplaque de la croissance bactérienne associée à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus* en présence de deux éléments traces métalliques, Zn et Cr

Résultats de croissance bactérienne du sol E :

Combinaison	Facteurs				Réponse
	[Zn]	[Cr]	[Exsudats]	Proximité racinaire	
1	-1	-1	-1	NR	1,07
2	+1	-1	-1	NR	0,68
3	-1	+1	-1	NR	0,66
4	+1	+1	-1	NR	0,64
5	-1	-1	+1	NR	0,93
6	+1	-1	+1	NR	0,61
7	-1	+1	+1	NR	0,64
8	+1	+1	+1	NR	0,62
9	-1	-1	-1	R	0,91
10	+1	-1	-1	R	0,73
11	-1	+1	-1	R	0,67
12	+1	+1	-1	R	0,63
13	-1	-1	+1	R	0,95
14	+1	-1	+1	R	0,66
15	-1	+1	+1	R	0,81
16	+1	+1	+1	R	0,73

Niveau « -1 »	0,26 mmol L <sup>-1</sup>	0,06 mmol L <sup>-1</sup>	0,0062 mg L <sup>-1</sup>	Non Rhizosphérique
Niveau « +1 »	3,21 mmol L <sup>-1</sup>	12,21 mmol L <sup>-1</sup>	0,0620 mg L <sup>-1</sup>	Rhizosphérique

Combinaison	Facteurs				Réponse
	[Zn]	[Cr]	[Exsudats]	Proximité racinaire	
1	-1	-1	-1	R	0,91
2	+1	-1	-1	R	0,73
3	-1	+1	-1	R	0,67
4	+1	+1	-1	R	0,63
5	-1	-1	+1	R	0,95
6	+1	-1	+1	R	0,66
7	-1	+1	+1	R	0,81
8	+1	+1	+1	R	0,73
9	-1	-1	-1	RP	1,06
10	+1	-1	-1	RP	0,87
11	-1	+1	-1	RP	0,87
12	+1	+1	-1	RP	0,85
13	-1	-1	+1	RP	1,01
14	+1	-1	+1	RP	0,85
15	-1	+1	+1	RP	0,81
16	+1	+1	+1	RP	0,80

Niveau « -1 »	0,26 mmol L <sup>-1</sup>	0,06 mmol L <sup>-1</sup>	0,0062 mg L <sup>-1</sup>	Rhizosphérique
Niveau « +1 »	3,21 mmol L <sup>-1</sup>	12,21 mmol L <sup>-1</sup>	0,0620 mg L <sup>-1</sup>	Rhizoplan

## Résultats de croissance bactérienne du sol Mix :

Combinaison	Facteurs				Réponse
	[Zn]	[Cr]	[Exsudats]	Proximité racinaire	
1	-1	-1	-1	NR	0,90
2	+1	-1	-1	NR	0,67
3	-1	+1	-1	NR	0,68
4	+1	+1	-1	NR	0,67
5	-1	-1	+1	NR	0,94
6	+1	-1	+1	NR	0,66
7	-1	+1	+1	NR	0,69
8	+1	+1	+1	NR	0,66
9	-1	-1	-1	R	0,93
10	+1	-1	-1	R	0,66
11	-1	+1	-1	R	0,67
12	+1	+1	-1	R	0,68
13	-1	-1	+1	R	0,94
14	+1	-1	+1	R	0,61
15	-1	+1	+1	R	0,69
16	+1	+1	+1	R	0,65

Niveau « -1 »	0,26 mmol L <sup>-1</sup>	0,06 mmol L <sup>-1</sup>	0,0062 mg L <sup>-1</sup>	Non Rhizosphérique
Niveau « +1 »	3,21 mmol L <sup>-1</sup>	12,21 mmol L <sup>-1</sup>	0,0620 mg L <sup>-1</sup>	Rhizosphérique

Combinaison	Facteurs				Réponse
	[Zn]	[Cr]	[Exsudats]	Proximité racinaire	
1	-1	-1	-1	R	0,93
2	+1	-1	-1	R	0,66
3	-1	+1	-1	R	0,67
4	+1	+1	-1	R	0,68
5	-1	-1	+1	R	0,94
6	+1	-1	+1	R	0,61
7	-1	+1	+1	R	0,69
8	+1	+1	+1	R	0,65
9	-1	-1	-1	RP	0,99
10	+1	-1	-1	RP	0,79
11	-1	+1	-1	RP	0,74
12	+1	+1	-1	RP	0,75
13	-1	-1	+1	RP	1,01
14	+1	-1	+1	RP	0,76
15	-1	+1	+1	RP	0,76
16	+1	+1	+1	RP	0,78

Niveau « -1 »	0,26 mmol L <sup>-1</sup>	0,06 mmol L <sup>-1</sup>	0,0062 mg L <sup>-1</sup>	Rhizosphérique
Niveau « +1 »	3,21 mmol L <sup>-1</sup>	12,21 mmol L <sup>-1</sup>	0,0620 mg L <sup>-1</sup>	Rhizoplan

## Résultats de croissance bactérienne des rhizoplans :

Combinaison	Facteurs				Réponse
	[Zn]	[Cr]	[Exsudats]	Type de consortium	
1	-1	-1	-1	Rhizoplan sol E	1,06
2	+1	-1	-1	Rhizoplan sol E	0,87
3	-1	+1	-1	Rhizoplan sol E	0,87
4	+1	+1	-1	Rhizoplan sol E	0,85
5	-1	-1	+1	Rhizoplan sol E	1,01
6	+1	-1	+1	Rhizoplan sol E	0,85
7	-1	+1	+1	Rhizoplan sol E	0,81
8	+1	+1	+1	Rhizoplan sol E	0,80
9	-1	-1	-1	Rhizoplan sol Mix	0,99
10	+1	-1	-1	Rhizoplan sol Mix	0,79
11	-1	+1	-1	Rhizoplan sol Mix	0,74
12	+1	+1	-1	Rhizoplan sol Mix	0,75
13	-1	-1	+1	Rhizoplan sol Mix	1,01
14	+1	-1	+1	Rhizoplan sol Mix	0,76
15	-1	+1	+1	Rhizoplan sol Mix	0,76
16	+1	+1	+1	Rhizoplan sol Mix	0,78

Niveau « -1 »	0,26 mmol L <sup>-1</sup>	0,06 mmol L <sup>-1</sup>	0,0062 mg L <sup>-1</sup>	Rhizoplan sol E
Niveau « +1 »	3,21 mmol L <sup>-1</sup>	12,21 mmol L <sup>-1</sup>	0,0620 mg L <sup>-1</sup>	Rhizoplan sol Mix

## **RESUME**

Le sol est une ressource non renouvelable à conserver en raison de son importance socio-économique et environnementale. Mais, les activités (bio)industrielles peuvent le dégrader et entraîner l'apparition de friches à pollutions persistantes. La capacité de *Miscanthus x giganteus* à s'adapter aux sols de friches pollués en éléments traces métalliques (ETM), tout en favorisant la consolidation des processus de bioremédiation des polluants, sans entraîner d'impact négatif sur l'environnement, est étudiée. Des terrains lorrains, très impactés par l'activité industrielle passée, sont utilisés. Considérant la complexité des relations sol-plante-microorganismes, différents outils d'évaluation complémentaires (*i.e. in vitro*, en mésocosme et sur le terrain) sont employés afin de déterminer la réponse de chaque composante et de leurs interactions et ainsi déduire la durabilité de la méthode. La culture de *M. x giganteus* a un potentiel pour la réhabilitation des sols de friche à pollutions multimétalliques ou mixtes (+HAP), avec un double bénéfice : la phytostabilisation des ETM au niveau racinaire et la production d'une biomasse aérienne révalorisable (transfert limité des ETM). La plante n'altère pas les caractéristiques du sol qui participent à la mobilité des ETM (pH, CEC) ; les variations de celles liées à la fertilité du sol, de la toxicité (fraction liquide) et de l'accumulation des ETM par d'autres organismes, attestent de l'interaction avec le milieu qui rendrait les éléments plus disponibles. L'activité végétale est à l'origine des associations avec les bactéries du sol, où les phylotypes potentiellement métallorésistants (Zn, Cr) semblent communs aux sols utilisés.

**Mots clés :** Phytoremediation, friche industrielle, réhabilitation, *Miscanthus x giganteus*, éléments traces métalliques

## **ABSTRACT**

Soil is a nonrenewable resource to maintain because of its socio-economic and environmental importance. However, (bio)industrial activities can degrade soil and cause the appearance of persistent pollution brownfields. The ability of *Miscanthus x giganteus* to adapt to brownfield soils polluted with heavy metals (HM), while promoting the consolidation process of bioremediation of pollutants, without causing a negative impact on the environment, is studied. Soils from Lorraine region (France), very affected by past industrial activity, are used. Considering the complexity of soil-plant-microorganisms relationships, various complementary assessment tools (*i.e. in vitro*, mesocosm and field) are used to determine the response of each component and their interactions, and thus deduce the sustainability of the method. The culture of *M. x giganteus* has great potential for the rehabilitation of brownfield soils having a multimetallic pollution or mixed (+PAH) with a double benefit: phytostabilisation of HM at the root level and the production of biomass reclaimable (limited transfer of HM). The plant does not alter the characteristics of the soil involved in the mobility of HM (pH, CEC); but changes from those related to soil fertility, toxicity (liquid fraction) and the accumulation of HM by other organisms attest to the interaction of the plant with the elements that would make them more available. Plant's activity is causing associations with soil bacteria, for which the phylotypes potentially métallorésistants (Zn, Cr) seem common in soils used.

**Keywords:** Phytoremediation, brownfield, revitalisation, *Miscanthus x giganteus*, heavy metals

## **RESUMEN**

El suelo es un recurso no renovable necesario de conservar debido a su importancia socio-económica y ambiental. Sin embargo, las actividades (bio)industriales pueden degradarlo y provocar la aparición de zonas industriales abandonadas con contaminaciones persistentes. La capacidad de adaptación de *Miscanthus x giganteus* a los suelos contaminados por los elementos traza metálicos (ETM), promoviendo al mismo tiempo el proceso de biorremediación de los contaminantes, sin causar un impacto negativo en el medio ambiente, es estudiada. Los terrenos de la región de Lorraine, muy afectada por la actividad industrial pasada, son utilizados. Teniendo en cuenta la complejidad de las relaciones suelo-planta-microorganismos, varios instrumentos de evaluación complementarios (*i.e. en mesocosmos, in vitro* y en campo) son utilizados para determinar la respuesta de cada componente y sus interacciones, y por consiguiente deducir la sostenibilidad del método. El cultivo de *M. giganteus* tiene gran potencial para la rehabilitación de zonas industriales abandonadas con contaminaciones multimetálicas o mixtas (+HAP), presentando un doble beneficio: la fitoestabilización de los ETM en la raíz y la producción de biomasa recuperable (transferencia limitada de los ETM). La planta no altera las características del suelo que participan en la movilidad de los ETM (pH, CEC) pero modifica aquellos relacionados con la fertilidad del suelo, la toxicidad (fracción líquida) y la acumulación de los ETM por otros organismos, lo que revela una interacción de la planta con el medio que podría volver los elementos más disponibles. La actividad de la planta causa asociaciones con las bacterias del suelo; y los filotipos potencialmente metalloresistentes (Zn, Cr) parecieran comunes en los diferentes suelos utilizados.

**Palabras clave:** fitorremediación, rehabilitación, zonas industriales abandonadas, *Miscanthus x giganteus*, elementos trazas metálicos