



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

136036251

04 IN PL 004 N

(51) 2004 SCHMITT-SIRGUEY C.

Institut National Polytechnique de Lorraine

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries alimentaires
Ecole doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire Sols et Environnement UMR 1120 ENSAIA-INPL/INRA

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

en
Sciences Agronomiques

Par

Catherine SCHMITT-SIRGUEY

**Dynamique du Cd disponible du sol sous l'influence
de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens***

Soutenue le 02 février 2004 devant le jury composé de :

Sylvain PELLERIN	Directeur de Recherches, INRA, Bordeaux	Rapporteur
Jean-Charles MUNCH	Professeur, Université Technique, Munich	Rapporteur
Catherine KELLER	Adjointe Scientifique, EPFL, Lausanne	Examineur
Nadine DUESO	Ingénieur, ADEME, Angers	Examineur
Jean-Louis MOREL	Professeur, ENSAIA-INPL/INRA, Vandœuvre	Directeur
Christophe SCHWARTZ	Maître de Conférences, ENSAIA-INPL/INRA, Vandœuvre	Co-Directeur

Remerciements

Me voici arrivée au terme de cette aventure qui a démarré il y a déjà plus de trois ans. La route qui mène au titre de Docteur est souvent sinueuse et jalonnée d'embûches ; mais heureusement nous ne sommes pas seuls, et au détour du chemin se trouve souvent la personne providentielle qui nous permet d'avancer un peu plus loin. Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui ont parcouru un bout de chemin avec moi, contribuant ainsi à l'élaboration de ce manuscrit.

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Jean-Louis Morel qui m'a accueillie chaleureusement au sein du Laboratoire Sols et Environnement. Je me souviens encore de ce jour de mai 1998 où je suis venue vous voir avec toute ma motivation pour obtenir mon stage de DESE. A cette époque, je ne m'imaginai même pas que je resterais bien plus longtemps. Malgré le peu de temps disponible, j'ai pu bénéficier d'une écoute attentive et de votre rigueur scientifique. Avec vous, j'ai appris ce que « travailler dans l'urgence » signifie ; mais surtout, j'ai pu bénéficier de nombreux conseils qui m'ont souvent aidé à lever quelques verrous. J'espère avoir su « lever le nez du guidon » comme vous me le disiez souvent.

Je remercie également Christophe Schwartz qui m'a encadré durant toutes ces années. Décrire en quelques lignes tout ce qui s'est passé relève de la gageure. Merci de l'attention permanente que tu as portée à ce travail. Merci également de m'avoir fait partager ton expérience et ta passion pour la recherche. Merci de m'avoir toujours fait confiance et de m'avoir laissé une grande liberté d'action et d'expression. Enfin, merci pour ton amitié, ton soutien, ta bonne humeur constante et ton optimisme, surtout lors des moments de doutes.

Tous mes remerciements vont à messieurs Jean-Charles Munch, professeur à l'Université Technique de Munich, et Sylvain Pellerin, directeur de recherche à l'INRA de Bordeaux, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour votre analyse critique du document et la qualité de la discussion qu'il aura suscitée.

Je remercie Catherine Keller, Adjointe Scientifique à l'EPFL de Lausanne, et Nadine Dueso, Ingénieur ADEME, pour avoir accepté de commenter et de juger ce travail. Merci pour votre soutien, votre enthousiasme et votre contribution scientifique.

Il va sans dire que je n'oublie pas toutes les personnes du Laboratoire Sols et Environnement qui ont apporté une (ou plusieurs) briques à l'édifice. Merci à Thibault Sterckeman et à Guillaume Echevarria pour avoir répondu à mes interrogations. Merci à Stéphanie Ouvrard pour m'avoir initié au monde obscur de la chimie et pour tout le temps passé en de nombreuses discussions. Un grand merci à notre super équipe technique, Bernard & Stéphane Colin et Alain Rakoto, dont l'ingéniosité et la bonne humeur permettent de réaliser même l'impossible.

J'aurais une attention toute particulière pour Tina, Richard, Alain et Stéphane pour nos nombreuses conversations, plus ou moins philosophiques, durant la pause de midi. Merci pour votre amitié et votre soutien. Je ne pourrais oublier mon colocataire de bureau, Arnaud, avec qui j'ai partagé l'exiguïté du lieu au plus fort de la canicule. Nos neurones ont survécu à la fois à la rédaction de la thèse et à la chaleur, certainement grâce à sa bonne humeur communicative. Un grand merci à tous ceux et toutes celles qui œuvrent à la bonne ambiance générale du laboratoire. La liste est trop longue pour tous les nommer, mais je ne doute pas qu'ils se reconnaîtront.

Je remercie les stagiaires, Eve Randriamana, Marion Beaudoin, Mathieu Radek, Bertrand Leroy et Guillaume Gaches qui ont participé activement, et avec beaucoup de bonne humeur, à ce travail.

Mes dernières pensées iront à mes proches et à ma famille. Je pense en particulier à Ingrid, comparse de toujours (ou presque), oserais-je dire ma jumelle tant nos destinées sont parallèles. Que de galères et de bons moments partagés ensemble ! Je n'oublie pas non plus Noël & Laurence et Vincent & Natacha, qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Un grand merci également à mes parents qui ont toujours eu foi en moi. Pour conclure, je dédierai ce travail à Daniel, mon mari, qui a vécu pleinement toutes ces années de dur labeur, partageant mes enthousiasmes comme mes doutes et à Lilian, notre futur enfant, qui s'il poursuit nos passions, ne manquera pas d'être chercheur.

Table des matières

<i>Introduction</i>	1
---------------------------	---

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Dynamique des métaux dans le système sol-plante : particularité des plantes hyperaccumulatrices

1. Cycles biogéochimiques des éléments en traces dans le système sol-plante.....	3
1.1. Les processus pédologiques	3
1.2. Les apports anthropiques	4
1.2.1. Les retombées atmosphériques	4
1.2.2. Les matières fertilisantes	5
1.2.3. Autres voies de contamination des sols en éléments en traces.....	5
1.3. Les flux de sortie	5
1.3.1. Les entraînements verticaux	6
1.3.2. Les entraînements latéraux.....	6
1.3.3. L'absorption par les végétaux	6
1.4. Cycle des éléments en traces dans les écosystèmes perturbés.....	7
2. Risques liés à la présence des métaux dans les sols.....	7
2.1. Implications pour la santé humaine	7
2.2. Biodisponibilité des métaux dans les sols	8
2.2.1. Disponibilité chimique des métaux	8
2.2.2. Disponibilité biologique des métaux.....	11
2.3. Absorption des métaux par les plantes	12
2.3.1. Les mécanismes d'absorption.....	12
2.3.2. Facteurs influençant l'absorption.....	13
2.3.3. Transport et stockage des métaux dans la plante.....	14
3. Les voies de décontamination des sols pollués par les éléments en traces.....	15
3.1. Les voies physico-chimiques.....	15
3.1.1. Les méthodes par piégeage de la pollution	15
3.1.2. Les méthodes par extraction de la pollution.....	16
3.2. Les méthodes biologiques.....	16
4. La phytoextraction des sols contaminés par les métaux.....	17
4.1. Distribution géographique et écologie des plantes hyperaccumulatrices.....	18
4.2. Mécanisme de tolérance	19
4.3. Cycle des métaux dans le système sol contaminé – plante hyperaccumulatrice	20
4.4. Un modèle de plante hyperaccumulatrice pour la phytoremédiation : <i>Thlaspi caerulescens</i>	21

4.4.1. Prélèvement et accumulation des éléments en traces par les hyperaccumulateurs	21
4.4.2. Faisabilité de la phytoextraction	24
5. Conclusion	26

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1. Matériels	28
1.1. Plantes.....	28
1.2. Terres	28
2. Caractérisation physico-chimique des terres	29
2.1. Caractérisation agronomique	29
2.1.1. Terre S1	29
2.1.2. Terre S2	31
2.1.3. Terre S3	31
2.1.4. Terres S4 et S5	31
2.2. Concentrations des métaux dans les terres	31
2.2.1. Concentrations totales	31
2.2.2. Extraction sélective	32
2.2.3. Cd isotopiquement échangeable.....	32
2.3. Spéciation du Cd en solution.....	35
2.3.1. Description du modèle	35
2.3.2. Ajustement des paramètres relatifs à la réactivité de la matière organique et aux réactions d'adsorption du Ca et du Cd	36
2.3.3. Evaluation de la pertinence du modèle	37
3. Dispositifs de culture.....	37
4. Echantillonnage des terres	38
5. Analyse des récoltes.....	38
5.1. Concentrations totales des métaux	38
5.2. Composition isotopique des plantes.....	39
6. Traitement statistique des données	39

Chapitre 3

Origine de la variabilité de l'hyperaccumulation chez *Thlaspi caerulescens* :

Contribution de la biodisponibilité des métaux et des différenciations génétiques

PARTIE I. INFLUENCE DES PROPRIÉTÉS DES SOLS SUR L'HYPERACCUMULATION DES MÉTAUX PAR <i>T. CAERULESCENS</i>	42
1. Matériels et méthodes.....	42

1.1. Sites prospectés	42
1.2. Echantillonnage	44
1.3. Paramètres mesurés	44
1.4. Méthodes statistiques	44
2. Résultats	45
2.1. Caractéristiques physico-chimiques des terres	45
2.1.1. Analyse agronomique	45
2.1.2. Concentrations totales des métaux	45
2.1.3. Biodisponibilité des métaux	46
2.2. Extraction des métaux par <i>T. caerulea</i> sur sites métallifères	49
2.2.1. Biomasse	49
2.2.2. Concentrations des métaux	50
2.2.3. Extraction des métaux	52
2.3. Modélisation empirique de l'hyperaccumulation des métaux par <i>T. caerulea</i>	52
2.3.1. Influence des propriétés des sols sur la mobilité et la biodisponibilité des métaux	52
2.3.2. Influence des propriétés des sols sur les concentrations du Cd et du Zn dans les plantes	54
3. Discussion	57
3.1. Biodisponibilité du Cd et du Zn	57
3.2. Hyperaccumulation des métaux	58
4. Conclusion	59

PARTIE II. EFFET DES VARIATIONS GÉNÉTIQUES SUR L'HYPERACCUMULATION
DU CD CHEZ *T. CAERULEA*

1. Matériels et méthodes	60
1.1. Plantes	60
1.2. Marquage des terres	61
1.3. Dispositif	61
1.4. Mesure de la valeur E	61
1.5. Mesure de la valeur L	62
1.6. Récolte	62
2. Résultats	62
2.1. Morphologie des plantes	63
2.2. Production de biomasse	63
2.3. Concentrations du Cd dans les parties aériennes des plantes	64
2.4. Effet de la culture sur le Cd isotopiquement échangeable	67
2.5. Variation des valeurs de Cd_L et comparaison avec Cd_E	67
3. Discussion	70
3.1. Variabilité du potentiel d'accumulation chez <i>T. caerulea</i>	70
3.2. Accessibilité de <i>T. caerulea</i> au Cd non labile du sol	70
3.2.1. Etude de la variabilité inter-populations	70
3.2.2. Etude de la variabilité inter-individus	72

4. Conclusion	72
---------------------	----

Chapitre 4

Evolution du compartiment biodisponible des métaux des sols sous l'effet de cultures de *Thlaspi caerulescens*

PARTIE I. EVOLUTION DE LA BIODISPONIBILITÉ DU Cd DANS LA RHIZOSPHERE DE <i>T. CAERULESCENS</i>	75
1. Matériels et méthodes	75
1.1. Terres	75
1.2. Dispositif	75
1.3. Echantillonneurs de solution du sol	75
1.4. Culture	76
1.5. Mesures	77
2. Résultats	77
2.1. Effet de <i>T. caerulescens</i> sur le compartiment soluble du Cd	77
2.1.1. Potentiel redox	77
2.1.2. pH	77
2.1.3. Concentration du Cd	78
2.2. Production de biomasse	79
2.3. Concentrations du Cd et du Zn dans les plantes	79
2.4. Exportation du Cd et du Zn par <i>T. caerulescens</i>	80
2.5. Distribution du Cd au sein des compartiments isotopiquement échangeables	81
3. Discussion	81
4. Conclusion	82
PARTIE II. EVOLUTION DE LA BIODISPONIBILITÉ DU Cd SOUS L'EFFET DE CULTURES SUCCESSIVES DE <i>T. CAERULESCENS</i>	83
1. Matériel et méthode	83
1.1. Terre	83
1.2. Dispositif	83
1.3. Culture	83
1.4. Mesures	84
2. Résultats	84
2.1. Effet de <i>T. caerulescens</i> sur le compartiment soluble du Cd et du Zn	84
2.1.1. Potentiel redox	84
2.1.2. pH	85
2.1.3. Carbone organique soluble	85
2.1.4. Concentration du Cd	87
2.1.5. Concentration du Zn	90
2.2. Concentrations du Cd et du Zn dans les plantes	92

2.3. Extraction du Cd et du Zn par <i>T. caerulescens</i>	93
2.4. Distribution du Cd au sein des compartiments isotopiquement échangeables	93
3. Discussion.....	94
3.1. Modifications des compartiments échangeables du Cd	94
3.2. Modifications du compartiment soluble du Cd.....	95
3.3. Phytoextraction du Cd et du Zn	96
4. Conclusion	97

Chapitre 5

Réponse in situ de *Thlaspi caerulescens* aux contaminations modérées

1. Matériel et méthode	98
1.1. Terres utilisées	98
1.2. Dispositif.....	100
1.3. Culture	100
2. Résultats	101
2.1. Production de biomasse	101
2.2. Concentrations des métaux dans les plantes.....	102
2.3. Variabilité de l'hyperaccumulation chez <i>T. caerulescens</i> et biodisponibilité du Cd.....	104
2.4. Discussion	105
3. Conclusion	106

Chapitre 6

Modélisation simplifiée de la phytoextraction du Cd par *Thlaspi caerulescens*

1. Matériels et méthodes.....	107
1.1. Concentration du Cd dans les parties aériennes de <i>T. caerulescens</i>	107
1.2. Croissance des parties aériennes de <i>T. caerulescens</i>	107
2. Résultats	108
2.1. Courbe de croissance de <i>T. caerulescens</i>	108
2.2. Application du modèle simplifié : comparaison avec les résultats expérimentaux.....	110
2.3. Analyse de sensibilité du modèle	111
3. Discussion.....	112
4. Conclusion	112

Conclusion générale

1. Variabilité de l'hyperaccumulation chez <i>T. caerulescens</i> et biodisponibilité du Cd ...	114
2. Renouvellement du compartiment biodisponible des sols	115
3. Prédiction du rendement de phytoextraction	116

4. Optimisation de la phytoextraction 117

Références bibliographiques.....118

Annexes.....131

Introduction

Dans le règne végétal, certaines plantes présentent d'extraordinaires aptitudes à prélever et concentrer les métaux dans leurs parties aériennes. Ces espèces hyperaccumulatrices sont rencontrées préférentiellement sur des sites métallifères naturels où la pression de sélection entraîne la disparition des autres espèces végétales. Étudiées dans un premier temps pour orienter et faciliter l'exploration minière, la particularité des plantes hyperaccumulatrices a amené la communauté scientifique à envisager leur utilisation pour le traitement des sols contaminés par les métaux. En effet, il est très difficile de traiter les sols pollués par les métaux car ces derniers sont souvent très fortement liés à la matrice organo-minérale. Il existe alors peu de méthodes de traitement adaptées (lavage acide, électromigration, biolixiviation par exemple) et l'utilisation des plantes hyperaccumulatrices est l'une des rares méthodes d'extraction sélective des métaux du sol. Depuis plus de 10 ans, des travaux de recherche ont ainsi contribué au développement de la phytoextraction. Extensive par rapport aux techniques physico-chimiques traditionnelles, elle présente l'avantage de conserver les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Parmi les nombreuses espèces hyperaccumulatrices répertoriées dans le monde, *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae), hyperaccumulateur de cadmium, nickel et zinc, représente l'un des meilleurs candidats en vue de l'application de la phytoextraction à grande échelle.

Les divers travaux engagés à ce jour ont contribué à la connaissance et à la compréhension des mécanismes physiologiques de l'hyperaccumulation ainsi qu'au développement de *T. caerulescens* sur des sols pollués et à la faisabilité de la phytoextraction. Les facteurs affectant les quantités de métaux absorbés par une plante sont ceux contrôlant : (1) la biodisponibilité des métaux dans la solution du sol, (2) leur mouvement vers la surface des racines, (3) leur transport dans les racines et (4) leur translocation vers les parties aériennes. De nombreux facteurs édaphiques gouvernent la biodisponibilité des métaux comme par exemple le pH, le Eh, les concentrations totales en métaux et le pouvoir tampon des sols. Toutefois, les plantes sont susceptibles d'induire des modifications plus ou moins marquées par exemple par l'exsudation de molécules chélatantes et le développement de systèmes racinaires particuliers.

Ce travail a pour objectif de mieux comprendre les interactions entre la fourniture des métaux par la phase solide du sol, ou disponibilité, et l'hyperaccumulation du Cd par *T. caerulescens* dans le cadre de scénarios de phytoextraction.

- Quel est l'impact des plantes hyperaccumulatrices sur les flux des éléments en traces dans les sols ?
- La phytoextraction permet-elle d'abaisser durablement les compartiments biodisponibles des métaux ?
- Quels sont les mécanismes de fourniture des métaux par la phase solide du sol à *T. caerulescens* ?

Dans ce but, un premier chapitre présente une étude bibliographique consacrée à la dynamique des métaux dans les systèmes sol-plante avec un accent spécifique sur les plantes hyperaccumulatrices, en particulier *T. caerulescens*, et les connaissances actuelles quant à la faisabilité de la phytoextraction.

Dans un deuxième chapitre, sont décrits les matériels et méthodes communs mis en œuvre dans le cadre de ce travail.

Le troisième chapitre est dédié à l'étude de la variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. Il s'agit ici, de mettre en lumière quelle est la part des conditions environnementales et des différenciations génétiques dans la variabilité totale observée pour plusieurs populations de l'espèce *T. caerulescens* présentant des aptitudes différentes à accumuler les métaux. Pour ce faire, une première partie mettra en relation les propriétés

physiques et chimiques des sols (Ex. : biodisponibilité des métaux, fertilité) et l'hyperaccumulation des métaux chez *T. caerulescens* en milieu naturel. Puis, une deuxième partie permettra d'établir l'influence de la variabilité génétique sur l'hyperaccumulation des métaux chez *T. caerulescens*.

Un quatrième chapitre est consacré à l'étude du renouvellement du compartiment biodisponible des sols sous l'effet de cultures successives de *T. caerulescens*. Nous étudierons son impact sur l'évolution dans le temps des différents compartiments des métaux (solubles et biodisponibles) dans le sol et des métaux hyperaccumulés par la plante.

Le cinquième chapitre est dédié à la culture en conditions climatiques réelles de différentes populations de *T. caerulescens* caractérisées par des potentiels d'accumulation différents. Il s'agit de vérifier si le comportement hyperaccumulateur de différentes populations de *T. caerulescens* est identique en conditions contrôlées et en conditions climatiques réelles.

Le sixième chapitre a pour objectif d'appliquer les connaissances fondamentales acquises afin d'établir un modèle prédictif du rendement de phytoextraction par *T. caerulescens*.

Nous concluerons le manuscrit par une synthèse des connaissances acquises sur la variabilité de l'hyperaccumulation et de la dynamique des métaux dans le système sol-*T. caerulescens* ainsi que les perspectives de recherche.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Dynamique des métaux dans le système sol-plante : particularité des plantes hyperaccumulatrices

« Dès le III^{ème} millénaire avant J.C., l'expansion indo-européenne se manifeste par la recherche de gisements métallifères dans les Alpes et les Carpates. Dès lors, l'activité métallurgique contamine les sols » (Guillaume, 2003). Cette phrase nous fait prendre conscience que la problématique des sols contaminés par les métaux n'est pas un phénomène récent, mais qu'elle est liée à l'Homme par des milliers d'années d'exploitation des métaux.

En milieu naturel, les sols contiennent de faibles quantités d'éléments en traces. Qu'ils soient nécessaires ou non aux processus vitaux, leur présence dans les sols à de fortes concentrations présente un risque pour les organismes vivants. Le cadmium (Cd) et le zinc (Zn) sont deux éléments en traces métalliques associés dans les minerais et largement répandus dans les sols à des concentrations plus ou moins élevées pouvant s'avérer toxiques pour la faune et la flore. Dans les pays industrialisés, de grandes superficies de terres sont ainsi concernées par une possible contamination par des éléments en traces et, par conséquent, d'une potentielle diffusion vers la chaîne alimentaire. Alors que les réglementations sur la protection de l'air et de l'eau potable se sont bien développées, ce n'est que récemment que la nécessité de protéger les sols s'est faite ressentir. Notons pour exemple la mise en place d'une stratégie thématique, au cours de l'année 2002 et révisée le 19 novembre 2003, pour la protection des sols au sein de la Communauté Européenne.

Les milieux métallifères ont favorisé le développement d'une flore particulière tolérante dont certaines espèces ont acquis une aptitude à absorber et à concentrer de très fortes quantités d'éléments en traces dans leurs tissus. De par leurs propriétés extraordinaires, les plantes hyperaccumulatrices constituent le fondement de la phytoextraction des sols contaminés par les éléments en traces.

1. Cycles biogéochimiques des éléments en traces dans le système sol-plante

La croûte terrestre ou lithosphère est composée de 80 éléments qui se répartissent en 2 groupes en fonction des concentrations moyennes auxquelles on les trouve dans les organismes biologiques végétaux et animaux : les macro et les oligo-éléments. Si les microéléments sont, pour la plupart, indispensables aux processus vitaux, ils deviennent rapidement toxiques dès que leur concentration dans un organisme vivant dépasse un seuil variable en fonction de la nature de l'élément et du tissu de l'organisme considéré (Marschner *et al.*, 1986). Reconnus comme un facteur de pollution, les éléments en traces (métaux et non-métaux) sont impliqués dans les processus permanents de transfert vers le compartiment sol ou d'exportation hors de ce compartiment. Ces flux modifient de manière continue le stock d'éléments présents dans le sol et donc la qualité de l'écosystème.

1.1. Les processus pédologiques

Le fond géochimique est, par définition, la teneur "naturelle ou originale" en éléments en traces dans le sol en l'absence de tout processus d'apport ou d'export vers ou hors d'un site considéré (Baize, 1993 ; Robert et Juste, 1998). Cette concentration dépend en premier lieu de la concentration des métaux dans la roche mère mais également des processus intervenus lors de la formation du sol qui ont pu lessiver ou plus généralement concentrer un élément. Le fond géochimique va plus ou moins contribuer au stock de métaux en fonction de la diversité des substrats géologiques, des conditions de mise en place des matériaux et de la pédogenèse. Dans son étude menée sur 815 échantillons de sols originaires d'une quarantaine de départements français (principalement de la moitié nord du pays), Baize (2000) met en évidence que les gammes des concentrations mesurées sont extrêmement larges, celles-ci dépendant beaucoup de la roche mère, du type de sol et du type d'horizon considérés. Ainsi, dans certains sols les concentrations naturelles des éléments en traces peuvent être notablement supérieures aux valeurs seuils au-delà desquelles les apports de boue de stations d'épuration urbaines aux sols sont limités, voire interdits. C'est le cas

notamment des zones cristallines et, de façon moins généralisée, de certaines zones sédimentaires (Baize, 1993).

Les processus géologiques comme l'altération des roches ou la formation des sols sont difficiles à étudier du fait de l'échelle de temps qui leur est associée (plusieurs siècles à plusieurs millénaires). Souvent, les chronoséquences de sols permettent de mieux appréhender ces phénomènes (Lichter, 1998). Les quantités d'éléments libérés au cours de l'altération dépendent de la nature des minéraux (Alloway, 1995c ; Robert et Juste, 1999). Ainsi, les minéraux les plus altérables sont les minéraux carbonatés suivis des minéraux ferromagnésiens et des feldspaths. Longtemps, l'altération des roches était attribuée aux seuls processus météoriques (Hinsinger *et al.*, 2001). Aujourd'hui, de nombreuses études ont montré l'effet d'agents chimiques d'origine biologique sur l'altération des roches et des minéraux qu'ils soient d'origine microbienne (Banfield *et al.*, 1999 ; Brantley *et al.*, 1999 ; Jongmans *et al.*, 1997), végétale (Hinsinger et Gilkes, 1997 ; Hinsinger *et al.*, 2001 ; Scholtus, 2003) ou lichénique (Adamo et Violante, 2000).

1.2. Les apports anthropiques

Les apports anthropiques, répétés durant de longues périodes, peuvent être à l'origine de stocks importants d'éléments en traces dans les sols. Les principales sources de métaux dans l'environnement sont (Alloway, 1995a) (tableau 1.1) :

- les gisements métallifères,
- les industries de métallurgie,
- l'électronique,
- la chimie,
- la combustion du carbone fossile,
- les matériaux agricoles et horticoles,
- les boues de station d'épuration,
- les déchets,
- les plombs de pêche et de chasse,
- les zones militaires.

Tableau 1.1 : Contributions de différentes sources à l'approvisionnement moyen annuel des terres émergées en éléments en traces (Juste, 1990)

	Unités	Eléments			
		Cuivre	Zinc	Cadmium	Plomb
Total	10 ³ t	216	760	20	382
Déchets agricoles	%	55	61	20	12
Déchets urbains	%	28	20	38	19
Engrais	%	1	1	2	1
Retombées atmosphériques	%	16	18	40	68

1.2.1. Les retombées atmosphériques

Les retombées atmosphériques représentent la source essentielle d'accumulation en éléments en traces à proximité des zones industrielles ou au voisinage des fortes concentrations urbaines (Cambier, 1994 ; Nriagu, 1979 ; Sanka *et al.*, 1995). Le trafic automobile est la principale source de pollution pour le plomb (Pb), le Zn et le cuivre (Cu), dans les sols et dans les plantes, en milieu urbain (Sanka *et al.*, 1995). Une importante source de Cd est l'incinération d'ordures ménagères tandis que le mercure (Hg) provient principalement des émissions de gaz de sites contaminés (Cambier, 1994). Les poussières industrielles issues de la métallurgie des métaux non ferreux et ferreux ainsi que des

activités de fonderie contiennent également de grandes quantités d'éléments en traces, représentant un risque pour leur transfert à travers la chaîne alimentaire (Baker *et al.*, 1994a ; Escarré *et al.*, 2000 ; Florentin *et al.*, 1998).

En dehors de ces contaminations de proximité, les retombées atmosphériques de microparticules ou d'aérosols transportés à longue distance participent à l'accumulation des éléments en traces dans les sols. Elles proviennent principalement des activités industrielles et urbaines mais également du volcanisme (Juste *et al.*, 1995 ; Robert et Juste, 1998).

1.2.2. Les matières fertilisantes

Les contaminations liées aux pratiques agricoles sont une source majeure d'éléments en traces. D'une part, parce que cela concerne de grandes surfaces (en France environ 110 000 km² correspondant à la totalité de la surface agricole utile) et d'autre part, parce que la contamination éventuelle des sols agricoles est à la source même d'une possible contamination de la chaîne alimentaire (Robert et Juste, 1998). Certains engrais, obtenus à partir de la transformation des produits de gisement tels que les phosphates, peuvent renfermer des concentrations des éléments en traces (Cd, Zn, Mn et Co par exemple) souvent très supérieures à celles de la majorité des sols (Juste *et al.*, 1995).

Une autre source d'éléments en traces aux sols sont les amendements organiques (déchets et produits dérivés) tels que les composts d'ordures ménagères, les boues résiduaires de stations d'épuration, les fumiers et les lisiers, voire de l'irrigation avec des eaux usées brutes. L'épandage de boues urbaines en agriculture est justifié par leur valeur fertilisante (Guckert et Morel, 1979), leur contribution au maintien du stock humique des sols et donc par leur action sur les propriétés physico-chimiques des sols et leur valeur socio-économique. L'application de boues d'épuration peut néanmoins apporter du Zn, du Cd, du Pb, du Cu, du Cr et du Ni, et augmenter de façon cumulative les concentrations des métaux dans les sols. Ceux-ci peuvent alors être transférés aux cultures par absorption des plantes et contaminer la chaîne alimentaire (Baker *et al.*, 1994a ; Barbarick *et al.*, 1998 ; Baveye *et al.*, 1999 ; Jahrausch-Wehrheim *et al.*, 1999 ; McGrath, 1987 ; Morel et Guckert, 1984 ; Morel *et al.*, 1988). Le contrôle de la qualité et de l'épandage des boues urbaines, notamment en terme des concentrations des éléments en traces, encadré par la réglementation, a permis de réduire les risques de transfert vers la chaîne alimentaire.

Toutefois, les amendements organiques peuvent également jouer un rôle dans la fixation des métaux aux sols en redistribuant les métaux de la fraction échangeable vers les fractions moins solubles (Shuman, 1999 ; Urasa et Macha, 1999). Cette immobilisation pourrait intéresser les sols fortement contaminés, comme les friches industrielles, où les apports de boues seraient une des étapes de réhabilitation. Cependant, une attention particulière doit être faite quant à l'évolution à long terme des éléments métalliques dans les sols, notamment suite à la minéralisation de la matière organique.

1.2.3. Autres voies de contamination des sols en éléments en traces

D'autres types d'enrichissement des sols en métaux peuvent avoir lieu. Il s'agit notamment de déchets industriels, miniers ou pétroliers qui sont stockés sur d'anciennes friches industrielles. Les boues de curage des cours d'eau posent également le problème de leur valorisation par les concentrations élevées du Zn, du Pb et du Cd qu'elles peuvent contenir (Caille, 2002 ; Juste *et al.*, 1995).

1.3. Les flux de sortie

Les flux de sortie d'éléments en traces sont plus difficiles à évaluer que les flux de pollution parvenant au sol, car les voies et mécanismes de transfert sont beaucoup plus variés. Les flux de sortie peuvent prendre différentes formes : des déplacements latéraux ou verticaux, une absorption et une exportation par les végétaux, voire une volatilisation directe

dans l'atmosphère pour certains éléments comme Hg et l'arsenic (As) (Robert et Juste, 1999).

1.3.1. Les entraînements verticaux

Les entraînements verticaux peuvent se produire sous formes particulières, colloïdales ou sous formes solubles. Le transport par les colloïdes détermine un mouvement des polluants en association avec des particules solides comme les argiles, la matière organique dissoute et la biomasse (virus, cellules ; McCarthy et Zachara, 1989 ; Mills *et al.*, 1991). Ce type de transport contribue à augmenter la mobilité de contaminants insolubles (Enfield et Yates, 1990).

Les entraînements sous forme soluble dépendent fortement des conditions du milieu. Le pH est particulièrement déterminant dans la régulation des processus contrôlant la solubilité des éléments en traces, les fractions les plus mobiles apparaissant aux pH les plus bas (Cavallaro et McBride, 1980, 1984 ; Harter et Naidu, 1995 ; Martinez et Motto, 2000 ; Stahl et James, 1991). Le potentiel redox va également affecter la solubilité chimique, la mobilité et la toxicité des éléments en traces par différents mécanismes : la conversion d'espèces solubles en espèces gazeuses, la dissolution de composants liés à la matrice des sols et la modification des espèces chimiques les plus stables de la phase soluble ou liées à la phase solide (Hesterberg, 1998). Le plus souvent, la mobilité des éléments en traces, en particulier Cd, Cu, Cr, et Zn, augmente dans les sols faiblement aérés. Le potentiel redox intervient de façon majeure lors de l'épandage des sédiments de dragage (Caille, 2002).

1.3.2. Les entraînements latéraux

En France, près de 5 millions d'hectares seraient sensibles à l'érosion avec des pertes de terre par entraînement pouvant varier selon les années climatiques et la couverture végétale du sol, de 1 à 10 t ha⁻¹ an⁻¹ (Robert et Juste, 1999). Elles représentent évidemment la cause principale de dispersion des éléments en traces initialement concentrés dans les horizons de surface sur les phases constitutives du sol mais aussi dans les particules légères des déchets apportés en surface. Ce phénomène concerne tout particulièrement les sols viticoles dans lesquels les concentrations du Cu peuvent atteindre 100 à 1 500 mg kg⁻¹ de sol du fait de l'utilisation intensive du sulfate de Cu (Besnard *et al.*, 2001) et dont la position de pente favorise largement la dissémination du Cu par ruissellement (Ballif, 1995 cité par Besnard *et al.*, 2001). Des apports d'amendements associés à une revégétalisation réduisent alors l'érosion des sols et permettent de fixer les métaux (Robert et Juste, 1999 ; Vangronsveld *et al.*, 1995a, b).

1.3.3. L'absorption par les végétaux

La valeur absolue des flux de sortie des éléments en traces par le biais de l'exportation par les végétaux est fonction des espèces végétales et du degré de couverture du sol par les plantes. Elle est aussi dépendante du degré de pollution du sol par les éléments en traces, avec une augmentation en fonction du niveau de contamination des sols. Ainsi, en Pologne, Dudka *et al.* (1996) montrent, lors d'une étude *in situ*, que des cultures sur sols contaminés par des poussières de fonderie de Zn et de Pb contiennent des quantités notables de Pb, de Cd et surtout de Zn (tableau 1.2).

Des concentrations élevées des métaux dans les sols peuvent conduire à une amplification du prélèvement par les plantes. Toutefois, ce n'est pas tant les concentrations totales des éléments en traces dans les sols (Ahnstrom et Parker, 1999 ; Shallari *et al.*, 1998 ; Voutsas *et al.*, 1996) que leur biodisponibilité (Kabata-Pendias, 2001) qui vont influencer l'absorption par les plantes.

Tableau 1.2 : Flux d'éléments en traces exportés par des cultures successives (blé, graminées, trèfle et pommes de terre) sur une période de quatre ans (d'après Dudka *et al.*, 1996)

Poussières de fonderie Zn/Pb (t ha ⁻¹)	Exportations en métaux (g ha ⁻¹)		
	Zn	Cd	Pb
0	1698	12	87
2,0	2574	22	96
6,7	4660	58	118
33,4	3901	91	243
66,8	4076	70	371

1.4. Cycle des éléments en traces dans les écosystèmes perturbés

Les éléments en traces, de par leur toxicité, modifient le fonctionnement des écosystèmes en perturbant les cycles des éléments minéraux et de la matière organique. La quantité et la distribution des éléments en traces dans les sols dépendent du cycle biogéochimique de l'écosystème concerné. Conséquence du recyclage via la végétation, des dépôts atmosphériques et de l'adsorption par la matière organique du sol, des éléments comme le Cd et le Zn se retrouvent souvent concentrés dans les horizons de surface (Bañuelos et Ajwa, 1999). De fortes concentrations des éléments en traces peuvent être potentiellement toxiques pour les arbres (Kahle et Breckle, 1989) et les champignons mycorhiziens qui leur sont associés (Blaudez *et al.*, 2000), pour les invertébrés (Russell et Alberti, 1998 ; Salminen et Haimi, 1999) et les vertébrés (Ieradi *et al.*, 1996). L'absorption des métaux intervient soit directement à partir du sol, soit par accumulation dans la chaîne alimentaire.

Les éléments en traces agissent sur les microorganismes du sol en déprimant leur activité (Baath, 1989 ; Barajas Aceves *et al.*, 1999 ; Pennanen, 2001), ce qui se traduit par une augmentation de la litière non décomposée à la surface du sol et par une altération du cycle des nutriments de tout l'écosystème (Fritze *et al.*, 1997 cité par Salemaa *et al.*, 2001). L'accumulation des métaux dans les sols forestiers peut alors conduire à une déficience en cations échangeables (Derome et Lindroos, 1998 ; McEnroe et Helmisaari, 2001). Les effets toxiques des éléments en traces et les modifications du statut en nutriments des sols constituent une forte pression de sélection pour la végétation (Salemaa *et al.*, 2001).

2. Risques liés à la présence des métaux dans les sols

2.1. Implications pour la santé humaine

De tous les éléments, les principaux à considérer en terme de contamination de la chaîne alimentaire sont As, Cd, Hg, Pb et Se. Le transfert du sol vers la chaîne alimentaire (plantes et animaux) est, pour beaucoup d'éléments en traces, la voie d'exposition majeure. Ceci est vérifié pour le Cd, un élément non essentiel pour les fonctions biologiques. Chez l'homme, le Cd s'accumule principalement dans les reins pour provoquer de graves dysfonctionnements physiologiques. La manifestation la plus connue d'une absorption massive de Cd est la maladie d'Itai-Itai survenue au Japon dans les années 50. En général, on estime l'apport de Cd par l'alimentation humaine entre 50 et 150 µg jour⁻¹ (Abrahams, 2002), la dose la plus élevée correspondant à celle pour laquelle les premiers effets sur l'homme apparaissent.

En Grande Bretagne, une étude épidémiologique a été réalisée dans le village de Shipham dont les concentrations du Cd dans les sols agricoles et les sols de jardins étaient supérieures d'un ordre de grandeur à celle rencontrées au Japon dans le cas de la maladie d'Itai-Itai (Thornton, 1988). La concentration moyenne du Cd mesurée dans les légumes atteignait 0,25 mg kg⁻¹ de matière fraîche (Morgan *et al.*, 1988), dépassant les concentrations maximales admises pour les denrées alimentaires par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF, 1996) (tableau 1.3). Toutefois, aucun effet nocif n'a été détecté sur la population, mettant en évidence l'existence de barrières dans le transfert des éléments

en traces du sol vers la chaîne alimentaire puis vers l'homme. Cela nous conduit vers la notion de biodisponibilité des éléments en traces.

Tableau 1.3 : Concentrations maximales admises pour le Cd dans les denrées alimentaires (matière fraîche)

Denrées alimentaires	Valeurs limites en mg Cd kg ⁻¹
Céréales et produits dérivés	0,10
Légumes	0,10
Poissons	0,10
Viandes	0,10
Reins	2,00
Jus de fruits	0,02
Vins, bières	0,02

2.2. Biodisponibilité des métaux dans les sols

Dans le système sol-plante, la biodisponibilité d'un élément est son aptitude à être transféré d'un compartiment quelconque du sol vers le système racinaire du végétal (Barber, 1995) ou vers les (micro)organismes, soit directement soit indirectement. Ainsi, les éléments en traces biodisponibles doivent être sous une forme chimique pouvant être absorbée par les organismes. La biodisponibilité peut être considérée comme un processus dynamique (Peijnenburg et Jager, 2003) comprenant deux phases distinctes (figure 1.1) :

- une phase physico-chimique dans laquelle les processus de partition et d'équilibre déterminent la taille des fractions des métaux potentiellement et effectivement disponibles ; en d'autres termes, la disponibilité chimique,
- une phase physiologique d'absorption dans laquelle les fractions des métaux chimiquement disponibles -spécifiques de l'organisme, du métal et de l'environnement considérés- sont accumulés par les organismes ou les plantes ; en d'autres termes, la disponibilité biologique.

De façon générale, les plantes absorbent les métaux présents dans la solution du sol sous forme ionique ou sous forme chélatée et complexée (Kabata-Pendias, 2001). Les facteurs prédominants qui déterminent la biodisponibilité des éléments en traces sont : la capacité de rétention par les constituants du sol, la composition de la solution du sol, le potentiel redox et le pH (Cataldo et Wildung, 1978 ; Kabata-Pendias, 2001).

2.2.1. Disponibilité chimique des métaux

Même si les concentrations totales des éléments en traces dans les sols donnent des indications sur leur niveau de contamination, elles ne fournissent pas d'informations sur leur mobilité et leur biodisponibilité. Les éléments en traces sont présents dans les sols sous différentes formes qui vont influencer leur réactivité et de ce fait leur mobilité (figure 1.1), allant de formes faiblement liées jusqu'à des formes fortement adsorbées ou intégrées dans les matrices minérales.

La spéciation d'un élément concerne plus particulièrement les formes et associations chimiques solubles et vise à définir les modes d'association entre anions et cations en solution. Toutefois, cette notion de spéciation s'est élargie aux phases solides et vise alors à définir les modes d'association et de localisation des cations et anions sur ou dans la matrice solide. La connaissance de la spéciation peut dès lors permettre de prévoir les conditions de mobilité actuelle ou future des éléments en traces. Nous allons traiter des différentes méthodologies permettant de déterminer la spéciation des éléments en traces et de quantifier le compartiment biodisponible des métaux du sol.

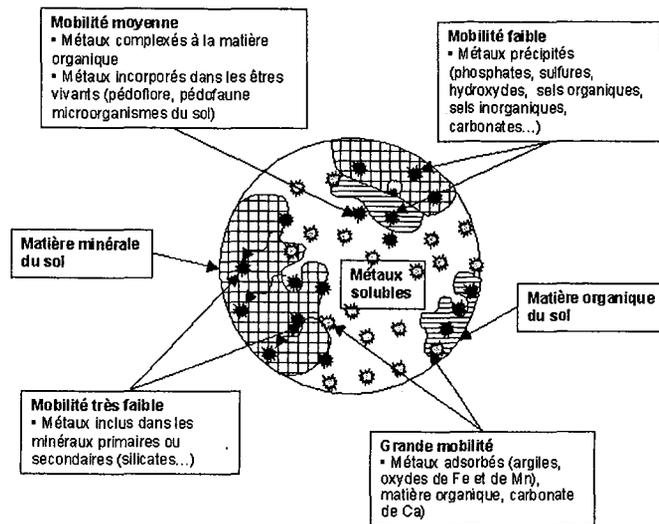


Figure 1.1 : Localisation des éléments en traces dans le sol à l'échelle de l'agrégat

Distribution granulométrique

Les méthodes physiques de séparation des constituants d'un sol contaminé sont souvent considérées comme une première étape pour déterminer la spéciation des métaux (Conil et Clozel, 1999). Elles consistent à séparer les constituants de l'échantillon en fonction de leur taille et à analyser la localisation des éléments en traces au sein des fractions ainsi isolées. Le plus souvent, les plus fortes concentrations apparaissent liées aux constituants de la fraction la plus fine (Adamo *et al.*, 2003). Toutefois, une proportion variable des éléments en traces peut également être présente dans des minéraux de la taille des sables ou des limons (Qian *et al.*, 1996).

Extractions sélectives

La biodisponibilité des métaux est généralement évaluée par extraction d'une fraction de la quantité totale de métaux par l'intermédiaire des réactifs chimiques (Peters, 1999 ; Pickering, 1986). En général, on distingue quatre catégories d'extractants : les acides (HF, HCl, HNO₃, eau régale), les agents chélatants (EDTA, DTPA), les solutions salines (CaCl₂, NH₄NO₃) tamponées et non tamponées (Kabata-Pendias, 2001). Certaines de ces techniques d'extraction sont déjà normalisées ou en voie de normalisation en Europe (Lebourg *et al.*, 1996). Les extractants sont choisis pour leur aptitude à solubiliser une fraction de l'élément total corrélée avec la quantité d'élément prélevée par une plante test (figure 1.2).

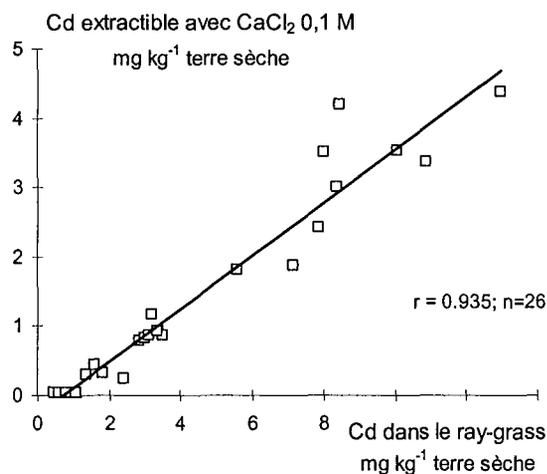


Figure 1.2 : Corrélation entre le cadmium extractible à l'aide d'un réactif d'extraction chimique (CaCl₂) et le prélèvement du métal par une plante test (d'après Wu, 1989)

Les méthodes chimiques sont souvent utilisées de façon séquentielle pour essayer de localiser les éléments en traces et mieux comprendre les processus qui influencent la biodisponibilité (Takagi, 1976 ; Tessier *et al.*, 1979). Chaque phase du traitement est censée correspondre à la dissolution d'un constituant particulier du sol. L'analyse par extraction séquentielle est alors une méthode indirecte d'estimation de la localisation des éléments en traces et non pas de leur spéciation proprement dite. Cette méthode peut d'ailleurs conduire à de nombreux artefacts comme l'absence de sélectivité des réactifs ou une refixation des éléments en traces préalablement extraits d'autres constituants du sol (Bermond et Malenfant, 1990 ; Bermond, 1992).

Spéciation en phase solide

Le devenir des éléments en traces dans les sols est essentiellement commandé par des processus d'incorporation dans des phases solides et/ou à la surface de ces solides (minéraux, colloïdes, polymères, microorganismes). La solubilité des espèces minérales ou organiques porteuses ainsi que la stabilité des complexes de surface sont très dépendantes des conditions physico-chimiques du milieu (Eh, pH ; Thiry et Van Oort, 1999).

Les analyses de spéciation des solides vont d'analyses globales jusqu'à des analyses de plus en plus détaillées. La diffraction des rayons X est une des premières étapes d'analyse d'un sol pollué par son coût relativement faible permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Buatier *et al.*, 2001 ; Burt *et al.*, 2003 ; Thiry et Van Oort, 1999). Toutefois, sa sensibilité est limitée (Hesterberg *et al.*, 1997). Des analyses plus précises peuvent être réalisées en complément sur des échantillons sélectionnés comme l'utilisation de microsondes ou des méthodes d'analyse des phases ultra-microscopiques (microfluorescence X sur rayonnement synchrotron, EXAF) (Hesterberg *et al.*, 1997 ; Juillot, 1998 ; Manceau *et al.*, 1999). Le couplage de ces différentes méthodes permet l'intégration de différentes échelles d'analyse et donne accès à la localisation et à la spéciation des métaux dans les sols.

Spéciation en phase liquide

Deux approches différentes peuvent être utilisées pour déterminer la spéciation des métaux dans la solution du sol. La première approche consiste en une détermination analytique. Plusieurs techniques sont disponibles pour mesurer l'activité des métaux en solution :

- les électrodes ioniques spécifiques qui permettent une mesure directe des ions libres (Cu : Sauvé *et al.*, 1995 ; Cd et Pb : Gupta et Jeanne D'Arc, 2000),
- les méthodes voltamétriques qui sont des méthodes électrochimiques plus sensibles pouvant être utilisées pour mesurer les concentrations des métaux labiles (Pardo *et al.*, 1990 ; Pardo *et al.*, 1994 ; Sauvé *et al.*, 2000a),
- les résines échangeuses d'ions, utilisées pour mesurer l'activité des métaux ou leur relative labilité (Agbenin *et al.*, 1999 ; Beveridge *et al.*, 1989 ; Slavek *et al.*, 1990),
- les films DGT (Diffusive Gradients in Thin films), basés sur l'utilisation d'un gel pour extraire les ions de la solution (Harper *et al.*, 1998 ; Harper *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 1998).

La seconde approche pour déterminer la spéciation des métaux en solution consiste à utiliser des modèles d'équilibres chimiques. Les programmes de modélisation de la spéciation en solution sont basés sur les principes de la thermodynamique et permettent de calculer la spéciation d'un système à l'équilibre sur la base des concentrations totales des composés. L'efficacité des programmes de spéciation dépend essentiellement de l'introduction dans le modèle des constantes d'équilibre exactes pour les espèces en question. Ainsi, la proportion de Cd libre dans la solution du sol peut varier de 16 à 82% en fonction des valeurs de $\log K$ utilisées pour modéliser les complexes Cd-matière organique dissoute (Krishnamurti et Naidu, 2003). Ces codes de calcul peuvent ainsi permettre d'estimer non seulement les concentrations des ions ainsi que leur activité en solution mais

aussi de modéliser la dynamique des flux entrant et sortant des métaux pour différents sols (Tipping *et al.*, 2003).

Méthodes isotopiques

Les méthodes isotopiques constituent un ensemble de techniques qui permettent de suivre, à l'aide de traceurs radioactifs ou stables, le devenir des éléments dans les systèmes sol-plante et par conséquent d'estimer leur phytodisponibilité. Ces méthodes ont montré tout leur intérêt pour l'étude de la dynamique des éléments nutritifs comme le phosphore (P), le potassium (K) ou l'azote (N) dans les systèmes sols-plantes (Fardeau, 1981). Elles ont été appliquées avec succès avec les éléments en traces (Ni : Echevarria, 1996 ; Echevarria *et al.*, 1998 ; Shallari, 1997 ; Cd : Gérard, 2000 ; Gérard *et al.*, 2001 ; Wu, 1989 ; Zn : Sinaj *et al.*, 1999).

La méthode des cinétiques d'échange isotopique consiste à introduire dans un système sol-solution en état stationnaire un isotope de l'élément étudié à une concentration qui ne modifie pas les équilibres initiaux, puis à suivre l'évolution de la concentration de l'isotope en solution. Les ions marqués s'échangent contre leurs isotopes présents dans le sol selon une loi cinétique dont les paramètres peuvent être calculés. Les travaux ont démontré l'identité entre les ions du sol qui participent à l'échange isotopique et ceux qui sont réellement assimilables par les végétaux (Fardeau et Jappé, 1976 ; Fardeau *et al.*, 1979 ; Fardeau, 1981). Cette observation fondamentale autorise donc la mesure de la taille du compartiment des ions assimilables du sol à partir du simple suivi de l'échange isotopique pour des temps courts.

2.2.2. Disponibilité biologique des métaux

Nous avons décrit les différentes méthodes accessibles pour déterminer l'offre du sol en éléments en traces. L'utilisation combinée de ces méthodes permet d'avoir une vision à la fois spatiale et temporelle du comportement des éléments en traces et de quantifier les risques de dissémination vers la biosphère. Toutefois, comme nous l'avons précisé au préalable, la biodisponibilité d'un contaminant ne peut être évaluée sans prendre en considération la « demande » de l'organisme cible.

Utilisation des végétaux

A priori, le meilleur outil pour mesurer la biodisponibilité des éléments en trace est l'organisme lui-même. La mesure de la phytodisponibilité consiste à déterminer la concentration des éléments en traces dans les tissus végétaux à la récolte. Cette mesure permet de déterminer les transferts réels de contaminants du sol vers la plante et d'évaluer les risques de contamination de la chaîne alimentaire. Cependant, les quantités mises en jeu ne reflètent généralement pas les quantités totales d'éléments phytodisponibles. Pour cela, la plante devrait absorber la totalité du compartiment biodisponible durant la période de culture. De plus, les expériences sont coûteuses en temps et la réponse reste spécifique de l'espèce ou de la variété étudiée, ce qui implique d'en utiliser un panel pour pouvoir appréhender la phytodisponibilité.

Des tests normalisés peuvent être utilisés pour juger de la phytotoxicité de substances par leurs effets sur la germination (AFNOR X31-201) et la croissance (AFNOR X31-202) des végétaux. En complément à de telles analyses, il est possible d'étudier l'effet des métaux sur le fonctionnement même de la plante en utilisant des biotests de toxicité chronique basés sur la mesure de marqueurs biochimiques (mesures d'activité enzymatiques par exemple).

Les plantes peuvent également être utilisées pour déterminer les quantités labiles d'un élément dans le sol grâce au principe de la dilution isotopique. Le compartiment labile du sol est, d'après Lopez et Graham (1970), la quantité de l'élément, dans la solution du sol et sur la phase solide, mesurée grâce à l'utilisation d'isotopes, soit par équilibre chimique (valeur *E*) soit par prélèvement par la plante (valeur *L*), qui devient assimilable pendant la durée de la

végétation. Le principe de la détermination de L est d'apporter un élément marqué dans une terre sur laquelle on cultive des végétaux et de mesurer en fin de culture l'activité spécifique de l'élément dans ces plantes. Les tests sur les végétaux donnent alors une image réelle de la phytodisponibilité.

Tests microbiologiques

Les microorganismes peuvent également être utilisés pour évaluer le biodisponibilité des métaux dans les sols. En effet, certaines activités ou biosynthèses enzymatiques sont inhibées par des éléments métalliques. Ainsi, MetPLATE est un test commercial basé sur l'inhibition de la β -galactosidase par les métaux chez un mutant d'*Escherichia coli* (Bitton *et al.*, 1994). Le test MetPLATE donne une réponse corrélée à celle des plantes tests (production de biomasse et prélèvement de métaux ; Morel *et al.*, 1997). Ce test a également été adapté par Boularbah *et al.* (2000) pour déterminer la toxicité des métaux dans des extraits de plantes. Les auteurs ont observé une augmentation de la toxicité métallique avec l'augmentation des concentrations des métaux dans les plantes. Ce test simple peut être utilisé pour évaluer rapidement l'accumulation en métaux dans les plantes (Boularbah *et al.*, 2003). Un autre test commercial, Microtox®, utilise les propriétés bioluminescentes de *Vibrio fischeri*. Initialement développés pour les milieux aquatiques, ces tests ont été adaptés avec succès aux matériaux solides (sols : Brohon et Gourdon, 2000 ; déchets : Bastian et Alleman, 1998).

2.3. Absorption des métaux par les plantes

La croissance des végétaux implique une interaction entre les propriétés des sols et celles des plantes. Le sol représente le milieu de croissance normal pour les végétaux en raison de sa fonction de réservoir dans lequel les racines peuvent puiser les nutriments et l'eau. Le flux d'absorption des éléments par la plante dépend de processus apparaissant à la fois dans les racines et dans le sol. Il est donc essentiel de suivre les mécanismes mis en jeu dans le sol et les plantes qui influencent la solubilité, la spéciation, la mobilisation et l'absorption ainsi que le transport des éléments en traces.

2.3.1. Les mécanismes d'absorption

La racine agit comme un puits vis-à-vis de l'eau et de ses solutés. Ces derniers migrent vers la racine à la fois par convection, ou flux de masse, et par diffusion (Barber, 1995). La convection représente le transport de la solution du sol selon le gradient de potentiel hydrique c'est à dire le flux d'eau suscité par la transpiration de la plante tandis que la diffusion représente un déplacement des solutés selon un gradient de concentrations.

L'environnement rhizosphérique et l'étendue avec laquelle les racines et la microflore associée modifient cet environnement sont fondamentaux dans l'absorption des nutriments, la transformation des xénobiotiques et l'adaptation des plantes aux perturbations chimiques du sol (Zhang et Pang, 1999).

Avant d'être absorbés par les cellules des racines, les ions peuvent circuler librement dans les espaces intercellulaires du cortex ou être retenus par les charges négatives des groupements carboxyliques des parois cellulaires (Barber, 1995). Le passage des métaux dans la cellule peut se faire passivement, par diffusion à travers la membrane plasmique, ou activement. Dans ce cas, le transport se fait contre un gradient de concentrations et nécessite de l'énergie. Les mécanismes d'absorption diffèrent selon l'élément concerné. Le Pb et le Ni par exemple sont préférentiellement absorbés par voie passive tandis que Cd, Cu, Mo et Zn sont préférentiellement absorbés par voie active (Kabata-Pendias, 2001).

2.3.2. Facteurs influençant l'absorption

Les facteurs affectant les quantités de métaux absorbés par une plante sont ceux contrôlant : (1) les concentrations et la spéciation du métal dans la solution du sol, (2) les mouvements de métaux du sol vers la surface racinaire, (3) le transport des métaux de la surface racinaire dans les racines et (4) leur translocation des racines vers les parties aériennes (Alloway, 1995c). Les conditions à l'interface sol-racine diffèrent sur plusieurs points des conditions présentes à distance des racines. Une absorption préférentielle d'ions ou d'eau conduit à des profils d'accumulation ou de dépression en ions. Les racines libèrent des ions H^+ ou HCO_3^- qui modifient le pH et consomment ou rejettent de l'oxygène qui modifie le potentiel redox. L'exsudation racinaire peut mobiliser des minéraux directement mais consiste principalement à fournir de l'énergie aux microorganismes de la rhizosphère. Ces modifications induites par la rhizosphère sont cruciales dans la nutrition minérale des plantes (Marschner, 1986).

La composition de la solution du sol

Plusieurs études ont démontré l'importance de la composition de la solution du sol sur la nature et l'intensité de l'adsorption des métaux par les sols et leurs constituants (Boekhold *et al.*, 1993 ; Naidu *et al.*, 1994 ; Zachara *et al.*, 1993). Dans la majorité des cas, le phénomène principal responsable de l'adsorption du Cd et du Zn est l'échange ionique (Cavallaro et McBride, 1978 ; Fotovat et Naidu, 1998 ; McBride *et al.*, 1981). L'augmentation de la force ionique de la solution conduit à une augmentation des quantités de métaux solubles (Fotovat et Naidu, 1998). Les ions Ca^{2+} sont des compétiteurs forts des ions Cd^{2+} pour les sites d'échange. La présence de Ca^{2+} en fortes concentrations réduit fortement l'efficacité de l'adsorption du Cd par les charges permanentes des argiles (Kookana et Naidu, 1998). Les concentrations du Zn soluble sont également contrôlées par la complexation avec la matière organique dissoute (MOD) (Fotovat et Naidu, 1998). Les concentrations du Cu, et dans une moindre mesure du Zn, augmentent avec les concentrations croissantes de la MOD (Yin *et al.*, 2002).

Le pH

Les modifications de pH rhizosphérique sont principalement dues à l'excrétion de H^+ et de HCO_3^- par les racines. Cette excrétion est liée au ratio cations absorbés/anions absorbés (Marschner, 1986). La forme d'apport azoté a la plus forte influence sur ce ratio et par conséquent sur le pH rhizosphérique. Ainsi, l'apport d'azote ammoniacal est corrélé positivement avec une absorption préférentielle de cations et une plus forte excrétion de protons par rapport à HCO_3^- ou OH^- tandis qu'un apport sous forme nitrates produit l'effet inverse (Marschner *et al.*, 1982 ; Marschner et Römheld, 1983). La baisse de pH consécutive à l'apport d'ammonium peut se traduire par une dissolution de minéraux (phosphates, MnO_2) et/ou une absorption plus importante de métaux (Cd, Mn) (Marschner, 1988, 1991 ; Wu, 1989). D'autres matières fertilisantes comme le fumier (del Castilho *et al.*, 1993) ou l'urée (Lavado *et al.*, 1999 ; Mitchell *et al.*, 2000 ; Tu *et al.*, 2000) provoquent des baisses de pH et une augmentation de la biodisponibilité et de l'absorption des métaux. Les effets de l'apport d'N sous forme nitrate sur le pH sont moins caractéristiques, les nitrates pouvant par exemple augmenter la toxicité du Ni chez le tournesol et fortement réduire sa croissance (Zornoza *et al.*, 1999).

Le potentiel redox (Eh)

Le potentiel redox intervient dans la dynamique de nombreux éléments en traces, en particulier ceux formant des oxydes, comme MnO_2/Mn^{2+} , Fe(III) oxydes/ Fe^{2+} , ou bien ceux fixés sur des oxydes (ex. : Co, Cu, Ni, Cd, Zn) (Alloway, 1995b ; Jung et Thornton, 1997). Des modifications de Eh peuvent affecter la répartition du Cd entre les différentes formes chimiques du métal. Il a été démontré qu'une augmentation de Eh de -150 à 500 mV conduisait à une diminution de la concentration du Cd échangeable et une augmentation des formes réductibles (Khalid *et al.*, 1981). Dans les sols hydromorphes, le Eh est

particulièrement bas, entraînant des concentrations élevées et phytotoxiques des éléments dans la solution du sol (Marschner, 1991). Ainsi, dans les sols de rizière, en conditions réductrices, on trouve de relativement fortes concentrations des métaux échangeables, du fait d'une possible dissolution des métaux présents dans les oxydes de Fe et de Mn (Jung et Thornton, 1997).

L'exsudation racinaire

L'exsudation racinaire correspond à l'ensemble des éléments et des composés libérés dans le sol par les racines des végétaux. Elle inclut des ions (protons, hydroxydes, bicarbonates) des matières organiques particulières (tissus, cellules exfoliées, mucilages) ou solubles (sucres simples, acides aminés et acides organiques, phénols), ainsi que des gaz (dioxyde de carbone, oxygène, éthylène) et des composés volatils (acides gras) (Rovira, 1969 ; Rovira *et al.*, 1979 ; Uren et Reisenauer, 1988). Les exsudats racinaires peuvent intervenir soit directement en mobilisant les éléments en traces peu mobiles (Mn : Godo et Reisenauer, 1980 ; Fe : Röhmeld et Marschner, 1986a, b ; Von Wirén, 1994 ; P : Dinkelaker *et al.*, 1989 ; Grimal, 1994 ; Marschner, 1986), soit indirectement via leur influence sur les populations microbiennes de la rhizosphère et les effets de ces organismes sur la solubilisation et l'acquisition des éléments (Uren et Reisenauer, 1988).

Les exsudats racinaires doivent également être pris en compte dans la dynamique d'éléments comme Cu, Zn, Cd ou Pb. Ainsi, les acides muginéliques libérés par les graminées peuvent former des complexes avec d'autres métaux que le Fe, par exemple Co(III), Cu(II) et Zn(II) (Mench, 1992). Certains métaux (Cr : Srivastava *et al.*, 1999 ; Cd : Cieslinski *et al.*, 1998 ; Krishnamurti *et al.*, 1997 ; Naidu et Harter, 1998) formeraient également des complexes mobiles avec des acides organiques de faible poids moléculaire, influençant ainsi leur mobilité et leur absorption (Mench *et al.*, 1990). Chez le maïs, différentes études ont prouvé que les exsudats racinaires pouvaient former des liaisons avec les métaux (Mench *et al.*, 1987 ; Mench *et al.*, 1988 ; Morel *et al.*, 1986) avec des variations en fonctions des fractions, les mucilages présentant une faible capacité de liaison (10 à 20 meq 100 g⁻¹ MS) par rapport à celle des exsudats solubles (160 à 200 meq 100 g⁻¹ MS) (Morel *et al.*, 1987).

Les exsudats racinaires pourraient également jouer un rôle dans la détoxification des métaux (acides aminés et Ni : Salt et Baker, 2000 ; acide citrique et Al : Yang *et al.*, 2000). Une fonction des mucilages serait de protéger l'apex contre une pénétration excessive de certains métaux comme Pb et Cu. A l'inverse, le transfert de métaux très mobiles et plus faiblement retenus (Cd, Zn) pourrait être accéléré dans ces phases hydratées solides (Naidu et Harter, 1998 ; Wu, 1989). Il faut toutefois noter que l'effet des acides organiques sur l'absorption des métaux par les plantes va dépendre fortement des propriétés biologiques et physico-chimiques du sol étudié (Jones et Darrah, 1994) et notamment du pH (Naidu et Harter, 1998).

2.3.3. Transport et stockage des métaux dans la plante

Les éléments en traces sont absorbés, soit passivement par la racine, soit activement par un processus métabolique (Marschner, 1986). Selon les espèces, les éléments et leur concentration dans le sol, les métaux sont retenus dans les racines ou bien transportés dans les parties aériennes ou encore uniformément répartis dans la plante (Kabata-Pendias, 2001). Les oligo-éléments, tout comme les macro-éléments, se déplacent dans la racine à la fois par voie apoplasmique et symplasmique. Le transport xylémique peut se faire soit sous forme ionique (Mn : White *et al.*, 1981a, b ; Pb : Kochian, 1991 ; Co : Tiffin, 1976) soit sous forme de complexes organométalliques. C'est le cas du Fe (Tiffin, 1976) et du Zn (White *et al.*, 1981a, b) qui sont véhiculés sous forme associée à l'acide citrique et à l'acide malique ainsi que du Cu (White *et al.*, 1981a, b) et du Ni (Krämer *et al.*, 1996) liés à des acides

aminés. Il existe donc une barrière physiologique limitant le transfert de la majorité des polluants vers les parties aériennes des végétaux.

Dans les parties aériennes, les éléments en traces sont stockés principalement dans les organes végétatifs, le transfert vers les organes de reproduction ou de réserve restant généralement très minoritaire. C'est le cas notamment du Cd pourtant relativement mobile, mais dont la translocation vers les tissus est réduite par sa forte affinité pour les sites d'échange présents au niveau des parois cellulaires, conduisant ainsi à son accumulation dans les racines (Kabata-Pendias, 2001). Une translocation importante du Zn vers les graines a cependant été mise en évidence chez le maïs (Jahrausch-Wehrheim *et al.*, 1999). En fait, en présence de concentrations normales, le Zn est rapidement distribué des racines vers les tiges où il peut être momentanément stocké puis redistribué vers les tissus végétatifs en croissance, les organes reproducteurs et les graines. Par contre, lors d'un apport supplémentaire, par exemple par des boues urbaines, les organes de stockage ne sont plus les graines mais les feuilles et la tige.

3. Les voies de décontamination des sols pollués par les éléments en traces

La décontamination des sols pollués par les éléments en traces est devenue dans de nombreux cas une nécessité. Le traitement des sols contaminés ne consiste pas exclusivement en une extraction des polluants. On peut également faire appel à des techniques de mise en sécurité. Il s'agit alors de confiner le site à l'aide de couvertures ou de barrières verticales étanches de façon à empêcher les flux de substances polluantes dans l'environnement. Ces dernières méthodes ne représentent alors que des mesures provisoires en attente d'une future remédiation généralement inévitable.

Les méthodes de remédiation sont classées selon leur localisation et les processus impliqués. Ainsi nous pouvons distinguer les méthodes appliquées *in situ*, sur site ou *ex situ* et mettant en œuvre des processus thermiques, chimiques, physiques ou biologiques. Nous allons donc décrire ici les principaux procédés applicables aux pollutions métalliques (Koning *et al.*, 2000 ; Lecomte, 1995 ; Nyer, 1993).

3.1. Les voies physico-chimiques

Les procédés de traitement des sols par voies physico-chimiques principalement utilisés sont l'extraction et ou le lavage par voie physique (Koning *et al.*, 2000). Le principe est alors de concentrer le contaminant dans une fraction résiduelle par séparation des matériaux.

3.1.1. Les méthodes par piégeage de la pollution

Les méthodes physiques de piégeage de la pollution consistent à empêcher le flux de contaminants dans le milieu naturel. Ce ne sont généralement que des solutions transitoires pour immobiliser les métaux sur place sans les extraire. La stratégie d'immobilisation consiste principalement à introduire une substance qui va réduire les transferts de métaux toxiques en diminuant leur solubilité. Plusieurs substances peuvent être utilisées telles la béringite (Vangronsveld *et al.* 1995a, b), les argiles (Garcia-Sanchez *et al.*, 1999 ; Lothenbach *et al.*, 1999), la grenaille d'acier (Sappin-Didier et Gomez, 1994), l'hydroxyapatite (Boisson *et al.*, 1999 ; Zhang et Ryan, 1998) ou encore un gel de polyacrylate Na-K (Torres et Varennes, 1998).

La vitrification permet également de confiner les métaux dans les sols. Le sol contaminé en place est porté à très haute température, de l'ordre de 2000°C, de façon à obtenir un matériau fondu inerte. Les métaux sont alors incorporés au verre sous une forme chimique stable, avec une très faible quantité d'éléments lixiviables.

3.1.2. Les méthodes par extraction de la pollution

L'excavation

L'excavation de terres contaminées consiste à les extraire du milieu dans lequel elles se trouvent pour qu'elles subissent un traitement sur site, hors site (dans un centre de traitement spécialisé) ou qu'elles soient stockées (dans un centre d'enfouissement technique). Le site ainsi assaini devra être remblayé avec des terres ou matériaux exogènes afin de recouvrer des propriétés aptes au développement d'organismes vivants. Cette technique radicale s'applique en cas d'extrême urgence ou encore comme opération préliminaire à une autre méthode de remédiation.

Les méthodes de lavage

Les méthodes de lavage sont réalisables tant sur site que hors site. Elles consistent à injecter un liquide dans le milieu puis à le pomper et le traiter après passage dans la zone de sol contaminée. Lors du lavage par voie « physique » la terre subit un tri granulométrique préalable permettant de concentrer les métaux dans la fraction la plus fine. Les solutions de lavage utilisées peuvent contenir des extractants (Pichtel et Pichtel, 1997 ; Steele et Pichtel, 1998), des surfactants (Doong *et al.*, 1998), des acides organiques (Wasay *et al.*, 1998) ou des acides.

Les méthodes électro-chimiques

Les méthodes électrochimiques consistent à utiliser deux électrodes par lesquelles circule un courant continu de forte puissance (Marceau *et al.*, 1999 ; Reddy *et al.*, 1999). Les métaux, transportés par l'intermédiaire d'une solution, se concentrent alors à la cathode d'où ils pourront être extraits. La solution est constituée d'eau et d'additifs chimiques tels HCl (Le Hecho *et al.*, 1998) ou des agents complexants (Wong *et al.*, 1997).

Les méthodes thermiques

Les méthodes thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire les polluants. Les métaux se retrouvent, soit dans les effluents gazeux lorsqu'ils sont volatilisables (Hg, Cd, Pb), soit dans les résidus solides de la combustion. Les effluents gazeux chargés en polluants sont condensés puis filtrés. Les déchets ultimes devront faire l'objet d'une élimination appropriée.

3.2. Les méthodes biologiques

Les méthodes physico-chimiques décrites précédemment sont souvent coûteuses et généralement appropriées à la décontamination de petites zones de pollution aiguë où la pression d'occupation des sols est forte. De plus, ces techniques affectent l'activité biologique des sols et dégradent leur structure en ne laissant, bien souvent, qu'un résidu stérile.

Les voies biologiques de décontamination des sols apparaissent alors comme des méthodes de substitution ou complémentaires, moins coûteuses et plus respectueuses des caractéristiques des sols (McCarty, 1991 ; Schwartz *et al.*, 1999a). Elles font intervenir des bactéries, des champignons et/ou des végétaux supérieurs. Parmi les techniques employées, notons la dégradation microbiologique qui est utilisée pour les composés organiques (HAP, pesticides ; Bouwer *et al.*, 1994 ; Broholm et Arvin, 2000 ; Morgan et Watkinson, 1989) ; la biolixiviation qui fait intervenir des microorganismes vivants pour extraire les métaux de milieux où ils sont insolubles (Bosecker, 1997 ; Krebs *et al.*, 1997) ou encore la biovolatilisation qui concerne essentiellement le Hg (Lloyd et Lovley, 2001), celui-ci étant volatilisé après réduction dans le sol par des microorganismes ou des enzymes extracellulaires (Iwahori *et al.*, 2000).

Une autre voie de décontamination biologique consiste à utiliser un couvert de plantes hypertolérantes et/ou hyperaccumulatrices de métaux pour extraire les métaux des sols

et/ou réduire leur dissémination par érosion. La phytoremédiation se définit donc comme l'utilisation de plantes pour extraire ou rendre moins biodisponibles les contaminants de l'environnement (Cunningham et Berti, 1993 ; Morel *et al.*, 1997 ; Schwartz, 1997). Elle se subdivise en plusieurs catégories (Baker *et al.*, 1997 ; Salt *et al.*, 1995) :

- la phytostabilisation est l'installation de végétaux tolérant la présence de substances toxiques dans les sols afin de réduire la mobilité des éléments en traces. Elle limite l'érosion et immobilise la pollution dans les couches superficielles évitant la migration vers les eaux de surface et souterraines. La phytostabilisation concerne essentiellement le Pb et le Cr. Des apports d'amendements au sol (par exemple la béringite) associés à une revégétalisation réduisent l'érosion des sols et permettent d'inactiver les métaux (Vangronsveld *et al.*, 1995a, b),
- la phytovolatilisation est caractérisée par l'absorption d'éléments (Se, Hg) puis leur relargage sous forme méthylée dans l'atmosphère (Bañuelos *et al.*, 1993 ; Terry *et al.*, 1992),
- la rhizofiltration pour laquelle des plantes absorbent, précipitent et concentrent les métaux toxiques d'effluents pollués,
- la phytoextraction pour laquelle des plantes hyperaccumulatrices de métaux sont cultivées pour transporter et concentrer les métaux du sol vers les parties aériennes.

Le coût de la remédiation des sols varie fortement et dépend du type de contaminants concernés, des propriétés des sols et des conditions du site (Lasat, 2000). L'estimation des coûts associés aux principales techniques de remédiation des sols contaminés montre une très forte variabilité (tableau 1.4). La phytoremédiation apparaît comme une alternative à moindre coût de la remédiation des sols. Outre l'aspect économique, la phytoextraction offre d'autres avantages (Ensley, 2000). En tant que méthode *in situ*, elle permet de ne pas perturber le site et de maintenir le fonctionnement biologique des sols. La phytoextraction s'intéresse particulièrement à la fraction biodisponible des métaux des sols. Cela rend la technique compatible avec les objectifs de remédiation autorisant le maintien des métaux non mobiles dans les sols. En outre, en tant que technique verte, la phytoextraction reçoit un accueil particulièrement favorable de la part de l'opinion publique. Si le coût est un avantage certain, la durée de traitement est l'inconvénient majeur de la phytoextraction.

Tableau 1.4 : Coût des différentes techniques disponibles pour la remédiation des sols (d'après Glass, 2000)

Technique	Coût (en dollars par tonne)
Traitement chimique	100-500
Lavage des sols	75-200
Lixiviation des sols	40-190
Vitrification (réactif)	75-90
Vitrification (thermique)	250-425
Désorption thermique	150-500
Traitement thermique	170-300
Electrocinétique	20-200
Incinération	200-1500
Mise en dépôt	100-500
Phytoremédiation	25-100

4. La phytoextraction des sols contaminés par les métaux

L'état des lieux sur la contamination des sols par les métaux nous a montré que les sols en sont un réceptacle majeur. Les activités anthropiques, consommatrices et productrices d'éléments en traces, contribuent à leur dissémination dans l'environnement. Dans les pays industrialisés, de très grandes surfaces de terre sont ainsi concernées par des contaminations plus ou moins intenses. Dès lors, il est indispensable de pouvoir évaluer les

risques de transferts des éléments en traces vers la chaîne alimentaire et vers l'Homme afin de mettre en œuvre une stratégie de décontamination lorsque cela s'avère nécessaire. Face à la dilution des contaminations sur des surfaces sans cesse croissantes, les techniques physico-chimiques traditionnelles de remédiation trouvent leurs limites d'application. Depuis plus de dix ans, de nombreux travaux de recherche ont contribué à développer la phytoextraction comme une alternative ou un complément aux techniques traditionnelles.

4.1. Distribution géographique et écologie des plantes hyperaccumulatrices

Certaines espèces végétales sont capables d'accumuler des quantités fortes et inhabituelles d'éléments en traces potentiellement phytotoxiques (par exemple Cd, Co, Cu, Pb, Ni et Zn) à partir de sols métallifères (Baker et Brooks, 1989). De telles plantes sont appelées hyperaccumulatrices. Le terme « hyperaccumulation » fut introduit pour la première fois pour désigner les plantes qui contenaient plus de 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Ni dans la matière sèche (Jaffré *et al.*, 1974). Initialement, les plantes hyperaccumulatrices ont été étudiées à des fins d'exploration minière (Brooks, 1983). Leur découverte remonte au XIX^{ème} siècle (Brooks, 1998). En effet, c'est en 1885 que Baumann découvrait plus de 1% de Zn dans la matière sèche de spécimens de *Viola calaminaria* et *Thlaspi calaminaria* poussant sur des dépôts de calamine à Aachen (Allemagne). Dans les années 1930, Beath et ses collaborateurs notaient l'hyperaccumulation de Se dans des spécimens d'*Astragalus* de l'Ouest américain tandis qu'en 1948, Vergnano et Minguzzi découvraient l'hyperaccumulation inhabituelle de Ni par *Alyssum bertolonii* sur la serpentine de Tuscau.

A partir des années 70, un grand nombre d'études sur les hyperaccumulateurs de Ni des sols tropicaux d'origine ultramafique ont été réalisées par Brooks et ses collaborateurs (Reeves et Baker, 2000). Leurs travaux ont permis d'établir l'existence de plus de 320 hyperaccumulateurs de Ni dont les deux tiers sont tropicaux (Reeves, 2003). La domination des hyperaccumulateurs de Ni (des sols d'origine ultramafique) serait principalement due à une large répartition de ces sols dans le monde. En outre, les sols dérivés de roches ultramafiques apparaissent, dans beaucoup de zones du globe, comme ayant donné lieu à l'évolution la plus étendue d'espèces nouvelles. Dans de nombreux cas, ces espèces sont restées endémiques de ce type de sol (Reeves, 2003). Les espèces hyperaccumulatrices de Ni se distinguent en deux groupes phylogénétiques et biogéographiques : quelques genres de la famille des Brassicaceae en zone tempérée de l'hémisphère nord et un groupe plus diversifié de genres tropicaux représentant les familles des Violaceae, Flacourtiaceae, Cunoniaceae et Euphorbiaceae.

Concernant les autres éléments que le Ni, les hyperaccumulateurs de Co et de Cu sont restreints en grande majorité à la République Démocratique du Congo. Les deux métaux apparaissent ensemble dans les sols métallifères et dans les plantes en proportion variables (Reeves et Baker, 2000). Les hyperaccumulateurs de Mn semblent n'être trouvés que sur les sols ultramafiques tropicaux ou subtropicaux où les concentrations du Mn total sont légèrement supérieures aux valeurs généralement rencontrées (Brooks *et al.*, 1981). Quelques hyperaccumulateurs de Pb ont été recensés exclusivement sur des sites de minéralisation du Pb et du Zn ou des déchets de mines ou de fonderies. De nombreux travaux réalisés ces vingt dernières années ont permis d'établir un inventaire des espèces de plantes présentant une hyperaccumulation d'éléments variés (tableau 1.5).

En Europe de telles plantes endémiques se retrouvent sur les sites naturels riches en métaux et les mines anciennement exploitées. Elles sont essentiellement représentées par des espèces des genres *Alyssum* et *Thlaspi* (Brassicaceae) des sols de serpentine et *Thlaspi* des sols de calamine (Baker *et al.*, 1991). Un exemple est l'espèce *Thlaspi caerulescens* (photographie 1.1) qui peut atteindre des concentrations du Zn et du Cd de

21 000 et 164 mg kg⁻¹ (Baker *et al.*, 1994b) et jusqu'à 40 000 mg kg⁻¹ de Zn et 3 000 mg kg⁻¹ de Cd (Reeves *et al.*, 2001 ; Schwartz *et al.*, 2003).

Tableau 1.5 : Nombre d'espèces hyperaccumulatrices connues à ce jour dans le monde (d'après Reeves, 2003)

Eléments	Concentration dans les plantes (mg kg ⁻¹)	Nombre d'espèces
Zinc	10 000	11
Manganèse	10 000	12
Nickel	1 000	> 320
Cobalt	1 000	30
Cuivre	1 000	34
Sélénium	1 000	20
Plomb	1 000	14
Cadmium	1 000	1
Arsenic	1 000	4



Photographie 1.1 : *Thlaspi caerulescens* (source : Ch. Schwartz)

4.1. Mécanisme de tolérance

La toxicité des éléments en traces, qu'ils soient essentiels (Cu, Zn, Ni) ou non (Cd, Hg, Pb) s'exprime à des seuils plus ou moins élevés selon la sensibilité des plantes. Généralement, les plantes répondent à la présence de métaux dans les sols par des stratégies d'exclusion, d'indication ou d'accumulation (Baker, 1981 ; figure 1.3). Les mécanismes de tolérance mis en œuvre par les plantes consistent en un ensemble de processus métaboliques (Kabata-Pendias, 2001) : (1) un prélèvement sélectif des ions, (2) une réduction de la perméabilité membranaire ou d'autres modifications de la structure et de la fonction des membranes, (3) une immobilisation des ions dans les organes, (4) une modification des voies métaboliques, (5) une adaptation au remplacement des métaux liés aux enzymes par des éléments en traces, (6) l'exclusion des ions par lessivage des feuilles, guttation ou excrétion racinaire, (7) l'exclusion des composés organométalliques volatils et (8) l'excrétion de sels métalliques par les feuilles.

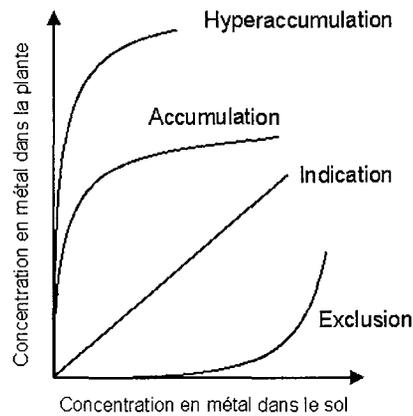


Figure 1.3 : Réponse des plantes à la présence de métaux dans le sol (d'après Baker, 1981)

Le rôle écologique de l'hyperaccumulation n'est pas encore complètement élucidé. Il a été suggéré que l'accumulation des métaux procure une protection contre les attaques par les champignons et les insectes (Boyd et Martens, 1992). D'autres travaux ont confirmé la fonction protectrice de l'hyperaccumulation du Ni contre des pathogènes fongiques et bactériens chez *Streptanthus polygaloides* (Boyd *et al.*, 1994) et contre des attaques d'insectes herbivores chez *S. polygaloides* et *Thlaspi montanum* (Boyd et Martens, 1994 ; Martens et Boyd, 1994). Un effet du Zn contre les herbivores a également été démontré chez l'hyperaccumulateur *T. caerulescens* (Pollard et Baker, 1997). La production de glucosinolates par les plantes est un mécanisme courant chez les Brassicaceae, et des concentrations élevées en glucosinolates ont été mesurées chez certaines espèces hyperaccumulatrices de Zn (Mathys, 1977). Ainsi, il a été suggéré que les glucosinolates interviendraient dans les mécanismes de tolérance au Zn. Selon les travaux de Ernst (1990), les concentrations élevées en glucosinolates chez les métalrophytes de la famille des Brassicaceae pourraient intervenir comme un mécanisme de défense contre les pathogènes fongiques. L'étude de Tolrà *et al.* (2001) sur l'influence de l'hyperaccumulation du Zn sur les glucosinolates chez *T. caerulescens* montre que les concentrations des glucosinolates diminuent dans les feuilles tandis qu'elles augmentent dans les racines avec l'augmentation des concentrations du Zn dans les tissus. Les auteurs suggèrent un rôle des glucosinolates en tant que l'un des systèmes de défense de la plante contre les pathogènes. Dans les feuilles, la présence des glucosinolates en concentrations élevées viendrait suppléer les faibles concentrations du Zn tandis que dans les racines les deux mécanismes s'additionneraient pour renforcer la défense de la plante.

4.3. Cycle des métaux dans le système sol contaminé – plante hyperaccumulatrice

Si de nombreuses études ont été réalisées sur l'effet des métaux sur la matière organique des sols, peu d'études concernent l'effet de la décomposition de la matière organique sur le cycle des métaux dans les systèmes plante métalrophytes - sol contaminé. La matière organique joue un rôle majeur dans la dynamique des éléments en traces dans les sols pollués (Harter et Naidu, 1995). Balabane *et al.* (1999), ont montré que la qualité de la matière organique d'une pelouse métallicole du Nord de la France se distinguait de celle des prairies selon trois critères : une accumulation de litière holorganique, une localisation du stock de carbone dans la couche superficielle et une forte proportion du carbone présent sous forme de matière organique particulaire. La répartition des métaux sur le site suit un gradient latéral (Dahmani-Muller *et al.*, 2000 ; Schwartz *et al.*, 2001b) : sous couvert de plantes métalrophytes strictes, de très fortes concentrations des éléments en traces sont observées dans l'horizon Ah (horizon organo-minéral) tandis que sous couvert de plantes pseudométalrophytes, les concentrations totales des éléments en traces dans l'horizon Ah

sont systématiquement inférieures. Ceci s'expliquerait par une extraction accrue des métaux par les métallophytes et leur immobilisation dans les tissus végétaux (Schwartz *et al.*, 2001b). Après sénescence des plantes, les résidus retournent à la surface du sol où ils sont accumulés. En effet, la présence de métaux en fortes concentrations dans les tissus limite leur dégradation et par conséquent la mobilité des métaux (Balabane *et al.*, 1999). Le même phénomène a été observé par Uhlig *et al.* (2001) sous couvert d'*Empetrum nigrum*, hyperaccumulateur de Ni et de Cu, sous une forêt fortement contaminée en ces éléments. Perronnet (2000) et Perronnet *et al.* (2000) montrent que l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices augmenterait la vitesse du cycle des métaux sur les sites contaminés par une augmentation des flux ascendants sol - plante avec un fort prélèvement des métaux dans les horizons inférieurs et leur concentration dans les tissus végétaux, entraînant un appauvrissement du compartiment assimilable des sols.

4.4. Un modèle de plante hyperaccumulatrice pour la phytoremédiation : *Thlaspi caerulescens*

L'hyperaccumulateur *T. caerulescens* J. & C. Presl fait partie de la famille des Brassicaceae et du genre *Noccaea*, Série *Alpestre* (Meyer, 1973). Il présente une large répartition géographique en France (Reeves *et al.*, 2001) et il a la particularité de pouvoir se développer sur de nombreux types de sites et de substrats tels que les sols miniers riches en Zn/Pb/Cd, les déchets de fonderie, les sols de serpentine à concentration élevée en Ni, sur les déchets et leurs produits dérivés ou encore sur des sols non métallifères (Meerts et Van Isacker, 1997 ; Reeves et Brooks, 1983 ; Schwartz, 1997). En Angleterre ainsi qu'au Pays de Galles, *T. caerulescens* est classé comme métallophyte absolue (Baker et Proctor, 1990). Dans la flore européenne (Clapham et Akeroyd, 1993), *T. caerulescens* est divisé en deux sous-espèces en fonction de son caractère bisannuel (*caerulescens*) ou pérenne (*virens*). Cette seconde sous-espèce est confinée dans la région sud-ouest des Alpes tandis que la première est très largement répandue. *T. caerulescens* s.e. *caerulescens* est décrite comme étant très variable avec de nombreuses variantes locales ayant, à l'occasion, fait l'objet de taxons spécifiques (Dvorakova, 1968 ; Jordan, 1846 ; Meyer, 1973). Les populations de *T. caerulescens* se développant sur des sols contaminés et sur des sols "normaux", c'est à dire à faibles concentrations des métaux, sont souvent distinguées en deux taxons, sur la base de nombreux traits morphologiques, respectivement s.e. *calaminare* Dvor. et s.e. *caerulescens*. Mais cette classification est très controversée. Récemment, Meerts et Van Isacker (1997) ont utilisé cette classification tout en précisant qu'ils le faisaient par commodité pour désigner les plantes sur ces deux types de substrats, sans qu'aucune affirmation ne soit faite sur leur séparation taxonomique. Koch *et al.* (1998) ont étudié le degré de variation génétique entre 28 populations de *T. caerulescens* d'Europe de l'Ouest à partir d'études génétiques basées sur l'analyse des isozymes pour comparer la diversité inter- et intra-population. Leurs résultats indiquent qu'une subdivision taxonomique de *T. caerulescens* n'est pas possible et que la tolérance aux métaux a dû évoluer au moins deux fois chez les populations des différentes aires.

4.4.1. Prélèvement et accumulation des éléments en traces par les hyperaccumulateurs

Différents mécanismes peuvent intervenir dans le prélèvement particulièrement élevé des métaux par les hyperaccumulateurs (Hutchinson *et al.*, 2000) : (1) une densité des sites d'absorption plus importante sur les membranes des cellules racinaires, (2) un transport plus rapide au sein de la plante, (3) une prolifération des racines dans les zones fortement concentrées en métaux (Keller *et al.*, 2003 ; Schwartz *et al.*, 1999b ; Whiting *et al.*, 2000), (4) une acidification de la rhizosphère et (5) une libération de phytométallophores dans la rhizosphère.

Mécanismes rhizosphériques

Nous avons vu précédemment que les plantes non hyperaccumulatrices augmentaient leur prélèvement de nutriments en réduisant le pH rhizosphérique, en modifiant le potentiel redox, en libérant des composés organiques ou encore en modifiant la morphologie de leur système racinaire. Le fait que Zn et Ni puissent être accumulés à la fois à partir de sols bien ou mal pourvus en métaux (Brown *et al.*, 1994 ; McGrath *et al.*, 1993 ; Schwartz, 1997) suggère qu'un mécanisme actif soit impliqué dans l'acquisition des métaux de la phase minérale du sol.

Chez les plantes hyperaccumulatrices, l'acidification de la rhizosphère ne constituerait pas un mécanisme par lequel ces plantes solubilisent les métaux. En effet, le pH n'est pas significativement différent dans des terres cultivées avec des espèces hyperaccumulatrices ou non, qu'elles soient contaminées en Ni (*Alyssum murale* / *Raphanus sativus* : Bernal et McGrath, 1994) ou en Zn (*T. caerulescens* / *T. ochroleucum* : McGrath *et al.*, 1997 ; *T. caerulescens* / *T. arvense* : Whiting, 1998). Dans certains cas, une augmentation du pH de la solution du sol a pu être observée après culture de *T. caerulescens* (Knight *et al.*, 1997 ; Luo *et al.*, 2000 ; Perronnet, 2000 ; Schwartz, 1997).

L'hyperaccumulation des métaux chez certaines plantes pourrait être expliquée par une aptitude à solubiliser les métaux dans la rhizosphère. Une étude de Whiting (1998) sur l'allocation du carbone aux racines de *T. caerulescens* montre une augmentation au voisinage des racines se développant dans des inclusions de terre enrichies en Zn par rapport aux racines développées dans le sol témoin. Toutefois, l'étude n'a pas permis de préciser le rôle des composés carbonés (rôle structurel ou de mobilisation), laissant supposer un possible rôle dans l'acquisition du Zn par *T. caerulescens*. Chez l'hyperaccumulateur de Ni *T. gœsingense* il a été montré, en conditions hydroponiques, que les exsudats racinaires ne semblaient pas comporter de chélatants, tandis que le non hyperaccumulateur *T. arvense* présentait du citrate et de l'histidine (Salt *et al.*, 2000). Dans ce cas, la production d'exsudats racinaires interviendrait dans les mécanismes de détoxification du Ni au voisinage des racines. Récemment, une étude *in situ* de *T. gœsingense* a mis en évidence une augmentation de la concentration du carbone organique et du Ni solubles dans la rhizosphère des plantes par rapport au sol non rhizosphérique (Wenzel *et al.*, 2003). Ainsi, l'exsudation de ligands organiques contribuerait à l'augmentation de la solubilité et au réapprovisionnement des métaux dans la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices. Il semblerait que la microflore bactérienne des sols joue aussi un rôle dans la mobilisation des métaux de la rhizosphère. Ainsi, Whiting *et al.* (2001a) ont montré que les microorganismes intervenaient dans la solubilisation du Zn non labile et augmentaient l'extraction du Zn par *T. caerulescens*. Plusieurs études sur l'effet de *T. caerulescens* sur les microorganismes du sol ont mis en évidence une augmentation de la sélection de bactéries résistantes dans la rhizosphère des plantes (Abouddrar *et al.*, 2003 ; Delorme *et al.*, 2001).

Un des mécanismes mis en avant dans le prélèvement élevé des métaux par *T. caerulescens* est la forte densité racinaire dans les sols enrichis en Zn comparé aux sols témoins (Schwartz, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1999b ; Whiting *et al.*, 2000). Les zones polluées en Zn et en Cd biodisponibles sont fortement explorées par les racines, augmentant ainsi la longueur du système racinaire. Whiting (1998) a également observé un réseau dense de poils absorbants chez *T. caerulescens*. Le prélèvement des métaux serait stimulé par cette zone pilifère active en augmentant la concentration d'exsudats par unité de volume de sol et en accentuant le flux de transpiration, favorisant l'acquisition du Zn ainsi que son transport vers les parties aériennes.

Même si *T. caerulescens* prélève de grandes quantités d'éléments en traces, ceux-ci proviennent des mêmes compartiments du sol que ceux prélevés par des plantes non hyperaccumulatrices (Gérard *et al.*, 2000 ; Hutchinson *et al.*, 2000). Ce phénomène avait

déjà été démontré pour l'hyperaccumulateur de Ni, *A. murale* (Shallari, 1997). Il s'avèrerait que *T. caerulescens* a une capacité limitée à prélever du Zn fortement lié à la phase minérale (Whiting, 1998). Une étude menée en vases de végétation par Whiting *et al.* (2001b) avec des amendements en Zn sous des formes présentant des biodisponibilités différentes a montré que de façon générale l'absorption du Zn par *T. caerulescens* est corrélée à sa biodisponibilité dans les sols sauf lorsque le Zn est apporté sous forme de sulfures. Dans ce cas, *T. caerulescens* accède à une fraction non labile du Zn. Toutefois, les auteurs expliquent en partie ce résultat par la forte densité racinaire observée pour un faible volume de sol. Le prélèvement du Cd et du Zn par *T. caerulescens* dépend donc fortement de leur phytodisponibilité dans le sol.

Mécanismes biochimiques

De récents travaux ont permis de montrer que *T. caerulescens* était capable d'accumuler de grandes quantités de Zn sur une large gamme de sols présentant des concentrations normales en cet élément (Escarré *et al.*, 2000 ; Reeves *et al.*, 2001). Ces résultats tendent à montrer que le comportement de cette espèce est un trait constitutif et établi de longue date (Boyd et Martens, 1992 ; Lombi *et al.*, 2000 ; Reeves *et al.*, 2001).

Prélèvement racinaire

Malgré la forte similarité chimique entre le Cd et le Zn, le prélèvement de ces métaux par *T. caerulescens* ne se fait pas de manière identique (McGrath *et al.*, 1993). Considérant deux populations de *T. caerulescens* cultivées sur un même milieu, l'une prélevait plus de Zn que l'autre et inversement pour le Cd. La comparaison d'espèces de *Thlaspi* hyperaccumulatrices (*T. caerulescens*) et non hyperaccumulatrices (*T. arvense*, *T. ochroleucum*) a mis en évidence des mécanismes d'absorption du Zn différents (Lasat *et al.*, 1996 ; Lasat *et al.*, 2000 ; Pence *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 1997). L'hyperaccumulation correspondrait à une stimulation du transport du Zn chez *T. caerulescens* intéressant aussi bien son influx dans les cellules racinaires et foliaires que son transport dans la sève brute. L'influx supérieur de Zn chez *T. caerulescens* s'expliquerait par une présence accrue de transporteurs dans les cellules racinaires. Une composante majeure de l'hyperaccumulation chez cette plante serait la surexpression du gène ZNT1 (ZiNc Transporteur) dans les racines et les feuilles quel que soit le statut du Zn (Pence *et al.*, 2000) alors que le gène est plus faiblement exprimé chez *T. arvense*, son expression étant stimulée lors de carences en Zn (Lasat *et al.*, 2000).

De précédentes études indiquent que différentes populations de *T. caerulescens* présentent une grande variation de leurs capacités à accumuler le Cd (Lombi *et al.*, 2000 ; Reeves *et al.*, 2001 ; Schwartz *et al.*, 2001b), avec des individus dans certaines populations pouvant contenir jusqu'à 0,1 à 0,4% de Cd dans leurs parties aériennes (Schwartz, 1997 ; Reeves *et al.*, 2001). Il semblerait que les populations accumulant le Cd à des concentrations élevées possèdent un transporteur spécifique à très forte affinité pour le Cd (Lombi *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2002).

Transport et accumulation dans la plante

Chez *T. caerulescens*, la détoxification de grandes quantités de Zn présentes dans les parties aériennes ferait intervenir des mécanismes de séquestration constitutifs et fortement exprimés (Shen *et al.*, 1997). Le Zn se distribue dans ses tissus à hauteur de 20,3% dans les racines, 77,7% dans les parties aériennes et 1,1% dans le xylème (Salt *et al.*, 1999). Cette observation chez les hyperaccumulateurs de ratios de concentrations des métaux dans les parties aériennes sur leurs concentrations dans les parties racinaires supérieurs à l'unité suggèrent un système de transport efficace des métaux hyperaccumulés des racines vers les feuilles (Baker *et al.*, 1994b ; Krämer *et al.*, 1996 ; Shen *et al.*, 1997). Lasat *et al.* (1996) ont observé que la vitesse d'accumulation du Zn dans les parties aériennes de *T. caerulescens* était plus élevée par comparaison à ce qu'ils observaient chez *T. arvense* ce qui suggère un taux de transfert élevé du métal dans le xylème. De ce fait, Lasat *et al.*

(1998) ont trouvé des concentrations du Zn 7 à 10 fois supérieures dans le xylème de *T. caerulescens* comparé à *T. arvense*.

Chez plusieurs hyperaccumulateurs du genre *Alyssum*, une corrélation linéaire entre les concentrations xylémiques de l'histidine et celles du Ni a été observée (Krämer *et al.*, 1996 ; Kerkeb et Krämer, 2003) indiquant que l'histidine pourrait faciliter le transfert du Ni vers le xylème par exemple en formant un complexe Ni-histidine. L'histidine peut également former des complexes stables avec le Zn à des pH proches de celui du cytoplasme ($\approx 7,5$). Dans ce cas, le rôle de l'histidine interviendrait principalement dans la prise en charge du métal dans la cellule. En effet, dans la sève brute de *T. caerulescens*, le Zn serait principalement transporté sous forme cationique Zn^{2+} hydratée avec une faible proportion liée à des acides organiques comme l'acide citrique (Salt *et al.*, 1999). Les mêmes auteurs montrent que dans les racines, le Zn intracellulaire est corrélé à l'histidine. Alors que le Zn est principalement localisé dans les vacuoles des cellules racinaires, le Cd a été localisé essentiellement dans l'espace intercellulaire et dans une moindre mesure dans les vacuoles (Nedelkoska et Doran, 2000 ; Vázquez *et al.*, 1992).

L'utilisation de la spectroscopie d'absorption atomique aux rayons X a permis de localiser le Zn dans les feuilles de *T. caerulescens*. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que, dans les feuilles, le Zn était principalement localisé dans les vacuoles des cellules épidermiques et sub-épidermiques (Frey *et al.*, 2000 ; Küpper *et al.*, 1999). Le Zn serait principalement complexé à des acides organiques (citrate et oxalate) et dans une moindre mesure à l'histidine ou aux parois cellulaires (Salt *et al.*, 1999). Toutefois, Frey *et al.* (2000) ont observé une forte proportion de Zn lié aux parois cellulaires du mésophylle, suggérant que sa compartimentation apoplastique pouvait être un autre mécanisme impliqué dans la tolérance à ce métal.

4.4.2. Faisabilité de la phytoextraction

Le concept d'utiliser les plantes hyperaccumulatrices pour extraire les métaux des sols a été discuté pour la première fois par Chaney (1983). Toutefois, ce n'est qu'à partir du début des années 90 que des expérimentations au champ ont été réalisées pour tester le potentiel de la phytoextraction des métaux avec des plantes hyperaccumulatrices (Baker *et al.*, 1991 ; Brown *et al.*, 1994 ; Hammer et Keller, 2003 ; McGrath *et al.*, 1993 ; Schwartz, 1997).

Tableau 1.6 : Simulation d'extraction du Cd et du Zn par *Thlaspi caerulescens* 1) et 2) : sols agricoles amendés avec des boues pendant 20 ans (Baker *et al.*, 1991 ; McGrath *et al.*, 1993) ; 3) sol agricole contaminé par des activités de fonderie (Brown *et al.*, 1994) ; 4) sol agricole amendé durant 2 ans avec une boue d'épuration urbaine à raison de 3 (4a) et 15 t ha⁻¹ an⁻¹ (4b) (Schwartz, 1997)

Sol	Population de <i>T. caerulescens</i>	Concentrations des métaux (mg kg ⁻¹ sol)		Extraction des métaux (kg ha ⁻¹)		Objectif de remédiation (mg kg ⁻¹ sol)		Nombre de cultures	
		Zn	Cd	Zn	Cd	Zn	Cd	Zn	Cd
1	Prayon	381	11	34,3	0,16	300	3	6	130
2	GB	444	13,6	30,1	0,14	300	3	13	192
	Prayon			27,6				13	
3	Prayon	2100	38	188 ^a	5,8 ^a	0	0	28	13
4a	Prayon	160	0,29	2,2	0,02	155 ^b	0,24 ^b	7	73
	Viviez			2,1	0,28			7	6
4b	Prayon	180	0,48	3,8	0,02			19	366
	Viviez			4,1	0,61			17	12

^a valeurs exprimées pour une culture continue durant 1 an. Les valeurs étant de 18,8 kg Zn ha⁻¹ et 0,58 kg Cd ha⁻¹ pour un temps de culture de 5 semaines

^b Concentrations initiales des métaux dans le sol

Les premières simulations de phytoextraction avec *T. caerulescens* démontrent le potentiel de cette plante pour extraire le Cd et le Zn apportés par l'épandage de boues de station d'épuration contaminées sur des sols agricoles (tableau 1.6). Les résultats prouvent que l'extraction du Zn excédentaire est réalisable, le nombre de cultures nécessaires variant de 6 à 19. Pour des contaminations plus importantes, comme dans le cas des sols agricoles contaminés par les activités industrielles (Brown *et al.*, 1994), le nombre d'années nécessaires pour extraire la totalité du Zn peut atteindre 28 ans si l'on considère une culture continue de *T. caerulescens*.

Dans un premier temps, l'extraction du Cd semblait plus difficile à réaliser. En effet, les simulations réalisées par Baker *et al.* (1991) et McGrath *et al.* (1993) laissent entrevoir une remédiation sur plus de 100 ans. Plus tard, les travaux de Schwartz (1997) ont montré que l'utilisation de populations de *T. caerulescens* provenant du sud de la France (Viviez) permettait d'atteindre des objectifs de remédiation du Cd similaires à ceux du Zn dans un délai de 6 à 12 ans.

L'observation de populations naturelles de *T. caerulescens* en milieux anthropisés (site minier de St Laurent le Minier, sud de la France) montre que des plantes non fertilisées peuvent produire annuellement 2,6 t de biomasse par hectare, soit une exportation de 30,2 kg Zn ha⁻¹ et 4,2 kg Cd ha⁻¹ (Robinson *et al.*, 1998). Des simulations, envisageant une fertilisation des plantes, indiquent que la diminution de moitié de quantités de métaux dans un sol de 500 mg Zn kg⁻¹ et 20 mg Cd kg⁻¹ est respectivement envisageable en 10 et 3 années de culture.

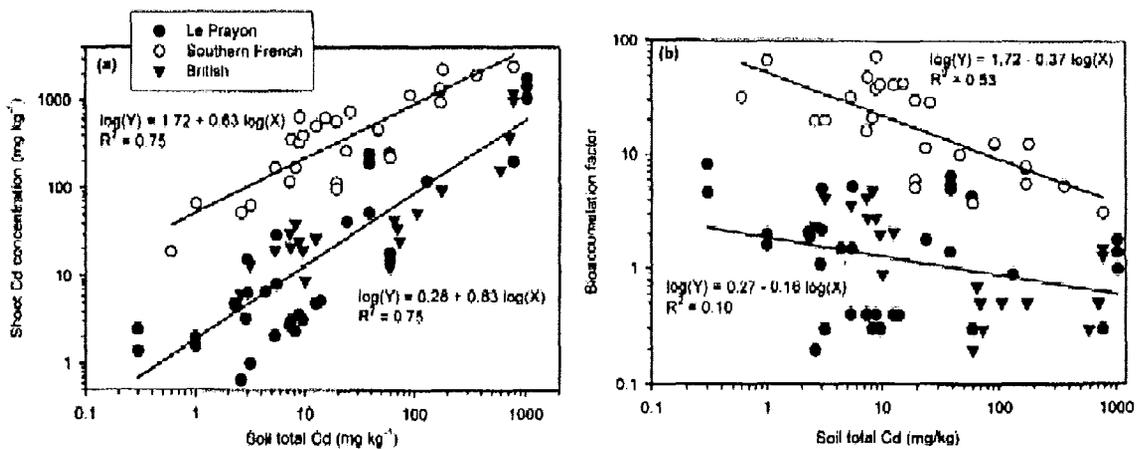


Figure 1.4 : Relation entre les concentrations du Cd dans les parties aériennes de différentes populations de *T. caerulescens* et les concentrations du Cd dans les sols (a) ; et relation entre le facteur de bioaccumulation du Cd et les concentrations du Cd dans les sols (b) (d'après Zhao *et al.*, 2003)

Zhao *et al.* (2003) ont examiné les relations entre les concentrations du Zn et du Cd dans les sols et celles dans les parties aériennes de *T. caerulescens* en agrégeant des données de la littérature fournies par différentes études. De façon générale, les auteurs ont montré que l'efficacité de l'extraction des métaux, représentée par le facteur de bioaccumulation, diminuait avec les concentrations croissantes dans le sol. Si pour le Zn aucune différence entre les populations de *T. caerulescens*, n'a été observée, il n'en va pas de même pour le Cd. En effet, les populations provenant du sud de la France présentent des concentrations du Cd dans les parties aériennes 25 fois supérieures à celles des autres populations (figure 1.4). De même, le facteur de bioaccumulation dans les populations françaises varie entre 3 et 73 contre une variation entre 0,2 et 8,3 dans les populations britanniques et belges. Dans le cas où *T. caerulescens* est utilisé dans le cadre d'une phytoremédiation de sols contaminés en Cd et en Zn, l'efficacité d'extraction est inversement proportionnelle au degré de pollution du site (Schwartz, 1997 ; Meerts et van Isacker, 1997).

Même si les premières simulations de phytoextraction avec *T. caerulescens* sont prometteuses, des doutes concernant le réel potentiel de cette plante sont apparus. La faible production de biomasse (Robinson *et al.*, 1998) et un nombre d'années de culture supérieur à 10 ans (Felix, 1997) apparaissent comme les principaux facteurs limitants. Réaliser une fertilisation adaptée peut être un moyen d'augmenter la biomasse. De nombreux auteurs ont pu mettre en évidence l'efficacité de l'apport d'N sur la production de biomasse des hyperaccumulateurs (Benett *et al.*, 1998 ; Ebbs *et al.*, 1997 ; Schwartz, 1997 ; Schwartz et Morel, 1998 ; Schwartz *et al.*, 2003). La fertilisation de cultures de *T. caerulescens* sur des sols métallifères a permis d'augmenter la production de biomasse d'un facteur 2 à 3 (Bennett *et al.*, 1998 ; Schwartz, 1997). La forme sous laquelle l'engrais est apporté s'avère alors être un facteur déterminant pour les concentrations des métaux dans la plante (Ebbs *et al.*, 1997 ; Schwartz, 1997). Schwartz (1997) montre que l'augmentation des concentrations du Zn et du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* est plus élevée quand N est apporté sous forme nitrique. Il est également possible d'améliorer la biomasse en utilisant les outils traditionnels de sélection et d'amélioration des plantes. Brewer *et al.* (1999) ont réussi à produire, par hybridation somatique entre *T. caerulescens* et *Brassica napus*, une plante produisant plus de biomasse que la population de *T. caerulescens* parentale. Dans une étude menée par Frérot *et al.* (2003), des croisements contrôlés ont été réalisés entre des individus de *T. caerulescens* provenant de sites métallifères avec des individus provenant de sites non métallifères. En effet, Meerts et van Isacker (1997) et Escarré *et al.* (2000) ont montré que les populations non métallophiles de *T. caerulescens* hyperaccumulaient plus de trois fois plus de Zn que les populations métallophiles, mais avec une production de biomasse aérienne deux fois plus faible. L'hyperaccumulateur idéal posséderait alors la combinaison de ces deux traits. Les auteurs ont démontré que de tels croisements contrôlés permettaient d'obtenir des individus capables à la fois de produire plus de biomasse et d'accumuler plus de Zn. Les simulations d'extraction du Zn d'un sol métallifère par de tels individus atteignent 60 kg Zn ha⁻¹ sans apport de fertilisation, soit le double de la valeur obtenue par Robinson *et al.* (1998) sur le même type de sol. Malgré cela, la phytoextraction avec *T. caerulescens* ne semble faisable que pour des sols modérément contaminés en Zn et Cd, au regard du nombre d'années nécessaire pour atteindre les seuils limites réglementaires de concentration dans les sols. De plus, il apparaît que la phytoextraction du Cd soit plus accessible que celle du Zn, en raison des concentrations totales du Cd dans les sols de deux ordres de grandeur inférieures à celles du Zn.

De nombreuses études ont montré que *T. caerulescens* était capable de diminuer les compartiments échangeable du Zn (Brown *et al.*, 1994 ; McGrath *et al.*, 1997 ; Knight *et al.*, 1997 ; Whiting, 1998) et du Cd (Schwartz, 1997 ; Gérard *et al.*, 2000 ; Perronnet *et al.*, 2000). Une autre utilisation potentielle de *T. caerulescens* serait alors d'extraire le Cd biodisponible des sols de façon à réduire son transfert vers les plantes alimentaires (Hamon et McLaughlin, 1999 ; Schwartz *et al.*, 2003). En considérant que le Cd biodisponible ne représente qu'une fraction du Cd total des sols, l'extraction de la majorité de cette fraction nécessiterait beaucoup moins de cultures de *T. caerulescens* qu'il n'en faudrait pour abaisser le contenu en Cd total des sols. Keller et Hammer (2003) montrent que trois cultures successives de *T. caerulescens* permet de réduire le Cd et le Zn extractible avec NaNO₃ et biodisponible pour la laitue dans un sol acide mais pas dans un sol calcaire. La toxicité pour la laitue, mesurée par la biomasse produite, est très fortement réduite dans le sol acide.

5. Conclusion

Les éléments en traces, essentiels ou non à la vie, se rencontrent dans différents compartiments de l'environnement en constante interaction les uns avec les autres et avec les différents constituants du sol. Une perturbation de l'écosystème peut alors conduire à l'accumulation des éléments en traces à un ou plusieurs niveaux de leur cycle biogéochimique. Dans le système sol-plante, les éléments en traces sont absorbés par les racines des végétaux et accumulés dans les différents organes à des niveaux de

concentration variables selon l'espèce végétale. Les plantes hyperaccumulatrices se distinguent des autres espèces végétales par leur aptitude à prélever et à concentrer de fortes quantités d'éléments en traces toxiques dans leurs parties aériennes. Une telle faculté permet d'envisager la réhabilitation de sites contaminés à l'aide de ces plantes. On parle alors de phytoextraction.

L'absorption des éléments en traces dépend principalement de la forme chimique sous laquelle ils se présentent dans le sol ou la solution du sol. De nombreux facteurs physico-chimiques (pH, Eh, concentration totale des métaux par exemple) et biologiques (exsudation racinaire, prolifération racinaire, activité microbiologique par exemple) interviennent dans la biodisponibilité des éléments en traces pour les plantes. Quel est l'impact des plantes hyperaccumulatrices sur les flux des éléments en traces dans les sols ? La phytoextraction permet-elle d'abaisser durablement le compartiment biodisponible des métaux ?

L'hyperaccumulateur de Zn et de Cd *T. caerulescens* a déjà fait l'objet de nombreuses recherches et semble le meilleur candidat pour l'application de la phytoextraction à grande échelle. Son étude permettra d'acquérir, dans un premier temps, de nouvelles données sur les mécanismes rhizosphériques mis en jeu lors du prélèvement de Zn et de Cd. Dans un second temps, la dynamique des métaux dans le système sol-eau-plante sera suivie au cours de successions de cultures. Le suivi des transferts sol-plante et sol-solution du Cd et du Zn permettra de visualiser la réorganisation des métaux dans les sols au cours d'une phytoextraction.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous allons décrire les matériels et méthodes communs à l'ensemble des expérimentations menées. Le travail entrepris a pour objectif de mieux comprendre les interactions entre la disponibilité des métaux et en particulier du Cd et son hyperaccumulation par *T. caerulescens* dans le cadre de scénarios de phytoextraction. Les expériences mises en œuvre sont destinées à déterminer :

- quels sont les facteurs expliquant la variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*,
- quel est l'impact de *T. caerulescens* sur les flux des éléments en traces dans les sols,
- la phytoextraction permet-elle d'abaisser durablement et de manière significative le compartiment biodisponible des métaux.

Des populations contrastées de *T. caerulescens* ont été étudiées dans leur milieu naturel (friches industrielles de mines de Zn/Pb et de fonderie de Zn ; site de serpentine à concentration élevée du Ni géochimique). Les relations existant entre les paramètres du sol, et en particulier la biodisponibilité des métaux, et l'hyperaccumulation chez ces plantes ont été analysées. Quatre populations ont été sélectionnées pour leur aptitude différente à accumuler les métaux. Cent individus de chaque population ont été cultivés en vases de végétation afin de mettre en évidence des différences génétiques entre les populations. Des individus des mêmes populations ont également été cultivés en conditions climatiques réelles. Enfin, l'impact de *T. caerulescens* sur le compartiment biodisponible des métaux a été étudié à l'aide de cultures successives d'une même population dans des systèmes lysimétriques équipés pour suivre l'évolution des compartiments eau-sol-plantes des métaux.

1. Matériels

1.1. Plantes

Les essais de phytoextraction ont été réalisés avec la plante hyperaccumulatrice *T. caerulescens* J. Presl & C. Presl. Les semences proviennent d'anciens sites miniers et de fonderie du sud de la France (Reeves *et al.*, 2001) et ont été collectées en juin 2001 lors d'une prospection pédofloristique menée avec le concours de Roger Reeves et Christophe Schwartz.

Différentes populations de l'espèce *T. caerulescens* se distinguant par leur potentiel d'accumulation ont été cultivées. Trois populations, notées Tc-1, Tc-2 et Tc-3, proviennent du sud de la France et sont reconnues comme hyperaccumulatrices de Zn et de Cd (Reeves *et al.*, 2001). La quatrième population, Tc-4, est originaire des Vosges. Elle est hyperaccumulatrice de Ni et co-accumulatrice de Cd. Les graines ont été collectées en juin 2001 par Stamatia Massoura.

Dans le cadre de certaines expérimentations, des espèces végétales non hyperaccumulatrices ont également été utilisées :

- *Thlaspi arvense* (Ta) a été utilisé comme témoin non hyperaccumulateur de métaux. Les graines nous ont été fournies par le Jardin Botanique de Nancy.
- *Lactuca sativa* (laitue) var. Reine de Mai a été choisie en tant que plante test accumulatrice de Cd. C'est une composée potagère fréquemment utilisée en alimentation humaine et connue pour ses prélèvements importants en éléments en traces métalliques (0,2 à 4,7 mg Cd kg⁻¹ MS dans les jardins potagers ; Costa, 1992 ; Costa et Morel, 1993 ; Schwartz *et al.*, 1997).

1.2. Terres

Cinq terres, notées S1 à S5, ont été utilisées pour l'ensemble des expérimentations.

Les terres S1 et S2 sont issues du programme de recherche de l'ADEME « Essais de traitement des sols » (fourniture Polden INSAVALOR, Lyon).

- La terre S1 provient d'un sol de type agricole ayant subi une pollution d'origine atmosphérique en Pb et en Zn, limitée en profondeur mais relativement étendue en surface. La terre a été prélevée sur une profondeur de 25 à 30 cm.
- La terre S2 a été obtenue suite au traitement physique de la terre S1 par le BRGM, partenaire du programme de recherche. Le traitement utilisé consistait à séparer les particules en fonction de leur taille et à éliminer la ou les fractions les plus chargées en métaux de façon à atteindre une concentration résiduelle des polluants compatible avec des objectifs de reconversion des terres (centre de stockage de classe 3 ou utilisation comme remblai).
- La terre S3, d'origine agricole, provient d'un Luvisol contaminé par l'épandage d'eaux résiduaires brutes urbaines (programme de recherche EPANDAGRI, INRA/Région Ile de France). L'horizon de surface du sol a été prélevé en novembre 2001, à la pelle, sur une profondeur de 25 à 30 cm.
- La terre S4 provient d'un sol brun lessivé, d'origine agricole (Domaine expérimental de La Bouzule), cultivé depuis 1995 dans le cadre d'un essai de phytoremédiation en microparcelles (Schwartz, 1997).
- La terre S5 est également une terre agricole utilisée comme terre témoin non contaminée. L'horizon de surface du sol a été prélevé dans une parcelle agricole située à Vannecourt (Meurthe-et-Moselle) en octobre 2000, à la pelle, sur une profondeur de 25 à 30 cm.

2. Caractérisation physico-chimique des terres

Avant toute analyse, les terres ont été séchées à l'air dans une pièce ventilée puis tamisées à 2 mm.

2.1. Caractérisation agronomique

La caractérisation complète (granulométrie, pH, calcaire, carbone, azote, C/N, phosphore assimilable Olsen, bases échangeables, capacité d'échange cationique) ainsi que la détermination des concentrations des métaux extractibles à l'EDTA ont été réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA (Arras) suivant des méthodes normalisées. Des mesures de pH_{eau} ont également été réalisées au laboratoire selon la norme AFNOR X31-117. Pour cela, une suspension de terre dans de l'eau osmosée (rapport 1:5, v:v) est réalisée en 4 répétitions par échantillon. Les suspensions sont mises à agiter énergiquement pendant 5 mn puis laissées au repos pendant 16 h pour atteindre l'équilibre chimique avant la mesure du pH.

Les humidités caractéristiques des terres (capacité au champ et point de flétrissement) ont été déterminées par la méthode de l'extracteur à plaque poreuse à pF 2,5 et pF 4,5.

Les concentrations des sulfates dans les terres ont été déterminées par turbidimétrie. Une prise d'essai de 10 g de sol sec est introduite dans un flacon de centrifugation avec 100 ml d'une solution de $CaCl_2$ 0,01M. Le mélange sol-solution est mis à agiter durant 30 mn puis centrifugé pendant 20 mn à 5000 $tour\ mn^{-1}$. La fraction liquide est filtrée sur papier Whatman n°40 et 10 ml sont prélevés et mis en présence de 2 ml d'un réactif de dosage ($BaCl_2$: 2 g, polyvinylpyrrolidone : 0,4 g, $H_2O_{distillée}$: 20 ml). La densité optique est mesurée à 460 nm dans les 30 mn qui suivent la réaction. Une courbe étalon permet de déterminer la concentration totale des sulfates.

2.1.1. Terre S1

La terre S1 (tableau 2.1) présente une texture homogène de type limon sablo-argileuse. Le pH est légèrement alcalin. Les concentrations du carbone et des matières organiques totales sont assez élevées et le rapport C/N est très élevé (20,9). La CEC de $11,9\ cmol\ kg^{-1}$

est proche des valeurs habituellement rencontrées dans les sols agricoles. Le complexe d'échange est saturé. De manière générale, les concentrations des cations échangeables sont supérieures à celles rencontrées en sol agricole sauf pour le Mg qui avec $0,67 \text{ cmol kg}^{-1}$ pourrait conduire à des carences magnésiques pour les plantes. Ceci est d'autant plus probable que la concentration du K de $0,80 \text{ cmol kg}^{-1}$ est très élevée et accentuée de ce fait les risques de carence magnésique par compétition de ces deux ions. Les concentrations du P assimilable sont très satisfaisantes. Le S sous forme sulfate atteint $18,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de sol sec ce qui correspond aux concentrations généralement rencontrées dans les sols agricoles lorrains (Diot, 1991). Dans ces conditions, dans un sol humide, riche en matières organiques et avec une microflore active, on n'observe pas de carences en sulfate (Watkinson et Kear, 1996). Toutefois le rapport C/N élevé laisse supposer que la minéralisation des sulfates organiques sera faible, pouvant induire des déficiences en S. Cette terre présente une capacité au champ moyenne comparée à un sol agricole. La réserve utile de 18,6% est satisfaisante. La terre S1 présente donc globalement des propriétés hydriques suffisantes pour satisfaire les besoins d'un couvert végétal.

Tableau 2.1 : Caractéristiques agronomiques des terres S1 à S5

	Unité	S1	S2	S3	^a S4	S5
argiles	%	15,2	5,1	7,7	31,6	21,9
limons fins	%	19,5	14,9	8,0	49,4	45,5
limons grossiers	%	33,8	47,8	9,1		
sables fins	%	20,5	31,6	42,0	19,0	32,6
sables grossiers	%	11,0	0,6	33,2		
matières organiques	%	6,43	2,95	5,51	2,05	2,60
azote organique	%	0,18	0,07	0,21	0,13	0,16
C/N		20,90	24,80	15,54	8,78	9,15
pH eau		7,9	8,4	7,0	7,4	6,4
CaCO ₃ total	%	1,8	0,6	4,3	0,3	0,2
P ₂ O ₅ Olsen	‰	0,176	0,075	0,305	0,047	0,013
CEC	cmol kg ⁻¹	11,9	4,1	6,9	11,1	11,0
Ca ²⁺	cmol kg ⁻¹	28,7	12,4	20,7	13,9	8,9
K ⁺	cmol kg ⁻¹	0,80	0,18	0,40	0,64	0,19
Mg ²⁺	cmol kg ⁻¹	0,67	0,44	0,60	1,23	3,72
Na ⁺	cmol kg ⁻¹	0,055	0,053	0,051	0,055	0,029
Cu EDTA	mg kg ⁻¹	13,8	10,0	^b nd	nd	nd
Zn EDTA	mg kg ⁻¹	460,0	194,3	nd	nd	nd
Mn EDTA	mg kg ⁻¹	12,6	17,8	nd	nd	nd
Fe EDTA	mg kg ⁻¹	19,9	50,6	nd	nd	nd
<i>Humidités caractéristiques</i>						
Capacité au champ	%	27,8	31,3	44,7	33,2	36,0
Point de flétrissement	%	9,2	3,7	5,5	14,7	12,8
Eau utile	%	18,6	27,6	39,2	18,5	23,2

^a d'après Schwartz (1997) ^b nd = non déterminé

2.1.2. Terre S2

Le traitement de S1 par tri physique et lavage chimique a entraîné une perte des argiles et des sables grossiers au profit des sables fins et des limons grossiers. La texture passe alors d'un limon sablo-argileux (S1) à un limon léger sableux (S2). Le pH est nettement plus alcalin que pour S1. La concentration des matières organiques est divisée par plus de 2 pour atteindre une valeur de 2,95%. Le rapport C/N s'élève à 24,8. La capacité d'échange cationique de 4,1 cmol kg⁻¹ est faible et réduite de près de 3 fois par rapport à S1. Le complexe d'échange reste saturé même si les cations échangeables présentent des concentrations faibles. S2 est peu pourvue en P assimilable. La terre S2 a une fertilité physique (mauvaise structuration) et chimique (faibles concentrations des éléments nutritifs et des matières organiques) faibles, pouvant compromettre le bon développement d'un couvert végétal.

2.1.3. Terre S3

La terre S3 présente une texture sableuse avec un pH neutre. Les concentrations du carbone et des matières organiques totales sont assez élevées, ce qui est le reflet de l'apport de boues résiduelles brutes durant une période couvrant environ 100 ans. Le rapport C/N est de 15,5. La CEC avec 6,9 cmol kg⁻¹ est relativement faible et le complexe d'échange est saturé par Ca²⁺. Les fortes valeurs de capacité au champ et de réserve en eau utile sont très certainement liées à la concentration élevée des matières organiques, celle-ci favorisant la rétention de l'eau. La terre S3 a une fertilité physique et chimique très satisfaisante permettant le développement d'un couvert végétal. Ce niveau de fertilité est le reflet d'un usage agricole.

2.1.4. Terres S4 et S5

Les terres S4 et S5 sont toutes deux d'origine agricole. La terre S4 présente un pH à tendance basique et une texture limono-argileuse. La concentration des matières organiques est relativement faible. Le rapport C/N de 8,7 est typique des valeurs rencontrées habituellement dans des sols agricoles. La terre S4 présente un déficit en P assimilable mais est bien pourvue en cations échangeables. De façon générale, elle présente une bonne fertilité. Il en va de même pour la terre S5 qui présente une texture limono-sableuse et un pH légèrement acide.

2.2. Concentrations des métaux dans les terres

2.2.1. Concentrations totales

La caractérisation des métaux totaux a été réalisée par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA (Arras) selon une méthode normalisée. Les concentrations des métaux totaux nous indiquent une contamination en Cd, Cu, Pb et Zn dans les terres S1 à S3 (tableau 2.2). La terre S4 présente des concentrations du Pb et du Ni légèrement supérieures aux valeurs limites de concentration. De façon générale, cette terre n'est pas contaminée en métaux.

Tableau 2.2 : Concentrations totales des métaux (mg kg⁻¹) dans les terres S1 à S5

Métaux totaux (HF)	S1	S2	S3	S4	S5	Valeurs limites de concentration dans les sols (décret 97-1133)
Cd	25,7	11,6	6,3	0,2	0,1	2,0
Cu	52	29	314	30	18	100
Ni	22	10	27	84	26	50
Pb	1270	619	581	155	22	100
Zn	1895	796	1071	154	53	300

2.2.2. Extraction sélective

La méthode utilisée pour l'extraction au chlorure de calcium (CaCl_2 0,01 M) est celle mise au point par Lebourg (1998). Une prise d'essai de 5 g de terre séchée à l'air et tamisée à 2 mm est mise en suspension avec 50 ml de réactif dans des pots de centrifugation en polyéthylène. Les solutions sont agitées durant 2 h avant centrifugation pendant 10 mn à 3000 tr mn^{-1} . Les solutions sont ensuite filtrées à $0,2 \mu\text{m}$ sur des filtres en acétate de cellulose (Sartorius) et acidifiées avec 0,5 ml HCl avant analyse par spectrométrie d'absorption atomique pour le Cd (Spectraa 220, Varian, four à effet Zeeman) et par spectrométrie d'émission à plasma d'argon pour le Zn (ICP-AES, Liberty II, Varian).

2.2.3. Cd isotopiquement échangeable

La méthode est basée sur la dilution d'un isotope de l'élément à étudier dans l'ensemble des compartiments du sol où se trouve l'élément. En effet, les métaux présents dans les sols se répartissent dans différents compartiments plus ou moins accessibles aux plantes. Un compartiment étant défini par Atkins (1973) comme un ensemble de composés ayant statistiquement les mêmes propriétés cinétiques. Ces compartiments peuvent être caractérisés par des fractions isotopiquement échangeables à des temps différents. Lorsqu'un radioisotope est mélangé avec un sol, il est distribué de façon proportionnelle entre ces différentes fractions de métal froid. Si deux échantillons ayant été en contact avec cet isotope montrent la même activité spécifique (élément radioactif/élément stable) après une période d'échange donnée, on peut affirmer que l'élément présent dans les deux échantillons provient d'un même compartiment du système. L'isotope radioactif $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (demi-vie 462 jours) a été fourni par Amersham (France). Il se présente sous forme de $^{109}\text{Cd}^{2+}$, en solution dans HCl 0,1 M. L'activité du ^{109}Cd est de $9,34 \cdot 10^{13} \text{ Bq g}^{-1}$ et son énergie de rayonnement gamma 0,088 Mev. Les sources ont été diluées dans de l'eau ultrapure (MilliQ) de manière à obtenir environ 180 kBq ml^{-1} , et ont été conservées à $+4^\circ\text{C}$.

Deux méthodes ont été utilisées pour mesurer le Cd isotopiquement échangeable. Tout d'abord nous avons appliqué, sur toutes les terres, la méthode des cinétiques d'échange isotopique élaborée par Fardeau *et al.* (1991) puis, uniquement pour la terre S3, nous avons mesuré le compartiment du Cd disponible pour les plantes (Cd_E) selon la méthode utilisée par Hamon *et al.* (2002).

(1) La méthode des cinétiques d'échange isotopique a été développée par Fardeau *et al.* (1991) pour déterminer le P assimilable du sol et adaptée par Echevarria *et al.* (1998) pour le Ni du sol et par Gérard *et al.* (2001) pour le Cd. Des rapports terre-eau de 50 g de terre dans 99 ml d'eau ultra pure (terres S1 et S2) ou de solution de CaCl_2 0,01 M (terres S3 et S4 et terres issues de la prospection pédofloristique) sont utilisés et réalisés en 4 répétitions. La solution de CaCl_2 0,01 M a été utilisée pour flocculer les colloïdes de sorte que les filtrations soient facilitées, voire rendues possibles pour certaines terres. Les suspensions sont agitées durant 21 h pour atteindre l'équilibre chimique et une concentration constante de Cd^{2+} en solution. Un ml d'une solution de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ est injecté au temps t_0 dans la suspension agitée par un barreau aimanté. Plusieurs aliquotes de la suspension sont prélevées à l'aide d'une seringue après des temps d'échange de 1, 4, 10 et 40 mn et filtrées immédiatement sur des filtres en nitrate de cellulose de porosité $0,02 \mu\text{m}$ (Schleicher & Schuell). La radioactivité en solution est mesurée par γ -spectrométrie. La radioactivité totale introduite au temps t_0 est mesurée en prenant en compte la quantité de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ adsorbée sur le matériel. Pour cela, une solution témoin est préparée à partir de terre séchée à l'air et mise en suspension dans de l'eau ultra pure dans le même rapport que précédemment. La suspension est agitée pendant 21 h, centrifugée à $10\,000 \text{ g}$ pendant 20 mn et filtrée sur des filtres en nitrate de cellulose ($0,02 \mu\text{m}$ de porosité) de manière à obtenir 99 ml de solution. Un ml de la solution

source de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ est introduit dans cette solution (4 répétitions) et quelques ml sont prélevés et filtrés après 1, 4, 10 et 40 mn.

La composition isotopique (CI_s) de Cd^{2+} de la solution du sol est définie par l'équation :

$$CI_s = r_t/R * 1/Cd_s \quad \text{Eq. 1}$$

avec r_t la quantité de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ en solution (en Bq kg^{-1} terre) et Cd_s la quantité de Cd^{2+} stable dans la solution (en mg Cd kg^{-1} terre), à l'instant t. R est la radioactivité ($^{109}\text{Cd}^{2+}$) introduite initialement en solution (en Bq kg^{-1} terre) et mesurée à l'instant t. CI_s est exprimée en mg^{-1} Cd kg terre. La quantité de Cd isotopiquement échangée entre le temps t_0 et le temps t est calculée par la formule

$$r_t/Cd_s = R/E_t \quad \text{Eq. 2}$$

Suivant le rapport terre-eau utilisé (m_{terre} et m_{eau} étant la masse de terre et d'eau), la valeur de Cd_s (mg kg^{-1} terre) est :

$$Cd_s = m_{\text{eau}}/m_{\text{terre}} * C_{\text{Cd}} \quad \text{Eq. 3}$$

La décroissance de r_t/R et la représentation des compartiments de Cd^{2+} isotopiquement échangeable en fonction du temps est décrite par un modèle mathématique proposé par (Fardeau, 1981) tel que :

$$r_t/R = m (t + (m)^{1/n})^{-n} + R \propto R_0 \quad \text{Eq. 4}$$

où n rend compte de la décroissance de ^{109}Cd restant en solution et m est assimilé à $r_{1\text{min}}/R$ (Fardeau *et al.*, 1991). Pour des temps d'expérience courts, il est possible de négliger les paramètres $m^{1/n}$ et $R \propto R_0$ ce qui permet de simplifier l'équation 4 qui devient :

$$r_t/R = (r_{1\text{min}}/R) * t^{-n} \quad \text{Eq. 5}$$

$$\text{soit } \ln(r_t/R) = \ln(r_{1\text{min}}/R) - n \ln(t) \quad \text{Eq. 6}$$

Les paramètres m et n peuvent être déduits d'une régression sur les premiers points expérimentaux du suivi de la cinétique d'échange (1, 4, 10 et 40 mn). Le ratio $R \propto R_0$ correspond à la dilution maximale de la radioactivité dans le système. En faisant l'hypothèse que la quantité maximale où peut se diluer la radioactivité introduite correspond à la quantité totale de Cd dans la terre étudiée l'équation 3 devient :

$$r_t/R = m (t + (m)^{1/n})^{-n} + Cd_s/Cd_T \quad \text{Eq. 7}$$

où Cd_T est le Cd total contenu dans 1 kg de terre. On peut donc, grâce à cette modélisation de r_t/R , calculer $E_{(t)}$ pour des temps bien plus longs que ceux du laboratoire et ainsi déduire, pour Cd, la quantité isotopiquement échangeable E pour le temps d'une culture végétale.

(2) Un deuxième protocole a également été utilisé avec la terre S3 pour mesurer le compartiment labile du Cd (Cd_E) (Hamon *et al.*, 2002). Une prise d'essai de 5 g de sol sec est mise à agiter avec 50 ml d'eau osmosée pendant 4 jours (5 répétitions). A l'issue de l'agitation, 0,1 ml d'une solution de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ à 200 kBq ml^{-1} est ajouté à la suspension avant une nouvelle agitation de 3 jours. La suspension est centrifugée à 2 000 g pendant 15 mn et le surnageant filtré à 0,2 μm (Schleicher & Schuell). Les deux méthodes ont donné des valeurs de Cd_E similaires, respectivement 2,69 et 2,67 mg kg^{-1} .

Effet de la filtration sur le paramètre C_{Cd}

Les travaux de Gérard (2000) et Gérard *et al.*, (2001) pour adapter la méthode des cinétiques d'échange isotopique dans le cas du Cd démontrent que le rapport sol-solution (la solution étant représentée dans ce cas par de l'eau ultrapure) comme le niveau de filtration influencent la concentration du Cd total dans la solution. Une diminution du Cd total en solution est observée en fonction de la porosité des filtres indiquant la présence de formes cadmiées colloïdales lors de filtrations supérieures à 0,02 μm .

L'utilisation d'une solution de CaCl_2 0,01 M pour flocculer les colloïdes dans certaines des terres étudiées nous a amené à reconsidérer la nécessité de filtrer les suspensions à moins

de 0,2 μm . Pour vérifier l'effet de la filtration sur la concentration du Cd dans la solution, nous avons réalisé des extractions avec 23 terres contrastées. Pour cela, 2,5 g de terre ont été mis en suspension dans 25 ml d'une solution non tamponnée de CaCl_2 0,01 M et mis en agitation durant 2h. Quatre répétitions ont été réalisées par terre. A l'issue de l'agitation, les suspensions ont été filtrées sur des filtres en nitrate de cellulose de porosité 0,2 et 0,02 μm (Schleicher & Schuell). Les solutions filtrées ont été acidifiées avec HNO_3 concentré à hauteur de 1% avant analyse par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES, Liberty II, Varian).

Les résultats (figure 2.1) nous montrent que la porosité n'influence pas la concentration totale du Cd lorsque les terres sont mises en suspension dans une solution de CaCl_2 . De ce fait, lorsque les cinétiques d'échange isotopique ont été réalisées avec une suspension terre- CaCl_2 , nous avons utilisé des filtres de porosité 0,2 μm .

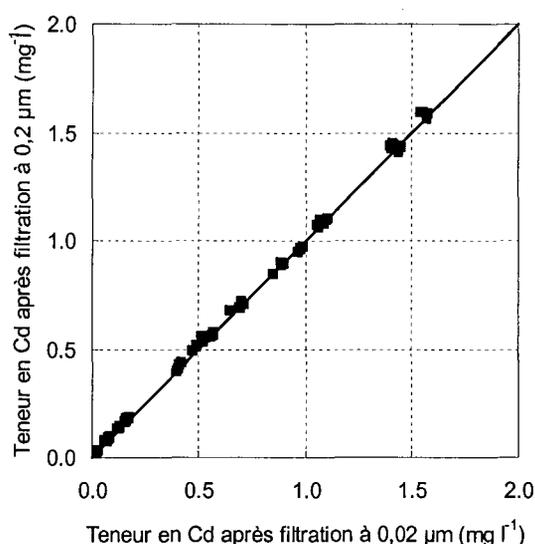


Figure 2.1: Relation entre la concentration totale du Cd (mg l^{-1}) mesurée dans des suspensions de terre (rapport 1:10) après filtration à 0,2 et 0,02 μm

Description des compartiments échangeables du Cd

Un compartiment du Cd échangeable est défini par un pool d'ions échangeables entre deux temps et le nombre de compartiments nécessaires pour représenter l'ensemble des ions Cd^{2+} du sol est fonction des intervalles de temps choisis. Suivant les auteurs et l'élément considéré, les compartiments ne sont pas définis pour les mêmes temps d'échange. Ainsi, pour les ions phosphates (Fardeau, 1993), les compartiments ont été déterminés par rapport au fonctionnement biologique de la plante et en particulier les phénomènes d'absorption active des ions phosphates. Nous retiendrons les mêmes compartiments pour représenter l'ensemble des ions Cd^{2+} à savoir :

- entre 0 et 1 mn, ce qui représente les quantités d'ions quasi-instantanément échangeables comprenant les ions Cd^{2+} de la solution et de la phase solide du sol ayant les mêmes propriétés cinétiques,
- entre 1 mn et 24 h, ce qui correspond aux quantités d'ions échangeables pendant la durée d'absorption d'une zone racinaire,
- entre 24 h et 3 mois, pour rendre compte des quantités échangeables durant la période de culture de la plante,
- entre 3 mois et 1 an, ce qui représente une année culturale,
- après un an c'est à dire les quantités d'ions non disponibles pour la plante.

Trois facteurs permettent de caractériser le Cd biodisponible du sol, il s'agit des facteurs quantité ($E_{0-1\text{min}}$), intensité (concentration des ions Cd^{2+} dans le système C_{Cd}) et capacité (rapport du facteur quantité au facteur intensité $E_{0-1\text{min}}/C_{\text{Cd}}$). Le facteur capacité est le pouvoir tampon du sol vis-à-vis des ions Cd^{2+} , c'est à dire sa capacité à réalimenter la solution du sol (tableau 2.3).

Dans la terre S1, seuls 12% du Cd total ne sont pas disponibles pour la plante à l'échelle de l'année. Cela signifie que plus de 80% du Cd total seront disponibles pour la plante durant la période de végétation. Dans cette terre, le Cd est donc particulièrement disponible et donc potentiellement phytotoxique. Dans la terre S2, les concentrations totales des métaux ont été divisées par deux suite au traitement par tri physique. Toutefois, la biodisponibilité du Cd reste très élevée puisque plus de 90% du Cd total sont échangeables durant un cycle cultural. La terre S3, présente la biodisponibilité la plus faible avec 45% du Cd total non disponibles pour les plantes. Enfin, la terre S4, qui présente la concentration du Cd total la plus faible, montre une très forte biodisponibilité du Cd puisque 88% sont échangeables en moins de 3 mois.

Tableau 2.3 : Biodisponibilité du Cd des terres S1 à S4

	Unités	S1	S2	S3	^a S4
C_{Cd}	$\mu\text{g l}^{-1}$	^b $50,9 \pm 2,5$	$17,1 \pm 0,85$	$8,1 \pm 0,4$	$0,044$
r_1/R		$0,015 \pm 0,004$	$0,017 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,002$	^c nd
n		$0,26 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,04$	nd
Facteur capacité	l kg^{-1}	108 ± 19	102 ± 10	53 ± 3	nd
$E_{0-1\text{min}}$	mg kg^{-1}	$5,5 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,0$	$0,106$
	(% Cd total)	$(21,4 \pm 3,8)$	$(15,0 \pm 1,5)$	$(6,8 \pm 0,4)$	$(24,2)$
$E_{1\text{min}-24\text{h}}$	mg kg^{-1}	$10,7 \pm 1,5$	$6,4 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,3$	^d $0,227$
	(% Cd total)	$(41,7 \pm 6,0)$	$(54,9 \pm 7,5)$	$(19,4 \pm 4,1)$	$(51,9)$
$E_{24\text{h}-3\text{mois}}$	mg kg^{-1}	$5,3 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$	^e $0,027$
	(% Cd total)	$(20,8 \pm 2,4)$	$(21,5 \pm 3,1)$	$(22,1 \pm 4,4)$	$(6,2)$
$E_{3\text{mois}-1\text{an}}$	mg kg^{-1}	$1,0 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,0$	
	(% Cd total)	$(4,1 \pm 0,7)$	$(0,0 \pm 1,2)$	$(6,1 \pm 0,6)$	^f $0,052$
$E_{>1\text{an}}$		$3,1 \pm 1,3$	$0,6 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,6$	$(11,8)$
		$(12,0 \pm 4,9)$	$(5,6 \pm 3,8)$	$(45,4 \pm 8,8)$	
C_{dE} (Hamon <i>et al.</i> , 2002)	mg kg^{-1}	^g ND	ND	$2,7 \pm 0,1$	ND
	(% Cd total)			$(42,4 \pm 1,4)$	

^a Terre S4 ayant reçu 15 t de boue urbaine compostée $\text{ha}^{-1} \text{an}^{-1}$ durant 4 ans ($C_{\text{d total}} = 0,438 \text{ mg kg}^{-1}$), valeurs d'après Randriamanana, 2001 ; ^b moyenne \pm écart type ; ^c nd = non déterminé ; ^d $E_{1\text{min}-15\text{jours}}$; ^e $E_{15\text{jours}-3\text{mois}}$; ^f $E_{>3\text{mois}}$; ^g ND = non déterminé

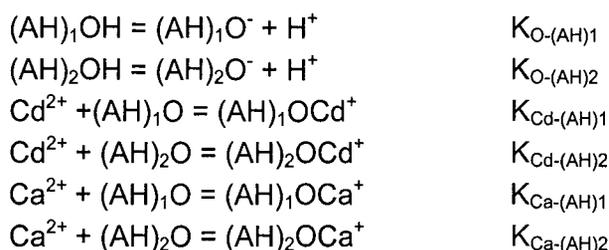
2.3. Spéciation du Cd en solution

La spéciation du Cd dans la solution du sol a été déterminée en utilisant le code de calcul JChess (Van der Lee, 1998). La base de données a été modifiée de façon à tenir compte de la complexation du Cd sur les acides humiques (AH).

2.3.1. Description du modèle

Les AH sont considérés comme des cylindres rigides. Deux sortes de sites primaires d'adsorption sur les AH sont considérés : un site fort et un site faible. Chacun de ces sites peut porter des charges négatives qui sont omises pour permettre une écriture plus claire

des équations. Il n'y a pas d'autres divisions de chacun des groupes. Pour simplifier le calcul, seules les associations monodentates, c'est à dire ne comportant qu'une seule liaison, sont considérées, les associations bidentates possibles étant négligées. Parce que la surface des AH est chargée négativement aux environs de pH 3, l'adsorption des anions est négligée. La quantité totale des sites d'adsorption sur les AH est considérée égale à l'acidité totale. L'ion Ca^{2+} étant le principal ion compétiteur de l'ion Cd^{2+} , nous avons pris en compte dans le modèle l'effet de compétition entre ces deux ions vis-à-vis des sites de charge de la matière organique. Le système de réactions considéré dans le modèle est repris ci-dessous :



2.3.2. Ajustement des paramètres relatifs à la réactivité de la matière organique et aux réactions d'adsorption du Ca et du Cd

Afin de déterminer les paramètres relatifs à la réactivité de la matière organique, nous avons utilisé une base de données provenant des travaux de Benedetti *et al.* (1995) et de Kinniburgh *et al.* (1996) qui ont étudié l'adsorption du Cd et du Ca sur un AH purifié provenant d'une tourbière ainsi que l'effet de compétition de ces deux ions vis-à-vis des sites de charges de cet AH. Les paramètres relatifs au rayon et à la densité des particules ont été fixés (tableau 2.4). Nous considérons, en effet, que ces deux paramètres sont peu sensibles dans le modèle.

Tableau 2.4 : Paramètres fixes utilisés dans le modèle de calcul de l'adsorption du Ca et du Cd sur les AH (Liu et Gonzalez, 2000)

Rayon du cylindre	$r = 0,33 \text{ nm}$
Densité des particules d'AH	$\rho = 1200 \text{ kg m}^{-3}$

Réactivité de la matière organique

A partir des données expérimentales, nous avons ajusté les constantes de dissociation des deux sites ($K_{\text{O}-(\text{AH})1}$ et $K_{\text{O}-(\text{AH})2}$) ainsi que les quantités de charges qui leurs sont associées. Les données expérimentales des auteurs permettent de travailler sur une gamme de pH allant de 5 à 9 pour 3 forces ioniques (0,002 ; 0,01 et 0,08 M). Les valeurs des 4 paramètres ont tout d'abord été ajustées pour chaque force ionique, puis ces valeurs ont été optimisées de façon à n'en retenir qu'une quelle que soit la force ionique de la solution (tableau 2.5). Les constantes de dissociation des charges de surface ont été corrigées selon le modèle de la double couche diffuse.

Tableau 2.5 : Valeurs des paramètres du modèle d'adsorption du Cd sur les acides humiques utilisées pour le calcul de spéciation

Masse molaire	1 200 kg m ⁻³
Surface	5 208 m ² g ⁻¹
Capacité d'échange	
Site AH ₍₁₎ -H	0,478 μmol m ⁻²
Site AH ₍₂₎ -H	0,181 μmol m ⁻²
Constantes	
Log K _{O-(AH)1}	-3,3
Log K _{O-(AH)2}	-5,8
Log K _{Cd-(AH)1}	-4,0
Log K _{Cd-(AH)2}	-1,3
Log K _{Ca-(AH)1}	-2,4
Log K _{Ca-(AH)2}	-3,6

Adsorption du Ca et du Cd

Dans un premier temps, nous avons ajusté séparément les constantes d'adsorption du Ca et du Cd sur les AH. Les constantes relatives à l'adsorption du Ca ($K_{Ca-(AH)1}$ et $K_{Ca-(AH)2}$) ont été ajustées pour une gamme de concentrations variant entre 10^{-6} et 10^{-2} mol Ca²⁺ l⁻¹ pour deux valeurs de pH (6 et 8) et une force ionique de 0,1 M. Les constantes relatives à l'adsorption du Cd ($K_{Cd-(AH)1}$ et $K_{Cd-(AH)2}$) ont été ajustées pour une gamme de concentrations restreinte, correspondant aux valeurs couramment rencontrées dans des systèmes naturels (entre 10^{-9} et 10^{-7} mol Cd²⁺ l⁻¹) pour deux valeurs de pH (6 et 8) et une force ionique de 0,1 M. Comme précédemment, les valeurs des quatre constantes ont été optimisées de façon à n'en retenir qu'une quel que soit le pH de la solution (tableau 2.5).

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'effet de compétition des ions Ca²⁺ et Cd²⁺ vis-à-vis des sites de charges en utilisant les données expérimentales de Kinniburgh *et al.* (1996).

2.3.3. Evaluation de la pertinence du modèle

Les données expérimentales utilisées pour établir le modèle d'adsorption du Ca et du Cd sur les AH présentent l'inconvénient majeur d'être très éloignées des valeurs que l'on peut rencontrer en milieux naturels. Afin d'évaluer la pertinence du modèle, nous l'avons testé avec une série de données de terrain (Sauvé *et al.*, 2000b). Les concentrations du Cd complexé avec les AH calculées avec le modèle correspondent bien aux données mesurées par Sauvé *et al.* (2000b) dans les conditions de pH acide (< 5,5). Pour des pH supérieurs, le modèle tend à surestimer la complexation du Cd. L'AH modèle utilisé pour établir les constantes correspond à une matière organique de tourbe, c'est à dire à des milieux acides, ce qui explique l'adéquation observée entre les données expérimentales et celles de terrain aux faibles pH. En outre, la spéciation du Cd en solution va également dépendre du type de matière organique mise en jeu, c'est à dire de la quantité et de la réactivité des sites de charge. Ainsi, à différents types de sols correspondront différents types d'AH, donc de réactivité. Or, le modèle tient compte d'une réactivité moyenne.

3. Dispositifs de culture

Les cultures en vases de végétation ont été menées dans une chambre climatique avec une photopériode de 16 h jour à 500 mmol de photons m⁻² s⁻¹ / 8 h nuit, une température de 23°C jour / 17°C nuit et une humidité de l'air de 70%. Ces cultures ont été menées à deux échelles différentes, en pots (chapitre 3) et en bacs lysimétriques (chapitre 4). Des cultures

ont également été réalisées en conditions climatiques réelles au Domaine expérimental de La Bouzule (chapitre 5).

4. Echantillonnage des terres

A l'issue des cultures, des échantillons de terre ont été constitués pour chaque répétition de chaque traitement. Dans certains cas, la terre rhizosphérique a été séparée de la terre non rhizosphérique. Pour ce faire, les plantes sont extraites de leur support de culture avec leur système racinaire et légèrement secouées de façon à éliminer la terre faiblement adhérente aux racines. La terre adhérente aux racines est alors considérée comme la terre rhizosphérique. La terre résiduelle est homogénéisée et constitue la terre non rhizosphérique. Lors de cultures successives de plantes sur un même support, plusieurs carottes de sol par dispositif ont été prélevées sur toute la profondeur pour constituer un lot homogène représentatif de chaque répétition à un temps donné. Tous les échantillons de terre ont été séchés à l'air, tamisés à 2 mm et homogénéisés avant leur analyse.

5. Analyse des récoltes

Après récolte, les parties aériennes et racinaires sont récoltées. Les plantes sont lavées à l'eau du robinet puis rincées à l'eau osmosée. Les biomasses fraîches et sèches sont déterminées avant et après passage à l'étuve à 70°C pendant 48h.

5.1. Concentrations totales des métaux

Les concentrations totales des métaux des échantillons végétaux sont déterminées à la suite d'une minéralisation acide. Les différents organes des plantes sont broyés dans un broyeur à mortier en agate. Deux protocoles de minéralisation sont utilisés en fonction de la quantité de biomasse sèche produite.

Protocole 1 :

Une prise d'essai de 0,5 g MS est placée dans un tube à minéraliser et soumise à une attaque acide avec 2 ml H₂SO₄, 6 ml HNO₃ et 6 ml H₂O₂ dans un bloc thermostaté (Schwartz, 1997). Le minéralisat est filtré sur papier filtre sans cendres et complété à 25 ml avec HNO₃ 0,1 M. Des témoins sont réalisés avec du matériel végétal certifié (CRM 281 : ray-grass, CEE et V 463 : maïs, INRA).

Protocole 2 :

Pour certaines expériences, la biomasse sèche produite avoisinait 20 mg, quantité trop faible pour utiliser le protocole précédent. Un protocole adapté a donc du être développé. Pour l'établir, nous nous sommes basés sur les travaux de Da Silva *et al.* (1998). Une prise d'essai de 20 mg est placée dans un tube en verre de volume 8 ml avec 2 ml HNO₃ concentré et mis à l'étuve à 80°C pendant 24 heures. Une fois les tubes refroidis, 2 ml H₂O₂ 30% sont ajoutés. Les minéralisats sont transvasés dans des flacons en polypropylène et les tubes sont rincés avec 10 ml d'eau osmosée. Des essais ont été réalisés sur deux échantillons certifiés : l'échantillon CRM 281 (ray-grass, CEE) et l'échantillon V463 (maïs, INRA-USRAVE). Un échantillon moyen *T. caerulescens* a également été utilisé comme référence. Cet échantillon a été analysé selon le protocole 1 puis trois sous échantillons ont été envoyés dans un laboratoire d'analyse des végétaux (INRA-USRAVE) pour en déterminer la concentration moyenne du Cd et du Zn. Les valeurs de concentration moyenne des éléments dans ces échantillons sont reprises dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6 : Comparaison des concentrations moyennes du Cd et du Zn dans les échantillons de référence avec les valeurs obtenues à l'aide du protocole 2

Echantillon	Valeurs référence		Protocole 2	
	Cd mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	Cd mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹
CRM 181	^a 0,120 (0,003)	31,5 (1,4)	0,080 (0,020)	29,7 (2,3)
V 463	1,58 (0,09)	59,9 (3,8)	1,56 (0,24)	56,5 (5,9)
<i>T. caerulea</i>	326 (4)	3750 (25)	334 (20)	3510 (26)

^a moyenne (écart type)

Les analyses des concentrations du Cd et du Zn dans les minéralisats sont réalisées par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES, Varian, Liberty II) ou spectrométrie d'absorption atomique électro-thermique (Spectraa 220, Varian, four à effet Zeeman) pour le Cd lorsque les concentrations étaient très faibles (inférieures à 100 µg l⁻¹).

5.2. Composition isotopique des plantes

Le ¹⁰⁹Cd est compté dans tous les échantillons secs, sur la totalité de la biomasse végétale broyée grossièrement, puis dans les minéralisats (200 échantillons) par comptage gamma (Packard Cobra Auto-Gamma Counting Systems modèle 503). La figure 2.3 montre une perte de rendement de comptage suite à la minéralisation. Malgré ces résultats, les calculs de composition isotopique des plantes ont été réalisés sur la base des valeurs obtenues par comptage sur échantillons liquides afin que les mesures des valeurs *E* et *L* se fassent dans les mêmes conditions de comptage.

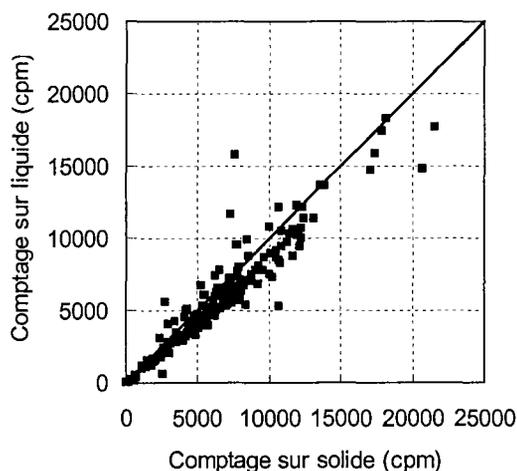


Figure 2.2: Comparaison des concentrations du ¹⁰⁹Cd (cpm plante⁻¹) dans les plantes en fonction du type de comptage sur solide ou liquide

6. Traitement statistique des données

Dans les figures et tableaux, les valeurs sont représentées pour chaque traitement par la moyenne arithmétique des répétitions affectée d'une lettre donnée par le test de Newman Keuls effectué suite à l'analyse de variance. Les valeurs suivies de lettres identiques au sein d'un même groupe statistique ne présentent pas de différences significatives au seuil de confiance de 5%. Les régressions sont accompagnées de l'équation de régression suivie du coefficient de corrélation (*r*). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STATBOX™ (Grimmer logiciels ©).

Afin de représenter la variabilité au sein des populations nous avons utilisé une représentation en box-plot (figure 2.3). Chaque boîte représente 50% de la variance avec la

valeur médiane représentée sous forme d'une ligne. Les limites supérieures (QS) et inférieures (QI) de la boîte représentent $\pm 25\%$ de la variance, la distance entre les deux étant appelée distance interquartile (DIQ). Les lignes extérieures à la boîte représentent les valeurs minimum et maximum dans le jeu de données qui rentre dans une gamme de variation acceptable. Les valeurs en dehors de cette gamme, appelées individus remarquables, sont représentées sous la forme de points et sont déterminées selon le calcul :

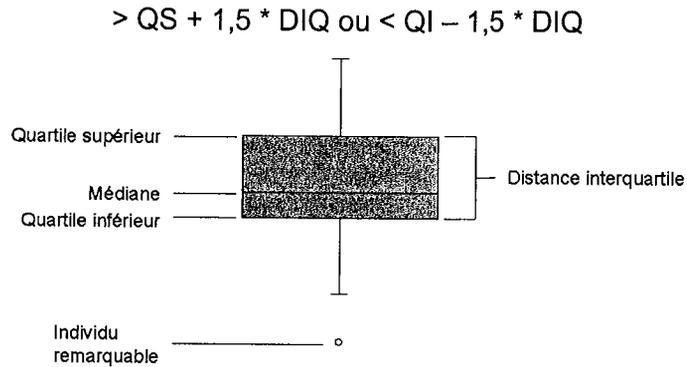


Figure 2.3 : Représentation en box-plot

Chapitre 3

***Origine de la variabilité de l'hyperaccumulation
chez *Thlaspi caerulescens* :***

***Contribution de la biodisponibilité des métaux
et des différenciations génétiques***

L'hyperaccumulateur *T. caerulescens* peut accumuler de grandes quantités de Zn sur une large gamme de sols présentant des concentrations normales de cet élément (Escarré *et al.*, 2000 ; Schwartz, 1997 ; Reeves *et al.*, 2001). Le comportement de cette espèce serait un trait constitutif et établi de longue date (Boyd et Martens, 1992 ; Lombi *et al.*, 2000 ; Reeves *et al.*, 2001). De précédentes études ont mis en évidence le rôle de la biodisponibilité des métaux dans l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. Toutefois, des différences marquées ont été enregistrées pour l'accumulation du Cd, certains individus pouvant atteindre 3000 mg kg⁻¹ dans les parties aériennes (Reeves *et al.*, 2001 ; Schwartz, 1997 ; Schwartz *et al.*, 2001c). Les mécanismes d'absorption mis en jeu seraient différents pour le Cd et le Zn, les populations accumulant le Cd à des concentrations élevées possèderaient un transporteur spécifique à très forte affinité pour cet élément (Lombi *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2002). Le territoire français compte au moins 80 sites abritant *T. caerulescens* et offrant une large gamme de populations évoluant dans des conditions écologiques différentes (Reeves *et al.*, 2001).

La génétique d'un caractère métrique est centrée sur l'étude de sa variation que l'on peut subdiviser en composantes attribuables chacune à une cause différente (Falconer, 1974). La valeur de cette variation est mesurée et exprimée par la variance. La variance totale représente alors la valeur des variances phénotypiques, c'est à dire la valeur du caractère mesuré sur un individu (par exemple la concentration du Cd dans les parties aériennes d'une plante). Elle se décompose en 3 éléments : la variance des valeurs génotypiques, la variance des écarts d'environnement et la variance d'interaction.

L'origine de la variation de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens* peut ainsi être scindée en deux composantes : les variations dues aux écarts de l'environnement, représentées principalement par les variations de la biodisponibilité des métaux dans les sols, et les variations génotypiques entre les populations. Il ne s'agit pas ici de considérer l'effet de la biodisponibilité des métaux sur l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens* en étudiant une population cultivée sur une large gamme de sols. Notre objectif est de déterminer comment, et avec quelle intensité, la biodisponibilité et la génétique influencent l'hyperaccumulation des métaux chez *T. caerulescens*. Pour cela, nous avons croisé l'utilisation d'un panel de populations présentant des aptitudes variées à hyperaccumuler les métaux avec un panel de sols présentant des biodisponibilités des métaux contrastées.

Dans la première partie, nous étudierons les relations existant entre les paramètres des sols (fertilité des terres, concentrations totale et biodisponible des métaux) et les paramètres des plantes (production de biomasse, concentrations des métaux dans les parties aériennes et racinaires, quantités de métaux extraites) en utilisant des méthodes statistiques multivariées. L'objectif est d'établir un modèle empirique expliquant la concentration des métaux chez *T. caerulescens* en fonction des paramètres du sol les plus pertinents avec une attention particulière pour les paramètres décrivant la biodisponibilité des métaux.

Dans la deuxième partie, nous étudierons la variabilité génotypique entre quatre populations de *T. caerulescens* présentant des potentiels d'hyperaccumulation différents. Un grand nombre d'individus de chaque population sera ainsi cultivé sur une même terre, offrant par conséquent les mêmes conditions de disponibilité du Cd. La culture est menée en conditions contrôlées de façon à s'affranchir des variations des conditions environnementales. Dans cette partie, nous allons également déterminer si le Cd accumulé par ces quatre populations est prélevé dans le même compartiment du Cd du sol. Pour cela, nous avons comparé les valeurs *E* et *L* du Cd pour évaluer l'aptitude des plantes à accéder au Cd non labile du sol en modifiant les conditions rhizosphériques.

PARTIE I. Influence des propriétés des sols sur l'hyperaccumulation des métaux par *T. caerulescens*

Cette première partie est dédiée à l'étude des relations entre les paramètres du sol (fertilité des terres, concentrations totales et biodisponibles des métaux) et les paramètres des plantes (biomasse, concentrations des métaux dans les parties aériennes et racinaires). L'objectif est de déterminer si la variation de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*, observée *in situ* en conditions naturelles, peut être expliquée par les variations des propriétés des sols et en particulier par les variations de biodisponibilité des métaux.

1. Matériels et méthodes

1.1. Sites prospectés

Au total, 9 sites codifiés par une lettre (A à I) ont été prospectés du 24 au 29 juillet 2001 dans le sud de la France.

Tous les sites sont des friches industrielles, mines de Zn/Pb et fonderies de Zn, sauf le site F qui est une carrière de roches serpentiniques caractérisées par des concentrations élevées du Ni et très faibles du Zn et du Cd. Tous abritent *T. caerulescens*. Une brève description des sites est faite ci-après (d'après Reeves *et al.*, 2001) :

Site A : Ce site a été exploité par intermittence depuis le XIII^{ème} siècle avec une prédominance pour l'exploitation du Pb. *T. caerulescens* peut être observé dans plusieurs habitats en bordure de route ou sous les résineux. Les prélèvements ont été faits en deux endroits dans un coteau et au niveau d'anciens bâtiments industriels.

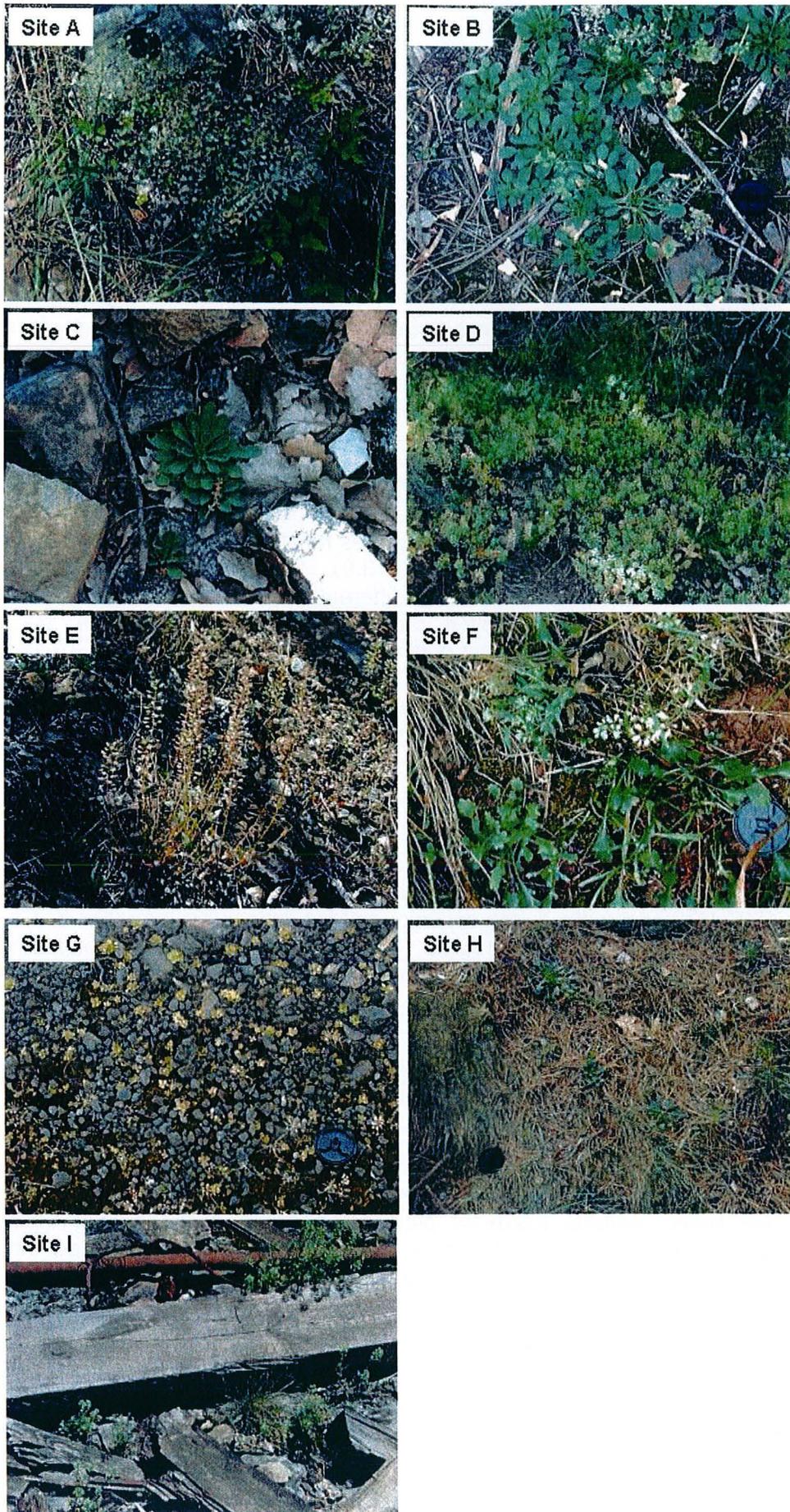
Site B : Ce site a été exploité de façon intensive jusqu'en 1972. Il se caractérise par une succession dans l'espace de substrats plus ou moins compactés et plus ou moins sableux. Le site est recolonisé en partie par une végétation arbustive et herbacée. *T. caerulescens* se développe sur les différents substrats ainsi qu'en bordure de forêt. Les prélèvements ont été réalisés sur 5 zones correspondant à des substrats et des habitats différents.

Site C : Ce site minier présente une forte recolonisation par la végétation environnante. Comme pour le site B, différents substrats peuvent être observés en fonction de leur caractère sableux ou compacté. *T. caerulescens* est trouvé sur ces substrats mais également dans des zones herbacées plus éloignées ou sous couvert forestier. Les prélèvements ont été faits dans 3 zones et dans un cas (C2') le sol adhérent aux racines a été séparé du sol non adhérent.

Site D : Ce site n'est plus exploité depuis de nombreuses années. La colonisation par la végétation est très dense. Une forte présence de *T. caerulescens* est observée autour de l'ancien bâtiment industriel. Les plantes ont été prélevées dans deux zones. Les concentrations des métaux rencontrées sur ce site sont particulièrement élevées.

Site E : Cet ancien site d'exploitation du Zn et du Pb se situe à flanc de montagne. Les plantes sont localisées en bordure de chemin et sur les coteaux. Les prélèvements ont été réalisés en deux endroits au sommet.

Site F : C'est un site de serpentine qui s'élève à une altitude de 350 à 480 m. Les sols de ce site présentent des concentrations particulièrement élevées du Ni. *T. caerulescens* est retrouvé sous forme de 3 populations sur le site. Les plantes ont été prélevées dans l'une d'entre elles en bordure de route.



Photographies 3.1 à 3.9: *Thlaspi caerulescens* sur les différents sites métallifères prospectés

Site G : Sur ce site, une fonderie de Zn/Cd a été opérante jusqu'à la fin des années 80. Les sols sont non seulement contaminés dans la zone même de traitement des métaux, mais également sur une surface de plusieurs kilomètres carrés autour du site comprenant les voies de chemin de fer et les talus routiers. *T. caerulescens* a été collecté dans 4 zones différentes.

Site H : Cet ancien site minier d'extraction du Pb s'élève à 850-880 m d'altitude. Les prélèvements ont été faits sur deux zones l'une présentant des concentrations élevées du Pb et faibles du Cd et du Zn et l'autre des concentrations élevées du Cd et du Zn et faibles du Pb.

Site I : Ce site n'est plus en activité depuis de nombreuses années, seuls quelques vestiges des anciens bâtiments témoignent encore de l'activité de fonderie de Pb. Les plantes ont été prélevées en deux zones, l'une des deux correspondant au bâtiment de stockage des déchets de Pb. Les concentrations des métaux sur ce site sont très élevées.

1.2. Echantillonnage

Sur chaque site, plusieurs couples sol-plante ont été prélevés sur une ou plusieurs zones choisies de façon à représenter des substrats et des habitats différents et/ou un gradient de concentration des métaux (photographies 3.1 à 3.9). Pour un même site, les individus de *T. caerulescens* récoltés dans des zones différentes seront considérés comme des populations distinctes. La terre récoltée provenait, autant que possible, de la zone d'enracinement de *T. caerulescens*, c'est à dire jusqu'à une profondeur de 10-15 cm. Les terres ont été séchées à l'air et tamisées à 2 mm avant analyse. Les plantes ont été prélevées avec leur système racinaire et préparées en vue de leur analyse en métaux totaux (chapitre 2, § 4). Une collection de graines a également été constituée pour chaque site pour les essais de laboratoire.

1.3. Paramètres mesurés

Les terres ont été caractérisées par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA à ARRAS. Les paramètres retenus sont la granulométrie 5 fractions, le pH eau, le Ca total et actif, le P Olsen, la capacité d'échange cationique et les cations majeurs (Na, K, Ca, Mg), le C et l'N organique et les métaux totaux (Cu, Zn, Ni, Pb et Cd ; tableau 3.2). Les concentrations du S sous forme sulfates ont également été mesurées au laboratoire (chapitre 2, § 2.2).

La biodisponibilité du Cd et du Zn a été déterminée sur toutes les terres des sites prospectés à l'aide des cinétiques d'échange isotopique (Cd) et d'extractions au chlorure de calcium (CaCl_2 0,01 M) (Cd et Zn) (chapitre 2, § 2.3).

1.4. Méthodes statistiques

Afin d'étudier les relations entre les variables mesurées (caractéristiques physico-chimiques des terres, métaux totaux et biodisponibles, concentrations et quantités de métaux extraites par les plantes), le choix s'est porté sur des méthodes statistiques multivariées. L'analyse en composantes principales (ACP) a donc été utilisée pour regrouper les variables sur la base de leurs intercorrélations. Une rotation des facteurs a été réalisée selon la méthode varimax de façon à ce que les contributions pour chaque facteur tendent vers des valeurs les plus proches possibles de 1 et -1 et d'éliminer les contributions moyennes. Ainsi, il est possible d'observer des distinctions plus nettes dans la formation des facteurs. Seules les variables comprises entre 1 et 0,7 et entre -0,7 et -1 ont été considérées comme corrélées avec les facteurs. Le nombre de facteurs a été restreint à 6.

En complément de l'analyse en composantes principales, une analyse des variables a été réalisée sur la base de leurs ressemblances. La classification hiérarchique permet donc de classer un groupe de variables en sous-groupes relativement homogènes sur la base de leurs similitudes ou de leurs différences.

La modélisation des concentrations du Cd et du Zn dans les parties aériennes et racinaires de *T. caerulescens* a été réalisée selon la méthode de régression multiple pas à pas.

2. Résultats

2.1. Caractéristiques physico-chimiques des terres

2.1.1. Analyse agronomique

Les résultats sont donnés tableau 3.1 sous forme synthétique et les résultats complets des analyses physico-chimiques de chaque terre sont repris en annexe 1.

Tableau 3.1 : Principales caractéristiques agronomiques des 24 échantillons de terre prélevés sur différents sites métallifères du sud de la France

	Unités	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane
argiles	%	1,5	22,7	9,2	9,2
limons fins	%	2,4	38,4	14,8	13,2
limons grossiers	%	1,1	22,2	11,4	10,8
sables fins	%	3,5	54,4	19,8	16,0
sables grossiers	%	10,1	91,2	44,9	42,9
pH eau		5,8	8,3	7,2	7,3
CaCO ₃ total	%	0,2	84,7	32,8	21,8
CaCO ₃ actif	%	1,3	2,6	1,4	1,3
P ₂ O ₅ Olsen	‰	0,002	0,090	0,022	0,015
S-SO ₄	mg kg ⁻¹	8,0	333,5	66,9	26,0
CEC	cmol kg ⁻¹	0,5	35,5	8,0	5,6
Ca ²⁺	cmol kg ⁻¹	0,9	23,9	5,7	4,2
Na ⁺	cmol kg ⁻¹	0,004	0,063	0,022	0,019
Mg ²⁺	cmol kg ⁻¹	0,21	24,37	2,24	0,84
K ⁺	cmol kg ⁻¹	0,017	0,505	0,169	0,131
carbone organique	%	0,4	13,6	3,9	2,7
matières organiques	%	0,7	23,4	6,7	4,6
azote organique	%	0,01	0,84	0,20	0,11
C/N		9,4	68,5	24,2	19,8

Les terres sont majoritairement de texture sableuse avec un pH allant de 5,8 à 8,3. De façon générale, leur fertilité est plutôt faible. En effet, le P assimilable est présent en très faible quantité et la capacité d'échange cationique se situe presque toujours en dessous de 10 cmol kg⁻¹. La mesure des concentrations des sulfates permet d'identifier deux groupes : les terres dont les valeurs sont proches de celles généralement rencontrées dans les sols agricoles (entre 8 et 20 mg kg⁻¹) et les terres présentant des valeurs 2 à 20 fois plus élevées. Les terres sont bien pourvues en matières organiques avec quelques valeurs supérieures à 10%. Le rapport C/N varie entre 9 et 69 avec une grande majorité des terres au dessus de 15.

2.1.2. Concentrations totales des métaux

Les concentrations des métaux totaux sont très élevées, souvent proches de 1% pour le Zn et pouvant atteindre 10% pour les terres les plus contaminées (C3, D1, D2 et I2) (tableau

3.2). Les concentrations du Pb se situent généralement autour de 0,5% mais elles peuvent dépasser 1% (C3, D2, E1, G1, H2 et I1) voire 10% (D1 et I2) dans certaines terres. Les concentrations du Cd se situent entre 50 et 350 mg kg⁻¹ sauf dans les terres F1 et H2 qui présentent 2 et 3 mg kg⁻¹, valeurs proches de la limite de concentration dans les sols pour l'épandage des boues urbaines (Arrêté du 8 janvier 1998). La majorité des terres prospectées présentent des concentrations du Cu et du Ni inférieures ou légèrement supérieures aux valeurs limites de concentration dans les sols pour l'épandage des boues. La terre F1 se démarque toutefois avec 1 840 mg Ni kg⁻¹ et les terres G1 et G3 avec respectivement 4 610 et 1 090 mg Cu kg⁻¹.

Tableau 3.2 : Concentrations totales des métaux (extraction HF, mg kg⁻¹) dans les 24 échantillons de terre prélevés sur différents sites métallifères du sud de la France

	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane
Cu	4	4 610	326	50
Zn	379	96 100	29 119	24 950
Ni	2	1 840	101	25
Pb	81	143 000	14 930	4 870
Cd	2	348	132	82

2.1.3. Biodisponibilité des métaux

Compartiments du Cd échangeable au cours du temps

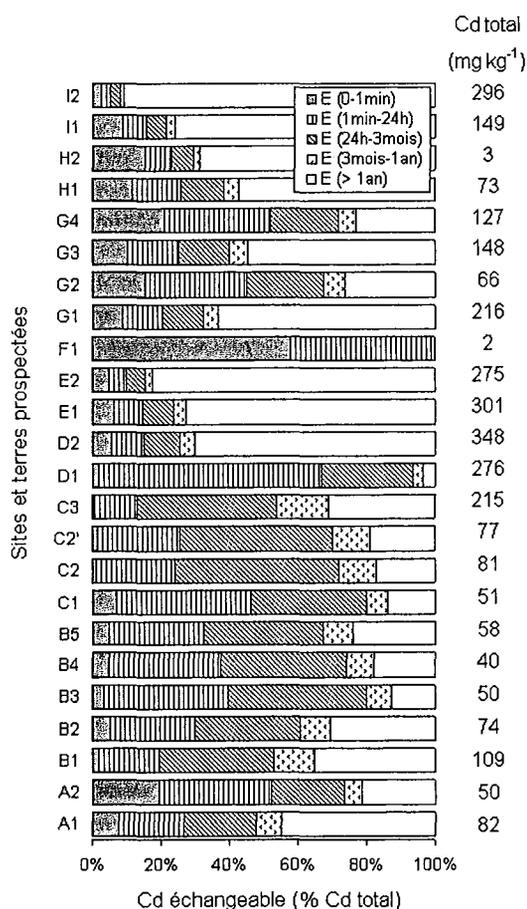


Figure 3.1 : Répartition du Cd entre les compartiments échangeables au cours du temps pour différentes terres métallifères du sud de la France (les valeurs sont exprimées en pourcentage du Cd total)

Les terres se répartissent majoritairement en deux lots : celles dont la grande majorité du Cd total (40 à 70%) est échangeable en plus d'un an et celles dont la majorité du Cd total (50 à 100%) est échangeable en moins de 3 mois (figure 3.1). De façon générale, $E_{0-1\text{min}}$ représente moins de 20% du Cd total sauf dans la terre F1 où il atteint près de 60%. Dans les terres étudiées, le Cd devient proportionnellement moins échangeable avec l'augmentation de sa concentration totale (figure 3.2).

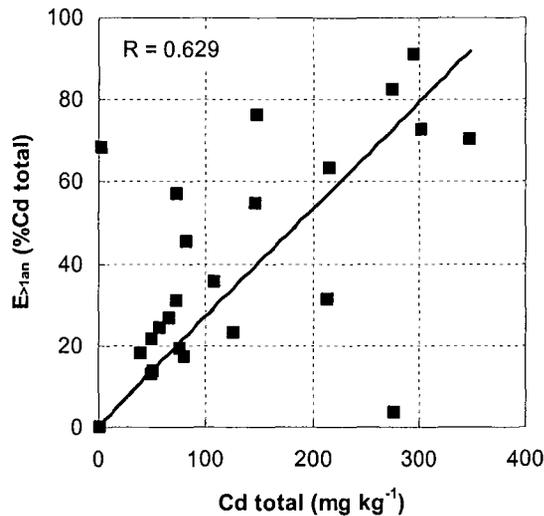


Figure 3.2 : Relation entre la concentration totale du Cd et la proportion d'élément isotopiquement échangeable en plus d'un an dans les 24 terres étudiées

Le facteur capacité (figure 3.3) varie de 1 à 43 l kg^{-1} ce qui est relativement peu élevé pour un élément non essentiel comme le Cd. La concentration du Cd dans les suspensions de terres varie entre 0,1 et 2,7 mg l^{-1} (figure 3.4). La terre F1 (terre de serpentine) se démarque des autres avec une concentration du Cd dans la solution de 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ et un facteur capacité proche de 250 l kg^{-1} (valeurs non représentées sur les graphiques). Vu la faible concentration du Cd mesurée, l'erreur inérente à l'analyse est élevée ce qui conduirait à une exagération du facteur capacité.

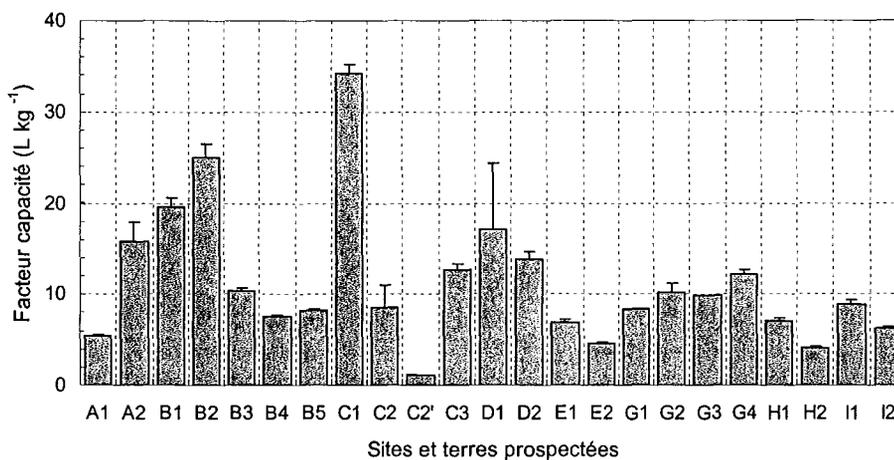


Figure 3.3 : Comparaison du facteur capacité (l kg^{-1}) entre différentes terres métallifères du sud de la France

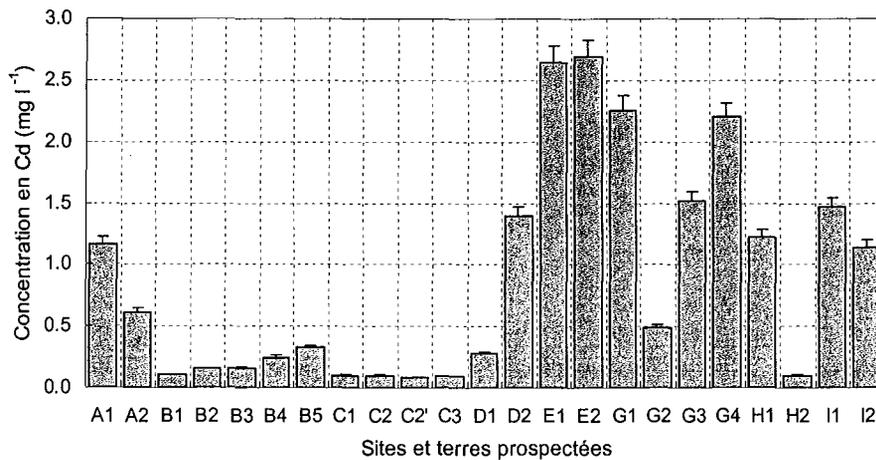


Figure 3.4 : Concentrations du Cd (mg l⁻¹) dans les suspensions des différentes terres étudiées

Métaux extractibles au chlorure de calcium

Les quantités de Cd et de Zn extraites par CaCl₂ 0,01 M dans les terres prospectées varient respectivement entre 0,25 et 15,6 mg kg⁻¹ (figure 3.5) et entre 19 et 654 mg kg⁻¹ (figure 3.6). En moyenne, 4,7% du Cd et 1,2% du Zn ont été extraits des terres (tableau 3.3). Concernant le Cd, ces valeurs restent proches de celles obtenues pour le compartiment E_{0-1min}. Les sites prospectés présentent des profils de biodisponibilité du Cd et du Zn semblables.

Tableau 3.3 : Principaux paramètres statistiques des concentrations du Cd et du Zn biodisponibles (extraction CaCl₂ 0,01 M ; % des métaux totaux) et des compartiments du Cd isotopiquement échangeable (% du Cd total) de différentes terres métallifères du sud de la France

	Teneurs extractibles (CaCl ₂ 0,01M)		Compartiments du Cd isotopiquement échangeable			
	Cd	Zn	E _{0-1min}	E _{1min-6mois}	E _{6mois-1an}	E _{>1an}
Minimum	0,34	0,03	0,6	6,1	0,0	0,0
Maximum	12,34	5,15	58,1	93,5	7,1	90,9
Moyenne	4,71	1,22	9,5	47,8	2,9	39,9
Médiane	3,59	0,86	5,8	54,1	2,5	30,9

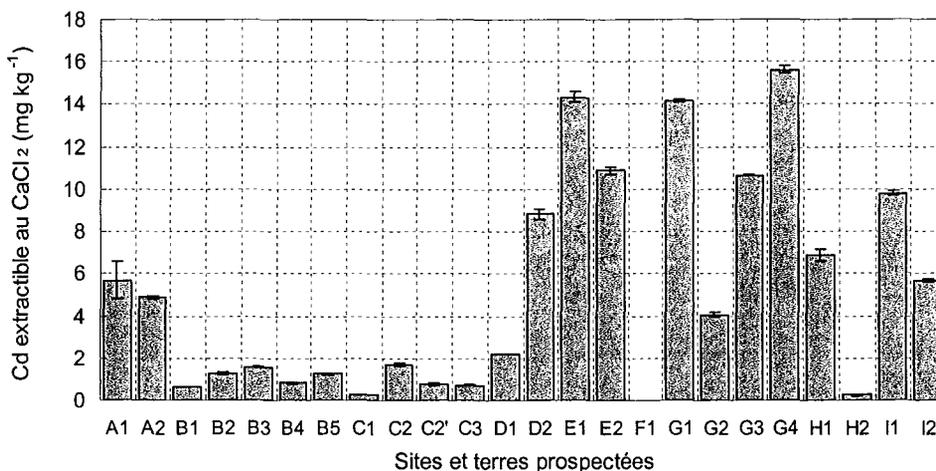


Figure 3.5 : Concentrations du Cd extractible (CaCl₂ 0,01 M) dans les terres prospectées

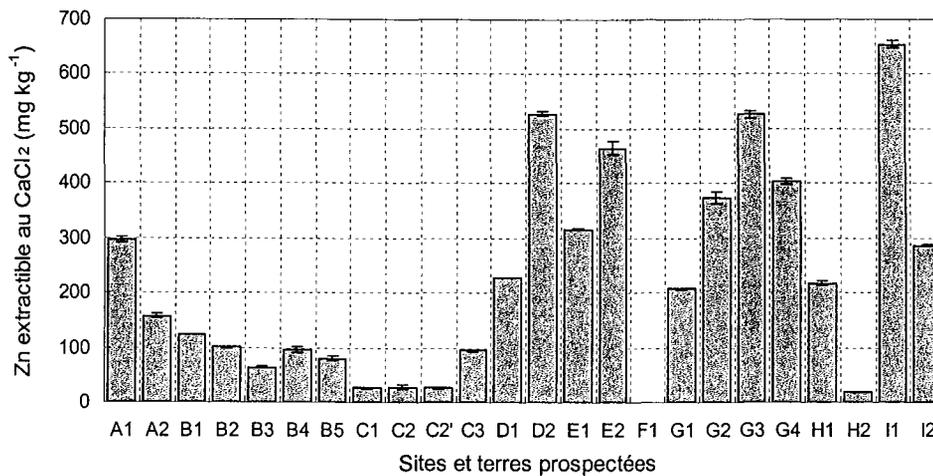


Figure 3.6 : Concentrations du Zn extractible (CaCl_2 0,01 M) dans les terres prospectées

De façon générale, la taille du compartiment du Cd présent dans la solution du sol et faiblement adsorbé sur la phase solide dans les terres métallifères échantillonnées mesurée selon la méthode des cinétiques d'échange isotopique est un tiers supérieure à celle mesurée par extraction au CaCl_2 0,01 M (figure 3.7).

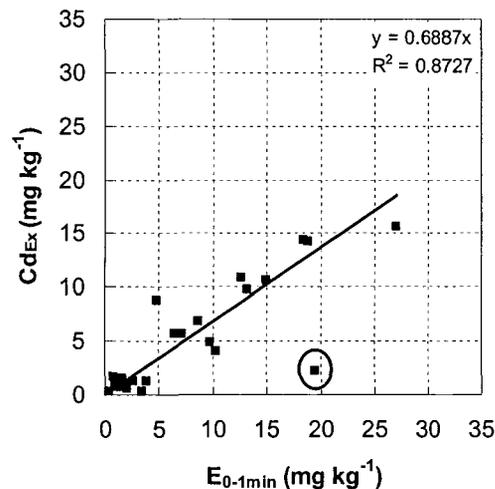


Figure 3.7 : Relation entre les quantités de Cd extraites par une solution de CaCl_2 0,01 M (Cd_{Ex}) et le compartiment du Cd échangeable en une minute ($E_{0-1\text{min}}$) dans 24 terres métallifères du sud de la France (le point encadré ne participe pas à la régression)

2.2. Extraction des métaux par *T. caerulescens* sur sites métallifères

2.2.1. Biomasse

Il existe une très forte hétérogénéité de la biomasse produite tant à l'échelle des sites qu'à celle des populations (tableau 3.4). La biomasse aérienne sèche individuelle la plus élevée est observée sur les terres B3 et B4, avec environ 500 mg par plante tandis que la plus faible est observée sur les terres C3 et G1. Ces deux derniers sites sont caractérisés par une forte compaction de la terre.

Tableau 3.4 : Production de biomasse sèche aérienne et racinaire (mg) par *Thlaspi caerulescens* sur les terres prospectées, valeurs minimum (min), maximum (max), moyenne (moy) et nombre d'individus récoltés (N)

Population	N	Feuilles			Racines		
		Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
A1	1	-	-	238	-	-	216
A2	1	-	-	187	-	-	295
B1	19	10	153	61	2	62	15
B2	5	53	211	131	45	318	136
B3	10	110	1043	489	30	171	85
B4	8	132	839	508	29	135	89
B5	10	16	182	119	4	47	22
C1	8	26	208	117	9	473	121
C2	12	110	937	342	32	239	95
C3	13	13	138	44	2	27	8,5
D1	17	27	189	75	6	35	14
D2	13	12	427	102	4	17	8,1
E1	17	15	908	113	6	37	20
E2	10	46	986	213	1	212	43
F1	10	13	502	115	2	427	27
G1	29	5	255	41	4	213	59
G2	14	16	1004	271	5	38	20
G3	11	55	316	152	4	45	21
G4	19	20	221	105	2	66	27
H1	15	21	625	177	2	66	27
H2	6	24	555	193	9	56	31
I1	9	13	975	282	1	118	34
I2	10	21	291	98	4	195	46

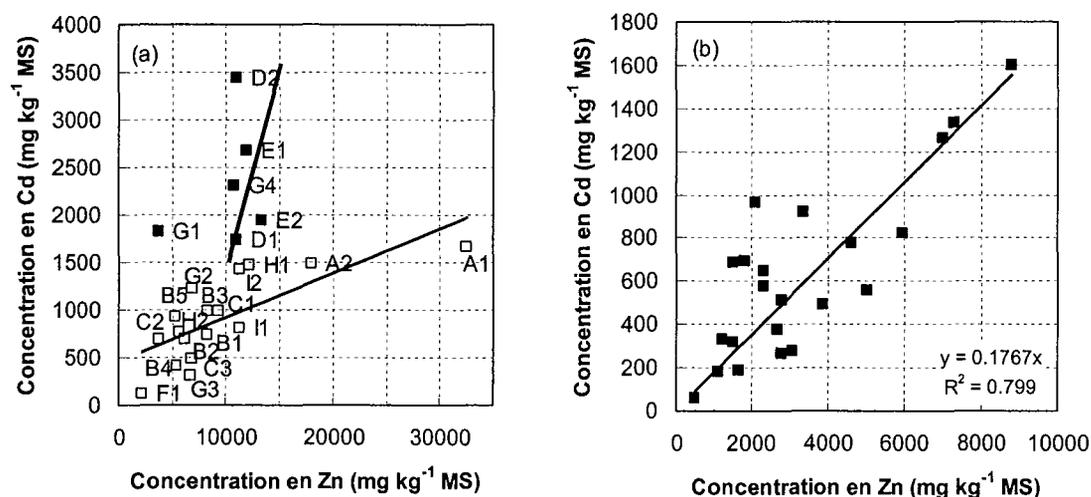
2.2.2. Concentrations des métaux

Les concentrations du Ni dans les parties aériennes sont très proches de zéro sauf chez la population F1 qui contient 9 829 mg Ni kg⁻¹ MS. Cette population est hyperaccumulatrice de Ni avec une faible accumulation de Cd et de Zn (tableau 3.5). Les concentrations du Zn varient entre 2 000 et 33 000 mg kg⁻¹ soit entre 0,2 et 3,3% de la biomasse sèche totale pour la population A1. Enfin, les concentrations du Cd varient entre 100 et 3 500 mg kg⁻¹ MS. Les populations présentant les plus fortes concentrations sont alors D2 et E1 avec respectivement 2 670 et 3 448 mg Cd kg⁻¹ MS.

Dans les racines (tableau 3.5), les concentrations des métaux sont systématiquement plus faibles que celles observées dans les parties aériennes sauf pour la population G3 en ce qui concerne le Cd et la population C2 en ce qui concerne le Zn. Les concentrations du Cd varient entre 59 et 1 643 mg kg⁻¹ MS tandis que celles du Zn varient entre 507 et 8 797 mg kg⁻¹ MS.

Tableau 3.5 : Concentrations du Cd, du Ni et du Zn (mg kg^{-1}) dans les parties aériennes et racinaires de *Thlaspi caerulescens* et minéralomasses ($\mu\text{g plante}^{-1}$) calculées (moyenne des individus récoltés)

Population	Concentrations des métaux (mg kg^{-1})						Minéralomasses ($\mu\text{g plante}^{-1}$)		
	Parties aériennes			Parties racinaires			Parties aériennes		
	Cd	Ni	Zn	Cd	Ni	Zn	Cd	Ni	Zn
A1	1660	<0,1	32579	821	12,1	5944	395	<0,1	7754
A2	1488	<0,1	17945	178	<0,1	1103	278	<0,1	3356
B1	730	<0,1	8291	492	<0,1	3880	45	<0,1	509
B2	693	<0,1	6197	320	<0,1	1514	121	<0,1	1078
B3	988	<0,1	8249	281	4,8	3060	523	<0,1	4370
B4	407	<0,1	5462	185	<0,1	1678	207	<0,1	2776
B5	931	<0,1	5271	683	1,2	1523	110	<0,1	625
C1	987	<0,1	9355	328	<0,1	1217	122	<0,1	1153
C2	687	<0,1	3810	559	<0,1	5003	235	<0,1	1304
C3	481	<0,1	6874	264	<0,1	2785	21	<0,1	302
D1	1737	0,2	10936	1601	<0,1	8797	123	<0,1	776
D2	3448	<0,1	11037	922	1,9	3350	351	<0,1	1124
E1	2670	<0,1	11912	1332	<0,1	7292	271	<0,1	1209
E2	1944	0,1	13322	1264	<0,1	6986	415	<0,1	2843
F1	118	9829,1	2191	59	1297,5	507	5	424,3	95
G1	1821	<0,1	3751	966	0,2	2105	493	<0,1	1016
G2	1219	<0,1	6832	575	<0,1	2323	186	<0,1	1042
G3	304	<0,1	6715	777	<0,1	4608	32	<0,1	707
G4	2303	<0,1	10709	1643	0,1	2225	76	<0,1	355
H1	1468	<0,1	12202	648	0,9	2300	259	<0,1	2154
H2	764	2,0	5688	691	<0,1	1790	147	0,4	1097
I1	805	<0,1	11186	373	<0,1	2671	227	<0,1	3156
I2	1426	0,9	11217	514	<0,1	2764	129	<0,1	1015


 Figure 3.8 : Relation entre les concentrations du Zn et du Cd (mg kg^{-1} MS) dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de *Thlaspi caerulescens* collecté sur différents sites métallifères

L'analyse des relations entre les concentrations du Cd et du Zn dans les parties aériennes et dans les racines de *T. caerulescens* (figure 3.8) met en évidence une corrélation positive hautement significative. Dans les feuilles, un groupe de populations se distingue par des concentrations croissantes en Cd pour une même concentration en Zn.

Dans les racines, les concentrations du Cd augmentent de façon linéaire avec celles du Zn. La population G4 ne participe pas à la régression.

Le facteur de translocation du Cd et du Zn des racines vers les parties aériennes de *T. caerulescens* (PA/PR) oscille entre 1 et 16 pour le Zn et entre 1 et 8 pour le Cd. La population A2 se distingue particulièrement des autres par son aptitude la plus élevée à transférer les métaux vers ses parties aériennes.

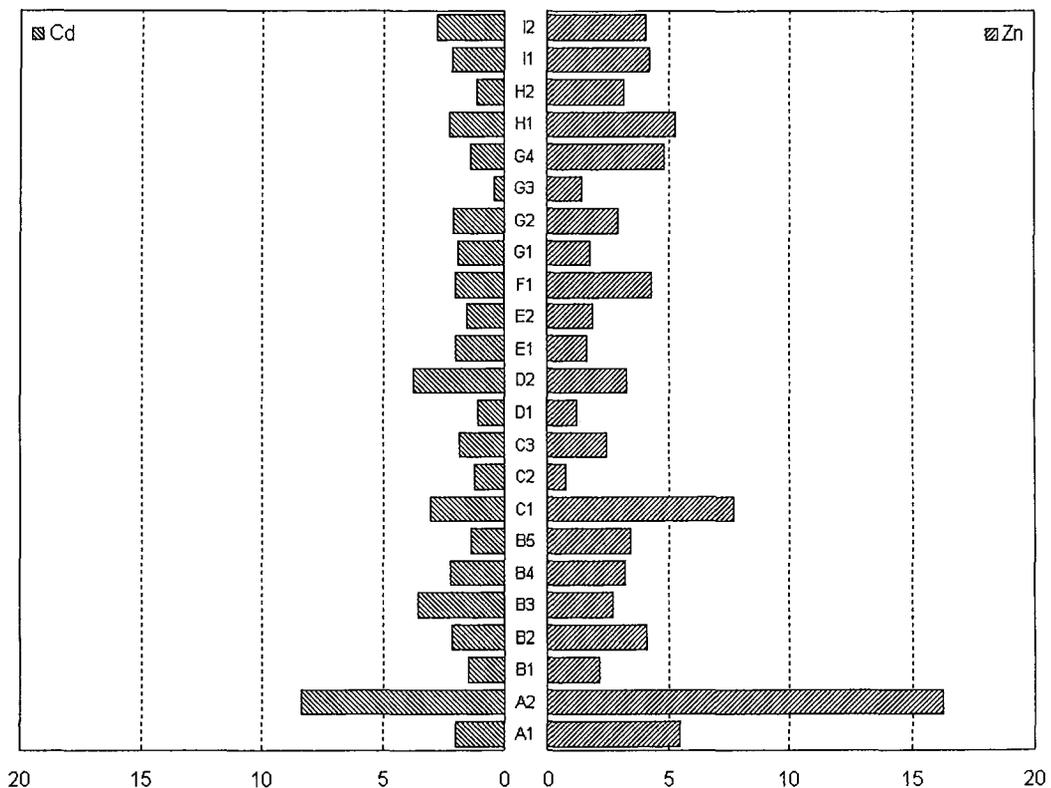


Figure 3.9 : Facteur de translocation du Cd et du Zn des racines vers les parties aériennes de *Thlaspi caerulescens* collecté sur différents sites métallifères du sud de la France

2.2.3. Extraction des métaux

Les quantités moyennes de métaux extraites par plante (seules les parties aériennes sont prises en compte) ont été calculées pour chaque site (tableau 3.5). La population F1 a extrait 424 µg Ni par plante contre seulement 95 et 5 µg par plante de Zn et de Cd respectivement. Pour les autres populations, les quantités totales extraites varient entre 0,5 et près de 8 000 µg par plante pour le Zn et entre 20 et 500 µg par plante pour le Cd.

2.3. Modélisation empirique de l'hyperaccumulation des métaux par *T. caerulescens*

2.3.1. Influence des propriétés des sols sur la mobilité et la biodisponibilité des métaux

Le tableau 3.6 montre les coefficients de corrélation entre les paramètres physico-chimiques des terres et la biodisponibilité du Cd et du Zn. La plus faible valeur significative

des coefficients de corrélation est 0,422 dans un intervalle de confiance de 95%. La quantité de Cd biodisponible en un an ($E_{<1an}$) ne présente de relation statistiquement significative qu'avec le contenu total en Zn des sols. Les autres paramètres de biodisponibilité semblent mieux corrélés aux propriétés physico-chimiques des terres.

Tableau 3.6 : Coefficients de corrélation entre les paramètres agronomiques des terres et la mobilité et la biodisponibilité du Cd et du Zn dans les sols métallifères (NS=non significatif) (Les valeurs hautement significatives ($p < 0.01$) sont représentées en gras)

Nomenclature		$E_{(0-1min)}$	$E_{(<1an)}$	$E_{(>1an)}$	^a Cd _{Ex}	^b Zn _{Ex}	^c FC
A	Argiles	0,423	NS	NS	NS	NS	0,456
LF	Limons fins	0,618	NS	0,561	0,443	NS	NS
LG	Limons grossiers	0,605	NS	0,601	0,450	0,648	NS
SF	Sables fins	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SG	Sables grossiers	-0,452	NS	-0,437	NS	NS	NS
pH eau		-0,437	NS	NS	NS	-0,596	NS
CaCO ₃ total	Calcaire total	-0,612	NS	NS	-0,492	-0,568	NS
S-SO ₄	Soufre échangeable	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P ₂ O ₅ Olsen	Phosphore échangeable	NS	NS	0,597	NS	0,592	NS
CEC	Capacité d'échange cationique	0,436	NS	NS	NS	0,483	NS
Ca	Calcium échangeable	NS	NS	NS	NS	NS	0,471
Na	Sodium échangeable	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mg	Magnésium échangeable	NS	NS	-0,453	-0,473	NS	0,655
K	Potassium échangeable	0,464	NS	NS	NS	0,500	NS
MO	Matière organique	0,664	NS	NS	0,464	0,636	NS
Norg	Azote organique	0,543	NS	NS	NS	0,683	NS
C/N		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cu tot	Cuivre total	0,414	NS	NS	0,401	NS	NS
Zn tot	Zinc total	NS	0,615	0,679	NS	0,600	NS
Ni tot	Nickel total	0,759	NS	0,584	0,651	NS	NS
Pb tot	Plomb total	NS	NS	0,661	NS	NS	NS
Cd tot	Cadmium total	0,555	NS	0,951	0,664	0,559	NS

^a Cd_{Ex} = Cd extractible (CaCl₂ 0,01 M) ; ^b Zn_{Ex} = Zn extractible (CaCl₂ 0,01 M) ; FC = facteur capacité

De façon à expliquer les valeurs de Cd_{Ex} et de Zn_{Ex} en fonction des paramètres sols nous avons fait appel à la méthode de régression multiple pas à pas. Seules les régressions pour lesquelles toutes les variables contribuaient significativement ($p < 0,05$) à leur formation ont été retenues (tableau 3.7). Les résultats nous montrent que les principaux facteurs affectant la mobilisation du Cd dans la solution du sol sont la concentration totale des carbonates et la concentration totale du Cd dans les sols tandis que la mobilisation du Zn est affectée par le pH et la concentration totale du Zn dans les sols. Les coefficients de corrélation multiple sont élevés avec un seuil de significativité inférieur à 0,01. En parallèle, nous avons testé l'équation générale obtenue pour Zn par McBride *et al.* (1997) sur 31 terres contaminées. Leurs valeurs de paramètres sont proches de celles que nous avons obtenues par régression sur notre propre jeu de données. Le calcul de Zn_{Ex} avec leur modèle permet d'estimer la valeur mesurée de façon hautement significative.

Tableau 3.7 : Coefficients appliqués pour les régressions linéaires des concentrations des métaux dans la solution ($\mu\text{g l}^{-1}$) en fonction du \log_{10} de la concentration dans les sols des carbonates totaux (%), du \log_{10} des concentrations des métaux totaux (mg kg^{-1}) et du pH et coefficients de corrélation multiple (R)

Log ₁₀ (métal extractible par CaCl ₂)	paramètres		constante	R	N
Cd =	- 0,326 * log (CaCO ₃ tot) +	0,865 * log (Cd _{tot}) -	1,653	0,783	23
Zn =	- 0,556 * pH	+ 0,589 * log (Zn _{tot}) +	3,664	0,798	23
^a Zn =	- 0,710 * pH	+ 0,680 * log (Zn _{tot}) +	4,440	^b 0,789	23

^a équation générale obtenue par McBride *et al.* (1997) sur 31 terres contaminées

^b coefficient de corrélation simple entre les valeurs de Zn_{EX} mesurées et calculées

2.3.2. Influence des propriétés des sols sur les concentrations du Cd et du Zn dans les plantes

Le tableau 3.8 montre les coefficients de corrélation entre les paramètres physico-chimiques et de biodisponibilité des métaux des terres, d'une part, et les paramètres plante, d'autre part, (biomasse, concentration du Cd et du Zn dans les parties aériennes et racinaires). La biomasse ne présente pas de réelle corrélation avec les paramètres sols, la seule corrélation mise en évidence étant très proche de la valeur limite inférieure. Concernant les concentrations des métaux dans les organes de *T. caerulescens*, les corrélations sont faibles avec les paramètres agronomiques des terres (haut du tableau). En revanche, les corrélations sont très élevées entre les métaux dans les sols et ceux dans les plantes (bas du tableau). Notons par exemple les relations $E_{0-1\text{min}} - \text{Cd}_F$ ($r = 0,727$), $E_{0-1\text{min}} - \text{Cd}_R$ ($r = 0,753$) et $\text{Cd}_{\text{EX}} - \text{Cd}_R$ ($r = 0,816$).

L'ACP a été réalisée avec la totalité des paramètres sols et plantes (figure 3.10). Le pourcentage de variance expliquée par les six facteurs atteint 80,6%. Seules les variables expliquant les axes ($0,7 < r < 1$ ou $-1 < r < -0,7$) et celles statistiquement bien représentées dans le plan des axes (somme des $\cos^2 \geq 0,5$) apparaissent sur les cartes des variables.

Le facteur 1, qui explique 21,9% de la variance totale, est lié d'une part avec les paramètres de fertilité (CEC, Na, K, MO, N_{org}) et d'autre part avec le pH (figure 3.10a). Les deux groupes de variables sont anti-corrélés. Le facteur 2 (18,6%) est fortement corrélé aux variables décrivant le Cd, tant dans les sols que dans les plantes. Plusieurs autres variables sont également bien représentées dans le plan des deux facteurs sans toutefois intervenir dans l'explication de ces facteurs. Ainsi la concentration du P assimilable se positionne à proximité du facteur 2 tandis que les compartiments du Cd total et isotopiquement échangeable se positionnent à proximité du facteur 1. Un petit groupe de variables, composé des concentrations du Ni total et du Zn extractible ainsi que du pourcentage en limons grossiers, se situe à équidistance des deux facteurs. Les facteurs 3 et 4 (figure 3.10b) expliquent chacun 12,5% de la variance totale. Les variables corrélées aux facteurs sont le pourcentage d'argile, la concentration du Ca et la capacité tampon des terres en ce qui concerne le facteur 3. Le facteur 4 quant à lui est expliqué par la concentration du Zn dans les parties aériennes de *T. caerulescens* associé à la concentration du Pb dans les sols.

Tableau 3.8 : Coefficients de corrélation entre les paramètres des sols et la biomasse produite et les concentrations du Cd et du Zn dans les parties aériennes (Cd_F et Zn_F) et racinaires (Cd_R et Zn_R) de *Thlaspi caerulescens* prélevé sur sols métallifères (NS=non significatif). (Les valeurs hautement significatives ($p < 0.01$) sont représentées en gras)

	Nomenclature	Biom	Cd_F	Zn_F	Cd_R	Zn_R
A	Argiles	NS	NS	NS	NS	NS
LF	Limons fins	-0,428	0,464	NS	NS	NS
LG	Limons grossiers	NS	0,450	NS	NS	NS
SF	Sables fins	NS	NS	NS	NS	NS
SG	Sables grossiers	NS	NS	NS	NS	NS
pH eau		NS	NS	NS	NS	NS
CaCO ₃ total	Calcaire total	NS	NS	NS	NS	NS
S-SO ₄	Soufre échangeable	NS	NS	NS	NS	NS
P ₂ O ₅ Olsen	Phosphore échangeable	NS	NS	0,636	NS	NS
CEC	Capacité d'échange cationique	NS	NS	NS	NS	NS
Ca	Calcium échangeable	NS	NS	NS	NS	NS
Na	Sodium échangeable	NS	NS	NS	NS	NS
Mg	Magnésium échangeable	NS	NS	NS	-0,456	NS
K	Potassium échangeable	NS	NS	NS	NS	NS
MO	Matière organique	NS	NS	NS	NS	NS
Norg	Azote organique	NS	NS	NS	NS	NS
C/N		NS	NS	NS	NS	NS
Cu tot	Cuivre total	NS	NS	NS	NS	NS
Zn tot	Zinc total	NS	NS	NS	NS	NS
Ni tot	Nickel total	NS	0,541	NS	0,508	NS
Pb tot	Plomb total	NS	NS	0,900	NS	NS
Cd tot	Cadmium total	NS	0,634	NS	0,454	0,477
E _(0-1min)		NS	0,727	NS	0,753	NS
E _(<1an)	Compartiments du Cd isotopiquement échangeable	NS	NS	NS	NS	NS
E _(>1an)		NS	0,620	0,501	NS	0,479
Cd _{EX}	Cd extractible au CaCl ₂	NS	0,672	NS	0,816	0,548
Zn _{EX}	Zn extractible au CaCl ₂	NS	0,451	NS	0,468	NS
FC	Facteur capacité	NS	NS	NS	NS	NS

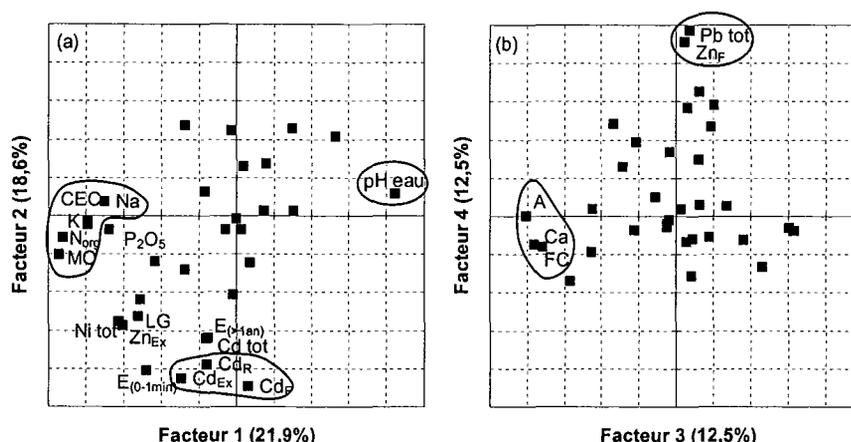


Figure 3.10 : Cartographie de la position des variables sol et plante en fonction des composantes principales sur 21 terres métallifères du sud de la France (a : facteurs 1 et 2 ; b : facteurs 3 et 4)

La classification hiérarchique ascendante permet de visualiser les distances entre les variables et de ce fait de distinguer des groupes homogènes (figure 3.11). L'analyse du dendrogramme révèle la formation de groupes de variables en adéquation avec les résultats de l'ACP. Le premier groupe est constitué par le pourcentage d'argiles et les concentrations du Ca et du Mg échangeables associés au facteur capacité. La force de liaison entre les variables atteint 0,47. Un deuxième groupe est constitué des paramètres relatifs à la rétention des cations dans les sols avec en première ligne la capacité d'échange cationique et la concentration dans les sols des matières organiques. La distance moyenne entre les paramètres constitutifs du groupe, r , est de 0,56 ce qui montre une bonne cohésion. Un troisième groupe est constitué par les paramètres liés au Cd avec, d'une part, les variables représentatives de la mobilité du Cd ($E_{0-1\text{min}}$ et Cd_{Ex}) et, d'autre part, les variables représentatives de la phytodisponibilité du Cd (Cd_R et Cd_F) ($r = 0,57$). La distance moyenne entre ces deux groupes est de 0,34, indiquant une liaison assez faible entre eux. Enfin, le dendrogramme met en évidence une relation entre les variables relatives aux concentrations totales des métaux (Zn, Cd et Pb). Les autres paramètres, en particulier les concentrations du Zn dans les parties aériennes et racinaires de *T. caerulescens*, ne présentent de relations significatives avec aucun groupe.

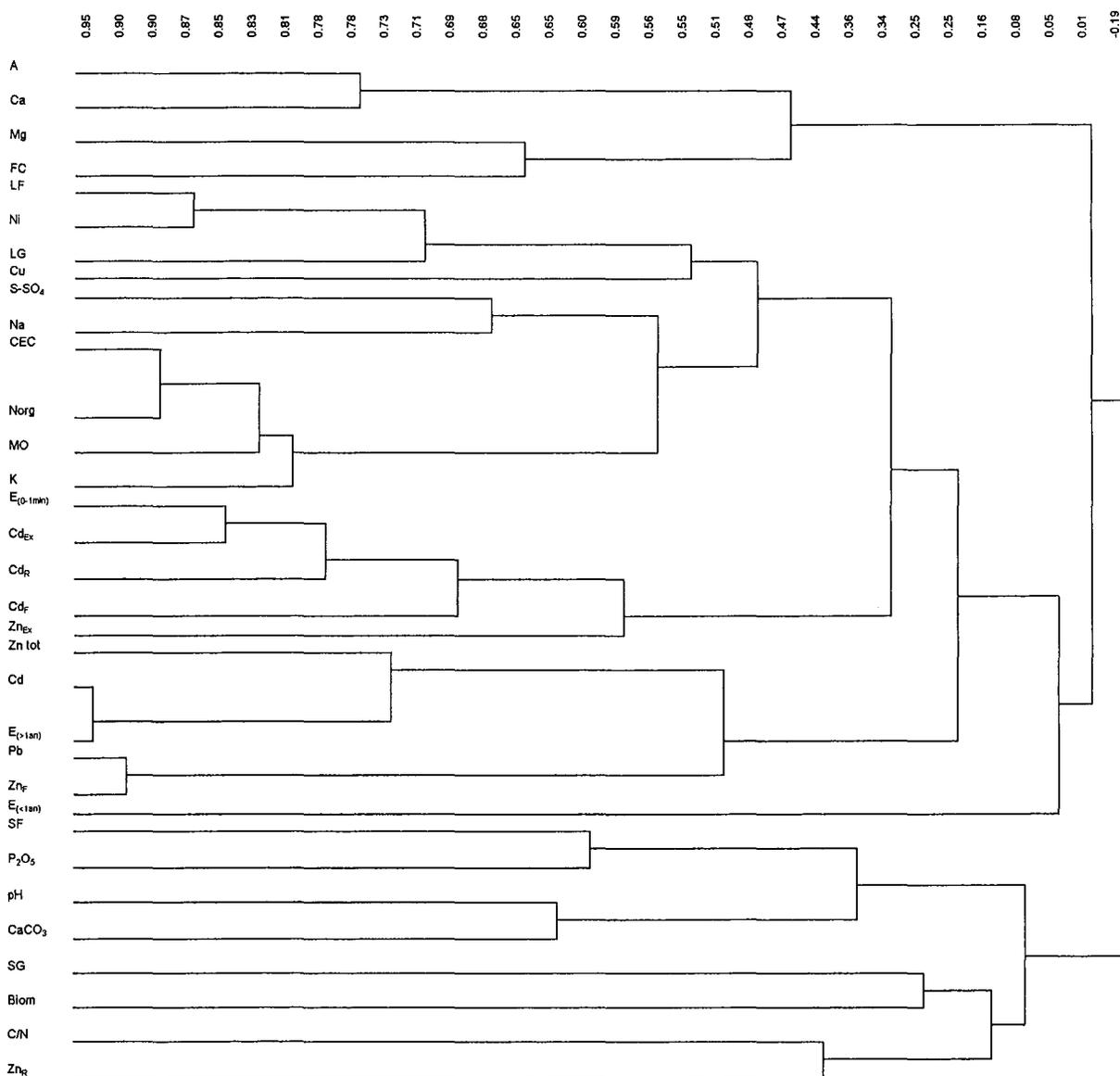


Figure 3.11 : Dendrogramme de classification de l'ensemble des variables sols et plantes

Des analyses en régression multiple ont également été réalisées afin d'expliquer l'accumulation des métaux dans les organes de *T. caerulescens* sur sites naturels (tableau 3.9). Seules les régressions pour lesquelles la totalité des variables contribuaient significativement ($p < 0,05$) à la formation de l'équation ont été retenues. L'accumulation du Zn par *T. caerulescens* est très peu liée aux paramètres sols contrairement à l'accumulation du Cd. Les concentrations du Cd et du Zn dans les racines de *T. caerulescens* sont significativement liées aux concentrations des métaux extractibles avec CaCl_2 0,01M et au pH. Pour le Zn, aucune régression n'a pu être dégagée pour expliquer ses concentrations dans les parties aériennes des plantes. A contrario, la concentration du Cd dans les feuilles est significativement affectée par le pH des terres, la capacité d'échange cationique ainsi que la concentration du Cd mobile. Les coefficients de corrélation multiple obtenus sont élevés avec un seuil de significativité inférieur à 0,01.

Tableau 3.9 : Coefficients appliqués pour les régressions linéaires des concentrations des métaux dans les parties aériennes (Cd_F) et racinaires (Cd_R et Zn_R ; mg kg^{-1}) de *Thlaspi caerulescens* en fonction du \log_{10} de la concentration du calcium dans les sols (cmol kg^{-1}), du \log_{10} des concentrations des métaux extractibles au CaCl_2 (mg kg^{-1}), du pH et du \log_{10} de la capacité d'échange cationique (CEC) et coefficients de corrélation multiple (R)

Log ₁₀ (métal)	Paramètres	constante	R	N
$\text{Zn}_R =$	$- 0,404 * \log (\text{Ca}) + 0,257 * \log (\text{Zn}_{\text{Ex}}) +$	3,116	0,629	23
$\text{Cd}_R =$	$- 0,326 * \log (\text{Ca}) + 0,326 * \log (\text{Cd}_{\text{Ex}}) +$	3,034	0,752	23
$\text{Cd}_F =$	$+ 0,301 * \text{pH} \quad + 0,246 * \log (\text{CEC}) + 0,373 * \log (\text{Cd}_{\text{Ex}}) +$	0,837	0,788	23

3. Discussion

Nous voulions déterminer si la variation de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*, observée *in situ* en conditions naturelles, pouvait être expliquée par les variations des propriétés des sols et en particulier par les variations de biodisponibilité des métaux. Pour cela, nous avons étudié les relations entre les paramètres de biodisponibilité du Cd et du Zn dans 23 terres métallifères avec l'hyperaccumulation du Cd et du Zn chez les populations de *T. caerulescens* correspondantes. Nous avons pu établir des relations empiriques entre d'une part le Cd et le Zn biodisponibles et les paramètres du sol et d'autre part entre le Cd et le Zn dans les organes de *T. caerulescens* et la biodisponibilité des métaux ainsi que les propriétés des sols associées.

3.1. Biodisponibilité du Cd et du Zn

Les propriétés physico-chimiques des terres étudiées sont très variables tant entre les sites qu'entre les différentes zones prospectées au sein même de chaque site. La raison provient sans doute des origines différentes de la contamination : soit par dépôt de particules par voie atmosphérique, soit par dépôt de déchets issus du traitement des minerais. Les métaux sont présents dans les terres sous des formes chimiques variées auxquelles pourra être attribuée une biodisponibilité propre.

Les faibles valeurs du facteur capacité mesurées peuvent être attribuées aux concentrations élevées du Cd dans la solution du sol, de l'ordre du mg l^{-1} , par rapport au compartiment $E_{0-1\text{min}}$. Il est connu que les hyperaccumulateurs, lors de leur décomposition, libèrent des éléments métalliques sous une forme plus biodisponible que ceux du sol (Perronnet *et al.*, 2000), permettant ainsi de maintenir des quantités élevées en métaux dans la solution. Il existe une forte liaison entre le Mg, le Ca, les argiles et le facteur capacité dans les terres étudiées. Le facteur capacité représente la capacité des terres à réapprovisionner la solution du sol en ions Cd^{2+} . Ce pouvoir tampon des terres va dépendre des quantités de sites de charge mais également des autres cations susceptibles de rentrer en compétition avec le Cd pour ces sites. Dans notre cas, les cations prioritaires sont les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

Alors que le pH apparaît souvent comme le facteur dominant de la régulation de l'adsorption du Cd, nous n'avons pas dégagé de liaison significative avec le facteur capacité.

Seules les concentrations totales du Cd et du CaCO₃ expliquent significativement le Cd extractible au CaCl₂ 0,01 M (Cd_{Ex}) dans les terres étudiées (tableau 3.6). La majorité des terres présentent des concentrations élevées des carbonates (> 10%). Dès lors, une grande partie du Cd total du sol pourrait être sous la forme minérale CdCO₃ ou sous forme de complexes de surface sur les carbonates.

Dans les sols carbonatés Zn pourra également réagir avec CaCO₃ par précipitation ou complexation de surface. Toutefois, contrairement au Cd, CaCO₃ ne représente pas le facteur dominant la biodisponibilité du Zn. Une corrélation négative forte entre le pH et le complexe d'échange (CEC et matières organiques (MO)) a été établie dans les terres métallifères étudiées. Si le Zn est présent majoritairement sur le complexe d'échange et lié à la MO, le pH est le facteur contrôlant sa biodisponibilité.

3.2. Hyperaccumulation des métaux

Les analyses des concentrations et des quantités de Zn et de Cd extraites par *T. caerulescens* confortent les résultats obtenus précédemment (Reeves *et al.*, 2001) sur l'existence d'une grande variabilité entre les différentes populations. Cette variabilité s'exprime entre les différentes aires géographiques mais également pour un même site entre différentes niches écologiques. De telles variations peuvent être le reflet de différences génétiques ou le résultat de la forte hétérogénéité caractéristique des sites miniers et industriels (Schwartz *et al.*, 2001a). Dans les parties racinaires, les concentrations du Cd augmentent linéairement avec les concentrations du Zn ce qui indique une absence d'un effet antagoniste d'un métal sur l'absorption de l'autre. Cela prouve également que l'absorption de ces deux métaux fait intervenir deux transporteurs spécifiques. Dans les parties aériennes, les populations se distinguent en deux groupes. Dans le premier groupe, les concentrations du Cd augmentent linéairement avec l'augmentation des concentrations du Zn, indiquant un transfert similaire des deux métaux. Dans le deuxième groupe les concentrations du Cd augmentent pour une même concentration du Zn. Chez ces populations, le transfert du Cd des parties racinaires vers les parties aériennes serait plus efficace. Les deux groupes de populations présenteraient alors des mécanismes distincts.

La forte variabilité observée en milieu naturel vis-à-vis de l'accumulation du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* apparaît comme étant fortement liée à la biodisponibilité du Cd dans les terres. Cette observation n'exclut toutefois pas l'existence de différences génétiques entre les populations étudiées. Les populations que nous avons étudiées, bien que d'aires géographiques différentes, proviennent toutes du sud de la France. Elles pourraient avoir évolué à partir d'une même population mère possédant un transporteur spécifique. Si l'on considère que la première évolution concerne l'acquisition d'un transporteur spécifique au Cd, la seconde évolution pourrait concerner l'expression de ce transporteur. Un certain nombre de populations étudiées présenterait cette propriété.

Dans le cas du Zn, nous n'avons pas pu observer d'influence des paramètres du sol sur son accumulation dans les parties aériennes de *T. caerulescens*. Cela ne signifie pas pour autant que la biodisponibilité du Zn n'influence pas son absorption par *T. caerulescens*. Il est probable que dans les terres métallifères étudiées le Zn biodisponible ne soit pas en quantités limitantes. De ce fait, les variations observées dans l'hyperaccumulation du Zn entre les différentes populations de *T. caerulescens* seraient principalement dues à des variations génétiques. La forte concentration rencontrée dans la population A1 correspondrait à une stimulation supérieure du transport du Zn concernant aussi bien son influx dans les cellules racinaires et foliaires que son transport dans la sève brute.

4. Conclusion

Dans les terres métallifères prospectées, les concentrations du Cd et du Zn dans les racines de *T. caerulescens* sont expliquées par les concentrations extractibles au CaCl_2 et la concentration du Ca échangeable. Dans les parties aériennes des plantes, la concentration du Cd est principalement expliquée par sa biodisponibilité, la capacité d'échange cationique et le pH. Ainsi, les variations de la biodisponibilité du Cd contrôleraient majoritairement l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens* par rapport aux variations génétiques. Dans le cas du Zn, les concentrations biodisponibles n'étant pas limitantes dans les terres, nous n'avons pas pu identifier de relation avec l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. Dès lors, les variations observées pourraient être attribuées aux variations génétiques seules. Ainsi les variations génétiques entre les différentes populations étudiées participent dans la variation totale de l'hyperaccumulation tant du Cd que du Zn chez *T. caerulescens*. Afin de le vérifier, nous avons cultivé quatre populations montrant des aptitudes différentes à hyperaccumuler le Cd sur une même terre présentant les mêmes conditions de biodisponibilité.

PARTIE II. Effet des variations génétiques sur l'hyperaccumulation du Cd chez *T. caerulescens*

L'étude du comportement de *T. caerulescens* dans son habitat naturel a mis en évidence l'existence d'une forte variabilité entre différentes populations de *T. caerulescens* pour l'hyperaccumulation du Cd et du Zn. Une large part de cette variabilité a pu être imputée aux quantités de métaux biodisponibles du sol en ce qui concerne le Cd. Une large gamme de concentrations du Cd dans les parties aériennes des plantes entre les individus d'une même population avait également été observée (Reeves *et al.*, 2001). Une telle variation peut être la conséquence de différences génétiques entre les individus ou le résultat de l'hétérogénéité typique des sols de sites miniers ou de fonderie.

D'autre part, le compartiment labile est représenté par la quantité de métal, dans la solution du sol et sur la phase solide, directement disponible pour les plantes durant leur période de croissance. Il est mesuré via l'utilisation d'isotopes, soit par équilibre chimique (valeur *E*), soit par l'absorption par les plantes (valeur *L*) (Lopez et Graham, 1970). La comparaison des valeurs *L* et *E* donne une indication sur l'aptitude des plantes à accéder au compartiment non labile des métaux par des modifications des conditions rhizosphériques. En effet, la dissolution de formes non labiles des métaux peut apparaître dans la rhizosphère à travers des processus comme la production d'exsudats racinaires solubilisant les métaux ou la diminution du pH rhizosphérique.

Peu d'expériences ont comparé les valeurs *E* et *L* pour le Cd. Hutchinson *et al.* (2000) ont comparé les valeurs *L* de six populations de *T. caerulescens* aux valeurs *E* de six sols présentant un gradient des concentrations totales en Cd allant de 59 à 770 mg kg⁻¹ de sol sec. Les valeurs *L* étaient toujours très proches des valeurs *E* indiquant que, dans les sols étudiés, *T. caerulescens* n'était pas capable d'absorber du Cd non labile en modifiant les conditions rhizosphériques. Des résultats similaires ont été obtenus par Hamon et McLaughlin (1999) qui n'ont trouvé aucune différence entre les valeurs *L* de *T. caerulescens* et celle du blé pour une gamme de sols contaminés allant de 0,1 à 19,5 mg Cd kg⁻¹ de sol sec. Gérard *et al.* (2001) a comparé les valeurs *E* d'un sol carbonaté (18,7 mg Cd kg⁻¹ sol sec, pH 8) et d'un sol acide (20,3 mg Cd kg⁻¹ sol sec ; pH 6,2) aux valeurs *L* de trois plantes présentant des stratégies d'accumulation différentes : *T. caerulescens*, *Lactuca sativa* et *Lolium perenne*. Il semblerait que *T. caerulescens* ne soit pas capable de mobiliser le Cd isotopiquement non échangeable lorsque les fractions totales ou biodisponibles sont très élevées. Par opposition, quand les fractions totales ou biodisponibles du Cd des sols sont faibles, *T. caerulescens* pourrait mobiliser du Cd non labile.

L'objectif de cette partie est de déterminer dans quelle mesure la variabilité génétique entre les populations de *T. caerulescens* peut expliquer la variabilité d'hyperaccumulation observée en conditions naturelles. Dans cette étude en conditions contrôlées, la variabilité observée entre les individus dans chaque population pourra être principalement attribuée à des différences génétiques puisque le sol aura été longuement mélangé et homogénéisé avant sa mise en culture. Le dispositif utilisé permet également de déterminer dans quelle mesure différentes populations de *T. caerulescens* peuvent accéder au Cd du sol non labile.

1. Matériels et méthodes

1.1. Plantes

Parmi les populations de *T. caerulescens* étudiées, trois d'entre elles (Tc-1, Tc-2 et Tc-3) sont hyperaccumulatrices de Cd et de Zn. Sur leurs sites d'origine (sites B3, C1-3 et G2), ces populations présentent un gradient décroissant de la concentration du Cd dans leurs

parties aériennes de 1 200 à 400 mg Cd kg⁻¹ MS. La quatrième population (Tc-4) est une hyperaccumulatrice de Ni qui présente sur son site d'origine (sol de serpentine des Vosges) une concentration du Cd dans les parties aériennes de 30 mg kg⁻¹ MS (Reeves *et al.*, 2001). Enfin, une plante non hyperaccumulatrice du genre *Thlaspi* a également été suivie afin de vérifier un effet dû aux hyperaccumulateurs. Le choix de l'espèce s'est porté sur *T. arvense* (Ta). Le contenu en Cd des graines est le plus élevé chez les populations de *T. caerulescens* hyperaccumulant le Cd avec 0,15, 0,16 et 0,11 µg par graine pour les populations Tc-1 à Tc-3. Chez Ta et Tc-4, les quantités de Cd sont significativement inférieures avec 0,02 et 0,001 mg par graine respectivement.

1.2. Marquage des terres

Les cultures ont été menées sur la terre agricole S3 préalablement marquée au ¹⁰⁹Cd. Le compartiment du Cd labile du sol a été mesuré par équilibre chimique (Cd_E) et par absorption par les plantes (Cd_L), la comparaison des deux valeurs étant un indicateur de l'aptitude des plantes à accéder au métal non labile du sol.

Le Cd²⁺ isotopiquement échangeable a été marqué à l'aide d'une solution radioactive de ¹⁰⁹Cd²⁺ sous forme de chlorure, à raison de 100 kBq kg⁻¹ de terre. De l'eau osmosée est ajoutée à des lots de 2 kg de terre en même temps que la solution radioactive de façon à les amener à 60% de la capacité au champ. Chaque lot est homogénéisé manuellement pendant 1 h puis tous les lots sont rassemblés et mélangés manuellement à nouveau pendant 1 h. La terre est alors pesée et recouverte d'une bâche opaque. Elle est maintenue à 60% de la capacité au champ pendant deux semaines afin d'obtenir un système stabilisé après le marquage.

1.3. Dispositif

La culture est menée dans des flacons en polyéthylène de 20 ml avec *T. caerulescens* (populations Tc-1, Tc-2, Tc-3 et Tc-4) et *T. arvense*. La terre est introduite dans les flacons à l'état humide à hauteur de 20 g équivalent sol sec. L'humidité est ramenée à 70% de la capacité au champ avec de l'eau osmosée. Trois graines sont semées par flacon de façon à conserver, à terme, un individu pour la culture. Pour chaque population, 100 répétitions sont réalisées (photographie 3.10). Les flacons sont disposés sur des supports en PVC (photographie 3.11). L'arrosage est réalisé quotidiennement à l'eau osmosée.



Photographies 3.10 et 3.11 : Vue générale du dispositif en chambre de culture et 100 individus d'une population de *T. caerulescens* cultivés individuellement en flacons

1.4. Mesure de la valeur E

Les compartiments du Cd isotopiquement échangeable ont été déterminés avant et après culture selon la méthode des cinétiques d'échange isotopique (chapitre 2, § 2.2). Un deuxième protocole a également été utilisé pour mesurer le compartiment labile du Cd (Cd_E) avant culture (Hamon *et al.*, 2002, chapitre 2, § 2.2).

Avant de mesurer Cd_E après culture, les 100 échantillons de terre de chaque population ont été classés selon les valeurs correspondantes de Cd_L croissantes puis regroupés 2 par 2, de façon à obtenir 50 lots de terre par population. Cd_E a alors été mesurée dans 28 lots parmi les 50 pour chaque population : 10 d'entre eux représentent les lots pour lesquels les individus exhibent les valeurs de Cd_L les plus faibles (10^{ème} centile) et les plus élevées (90^{ème} centile), les 18 restants étant sélectionnés au hasard.

1.5. Mesure de la valeur L

Le principe de la détermination de L est d'apporter un élément marqué dans une terre sur laquelle on cultive des végétaux et de mesurer en fin de culture l'activité spécifique de l'élément dans ces végétaux (équations 8 et 9).

$$AS_{\text{plante}} = r_t / Cd_p \quad \text{Eq. 8}$$

où r_t est la quantité d'ions $^{109}\text{Cd}^{2+}$ dans la plante (Bq kg^{-1} terre) et Cd_p la quantité d'ions Cd^{2+} stables dans la plante (mg.kg^{-1} terre) à l'instant t .

$$L = (1/AS_{\text{plante}}) * R \quad \text{Eq. 9}$$

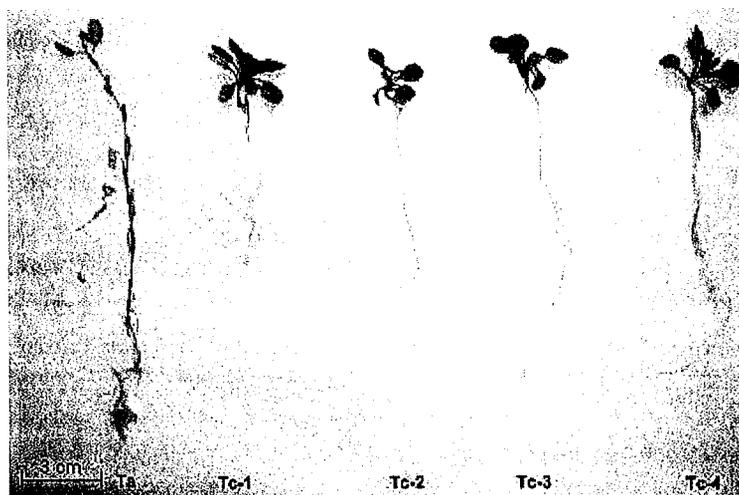
où R est la radioactivité initialement introduite dans un kilogramme de terre (Bq kg^{-1}).

1.6. Récolte

Chaque individu a été récolté avec son système racinaire. Des observations morphologiques des parties aériennes et racinaires ont été réalisées. Nous avons également estimé la longueur racinaire totale (L), la longueur racinaire volumique (L_v) et la mi-distance entre les racines (R_1) pour chaque population. Dans ce but, nous nous sommes basés sur les travaux de Perriguet (2002), qui exprime la longueur racinaire de *T. caerulescens* en fonction de sa biomasse racinaire sèche sous forme d'une équation de régression linéaire. Cette équation nous a permis d'estimer la longueur totale racinaire ainsi que la mi-distance entre les racines.

2. Résultats

A l'issue de la culture, *T. caerulescens* atteint le stade 6-8 feuilles et aucun symptôme de carence ou de toxicité n'est apparent (photographie 3.12). Le témoin, *T. arvense*, présente des chloroses et des nécroses foliaires. En outre, la plupart des individus ont atteint le stade montaison, ce qui est une réponse caractéristique des plantes au stress.



Photographie 3.12 : Morphologie d'individus de *Thlaspi caerulescens* (différentes populations) et *Thlaspi arvense* après récolte

2.1. Morphologie des plantes

Les quatre populations de *T. caerulescens* présentent différents systèmes racinaires. Dans tous les cas, la totalité du volume de sol était colonisé par les racines. Dans les populations Tc-1 et Tc-4, nous avons observé un système racinaire dense avec de nombreuses racines secondaires (figure 3.12a). Dans la population Tc-2, le réseau racinaire était plus large, mais les extrémités racinaires présentaient une prolifération dense de racines secondaires (figure 3.12b). Enfin, Tc-3 était caractérisée par une racine verticale dominante avec des branches diffuses (figure 3.12c).

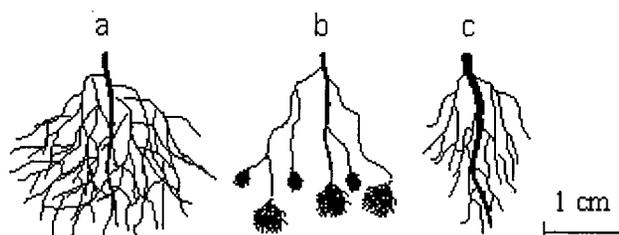


Figure 3.12 : Schéma des différents types de systèmes racinaires observés chez quatre populations de *Thlaspi caerulescens* cultivées sur la terre S3

La longueur totale racinaire a été calculée à partir de la biomasse sèche sur la base de l'équation de regression formée par Perriguet (2000) (tableau 3.10). La longueur racinaire volumique et la mi-distance entre les racines en ont été déduites. Les populations Tc-1 et Tc-4 présentent les longueurs racinaires totales les plus élevées. Ces populations influenceraient la totalité du volume de sol. Les populations Tc-2 et Tc-3 ont développé un système racinaire plus petit. L'effet des racines sur le sol environnant serait plus faible par rapport aux populations précédentes.

Tableau 3.10 : Moyennes estimées de la longueur totale racinaire (L), de la longueur racinaire volumique (L_v) et de la mi-distance entre les racines (R_1) chez *Thlaspi caerulescens* après quatre semaines de culture sur la terre S3

	Equation	Tc-1	Tc-2	Tc-3	Tc-4
L (cm)	$L = 57556 \cdot M_r$	218,7	149,6	132,4	207,2
L_v (cm cm ⁻³)	$L_v = L / (M_{sol} / d_a)$	13,1	9,0	7,9	12,4
R_1 (cm)	$R_1 = 1 / \sqrt{\pi L_v}$	0,16	0,19	0,20	0,16

M_r biomasse sèche racinaire (g) ; $M_{sol} = 20$ g ; d_a densité apparente du sol (1,2)

2.2. Production de biomasse

La production de biomasse au sein des 4 populations de *T. caerulescens* et *T. arvense* est représentée sous forme de box-plot (chapitre 2, § 6). Après 4 semaines de culture, des différences statistiques au seuil de 5% apparaissent entre les différentes populations (figure 3.13). La population Tc-1, avec 22,4 mg de MS moyenne par individu, est celle produisant le plus de biomasse avec Ta. Les autres populations produisent significativement moins de biomasse avec 17,6 mg pour Tc-4 et près de 15 mg pour Tc-2 et Tc-3.

La production de biomasse sèche racinaire moyenne varie entre 2,3 et 4,0 mg par plante (figure 3.14). *T. arvense* présente la plus forte moyenne (4,0 mg plante⁻¹) mais également la plus forte dispersion. Tc-1 et Tc-4 ont produit significativement plus de biomasse racinaire que Tc-2 et Tc-3.

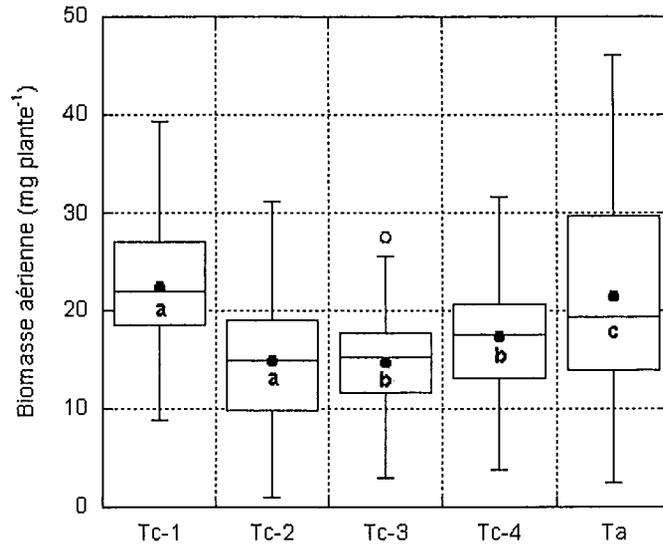


Figure 3.13 : Production de biomasse aérienne sèche par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture (N = 100)

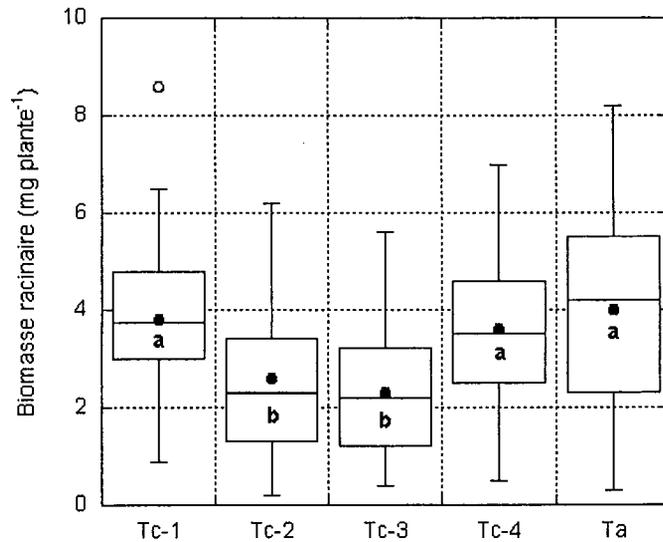


Figure 3.14 : Production de biomasse racinaire sèche par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture sur la terre S3 (N = 100)

2.3. Concentrations du Cd dans les parties aériennes des plantes

La concentration du Cd dans les plantes présente une grande variabilité inter- et intra-population (figure 3.15). La comparaison des concentrations moyennes du Cd dans les parties aériennes des plantes indique des différences statistiques au sein des populations de *T. caerulescens* hyperaccumulatrices de Cd avec en ordre décroissant Tc-3 > Tc-2 > Tc-1 ($p < 5\%$). Les deux populations non hyperaccumulatrices de Cd se distinguent très fortement des autres avec des valeurs 10 (Tc-4) à 100 fois (Ta) inférieures.

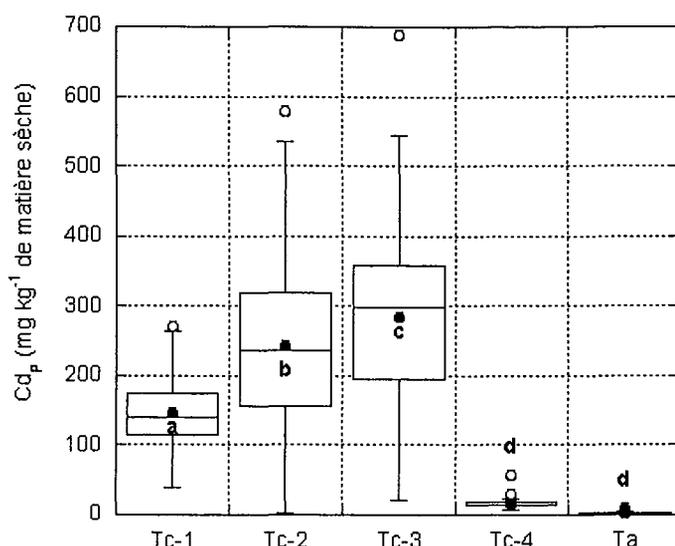


Figure 3.15 : Concentrations du Cd (mg kg^{-1}) dans les parties aériennes de 4 populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture sur la terre S3 (N = 100)

Les quantités de Cd extraites (minéralomasses) sont obtenues par le produit des concentrations dans les plantes et la biomasse sèche produite (figure 3.16). La population Tc-3 a extrait, en moyenne, le plus de Cd avec $0,2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ sol sec}$ ($p < 5 \%$) tandis que Tc-1 et Tc-2 ont extrait des quantités similaires et de l'ordre de 10 à 20% inférieures à Tc-3. De manière générale, les minéralomasses moyennes des trois populations de *T. caerulescens* sont nivelées, les populations à forte biomasse présentant les concentrations les plus faibles. Les deux populations non hyperaccumulatrices de Cd se distinguent très fortement des autres avec des valeurs 10 (Tc-4) à 100 fois (Ta) inférieures. La forte variabilité intra-population observée avec les concentrations du Cd dans les plantes reste très marquée au niveau des minéralomasses de Cd avec certains individus particulièrement performants. La valeur la plus forte est rencontrée chez Tc-2 et atteint $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ soit 2,5 fois plus que la valeur moyenne maximale observée.

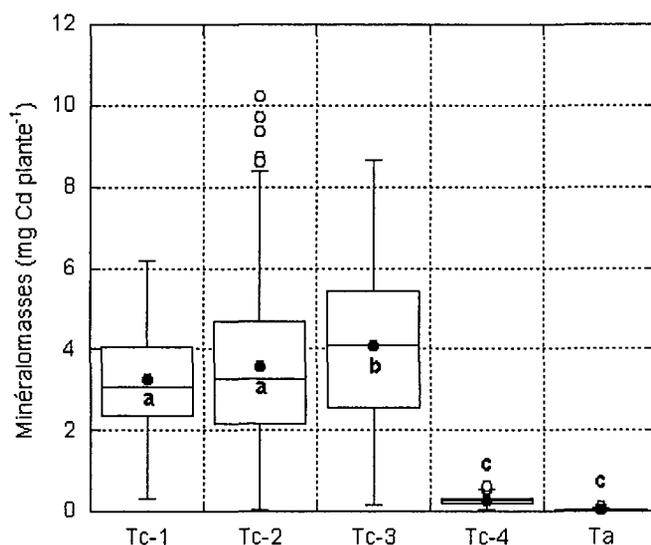


Figure 3.16 : Quantités de Cd extraites (mg plante^{-1}) par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture sur la terre S3 (N = 100)

Nous avons également pu observer que les individus les plus grands contribuent majoritairement dans l'extraction des métaux (figure 3.17). La production de biomasse par

les hyperaccumulateurs est alors un des facteurs prépondérants dans l'optimisation de la phytoextraction.

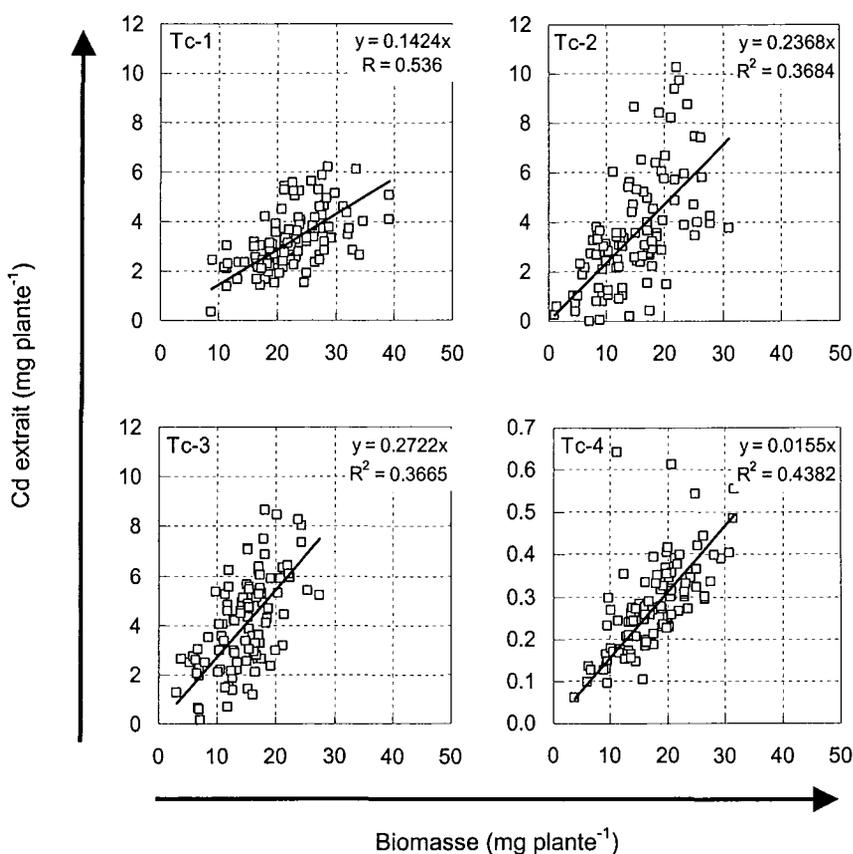


Figure 3.17 : Relation entre la production de biomasse sèche individuelle (mg plante^{-1}) et la quantité de Cd extrait (mg plante^{-1}) pour différentes populations de *Thlaspi caerulescens* cultivées durant quatre semaines sur la terre S3

Après quatre semaines de culture, les populations de *T. caerulescens* hyperaccumulatrices de Cd (Tc-1 à Tc-3) ont prélevé de 2,6 à 3,2% du Cd total (tableau 3.11). Ces valeurs restent faibles si l'on recherche un abaissement de la concentration totale du Cd du sol. Toutefois, si l'on considère les quantités isotopiquement échangeables du Cd, la part de métal prélevée atteint 38 à 47% du compartiment directement disponible pour les racines ($E_{0-1\text{min}}$) et 6 à 7,5% du compartiment de Cd échangeable durant la culture ($E_{1\text{mois}}$). Par contre, les plantes non hyperaccumulatrices de Cd ne permettent pas de réduire significativement ces mêmes compartiments.

Tableau 3.11: Pourcentages du Cd total et des compartiments du Cd isotopiquement échangeables ($E_{0-1\text{min}}$ et $E_{1\text{mois}}$) prélevés par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture

Plante	Prélèvement du Cd par les plantes		
	% Cd total du sol	% $E_{0-1\text{min}}$	% $E_{1\text{mois}}$
Tc-1	2,57	37,67	6,02
Tc-2	2,84	41,63	6,65
Tc-3	3,24	47,44	7,58
Tc-4	0,22	3,25	0,52
Ta	0,03	0,46	0,07

2.4. Effet de la culture sur le Cd isotopiquement échangeable

La concentration du Cd dans la solution du sol initial est de $8,1 \mu\text{g l}^{-1}$ (tableau 3.12). Après culture, cette valeur est significativement réduite avec les populations Tc-3 ($7,4 \mu\text{g l}^{-1}$) et Tc-4 ($7,1 \mu\text{g l}^{-1}$). Le paramètre n est légèrement affecté par la culture de *T. caerulescens* et de *T. arvense*. La valeur de r_1/R dans le sol témoin est de 0,035. Ce paramètre n'est pas significativement affecté par la culture de *T. caerulescens* quelle que soit la population considérée (entre 0,036 et 0,037) tandis qu'une diminution significative est observée suite à la culture de Ta (0,032).

Tableau 3.12 : Paramètres des cinétiques d'échange isotopique du Cd dans la terre S3 après quatre semaines de culture de différentes populations de *Thlaspi caerulescens* et de *Thlaspi arvense*

	Unités	^b Contrôle	Tc-1	Tc-2	Tc-3	Tc-4	Ta
^a C _{Cd}	$\mu\text{g l}^{-1}$	8,12 a	7,72 ab	7,90 a	7,43 b	7,13 b	7,81 ab
n		0,22 ab	0,22 b	0,19 ac	0,19 c	0,20 ac	0,20 ac
r_1/R		0,035 ab	0,037 b	0,036 b	0,036 b	0,034 a	0,032 c
$E_{0-1\text{min}}$	$\text{mg kg}^{-1} \text{ sol sec}$	0,43 a	0,42 a	0,44 a	0,41 a	0,41 a	0,50 b
$E_{1\text{min}-1\text{mois}}$	$\text{mg kg}^{-1} \text{ sol sec}$	2,26 a	2,33 a	1,89 c	1,76 c	1,87 c	2,09 b
$E_{>1\text{mois}}$	$\text{mg kg}^{-1} \text{ sol sec}$	3,61 ac	3,39 b	3,81 ac	3,96 cd	4,00 d	3,70 ac

^aC_{Cd} est la concentration du Cd dans la solution ^b Contrôle représente le sol initial avant culture

Dans le sol initial, $E_{0-1\text{min}}$ est de $0,43 \text{ mg kg}^{-1}$ soit 6,8% du Cd total du sol. La culture de *T. caerulescens* n'a pas affecté $E_{0-1\text{min}}$ quelle que soit la population utilisée tandis que l'on observe une augmentation significative suite à la culture de *T. arvense*. Près de 43% du Cd total initial est isotopiquement échangeable en un mois ($\text{Cd}_E = 2,69 \text{ mg kg}^{-1}$). Après récolte, Cd_E n'est pas significativement modifié dans les sols cultivés avec Tc-1 ($2,75 \text{ mg kg}^{-1}$) et Ta ($2,59 \text{ mg kg}^{-1}$) mais une diminution significative de Cd_E est observée avec les trois autres populations de *T. caerulescens*. Le Cd échangeable à long terme ($E_{>1\text{mois}} = 3,61 \text{ mg kg}^{-1}$) est significativement réduit dans les sols cultivés avec Tc-1 ($3,39 \text{ mg kg}^{-1}$) tandis que ce même compartiment est augmenté avec les autres plantes.

2.5. Variation des valeurs de Cd_L et comparaison avec Cd_E

Les valeurs de Cd_L sont différentes d'une population à l'autre. Parmi les populations de *T. caerulescens*, Cd_L présente des différences statistiques suivant la séquence Tc-2 ($3,71 \text{ mg kg}^{-1}$) > Tc-1, Tc-3 ($3,45 \text{ mg kg}^{-1}$) > Tc-4 ($3,27 \text{ mg kg}^{-1}$). Les valeurs de Cd_L varient fortement entre tous les individus au sein de chaque population (figure 3.18). *T. arvense* présente la valeur de Cd_L statistiquement la plus faible avec $2,97 \text{ mg kg}^{-1}$. Certains individus ont des valeurs de Cd_L particulièrement élevées, parfois proches du contenu total en Cd du sol.

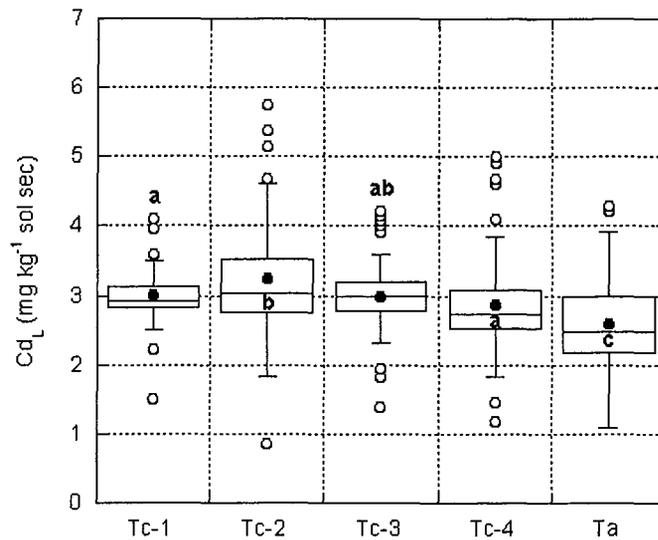


Figure 3.18 : Variation des valeurs de Cd_L ($mg\ plante^{-1}$) entre les différentes populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture

Le pH des sols au moment de la récolte ne présente pas de différences significatives avec le pH initial du sol (tableau 3.13). En outre, nous n'avons pas observé de relations entre les valeurs de Cd_L et les valeurs de pH correspondantes (figure 3.19).

Tableau 3.13 : Principaux paramètres statistiques décrivant l'évolution du pH suite à une culture de *Thlaspi caerulescens* et de *Thlaspi arvense* durant quatre semaines sur la terre S3

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart-type	Test de comparaison des moyennes
Témoïn	10	6.93	7.01	6.99	6.99	0.02	a
Tc-1	100	6.27	7.16	7.00	7.04	0.15	a
Tc-2	99	6.19	7.13	7.00	7.03	0.13	a
Tc-3	100	6.38	7.12	6.96	7.02	0.14	a
Tc-4	99	6.22	7.05	6.91	6.95	0.13	a
Ta	100	6.36	7.15	7.00	7.03	0.13	a

(les valeurs suivies d'une lettre identique ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5%)

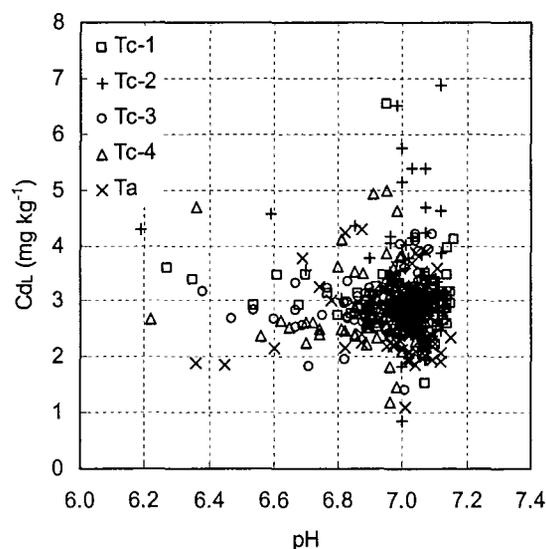


Figure 3.19 : Variations de Cd_L ($mg\ kg^{-1}$) en fonction du pH eau mesuré dans la terre S3 après quatre semaines de culture de *Thlaspi caerulescens* et de *Thlaspi arvense*

Le ratio entre Cd_L et Cd_E avant culture donne une information sur l'origine du Cd extrait par les plantes (figure 3.20). Des valeurs de Cd_L supérieures à Cd_E indiquent en effet que les plantes ont accès à une fraction du compartiment non isotopiquement échangeable du Cd du sol. *T. arvense* présente le ratio Cd_L/Cd_E moyen le plus faible (1,11). Les populations de *T. caerulescens* présentent systématiquement des valeurs statistiquement plus élevées s'échelonnant entre 1,22 (Tc-4) et 1,38 (Tc-2). Aucune relation n'a pu être établie entre le ratio Cd_L/Cd_E et les concentrations du Cd dans les parties aériennes des plantes (Cd_p) (figure 3.21).

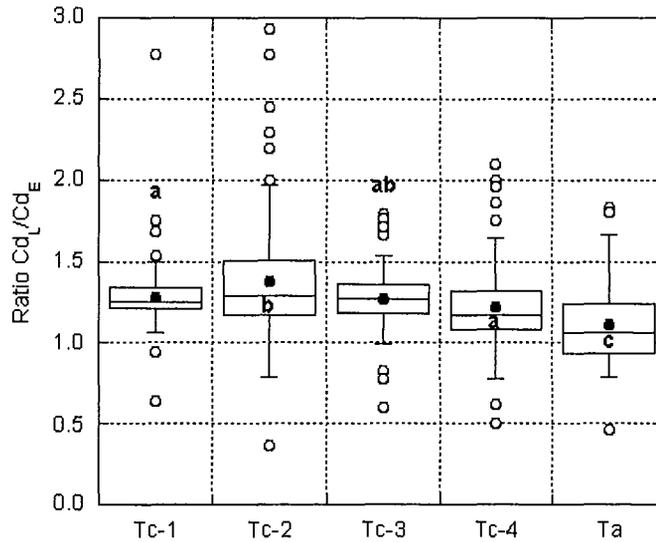


Figure 3.20 : Variation du ratio Cd_L/Cd_E entre les différentes populations de *Thlaspi caerulescens* et *Thlaspi arvense* après quatre semaines de culture

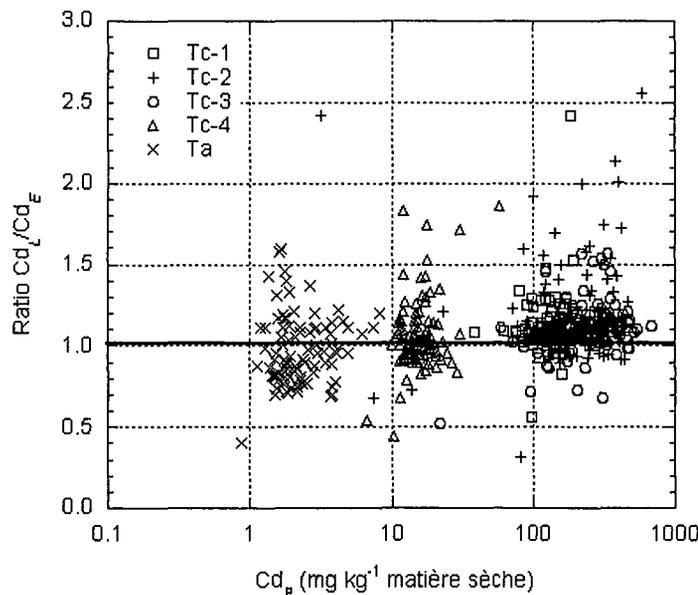


Figure 3.21 : Variations du ratio Cd_L/Cd_E en fonction des concentrations du Cd (Cd_p , $mg\ kg^{-1}$) dans les parties aériennes de *Thlaspi caerulescens* et de *Thlaspi arvense*

La comparaison de Cd_E après culture dans les sols cultivés durant un mois avec Cd_L dans les plantes correspondantes ne permet pas de mettre en évidence de relation significative exceptée pour la population Tc-3 pour laquelle Cd_E décroît significativement avec les valeurs croissantes de Cd_L (figure 3.22).

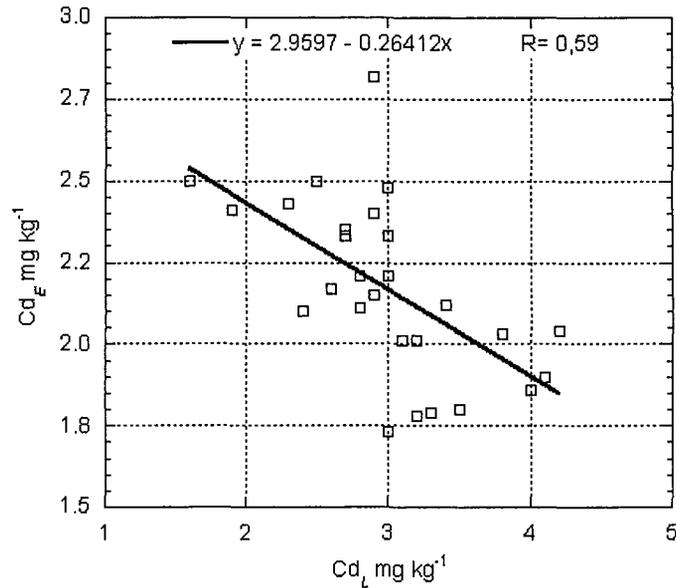


Figure 3.22 : Variation des valeurs de Cd_E après quatre semaines de culture de *Thlaspi caerulescens* (Tc-3) en fonction des valeurs de Cd_L (n=28).

3. Discussion

3.1. Variabilité du potentiel d'accumulation chez *T. caerulescens*

Nous avons vu précédemment que différentes populations de *T. caerulescens* présentaient une variation considérable dans leur aptitude à accumuler le Cd. Le prélèvement 10 fois supérieur de Cd observé lors des cultures en conditions contrôlées dans les populations Tc-1 à Tc-3 par rapport à la population Tc-4 pourrait s'expliquer par la présence d'un transporteur spécifique à très forte affinité pour le Cd (Lombi *et al.*, 2001).

Après un mois de culture sur le sol S3 homogénéisé, les populations de *T. caerulescens* (Tc-1 à Tc-3) présentent une séquence de concentrations du Cd dans les parties aériennes inverses de celles qui ont été observées en milieu naturel. Ces résultats impliquent que ces trois populations présentent des différences génétiques mais que les propriétés des sols, et en particulier la biodisponibilité du métal, sont des facteurs déterminants pour expliquer les différences de concentrations du Cd observées.

Dans la partie 1, nous n'avons pas pu faire le lien entre la production de biomasse et le niveau de fertilité chimique des terres. Toutefois les populations de *T. caerulescens* cultivées en conditions contrôlées sur une même terre présentent une séquence des valeurs de biomasse moyenne différente de celle observée en milieu naturel indiquant un effet sol. Le paramètre ayant la plus forte influence pourrait alors être la structure du sol et notamment son degré de compactage. Encore une fois, les différences statistiques observées entre les populations, lors d'une culture sur une terre homogène, sous-entendent des différences génétiques tant entre les populations qu'entre les individus.

3.2. Accessibilité de *T. caerulescens* au Cd non labile du sol

3.2.1. Etude de la variabilité inter-populations

Etant donnée la similitude entre les valeurs de Cd_L mesurées chez les quatre populations de *T. caerulescens*, il en est déduit que, quelle que soit la quantité de Cd extrait, *T. caerulescens* accède majoritairement au même compartiment du Cd du sol. La comparaison entre Cd_E avant culture et Cd_L est un indicateur de l'intensité avec laquelle les

plantes sont capables d'accéder au compartiment non labile du Cd en modifiant les conditions rhizosphériques. Il semblerait que *T. caerulescens* présente une certaine aptitude à accéder au Cd non labile comme le montrent les ratios moyens de Cd_L/Cd_E supérieurs à l'unité pour les quatre populations testées (valeurs entre 1,1 et 1,3 ; figure 3.17). Par contre, le témoin non hyperaccumulateur *T. arvense* ne présenterait pas la même aptitude à la vue du rapport Cd_L/Cd_E très proche de l'unité. Toutefois, il est nécessaire de regarder les résultats concernant *T. arvense* avec beaucoup de prudence étant données les très faibles valeurs de radioactivité mesurées dans les plantes à l'issue de la culture, celles-ci étant majoritairement inférieures à la limite de quantification de l'appareil de mesure. Ainsi, la forte variabilité observée chez cette espèce pourrait s'expliquer par des erreurs de mesure du paramètre r_t (équation 8, chapitre 2). Il n'est donc pas possible d'affirmer à partir de ces résultats que les deux espèces prélèvent bien le Cd dans des compartiments différents.

Un deuxième point pouvant être soulevé sur l'aptitude réelle de *T. caerulescens* à accéder au Cd non isotopiquement échangeable concerne la mesure du compartiment labile du Cd (Cd_E). En effet, le modèle des cinétiques d'échange isotopique selon Fardeau (1981) repose sur deux hypothèses (voir chapitre 2) :

(1) La concentration des ions Cd^{2+} stables dans la solution doit être constante durant toute la durée de l'expérience, or de précédents travaux (Kah, 2003 et Gérard, 2000) montrent que, pour des temps d'échange longs, la concentration de Cd^{2+} dans la solution du sol tend à augmenter. En outre, la radioactivité introduite réelle tend à diminuer au cours du temps par adsorption lente de $^{109}Cd^{2+}$ sur les parois des flacons. Ces résultats mettent en évidence la nécessité de mesurer les valeurs exactes de Cd_S et R pour chaque pas de temps. Ces mesures de précaution ayant été prises lors de la mise en œuvre des cinétiques d'échange isotopique, l'erreur de mesure de Cd_S et R peut être considérée comme ayant peu d'influence sur le calcul de E_t .

(2) Pour des temps infinis, les quantités d'ions Cd^{2+} isotopiquement échangeables doivent correspondre au Cd total du sol (équation 4, chapitre 2) c'est à dire que le ratio $R \propto R_0$ correspond au ratio Cd_S sur Cd_{tot} . La mesure de E_t pour des temps longs (Gérard, 2000 ; Kah, 2003) montre que le modèle mathématique tend à surestimer les quantités de Cd isotopiquement échangeables. Dans certains sols, une partie du Cd serait fixée de façon irréversible sur la matrice solide.

Dès lors, il est probable que nous ayons surestimé la taille du compartiment biodisponible du Cd. Dans cette hypothèse, les ratios Cd_L/Cd_E calculés pour les 4 populations de *T. caerulescens* mettent réellement en évidence un effet rhizosphérique des plantes. Comment expliquer alors les valeurs de Cd_L supérieures à Cd_E ?

- par la libération d'exsudats racinaires mobilisant les métaux ?
- par acidification de la rhizosphère ?
- par la mise en place de systèmes racinaires particuliers ?

Dans un premier temps, nous pouvons négliger l'apport de Cd par les graines puisque dans les quatre populations étudiées le contenu total en Cd des graines représente moins de 5% de la quantité totale absorbée. A la vue de nos résultats, l'acidification de la rhizosphère n'apparaît pas comme un mécanisme mis en œuvre par *T. caerulescens* pour augmenter l'absorption des métaux. Le faible volume de sol utilisé favorise également l'épuisement du Cd très labile et entraîne probablement un déséquilibre qui n'est pas observable dans les conditions naturelles. Nous avons observé que les différentes populations avaient développé des systèmes racinaires présentant des architectures différentes. L'architecture et la croissance racinaire de *T. caerulescens* ont été montrées fortement corrélées à la localisation des métaux dans le sol. Schwartz *et al.* (1999b) ont noté des différences morphologiques du système racinaire en fonction du type de matériel avec, soit une forte densité racinaire avec production de racines secondaires, soit une racine

verticale dominante avec des racines latérales diffuses, la longueur du système racinaire était très similaire dans les deux cas.

La population Tc-2 présente la plus forte aptitude à accéder au Cd du sol non isotopiquement échangeable. Or, cette population présente également un système racinaire particulier avec des amas racinaires terminaux. Ce type d'architecture pourrait exercer une dépression forte conduisant à une diffusion accrue du Cd froid vers la surface racinaire et, par conséquent, à une diminution de la composition isotopique du Cd prélevé. Cela se traduirait alors par une augmentation de Cd_L . Il est possible qu'en réalité Tc-2 ne présente pas d'aptitude particulière à accéder au Cd non isotopiquement échangeable par rapport aux trois autres populations.

3.2.2. Etude de la variabilité inter-individus

Nous avons pu à nouveau observer et mesurer une grande variabilité de réponse entre les individus. Une dizaine d'entre eux présentent des valeurs de Cd_L inférieures à Cd_E . Dans la majorité des cas, ces individus sont associés à des concentrations du Cd dans les parties aériennes très faibles en comparaison avec la valeur moyenne de la population, ce qui expliquerait les faibles valeurs de Cd_L mesurées. Par opposition, certains individus présentent une capacité particulièrement élevée pour accéder au Cd non labile comme le montrent les valeurs de Cd_L/Cd_E atteignant 2 à 3, en particulier dans la population Tc-2. De tels résultats suggèrent que certains individus puissent fortement modifier les quantités d'éléments biodisponibles ou accéder à différents compartiments du Cd. L'absence de relations entre les concentrations du Cd dans les parties aériennes des plantes et les valeurs de Cd_L montre que les plantes n'ont pas développé de mécanisme particulier pour absorber spécifiquement plus de Cd.

En regardant plus attentivement les individus remarquables (c'est à dire ceux présentant des valeurs de Cd_L très élevées), nous avons observé qu'ils étaient associés à des productions de biomasses racinaires plus basses que la moyenne dans les populations Tc-1 et Tc-2, avec des facteurs de réduction de 1,3 et 3,3 respectivement. Ainsi, dans ces populations, les valeurs extrêmes de Cd_L mesurées dans les plantes peuvent être attribuées à une déplétion des métaux dans la zone racinaire active (apex racinaire) et à une augmentation de la diffusion d'ions Cd^{2+} non marqués vers la surface racinaire, ce qui a pour conséquence une augmentation de Cd_L . Dans la population Tc-3, les individus remarquables étaient associés à une production de biomasse supérieure à la valeur moyenne. Dès lors, le mécanisme développé précédemment ne peut plus s'appliquer. En outre, nous avons observé une relation significative forte entre Cd_L et Cd_E dans cette population (figure 3.22) avec une diminution du compartiment biodisponible du Cd du sol après culture avec les valeurs individuelles croissantes de Cd_L . Ces résultats indiquent que, dans la population Tc-3, certains individus peuvent accéder à un compartiment du Cd biodisponible plus grand par rapport aux autres individus.

4. Conclusion

Cette partie nous a permis de confirmer le rôle majeur de la biodisponibilité du Cd dans la variation de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. Si la biodisponibilité des métaux joue un rôle majeur dans leur hyperaccumulation par *T. caerulescens*, nous avons également pu clairement établir l'existence de différences génétiques. L'influence de la génétique sur l'hyperaccumulation des métaux va concerner à la fois l'aptitude des plantes à prélever les métaux et à produire une biomasse importante. En effet, nous avons montré que les individus de grande taille étaient ceux qui contribuaient le plus à l'extraction des métaux. L'utilisation des outils traditionnels de sélection en association avec des pratiques de fertilisation raisonnée pourrait permettre alors d'améliorer les rendements d'extraction d'un facteur 2 à 4.

Nous avons également cherché à savoir si différentes populations de *T. caerulescens* présentant des aptitudes contrastées à accumuler le Cd étaient capables d'accéder au Cd non labile du sol. Nos résultats montrent que de façon générale, les quatre populations de *T. caerulescens* étudiées présentent une aptitude à accéder au Cd non labile du sol. Cependant, pour la majorité des individus, cette aptitude reste faible au regard des quantités totales de Cd présentes dans les sols contaminés. Seuls certains individus de la population Tc-3 présentent une aptitude élevée à accéder au Cd non labile des sols. L'évolution du caractère d'hyperaccumulation dans cette population aurait permis la mise en place de mécanismes particuliers leur permettant d'accéder au Cd non labile. De tels individus, s'ils peuvent être sélectionnés et reproduits, permettraient alors d'améliorer considérablement la phytoextraction du Cd, en particulier dans les sols présentant une biodisponibilité faible du métal.

Chapitre 4

***Evolution du compartiment biodisponible
des métaux des sols
sous l'effet de cultures de *Thlaspi caerulescens****

Dans les sols, les métaux peuvent provenir à la fois de la roche mère (fond géochimique) et des activités humaines. En fonction de leur origine et des conditions du milieu, ces éléments présenteront une biodisponibilité plus ou moins élevée. Les mesures faites sur le terrain montrent qu'en présence de plantes hyperaccumulatrices, la biodisponibilité du Cd est très élevée. En effet, dans ces écosystèmes particuliers, les métaux suivent un cycle avec une absorption par les racines, une redistribution dans la plante (Perronnet *et al.*, 2000) puis un dépôt dans les différents horizons (résidus racinaires, litières, exsudats racinaires) (Balabane *et al.*, 1999 ; Schwartz *et al.*, 2001b) assurant ainsi le renouvellement de la fraction biodisponible.

Lors d'un scénario de phytoextraction, *T. caerulescens* réduit le compartiment biodisponible. Il sera donc nécessaire de rompre le cycle du Cd sol-plante-sol, par exportation de la biomasse aérienne voire racinaire, afin de limiter le renouvellement du compartiment biodisponible. Il est donc important de déterminer : (1) dans quelle mesure les plantes hyperaccumulatrices peuvent épuiser le compartiment biodisponible des métaux suite à une phytoextraction et/ou accéder au métal non biodisponible et, (2) avec quelle cinétique le sol va réalimenter le compartiment biodisponible.

Notre objectif est de suivre l'évolution des différents compartiments des métaux dans le système sol-eau-plante au cours d'une succession de cultures de plantes hyperaccumulatrices et non hyperaccumulatrices. Il nous faudra répondre à plusieurs questions :

- Comment évolue la taille des compartiments isotopiquement échangeables des ions Cd²⁺ au cours d'une succession de cultures ?
- Avec quelle cinétique évoluent les concentrations des métaux dans la solution du sol ?
- Quelle est la contribution des racines dans le réapprovisionnement de la fraction biodisponible des métaux au cours d'un scénario de phytoremédiation ?
- Quel est le bilan des flux de métaux dans le système sol-eau-plante ?

Pour répondre à ces objectifs nous avons travaillé à l'échelle de bacs lysimétriques équipé de bougies poreuses de façon à pouvoir prélever la solution du sol. Les flux des métaux sont mesurés dans les différents compartiments du système sol-eau-plante. Dans la première partie, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à déterminer comment les racines de *T. caerulescens* influencent le compartiment biodisponible du Cd. Dans la deuxième partie, nous avons étudié les flux du Cd dans le système sol-eau-*T. caerulescens* au cours d'une succession de culture afin de dégager les mécanismes du renouvellement de la fraction biodisponible.

PARTIE I. Evolution de la biodisponibilité du Cd dans la rhizosphère de *T. caerulescens*

Au cours de la phytoextraction, *T. caerulescens* va contribuer à l'appauvrissement du compartiment biodisponible des métaux. Nous avons démontré précédemment que *T. caerulescens* était également capable d'accéder à une fraction du compartiment non biodisponible en modifiant les conditions rhizosphériques. Dans cette partie, nous allons donc suivre plus particulièrement l'évolution du compartiment biodisponible dans la rhizosphère de *T. caerulescens* cultivé en conditions contrôlées.

1. Matériels et méthodes

1.1. Terres

T. caerulescens a été cultivé sur une terre de périphérie d'usine métallurgique (S1) et la même terre ayant subi un traitement par tri physique (S2).

1.2. Dispositif

L'essai est composé de bacs en PVC (255 X 355 X 220 mm) dont le fond est constitué d'une couche drainante de gravier de 4 cm d'épaisseur (figure 4.1). Les bacs sont posés sur une balance de précision. Chaque bac comprend six échantillonneurs de solution disposés en quinconce afin d'explorer de façon homogène le volume de sol. Les échantillonneurs sont introduits horizontalement dans les sols après pré forage d'un trou de diamètre légèrement inférieur à celui des sondes. Une suspension de sol est injectée autour des sondes afin de favoriser le contact sondes-sol. L'étanchéité du système est assurée par des joints de silicone.

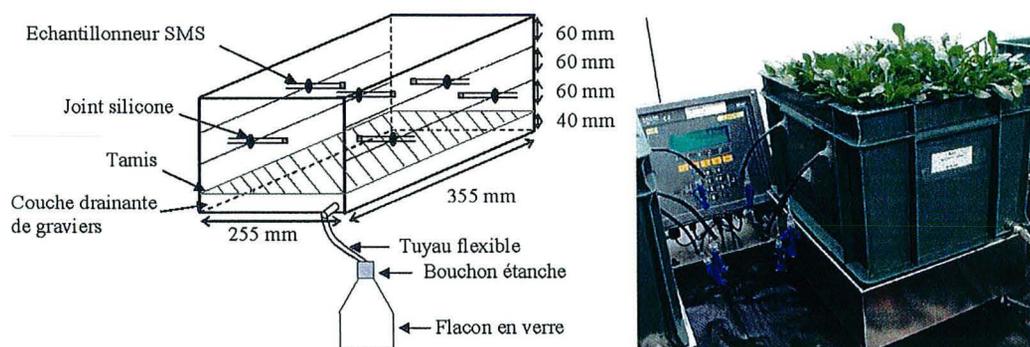


Figure 4.1 : Schéma et photographie du dispositif en bacs lysimétriques

1.3. Echantillonneurs de solution du sol

Le matériel utilisé pour prélever la solution du sol est le Rhizon Soil Moisture Sampler (échantillonneur SMS, figure 4.2 et photographie 4.1) (Eijkelkamp, Agrisearch Equipment, The Netherlands) (Gérard, 2000). L'échantillonneur est constitué d'une partie en polymère poreux hydrophile mesurant 10 cm de long (diamètre 2,5 X 1,4 mm), d'un tube collecteur en PVC de 20 cm (2,7 X 1 mm) et d'un connecteur. La sortie permet de raccorder une seringue destinée à exercer une dépression suffisante pour collecter la solution du sol. Une seringue de 10 ml permet de collecter environ 7 ml de solution. Le volume mort est inférieur à 0,5 ml. Le temps nécessaire pour échantillonner dépend de la conductivité hydraulique du sol. Le matériau

poreux est renforcé par une tige en acier inoxydable. La taille moyenne des pores est de 0,1 μm . Le diamètre de la sonde est faible (2,5 mm), minimisant la perturbation des propriétés hydrauliques du sol. La capacité d'échange ionique est nulle et il n'y a pas de modification du pH. Le matériel poreux est imperméable aux bactéries.

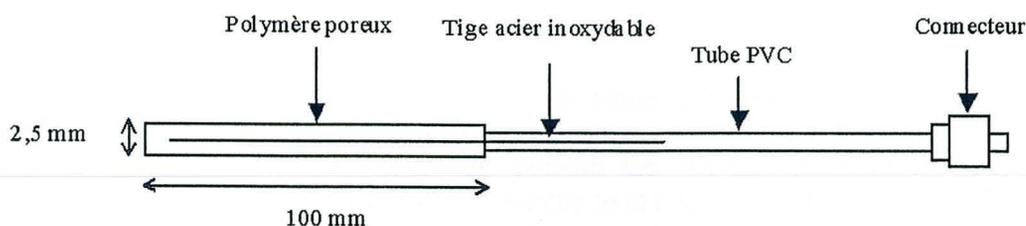
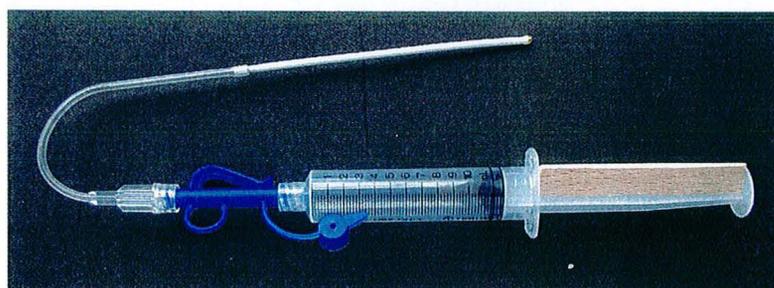


Figure 4.2 : Echantillonneur SMS



Photographie 4.1 : Détail du dispositif de prélèvement par bougie poreuse

1.4. Culture

T. caerulescens, population Tc-1, a été cultivé dans deux bacs lysimétriques constitués de 20 kg des terres S1 et S2. La terre S2, en réponse à sa faible fertilité et à sa texture déséquilibrée, a reçu l'équivalent de 60 t de compost de boue urbaine par hectare.

Dans un premier temps, tous les bacs sont ensemencés avec 36 graines de *T. caerulescens*. Après germination, 18 individus sont conservés de façon à obtenir une densité de semis équivalente à 200 plantes par m^2 . Un défaut de germination sur la terre S2 nous a amené à réaliser plusieurs semis successifs, avec au final, une densité de semis sur la terre S2 très supérieure à celle effectuée sur la terre S1 (~ 200 individus). Les dates de germination respectives pour les terres S1 et S2 correspondent aux semaines 1 et 9.

La fertilisation minérale des terres s'effectue en deux apports sous forme de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) au moment du semis et sous forme de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) après 45 jours de culture (tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Fertilisation des terres S1 et S2

Terre	Engrais	Azote (mg kg^{-1})	Phosphate P_2O_5 (mg kg^{-1})	Soufre (mg kg^{-1})
S1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	17,5		20
	NH_4NO_3	12,5		
S2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	362		480
	NH_4NO_3	357		
	compost de boue	410	860	

Durant les six mois de culture, les bacs sont pesés tous les deux jours. L'arrosage, à l'eau osmosée, se fait en surface à l'aide d'un pulvérisateur de façon à atteindre 80% de la

capacité au champ. Les bacs sont arrosés lorsqu'ils approchent 70% de la capacité au champ. La solution du sol est récoltée chaque semaine à potentiel hydrique constant, c'est à dire à poids constant (plus ou moins 5%), de manière à accéder au même compartiment de l'eau du sol lors de chaque prélèvement. Un délai de 24 h sépare l'arrosage du prélèvement de façon à ce que l'eau d'arrosage s'équilibre avec le système.

1.5. Mesures

La solution du sol est prélevée toutes les semaines et le potentiel redox mesuré dans la chambre de culture à l'aide d'une sonde platine (PT 737 A, Schott) dans les minutes qui suivent leur prélèvement. Le pH est mesuré au laboratoire. Les solutions sont ensuite acidifiées avec HNO₃ à hauteur de 1% et stocké à +4°C avant analyse des concentrations du Cd par spectrométrie d'absorption atomique (Spectraa 220, Varian).

Après récolte des parties aériennes les concentrations du Cd et du Zn dans la matière sèche sont mesurées. La terre rhizosphérique est séparée de la terre non rhizosphérique (chapitre 2, § 4) et les compartiments isotopiquement échangeables du Cd sont mesurés après culture dans les deux lots de terre par la méthode des cinétiques d'échange isotopique.

2. Résultats

2.1. Effet de *T. caerulescens* sur le compartiment soluble du Cd

2.1.1. Potentiel redox

Le potentiel redox montre d'abord une forte variabilité suivie par une phase stationnaire (figure 4.3). Dans la terre S2, la période sans végétation correspond à une augmentation du Eh en solution.

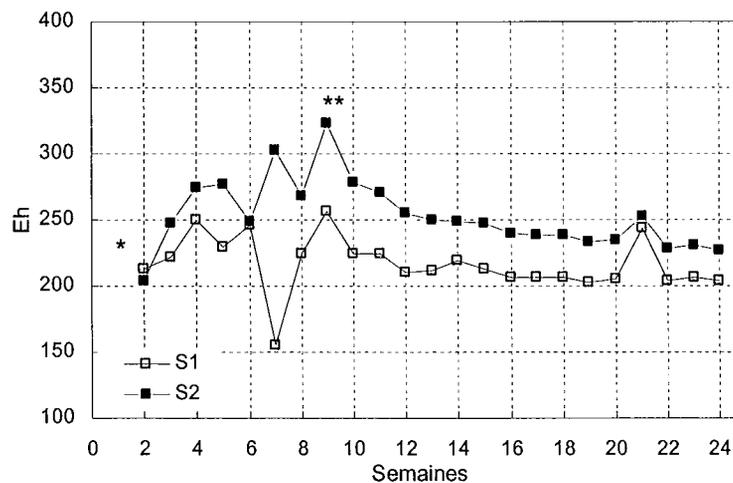


Figure 4.3 : Evolution du potentiel redox dans la solution des terres S1 et S2 au cours d'une culture de *Thlaspi caerulescens* (dates de germination sur les terres S1 (*) et S2 (**))

2.1.2. pH

Le pH de la solution de la terre S1 augmente significativement ($R=0,79$; $N=24$) durant la culture de *T. caerulescens* passant de 7,0 à 7,4 (figure 4.4). Sur la terre S2, l'évolution du pH peut être décomposée en deux phases. Durant les 10 premières semaines, en absence de végétation, il diminue significativement ($R=0,96$; $N=10$) et fortement passant de 7,2 à 6,2.

En présence de *T. caerulescens*, le pH augmente avec la même amplitude que celle observée sur la terre S1 ($R=0,62$; $N=14$). Le fait que le pH ait été réduit d'une unité montre que cette terre est très faiblement tamponnée, ce qui peut fortement influencer l'évolution de la mobilité des métaux.

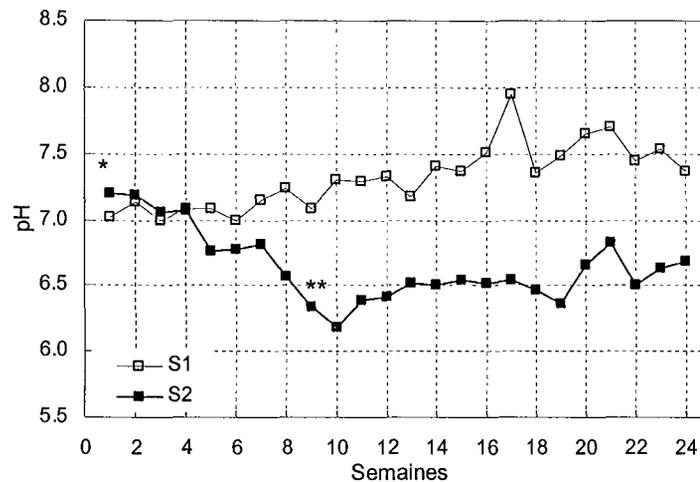


Figure 4.4 : Evolution du pH dans la solution des terres S1 et S2 au cours d'une culture de *Thlaspi caerulescens* (dates de germination sur les terres S1 (*) et S2 (**))

2.1.3. Concentration du Cd

La concentration du Cd dans la solution de la terre S1 est faible tout au long de la culture, ne dépassant pas $24 \mu\text{g l}^{-1}$ (figure 4.5). Elle montre quelques fluctuations avec, dans un premier temps (semaines 1 à 6), une libération de Cd dans la solution du sol. Puis, dans une deuxième phase (semaines 6 à 10), la concentration du Cd diminue fortement passant de 24 à $8 \mu\text{g l}^{-1}$ et se stabilise enfin.

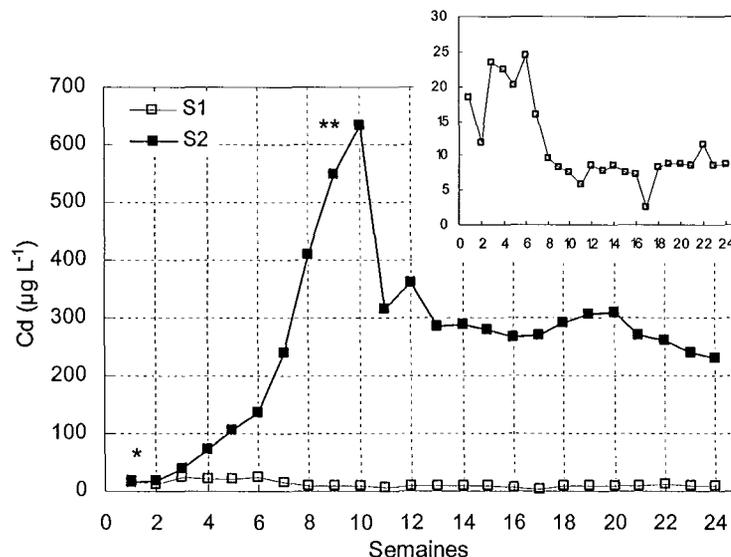


Figure 4.5 : Evolution de la concentration du Cd dans la solution des terres S1 et S2 au cours d'une culture de *Thlaspi caerulescens* (la fenêtre correspond à un zoom sur la terre S1) (dates de germination sur les terres S1 (*) et S2 (**))

Pour la terre S2, la concentration du Cd augmente de façon exponentielle dans la solution du sol passant de 14 à $634 \mu\text{g l}^{-1}$. Puis, elle diminue rapidement pour atteindre $287 \mu\text{g l}^{-1}$.

Enfin, durant les 10 dernières semaines, elle tend à diminuer lentement pour atteindre finalement $230 \mu\text{g l}^{-1}$.

Sur les deux terres S1 et S2, le pH de la solution du sol et la concentration du Cd soluble sont corrélés négativement ($R_{S1}=-0,74$; $R_{S2}=-0,87$; $p<0,01$).

2.2. Production de biomasse

La production de biomasse aérienne sèche par *T. caerulescens* est de 9,7 g sur S1 et de 27,8 g sur S2 (figure 4.6). La différence entre les deux terres est à attribuer à la forte différence de densité puisque l'on dénombre 23 individus sur la terre S1 contre 190 individus sur la terre S2 (photographies 4.2 et 4.3). La taille des individus est nettement influencée par la densité de semis. La biomasse racinaire sèche est de 0,9 g sur S1 et de 2,6 g sur S2, soit dix fois moins que la biomasse aérienne.



Photographies 4.2 et 4.3 : Production de biomasse aérienne par *Thlaspi caerulescens* cultivé sur les terres S1 (a) et S2 (b) durant 6 mois

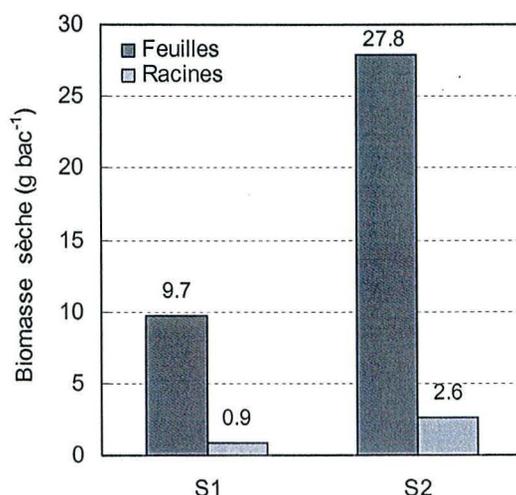


Figure 4.6 : Production de biomasse aérienne et racinaire sèche par *Thlaspi caerulescens* cultivé durant 6 mois sur les terres S1 et S2

2.3. Concentrations du Cd et du Zn dans les plantes

De façon générale, une forte réduction des concentrations des métaux dans les organes (parties aériennes et racinaires) de *T. caerulescens* est observée sur la terre S2 par rapport à la terre S1 (figure 4.7). La réduction de la concentration du Zn dans les parties aériennes et racinaire est plus faible que pour le Cd. Cette diminution peut être attribuée à la fois à la réduction de moitié des quantités totales de métaux présentes dans le sol S2 suite au traitement par tri physique et à la forte densité de population observée sur la terre S2. En

effet, dans ces conditions, la concurrence pour l'absorption des métaux est fortement accentuée.

Lorsque *T. caerulescens* est cultivé sur la terre S2, le transfert du Zn des racines vers les feuilles est réduit d'un tiers par rapport à celui observé sur la terre S1. Par opposition, le transfert du Cd est légèrement augmenté.

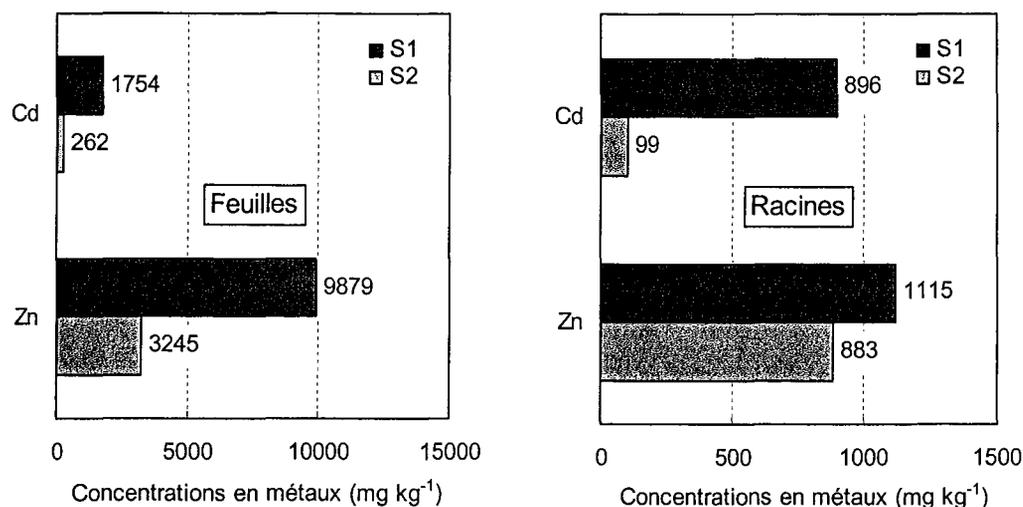


Figure 4.7 : Concentrations du Cd et du Zn dans les parties aériennes et racinaires de *Thlaspi caerulescens* après 6 mois de culture sur les terres S1 et S2

2.4. Exportation du Cd et du Zn par *T. caerulescens*

Sur la terre S1, la culture de *T. caerulescens* a extrait de l'ordre de 3,3% du Cd total et de 0,2% du Zn total (figure 4.8). Les pourcentages de Cd (3,1%) et de Zn (0,6%) extraits par *T. caerulescens* sur la terre S2 sont très proches malgré la forte différence de production de biomasse aérienne.

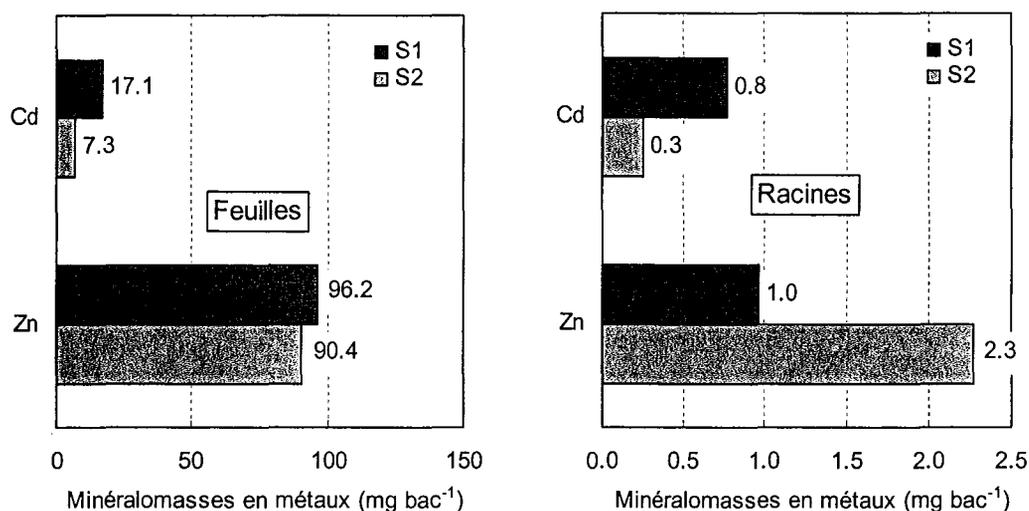


Figure 4.8 : Quantités totales de Zn et Cd extraites par les parties aériennes et racinaires de *Thlaspi caerulescens* après 6 mois de culture sur les terres S1 et S2

2.5. Distribution du Cd au sein des compartiments isotopiquement échangeables

Des cinétiques de dilution isotopique du Cd ont été réalisées sur les terres S1 et S2 avant et après culture (tableau 4.2). La concentration en Cd soluble et la quantité de Cd directement disponible pour les racines ($E_{0-1\text{min}}$) dans la terre S1 est très supérieure aux valeurs mesurées dans la terre S2. La terre S2 est plus faiblement tamponnée que la terre S1 comme le montre la valeur de n_{S1} inférieure à n_{S2} . Le facteur capacité est élevé dans les deux terres, mettant en évidence une aptitude élevée du sol à réapprovisionner la solution. Dans les deux terres, la biodisponibilité du Cd est élevée ($E_{24\text{h}} > 60\%$). Après traitement par tri physique, le Cd présent dans la terre S2 demeure très fortement biodisponible.

De façon générale, la concentration en Cd soluble est supérieure dans la terre rhizosphérique par rapport à la terre non rhizosphérique. Suite à la culture de *T. caerulescens*, $E_{0-1\text{min}}$ diminue fortement dans la terre S1 sans présenter de différences entre les terres rhizosphérique et non rhizosphérique. En revanche, des différences de disponibilité du Cd entre les terres rhizosphérique et non rhizosphérique apparaissent dans la terre S2. Ainsi, $E_{0-1\text{min}}$ est supérieur dans la terre rhizosphérique par rapport à la terre non rhizosphérique. Le facteur capacité du sol est considérablement modifié par la culture. Alors qu'il augmente dans la terre S1, il diminue dans la terre S2. Cette grande différence de comportement des deux terres est expliquée par la mise en solution de Cd en quantités très élevées dans la terre S2 alors que ces mêmes quantités sont fortement réduites dans la terre S1. Dans les deux terres, les quantités de Cd faiblement échangeable sont augmentées suite à la culture.

Tableau 4.2 : Paramètres de cinétique et répartition du Cd entre les compartiments échangeables au cours du temps dans les terres S1 et S2 avant culture (1) et après culture dans le sol non rhizosphérique (2) et rhizosphérique (3)

	S1			S2		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
C_{Cd} ($\mu\text{g l}^{-1}$)	50,9 a	3,8 b	5,7 b	17,1 c	27,3 b	83,3 a
n	0,26 b	0,25 b	0,22 bc	0,36 a	0,21 bc	0,18 c
r_1/R	0,015 c	0,005 d	0,003 d	0,017 c	0,032 b	0,063 a
Facteur capacité (l kg^{-1})	108 c	616 a	394 b	102 c	54 d	26 e
$E_{0-1\text{min}}$ (% Cd total)	21 a	9 b	9 b	15 b	13 c	18 a
$E_{1\text{min}-24\text{h}}$ (% Cd total)	42 a	29 b	22 b	54 a	29 b	28 b
$E_{24\text{h}-3\text{mois}}$ (% Cd total)	21 b	25 a	22 b	22 b	23 a	19 b
$E_{3\text{mois}-1\text{an}}$ (% Cd total)	4 b	7 a	7 a	3 b	6 a	5 a
$E_{>1\text{an}}$ (% Cd total)	12 b	27 a	37 a	6 b	26 a	27 a
Cd extrait (% Cd total)		3	3		3	3

(les valeurs suivies d'une lettre identique au sein d'une même ligne ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5%)

3. Discussion

Durant la croissance de *T. caerulescens*, les racines prélèvent le Cd dans la solution du sol et contribuent à l'appauvrissement du compartiment biodisponible du Cd. Ceci est vrai quelles que soient les conditions de la culture (semis tardif avec mise en solution de Cd ou non). Durant les dernières semaines de la culture, la concentration du Cd soluble reste constante indiquant un réapprovisionnement par la phase solide du sol.

Suite à la culture de *T. caerulescens*, la proportion de Cd échangeable en 3 mois diminue fortement tandis que celle échangeable en plus d'un an augmente. Les quantités de Cd absorbées par *T. caerulescens* (3% de Cd total) ne permettent pas à elles seules d'expliquer la réduction de $E_{3\text{mois}}$. Ces résultats mettent en évidence une immobilisation du Cd. Suite à la culture des plantes, un nouveau compartiment apparaît dans le système : les racines. Ce compartiment intervient comme un piège à métaux pouvant avoir pour conséquences un ralentissement des échanges. Toutefois, les quantités de Cd fixées dans ce nouveau compartiment représentent de l'ordre de 0,13% du Cd total dans les terres S1 et S2 ce qui ne permet pas d'expliquer les écarts observés. Les cinétiques d'échange isotopique sont des analyses ponctuelles, donnant une image de la répartition du Cd pour un temps donné. Il apparaît donc nécessaire de pouvoir comparer des terres cultivées et non cultivées dans des conditions identiques (humidité, température, date de prélèvement par exemple). En effet, il est possible que la répartition des métaux soit modifiée suite à l'incubation durant plusieurs mois des terres dans les conditions des chambres de culture.

En présence de fortes concentrations du Cd dans le sol, $E_{0-3\text{mois}}$ diminue plus fortement dans la terre rhizosphérique que dans la terre non rhizosphérique et l'écart est supérieur à la quantité de Cd extraite par les plantes. Ces résultats mettent en évidence une immobilisation du Cd dans la rhizosphère de *T. caerulescens* (Puschenreiter *et al.*, 2003). Par opposition, pour de faibles concentrations du Cd dans le sol, *T. caerulescens* mobiliserait activement le Cd ce qui se reflète par une augmentation de $E_{0-1\text{min}}$ dans la terre rhizosphérique par rapport à la terre non rhizosphérique. En outre, suite à la culture de *T. caerulescens*, la concentration du Cd soluble est supérieure dans la terre rhizosphérique par rapport à la terre non rhizosphérique. Des résultats similaires ont été observés avec le Ni lors d'une étude des caractéristiques de la rhizosphère de *T. gæsingense* en milieu naturel (site de serpentine) (Wenzel *et al.*, 2003). Il semblerait qu'une quantité supérieure de carbone organique soluble serait libérée dans la rhizosphère de l'hyperaccumulateur participant ainsi à la dissolution des minéraux porteurs du Ni. La dissolution des minéraux s'accompagne alors d'une augmentation du pH par libération d'ions hydroxydes dans la solution du sol. Durant la culture de *T. caerulescens*, nous avons pu observer une augmentation du pH dans les terres. Fotovat (1998) a montré que la matière organique soluble augmentait avec l'accroissement du pH en solution avec pour conséquence une solubilisation accrue des métaux par complexation. Il est possible que le même phénomène intervienne ici. Par la suite, la mesure de l'évolution de la concentration des matières organiques dans la solution durant la croissance de *T. caerulescens* pourra nous permettre de le vérifier.

4. Conclusion

Au cours de la phytoextraction, *T. caerulescens* va contribuer à épuiser le compartiment biodisponible du Cd. Nos résultats montrent également que les plantes modifient les conditions rhizosphériques ayant pour conséquence une augmentation de la solubilité du Cd et de $E_{0-1\text{min}}$ à proximité des racines par rapport aux zones distantes des racines. Le prélèvement du Cd dans le compartiment biodisponible va être en partie compensé par le réapprovisionnement à partir des compartiments les plus échangeables. Dès lors, que se passera-t-il suite à l'arrêt de la culture ? Comment va évoluer le compartiment biodisponible des métaux suite à plusieurs cultures successives de *T. caerulescens* ?

PARTIE II. Evolution de la biodisponibilité du Cd sous l'effet de cultures successives de *T. caerulescens*

Dans la partie précédente, nous avons démontré qu'une culture de *T. caerulescens* permettait de réduire considérablement le compartiment soluble du Cd. Cependant, les plantes sont capables de modifier les conditions rhizosphériques avec une augmentation de la solubilité du Cd à proximité des racines par rapport aux zones distantes. L'objectif est dorénavant de vérifier si la diminution du compartiment soluble du Cd du sol est durable et, le cas échéant, de déterminer comment ce compartiment est réapprovisionné. Trois cultures successives de *T. caerulescens* ont été réalisées avec le même système pilote décrit précédemment. Une culture finale de laitue sur tous les bacs nous a servi de test pour mesurer la biodisponibilité des métaux et évaluer les risques de transfert vers les végétaux consommables.

1. Matériel et méthode

1.1. Terre

Les cultures successives de *T. caerulescens* ont été réalisées sur la terre agricole S3 contaminée par l'épandage d'eaux résiduaires brutes urbaines.

1.2. Dispositif

Les cultures ont été menées avec le même dispositif pilote décrit précédemment. Six bacs de 15 kg de terre sèche sont utilisés : quatre bacs sont cultivés avec *T. caerulescens* et deux bacs sont laissés sans végétation (photographie 4.4). L'ensemble est disposé sur trois balances de précision et relié à un système d'arrosage automatique piloté par une interface de régulation (photographie 4.5). L'automatisme de l'arrosage permet de maintenir une humidité constante de la terre à une valeur égale à 80% de la capacité au champ, le déclenchement de l'arrosage ayant lieu pour une perte d'eau de 10%. Le contrôle fin de l'humidité du sol permet de maintenir les équilibres chimiques entre phase solide et phase liquide et d'éviter les phénomènes d'adsorption/désorption des métaux inhérents à la succession de périodes de dessiccation et d'humectation.



Photographies 4.4 et 4.5 : Dispositif de culture

1.3. Culture

Quatre cultures successives ont été réalisées : 3 cultures de *T. caerulescens* d'une durée de 15 semaines chacune et enfin une culture de laitue (plante test accumulatrice de Cd) d'une durée de 6 semaines. Entre chaque culture, la terre est laissée nue durant 5 semaines. *T. caerulescens* a été semé à hauteur de 200 plantes au m² soit 18 individus par bac. Les

plantes ont été fertilisées sous forme NH_4NO_3 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à raison de 20 mg S kg^{-1} et 30 mg N kg^{-1} en deux apports après 5 et 10 semaines de culture. Les laitues ont été repiquées à hauteur de 6 plantes par bac. Les plantes ont reçu une fertilisation N-P-K ($10\text{-}8\text{-}10 \text{ mg kg}^{-1}$ sol sec) après 4 semaines de culture.

1.4. Mesures

La solution du sol est récoltée chaque semaine et le potentiel redox des solutions de sol est mesuré dans la chambre de culture dans les minutes qui suivent leur prélèvement. Le pH est mesuré au laboratoire puis les solutions sont séparées en deux lots. Le premier lot est acidifié avec HNO_3 à hauteur de 1% et stocké à $+4^\circ\text{C}$ avant analyse des teneurs en métaux (Cd et Zn). Le deuxième lot est stocké à -20°C avant analyse des éléments majeurs (K, Na, Ca, Mg, N- NH_4 , N- NO_3 , N- NO_2 , PO_4 , SO_4 , Cl) et du carbone organique.

Le Cd est analysé par spectrométrie d'absorption atomique (Spectraa 220, Varian) et le Zn par spectrométrie d'émission atomique à plasma d'argon (ICP-AES, Liberty II, Varian). Les éléments majeurs sont analysés par chromatographie ionique (IC 25, Dionex ; colonne anionique AS 11 HC et colonne cationique CS 12 A). Le dosage des matières organiques solubles a été réalisé par spectrophotométrie UV-VIS à 400 nm (Liu et Gonzalez, 2000). Une courbe d'étalonnage est réalisée en mesurant l'absorbance de solutions étalons d'acide humique de synthèse (Aldrich) à pH 7.

2. Résultats

2.1. Effet de *T. caerulescens* sur le compartiment soluble du Cd et du Zn

2.1.1. Potentiel redox

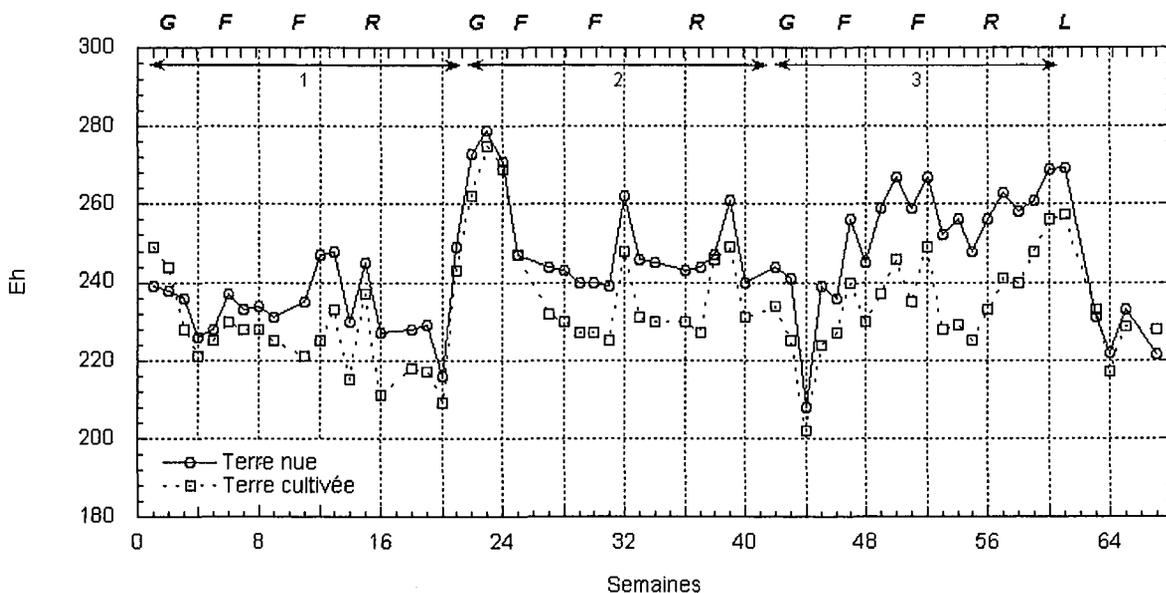


Figure 4.9 : Evolution de Eh dans la solution du sol durant trois cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et une culture de laitue (G : germination ; F : fertilisation ; R : récolte ; L : laitue)

L'évolution du potentiel redox est identique sur les lysimètres cultivés et nus (figure 4.9). En présence de plantes, les valeurs de Eh tendent à être inférieures à celles observées dans les terres nues. La chute de Eh apparaissant en semaine 44 survient suite à une manipulation des terres pour renouveler les bougies poreuses. Le contact sonde-sol ne se

faisant plus, un travail du sol en profondeur a dû être réalisé et une suspension diluée de la terre en place injectée à l'endroit même où sont localisées les bougies poreuses. Cette manipulation a eu des répercussions sur les autres paramètres, notamment sur la concentration des métaux et des éléments majeurs dans la solution du sol.

2.1.2. pH

Dans les terres nues, les fluctuations de pH sont faibles (figure 4.10). Durant la première culture, on observe une diminution du pH suite à l'apport de la fertilisation. Cette réduction peut être attribuée à la nitrification de l'azote apporté en semaine 5. Le pH passe alors de 7,0 à 6,4. A partir de la semaine 16, le pH tend à augmenter au cours du temps avec de faibles variations au moment de la fertilisation pour atteindre la valeur initiale en fin d'expérimentation.

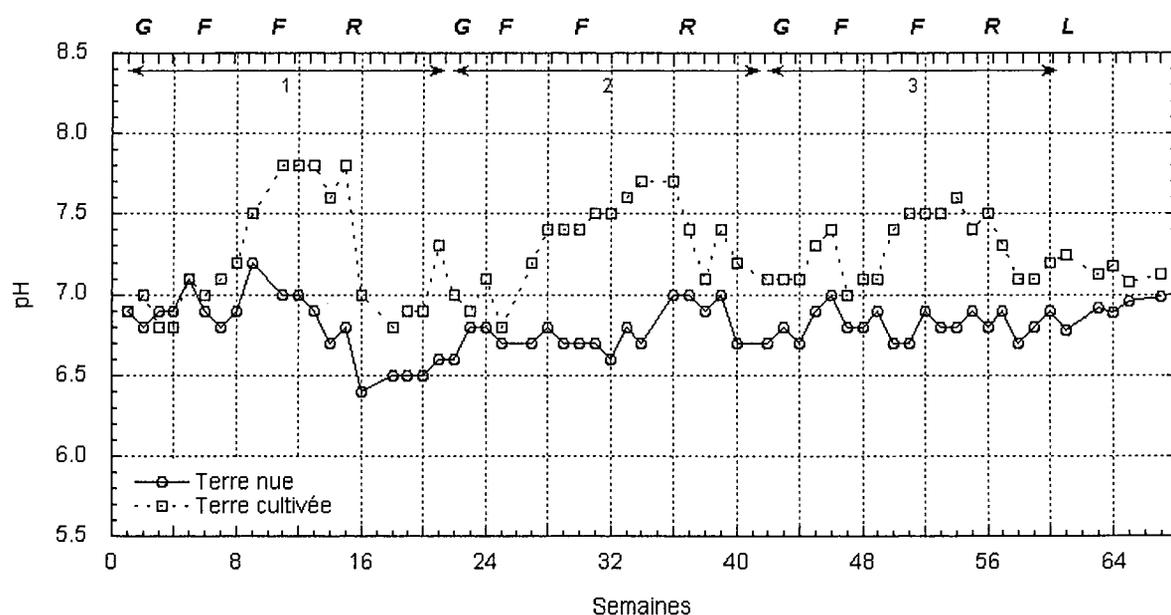


Figure 4.10 : Evolution du pH dans la solution du sol durant trois cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et une culture de laitue (G : germination ; F : fertilisation ; R : récolte ; L : laitue)

Dans les terres cultivées, le pH augmente de 0,5 à 1 unité durant la croissance des plantes puis rejoint l'état initial après récolte. On observe quelques fluctuations liées à la fertilisation. L'amplitude des variations diminue avec le temps. La laitue n'a pas d'effet sur le pH.

2.1.3. Carbone organique soluble

Dans les terres nues, la concentration du carbone soluble diminue durant les 12 premières semaines, passant de 7,2 à 3,6 mg l⁻¹ (figure 4.11). Durant les sept semaines suivantes, on observe une augmentation du carbone en solution jusqu'à atteindre 6 mg l⁻¹. A partir de cette date, la concentration du carbone soluble tend à se stabiliser autour de cette valeur. La semaine 43 est marquée par une nouvelle chute du carbone en solution jusqu'à atteindre 2,6 mg l⁻¹ la 53^{ème} semaine. Cette rupture dans l'évolution du carbone en solution est à mettre en relation avec le travail du sol effectué la 43^{ème} semaine. Les 8 dernières semaines, avant le repiquage de la laitue, la concentration du carbone soluble augmente à nouveau. Durant la culture, cette augmentation est maintenue de sorte que la concentration du carbone soluble atteint au final 8,4 mg l⁻¹.

Dans les terres cultivées, l'évolution de la concentration du carbone soluble tend à suivre celle observée dans les terres nues durant les périodes sans végétation et durant les premières semaines de croissance des plantes. De façon générale, une augmentation

importante de la concentration du carbone soluble est mise en évidence à partir de la 6^{ème} semaine après le semis de *T. caerulescens*. Cette augmentation correspond au démarrage de la phase d'activité racinaire. Un pic de carbone entre 9,2 et 10,3 mg l⁻¹ est systématiquement observé avant la deuxième fertilisation. Un second pic est observé au moment de la récolte.

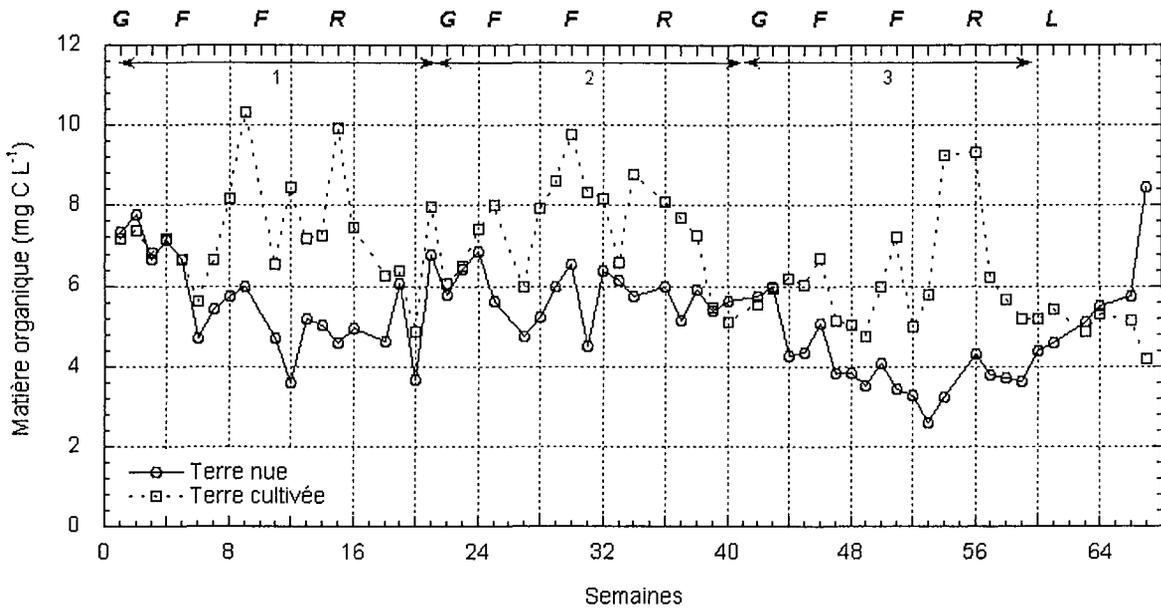


Figure 4.11 : Evolution de la concentration du carbone soluble (mg C kg⁻¹) durant trois cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et une culture de laitue (G : germination ; F : fertilisation ; R : récolte ; L : laitue)

Le mesure de l'absorbance des solutions de sol à 465 (E₄) et 665 nm (E₆) nous renseigne sur le degré d'aromaticité des matières organiques (figure 4.12). Ainsi, un rapport E₄/E₆ élevé indique que la matière organique est en majorité de type aliphatique. Le suivi du rapport E₄/E₆ durant la culture de *T. caerulescens* met en évidence une diminution de l'aromaticité des matières organiques parallèlement aux pics de carbone.

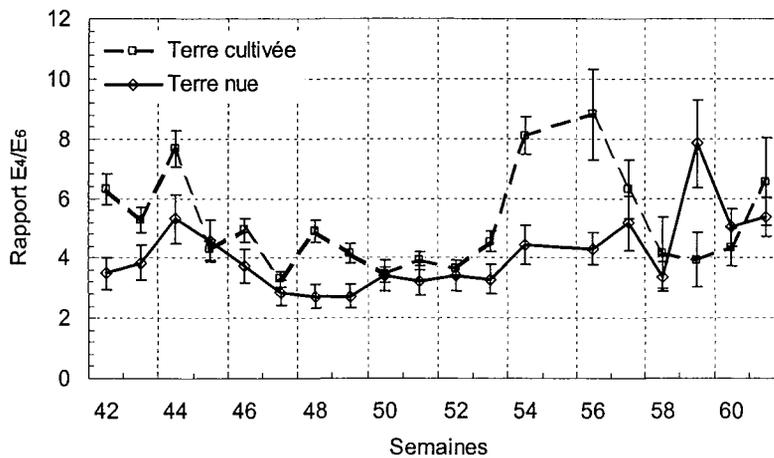


Figure 4.12 : Evolution des propriétés spectroscopiques du carbone organique soluble (rapport E₄/E₆) durant la troisième culture de *Thlaspi caerulescens* et une interculture

Par ailleurs, la figure 4.13 met en évidence une corrélation hautement significative entre l'augmentation du pH et l'augmentation de la concentration des matières organiques solubles dans les terres cultivées avec *T. caerulescens*.

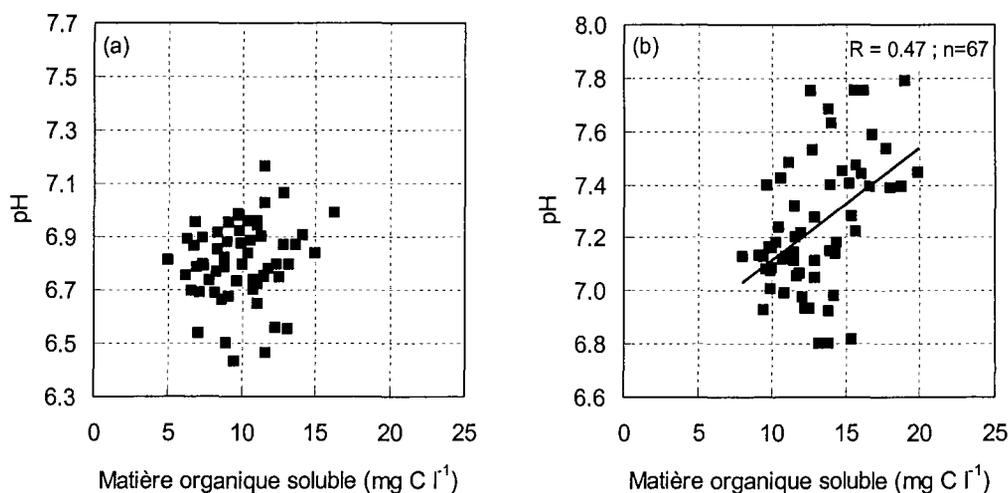


Figure 4.13 : Relation entre l'évolution du pH dans la solution du sol et la concentration des matières organiques solubles (mg C l^{-1}) dans les terres non cultivées (a) et cultivées avec *Thlaspi caerulescens* (b) (N=67)

2.1.4. Concentration du Cd

Dans les terres nues, les fluctuations de concentration du Cd soluble sont très fortes (figure 4.14). Deux périodes peuvent être distinguées : avant et après le travail du sol effectué en semaine 43. Ce travail du sol s'est déroulé en deux phases : une aération par retournement de la terre autour des sondes de prélèvement, suivie par une saturation temporaire en eau de la zone afin que le sol soit étroitement en contact avec les sondes. Il en résulte une augmentation de la surface d'échange et de la diffusion des métaux vers la solution ce qui se traduit en effet par une forte augmentation du Cd soluble, surtout dans les terres non cultivées.

Durant la première période, les fluctuations sont de l'ordre de 1 à $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$ et sont généralement liées à l'apport de la fertilisation. Durant la deuxième période, de fortes quantités de Cd sont mises en solution avec 2 pics à 10 et $28 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. Le deuxième pic en semaine 63 correspond au travail du sol réalisé en surface en vue du repiquage de la laitue.

Dans les terres cultivées, la présence d'un couvert végétal tamponne fortement les variations de concentration. De façon générale, sur les trois cultures successives, la concentration du Cd soluble diminue pour passer de 1,8 à $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ avec quelques écarts liés à la fertilisation. Durant les intercultures, la concentration du Cd soluble augmente.

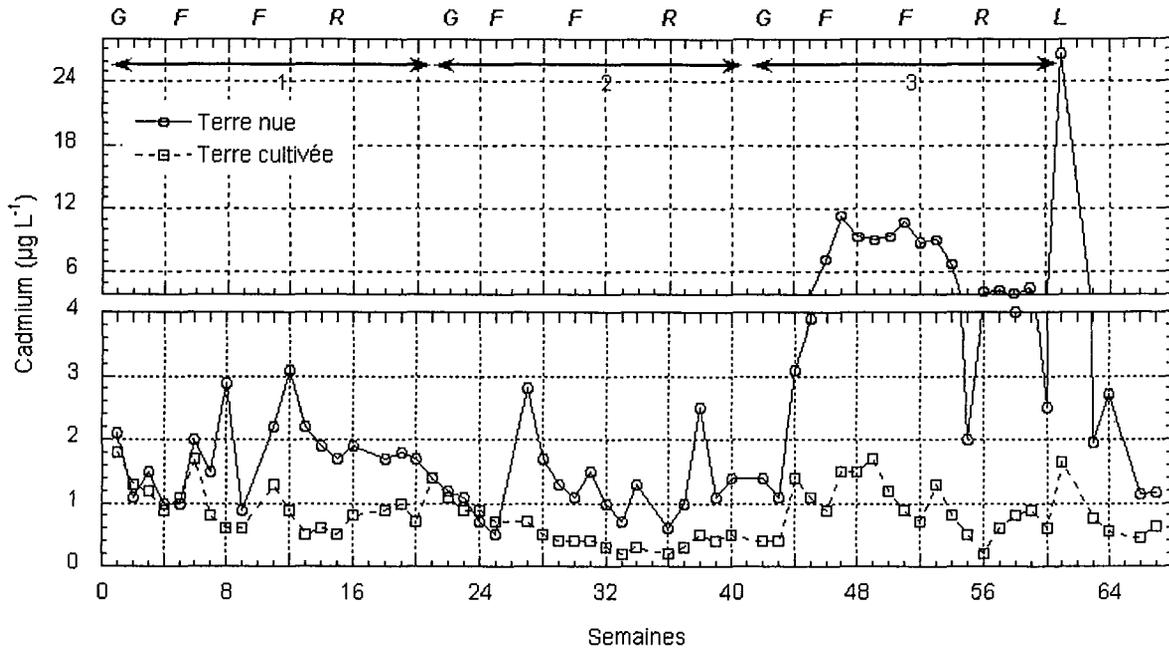


Figure 4.14 : Evolution de la concentration du Cd soluble ($\mu\text{g L}^{-1}$) durant trois cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et une culture de laitue (G : germination ; F : fertilisation ; R : récolte ; L : laitue)

La taille du compartiment du Cd soluble associé à la matière organique soluble a été déterminée à l'aide du programme Jchess (chapitre 2, § 2.4) (figure 4.15). Dans les terres non cultivées, la fraction du Cd soluble présent sous forme aqueuse varie entre 19 et 92% durant l'expérimentation. Par opposition, dans les terres cultivées, la part du Cd liée à la matière organique est prépondérante (entre 30 et 92%). Dans les terres non cultivées, une bonne adéquation entre l'évolution de la concentration du Cd dans la solution du sol et son association avec les matières organiques solubles a été observée. La relation entre les deux paramètres suit alors une fonction puissance avec un coefficient de corrélation hautement significatif (figure 4.16a). Seul le point correspondant à la plus forte concentration du Cd soluble ($26 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, semaine 61) n'est pas expliqué par la régression. Une tendance similaire est également observée dans les terres cultivées, même si la dispersion est beaucoup plus forte. La relation entre la concentration du Cd soluble et son association avec les matières organiques suit alors une fonction linéaire (figure 4.16b). Si l'on compare avec la figure 4.16a, la même gamme de concentrations du Cd entre 0 et $1,6 \mu\text{g l}^{-1}$ correspond à la portion linéaire de la courbe ce qui indique finalement un comportement similaire dans les deux terres.

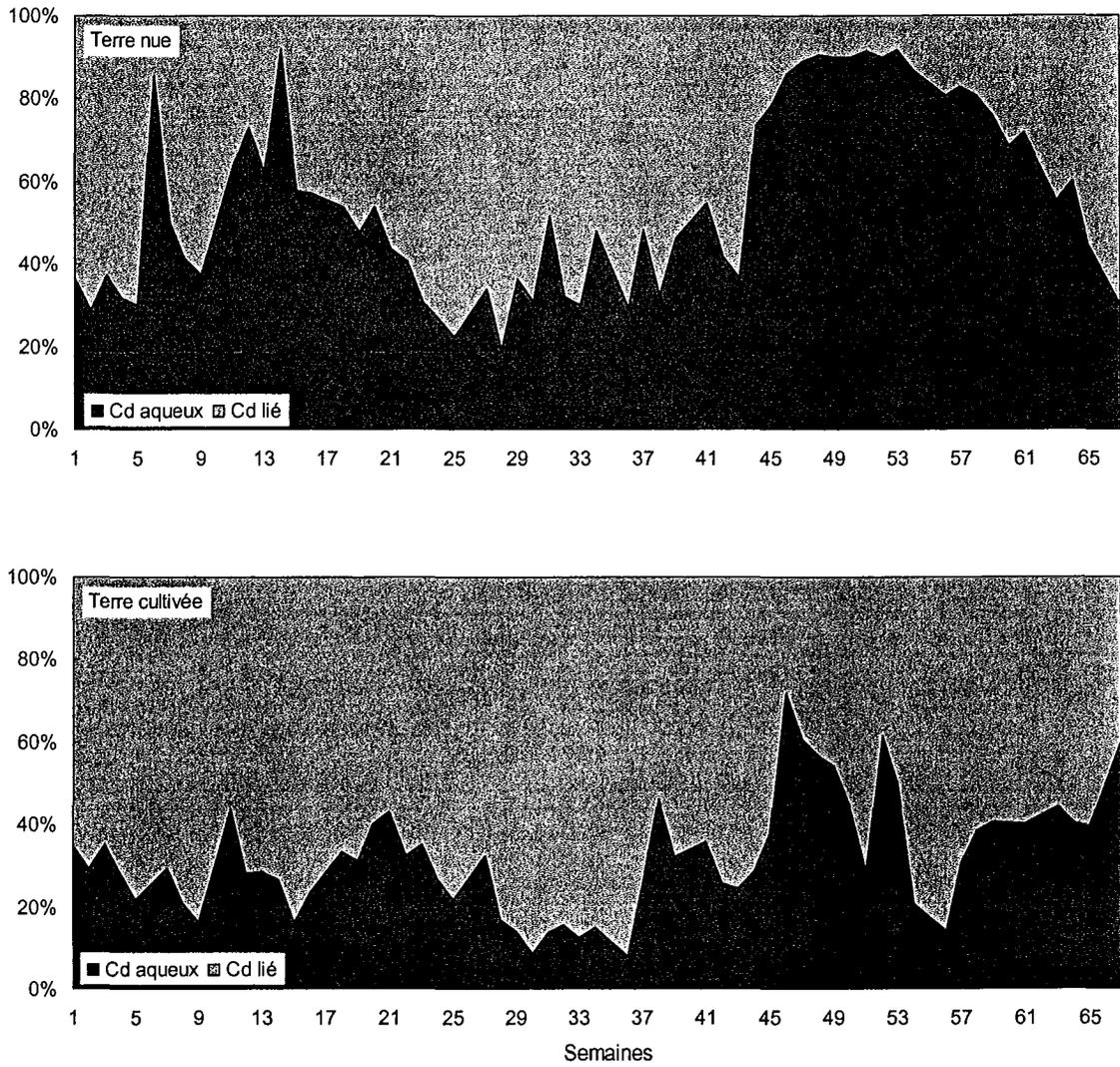


Figure 4.15 : Evolution de la part de Cd aqueux et associé à la matière organique soluble dans les terres nues (en haut) et cultivées (en bas) durant trois cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et une culture de laitue

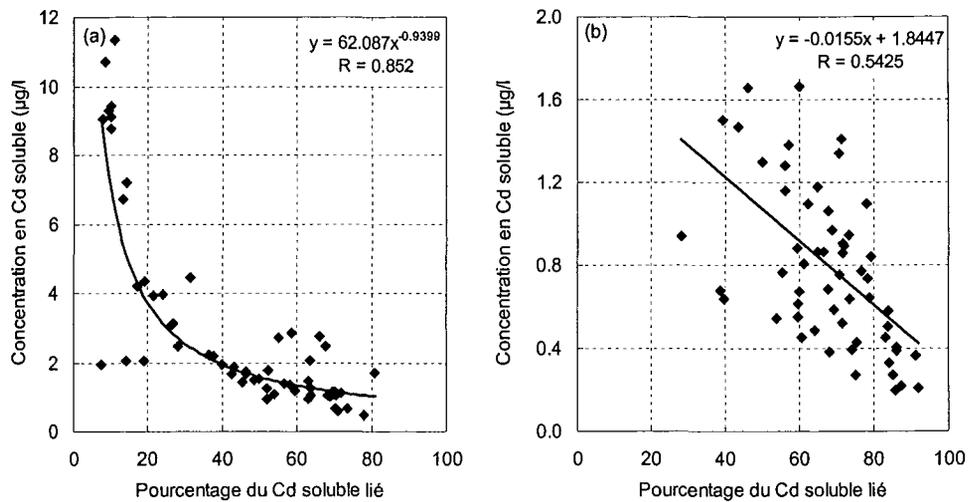


Figure 4.16 : Relation entre l'évolution des concentrations du Cd ($\mu\text{g l}^{-1}$) dans la solution du sol et le pourcentage du Cd lié aux matières organiques solubles dans les terres non cultivées (a) et cultivées avec *Thlaspi caerulescens* (b) (N=59)

2.1.5. Concentration du Zn

Dans la solution des terres cultivées, la concentration du Zn reste constante avec une valeur moyenne de $223 \mu\text{g l}^{-1}$ (figure 4.17). Par opposition, dans la solution des terres nues, la concentration du Zn dans la solution augmente régulièrement pour atteindre $0,8 \text{ mg l}^{-1}$ en semaine 43. Comme précédemment avec la concentration du Cd soluble, le travail du sol se traduit par une mise en solution de fortes quantités de Zn de sorte que sa concentration atteint 2 mg l^{-1} . Le second pic à 6 mg l^{-1} en semaine 63 correspond aux observations faites avec la concentration du Cd soluble et peut être attribué de même au travail du sol en surface réalisé en vue du repiquage de la laitue. La présence d'une couverture végétale sur les bacs permet de tamponner les variations de concentration du Zn soluble.

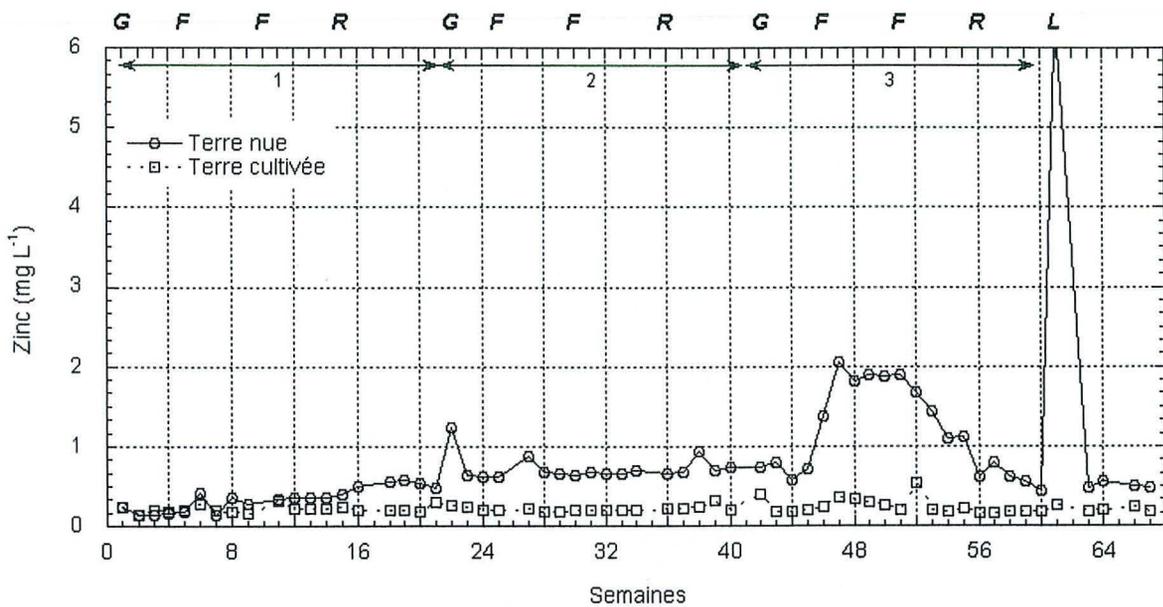


Figure 4.17 : Evolution de la concentration du Zn soluble (mg l^{-1}) durant trois cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et une culture de laitue (G : germination ; F : fertilisation ; R : récolte ; L : laitue)

T. caerulescens

Après 15 semaines de culture, les individus sont de grande taille et ne présentent pas de signes de carence (photographie 4.6 à 4.8).



Photographies 4.6, 4.7 et 4.8 : Production de biomasse aérienne par *Thlaspi caerulescens* après 15 semaines de culture sur la terre S3 (de gauche à droite cultures 1 à 3)

La biomasse sèche moyenne par bac produite par *T. caerulescens* diminue avec le nombre de cultures passant de 24 à 13 g bac⁻¹ (figure 4.18).

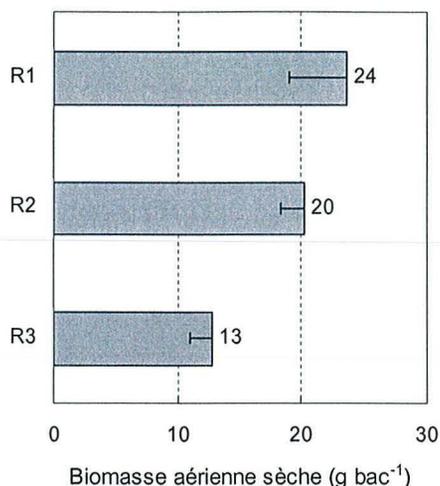


Figure 4.18 : Production de biomasse aérienne sèche (g bac⁻¹) par *Thlaspi caerulescens* durant trois cultures successives sur la terre S3.

L. sativa

La laitue a présenté une meilleure croissance sur la terre préalablement non cultivée par rapport à la terre traitée par phytoextraction (photographies 4.9 et 4.10). Il semblerait qu'après culture de *T. caerulescens* la terre soit devenue phytotoxique pour la laitue. Dans les deux cas, les plantes n'ont pas atteint le stade pommeison.



Photographies 4.9 et 4.10 : Production de biomasse aérienne par *Lactuca sativa* cultivée durant 6 semaines sur la terre S3 préalablement non cultivée (à gauche) et cultivée avec *Thlaspi caerulescens* (à droite).

La biomasse aérienne sèche moyenne par bac produite par *L. sativa* atteint respectivement 1,6 et 10,7 g sur la terre S3 cultivée avec *T. caerulescens* et non cultivée (figure 4.19). La même différence est observée au niveau des parties racinaires avec respectivement 40 et 290 mg.

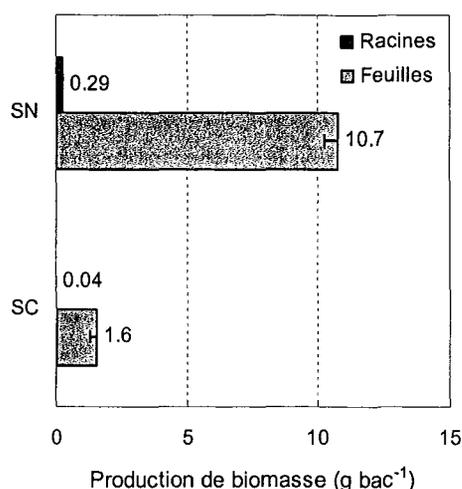


Figure 4.19 : Production de biomasse sèche aérienne et racinaire (g bac⁻¹) par *Lactuca sativa* cultivée durant 6 semaines sur la terre S3 préalablement non cultivée (SN) et cultivée avec *Thlaspi caerulescens* (SC)

2.2. Concentrations du Cd et du Zn dans les plantes

T. caerulescens

Parallèlement à la diminution de la production de biomasse, les concentrations du Zn et du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* diminuent avec les trois cultures (figure 4.20). Ainsi, les concentrations du Cd sont réduites de près de la moitié, passant de 157 à 87 mg kg⁻¹ tandis que les concentrations du Zn sont réduites de près d'un tiers passant de 4 436 à 3 456 mg kg⁻¹.

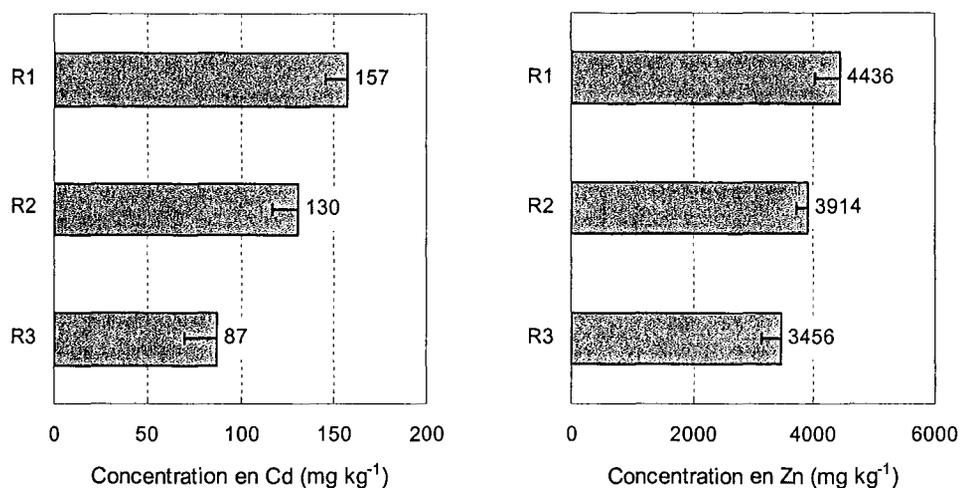


Figure 4.20 : Concentrations du Cd et du Zn (mg kg⁻¹) dans les parties aériennes de *Thlaspi caerulescens* durant trois cultures successives sur la terre S3

L. sativa

Les concentrations du Cd et du Zn dans les parties aériennes des plantes cultivées sur la terre cultivée avec *T. caerulescens* diminuent légèrement par rapport à celles cultivées sur la terre nue (Figure 4.21).

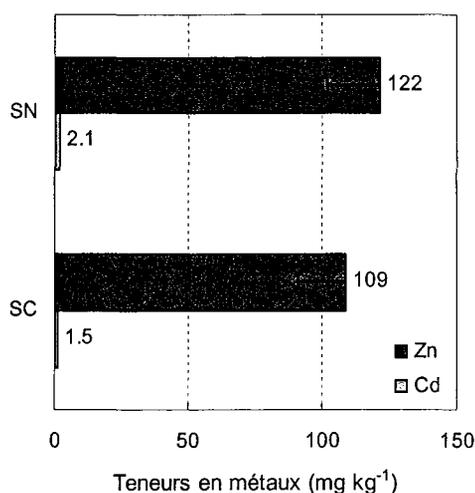


Figure 4.21 : Concentrations du Cd et du Zn (mg kg⁻¹) dans les parties aériennes de *Lactuca sativa* cultivée durant 6 semaines sur la terre S3 préalablement non cultivée (SN) et cultivée avec *Thlaspi caerulescens* (SC)

2.3. Extraction du Cd et du Zn par *T. caerulescens*

La première culture de *T. caerulescens* extrait 3,7 mg Cd bac⁻¹ et 104 mg Zn bac⁻¹ ce qui représente respectivement 4 et 0,6% du métal total du sol (figure 4.22). Comme précédemment, les quantités de Cd et de Zn extraites par *T. caerulescens* diminuent d'un facteur 3 et 2 avec les cultures successives. Au terme des trois cultures, *T. caerulescens* a extrait 8,3 et 1,4% du Cd total et du Zn total du sol.

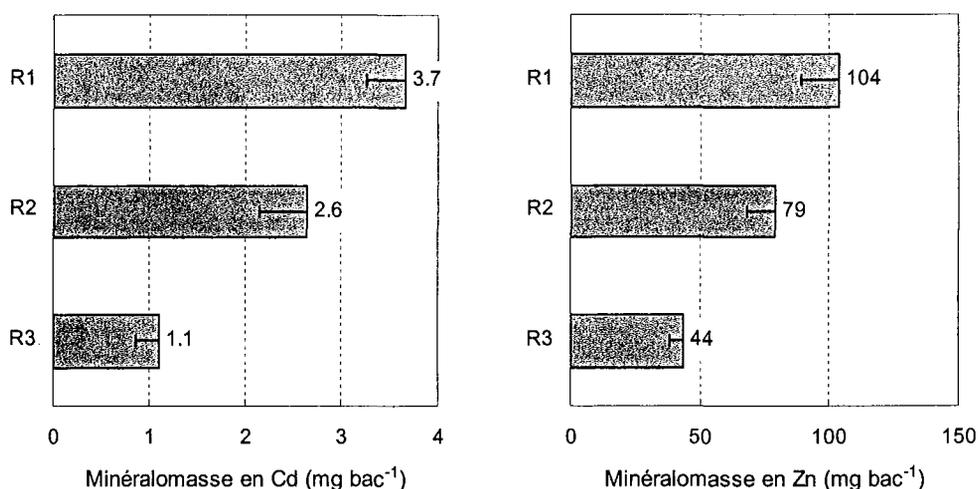


Figure 4.22 : Quantités de Cd et de Zn extraites (mg bac⁻¹) par *Thlaspi caerulescens* durant trois cultures successives sur la terre S3.

2.4. Distribution du Cd au sein des compartiments isotopiquement échangeables

Des cinétiques de dilution isotopique du Cd ont été réalisées sur la terre S3 avant et après chaque culture dans les terres cultivées et non cultivées. Considérons les deux premières cultures, c'est à dire avant le travail du sol réalisé en semaine 43. Le paramètre n et le facteur capacité sont significativement supérieurs dans la terre cultivée par rapport à la terre non cultivée (tableau 4.3). Par opposition, les paramètres r_1/R et C_{Cd} sont significativement inférieurs dans la terre cultivée par rapport à la terre non cultivée. Suite au

travail profond du sol réalisé au début de la troisième culture, une réduction significative des paramètres n et C_{Cd} a été enregistrée.

Tableau 4.3 : Paramètres de cinétique et répartition du Cd entre les compartiments échangeables au cours du temps dans la terre S3 avant culture (témoin) et après chaque cycle cultural (1, 2 et 3) dans les terres cultivées avec *Thlaspi caerulescens* et dans les terres non cultivées

	Témoin	Terre non cultivée			Terre cultivée		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
C_{Cd} ($\mu\text{g l}^{-1}$)	8,7 a	8,9 a	7,4 b	5,0 d	6,9 c	6,5 c	3,0 e
n	0,24 b	0,25 b	0,23 b	0,21 c	0,26 a	0,27 a	0,23 b
r_1/R	0,037 b	0,041 a	0,052 a	0,047 a	0,036 b	0,035 b	0,039 b
Facteur capacité (l kg^{-1})	50 b	46 a	36 a	43 a	53 c	53 c	53 c
$E_{0-1\text{min}}$ (% Cd total)	7 a	7 a	8 a	4 b	6 c	6 c	3 d
$E_{1\text{min}-15\text{sem}}$ (% Cd total)	52 a	52 a	50 a	26 b	50 a	52 a	27 b
$E_{15\text{sem}-1\text{an}}$ (% Cd total)	6 a	6 a	6 a	5 a	6 a	6 a	5 a
$E_{>1\text{an}}$ (% Cd total)	35 a	35 a	36 a	65 b	34 a	29 a	57 b
Cd extrait (% Cd total)					4	6	8

(les valeurs suivies d'une lettre identique au sein d'une même ligne ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5%)

Avant culture, 59% du Cd est disponible pour les plantes en 15 semaines ce qui démontre une forte biodisponibilité du métal. En absence de végétation et de tout remaniement de la terre la répartition du Cd au sein des compartiments échangeables ne varie pas. Par opposition, en présence de plantes, les compartiments $E_{0-1\text{min}}$ et $E_{1\text{min}-15\text{sem}}$ sont significativement réduits. La réduction du compartiment $E_{0-1\text{min}}$ apparaît faible en comparaison avec les quantités de Cd extraites par les plantes, indiquant un réapprovisionnement des compartiments les plus échangeables par la phase solide du sol. Suite au travail du sol au début de la troisième culture, le Cd est réparti au sein des compartiments échangeables en faveur de $E_{>1\text{an}}$. En effet, les quantités de Cd échangeables en 15 semaines dans la terre non cultivée ne représentent plus que 30% contre 60% avant le travail du sol.

3. Discussion

3.1. Modifications des compartiments échangeables du Cd

La culture de *T. caerulescens* sur la terre S3 a conduit à l'augmentation du paramètre n , relatif à la fixation du Cd sur la phase solide. Dans la terre S2, nous avons observé le phénomène inverse, c'est à dire une diminution de n que nous avons attribuée à la présence potentielle d'une phase organique réduisant les vitesses d'échanges. En effet, nos résultats démontrent que, sous couvert de *T. caerulescens*, la quantité de matières organiques solubles augmente. Lors de la mise en œuvre des cinétiques d'échange isotopique sur les deux terres, nous avons utilisé deux solutions extractantes : de l'eau ultra-pure pour S2 et une solution de CaCl_2 0,01 M pour S3 (voir chapitre 2, § 2.2). Il est probable qu'une partie de la matière organique soluble ait été floculée dans la terre S3. Dès lors, une partie du Cd, rapidement fixée sur les matières organiques, disparaîtrait du compartiment soluble ayant pour conséquence une apparente augmentation de la vitesse d'échange entre la solution du sol et la phase solide.

Comme précédemment avec les terres S1 et S2, la couverture du sol avec *T. caerulescens* conduit à la réduction significative de $E_{0-1\text{min}}$. En revanche, le Cd échangeable en plus d'un an ne varie pas. La faible diminution de $E_{0-1\text{min}}$ par rapport aux quantités de Cd extraites par les plantes montre que ce compartiment est réapprovisionné par la phase solide du sol, et plus particulièrement par les compartiments les plus échangeables, représentés ici par $E_{1\text{min}-15\text{sem}}$. Les quantités de Cd extraites par les plantes suite à deux cultures successives (7%) sont supérieures à la diminution de la quantité de Cd échangeable en 15 semaines. Ceci nous montre que la terre S3 réapprovisionne successivement les compartiments du Cd les plus échangeables.

Le travail du sol profond, réalisé en semaine 43, a modifié la répartition du Cd au sein des compartiments échangeables avec une très forte diminution des quantités de Cd échangeables en 15 semaines (de 58 à 30%). Toutefois, le travail du sol favorise fortement la solubilisation du Cd et du Zn.

3.2. Modifications du compartiment soluble du Cd

Dans l'expérience précédente avec les terres S1 et S2, nous avons mis en évidence 3 phases successives : (1) une mise en solution de Cd suite à l'apport d'une fertilisation minérale au moment du semis, (2) une décroissance forte et (3) une stabilisation de la quantité de Cd en solution. Avec S3, durant la croissance de *T. caerulescens*, la concentration du Cd soluble diminue fortement et régulièrement, de sorte que l'on n'observe ni la première ni la troisième phase. Cette différence est due, d'une part, au fractionnement de la fertilisation après 5 et 10 semaines de culture et, d'autre part, au facteur capacité plus faible de la terre S3 par rapport aux terres S1 et S2 impliquant un réapprovisionnement plus lent de la solution du sol en ions Cd^{2+} . En absence de végétation, les variations de concentrations du Cd soluble sont très fortes. Cependant, le sol maintient une concentration du Cd relativement proche de la valeur de départ ce qui nous indique une capacité tampon du sol vis-à-vis des ions Cd^{2+} suffisamment élevée. Ceci est vérifié tant que le système n'est pas trop fortement perturbé. En effet, suite au travail du sol réalisé en semaine 43, la concentration du Cd soluble atteint plus de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ durant 8 semaines consécutives.

Comme nous l'avons vu précédemment pour les terres S1 et S2, le pH de la solution du sol augmente durant la croissance de *T. caerulescens*. D'autres auteurs ont également mis en évidence une augmentation du pH de la solution du sol lors de cultures de *T. caerulescens* et par conséquent un rôle possible dans la réduction de la biodisponibilité des métaux (Hammer et Keller, 2002 ; Knight *et al.*, 1997). Cette augmentation du pH est fortement corrélée avec l'augmentation de la concentration des matières organiques solubles sous couvert de *T. caerulescens*. Ces résultats confortent l'hypothèse de la participation du carbone organique soluble libéré durant la croissance de *T. caerulescens* dans la dissolution des minéraux. Il en résulte une solubilisation accrue des métaux dans la rhizosphère de *T. caerulescens* par complexation avec la matière organique soluble, ce qui se traduit par une plus forte proportion du Cd soluble associé aux matières organiques dans les terres cultivées par rapport aux terres non cultivées.

L'augmentation de la concentration du Cd soluble dès la récolte des plantes met en évidence un réapprovisionnement de la solution du sol par les compartiments du Cd les plus échangeables, ce réapprovisionnement étant plus lent que l'absorption du Cd par les plantes. Dans le cas du Zn, le sol réapprovisionne le compartiment soluble avec la même vitesse que les plantes absorbent le métal. Dès lors, il apparaît que la terre S3 présente une capacité tampon vis-à-vis des ions Zn^{2+} suffisamment élevée pour maintenir une quantité de Zn disponible à la surface des racines de *T. caerulescens* telle que la plante puisse maintenir le flux d'absorption du Zn. Par opposition, la capacité tampon de la terre S3 vis-à-vis du Cd serait trop faible pour maintenir une quantité de Cd disponible à la surface des racines de *T. caerulescens* suffisante. Ceci se traduirait par une diminution du flux d'absorption racinaire

du Cd durant la culture. Par ailleurs, il est également nécessaire de prendre en compte la spéciation des métaux dans la solution du sol. Nous avons observé qu'en présence de *T. caerulescens*, la concentration des matières organiques solubles augmente dans la solution du sol, ce qui a pour conséquence une diminution de la part du Cd sous forme Cd^{2+} dans les terres cultivées par rapport aux terres non cultivées. Un pouvoir tampon faible ajouté à une association du Cd avec les matières organiques solubles dans la rhizosphère concourront à réduire l'absorption du métal par les racines de *T. caerulescens*. L'adsorption du Cd sur les matières organiques solubles interviendra d'autant plus que les concentrations du Cd soluble seront faibles.

3.3. Phytoextraction du Cd et du Zn

Lors des cultures successives de *T. caerulescens* sur la terre S3, nous avons observé une diminution de la production de biomasse par bac. Plusieurs paramètres peuvent intervenir dans la production de biomasse par les plantes :

- Durant la culture, les plantes ont reçu une fertilisation N-S raisonnée pour que ces éléments ne soient pas un facteur limitant pour la croissance. Les concentrations des ions NO_3^- dans la solution du sol (annexe 3) diminuent en effet avec les cultures. Cependant, les fortes quantités mises en solution suite au travail du sol, ne permettent pas d'expliquer la forte réduction de biomasse observée pour la 3^{ème} culture.
- L'humidité du sol intervient également dans la croissance des plantes, or l'utilisation d'un système d'arrosage automatique associée à une pesée en continu des bacs nous a permis de maintenir une humidité du sol constante et à une valeur proche de 80% de la capacité au champ.
- Il est également envisageable que lors de cultures successives de *T. caerulescens*, la culture précédente ait un effet négatif sur l'installation du système racinaire de la culture suivante réduisant l'absorption racinaire des nutriments et donc la croissance des plantes.
- Enfin, si l'on considère que le Zn est, chez *T. caerulescens*, indispensable au fonctionnement et à la croissance de la plante, alors la diminution de la concentration du Zn libre durant la succession de culture conduirait à une réduction de la croissance.

Parallèlement à la réduction de la production de biomasse, nous avons observé une réduction des concentrations du Zn et du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* avec les cultures successives. Nous avons vu que le pouvoir tampon du sol permettait de maintenir une concentration constante du Zn soluble. Dès lors, l'explication de la réduction de la concentration du Zn dans les parties aériennes se situerait au niveau de la plante elle-même, avec une absorption racinaire limitée. Nous rejoignons ici l'hypothèse d'une réduction du volume racinaire de *T. caerulescens* avec les cultures successives. En ce qui concerne le Cd, se grefferait en plus une réduction de la concentration du Cd soluble. En effet, la réduction de la concentration du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* est supérieure à celle mesurée pour le Zn.

Nous avons utilisé *L. sativa* comme plante test pour vérifier si la phytotoxicité du sol pour d'autres cultures était réduite suite à une phytoextraction par *T. caerulescens*. Si l'on prend en compte les résultats en terme de concentrations des métaux dans les parties aériennes des plantes, nous avons en effet observé une légère diminution de leur transfert. En fait, le flux d'absorption des métaux est beaucoup plus faible chez *L. sativa* que chez *T. caerulescens*. Le pouvoir tampon de la terre S3 permet alors de maintenir une concentration des métaux à la surface des racines suffisante, de sorte que l'on observe un flux d'absorption identique dans la terre traitée ou non. Par ailleurs, nous avons observé que *L. sativa* se développait beaucoup moins bien après traitement de la terre par phytoextraction. Comme nous avons laissé les systèmes racinaires de *T. caerulescens* en place après chaque culture, il est possible que cela ait gêné l'installation du système racinaire de la laitue. Les racines de *T. caerulescens* laissées en place pourraient libérer des

métaux toxiques lors de leur dégradation. Nous avons observé que des composés organiques solubles étaient libérés lors des cultures de *T. caerulescens*. Quel serait alors leur rôle ? Ces composés sont-ils toxiques pour les autres végétaux, de sorte qu'ils participeraient à une forme d'allélopathie ? Au cours de cette expérience, la période de repos entre chaque culture de *T. caerulescens* était courte (5 semaines) et les microorganismes du sol n'ont certainement pas pu dégrader complètement les racines laissées en place. Cette phase de dégradation apparaîtrait nécessaire pour pouvoir envisager des cultures de plantes non hyperaccumulatrices après la phytoextraction des terres par *T. caerulescens*.

4. Conclusion

Lors d'une culture de *T. caerulescens*, la plante va agir sur la taille du compartiment soluble des métaux ainsi que sur celle du compartiment biodisponible. Le flux d'absorption des métaux par la plante va dépendre de leurs quantités à la surface des racines. Lorsque le sol présente un pouvoir tampon suffisant, la solution du sol et en particulier la rhizosphère de *T. caerulescens* seront réapprovisionnées en métaux pour maintenir une concentration des métaux constante au voisinage des racines et donc un flux d'absorption constant. Cela correspond à nos observations dans la terre S3 avec le Zn. Par contre, dans le cas d'un pouvoir tampon insuffisant (par exemple pour le Cd dans la terre S3), le sol ne pourra pas maintenir une concentration des métaux à la surface racinaire suffisante pour conserver un flux d'absorption constant. L'efficacité de la phytoextraction diminue alors avec les cultures successives. Pour maintenir une efficacité constante, il faudrait réapprovisionner le compartiment biodisponible ; soit en laissant plus de temps au sol pour se rééquilibrer, par exemple en utilisant une culture de couverture intermédiaire entre deux cultures de *T. caerulescens* ; soit en apportant un agent favorisant la solubilisation des métaux, par exemple une fertilisation acidifiante durant la culture.

Nous avons démontré que la biodisponibilité des métaux était le principal facteur expliquant les variations d'hyperaccumulation chez différentes populations de *T. caerulescens*. Toutefois, la culture de 4 populations de *T. caerulescens* en conditions contrôlées sur une terre présentant des concentrations élevées en métaux biodisponibles (terre S3) a mis en évidence des différences génétiques entre les populations.

De grandes superficies de terres sont concernées par des contaminations modérées pour lesquelles la phytoextraction pourrait représenter une solution réaliste de traitement. L'objectif des travaux de ce chapitre est de déterminer le comportement hyperaccumulateur des populations Tc-1 à Tc-4 lorsqu'elles sont cultivées en conditions climatiques réelles sur une terre agricole faiblement contaminée par l'apport de boues de station d'épuration chargée en métaux.

1. Matériel et méthode

1.1. Terres utilisées

La culture de *T. caerulescens* a été menée sur un essai de plein champ implanté par C. Schwartz en 1995 sur une parcelle du Domaine Expérimental de l'ENSAIA situé à la Bouzule (Meurthe et Moselle), sur le sol S4.

Le dispositif d'origine comporte 48 parcelles de 2 m² chacune dont 32 ont reçu des boues urbaines chargées en métaux (tableau 5.1) durant quatre années successives. La boue a été apportée aux doses de 3 t de matière sèche ha⁻¹ an⁻¹ (B1) correspondant au maximum préconisé par l'arrêté du 8 Janvier 1998 en application du décret 97-1133 et 15 t de matière sèche ha⁻¹ an⁻¹ (B2) soit 5 fois la quantité autorisée. Un traitement témoin n'a pas reçu de boue (B0). Au total, 36 parcelles ont été cultivées (12 parcelles pour chaque traitement) et 12 laissées nues (4 parcelles par traitement). Les apports de boue ont été répartis de façon homogène sur les parcelles B1 et B2 dans les 25 premiers centimètres du profil. La culture a été menée sur 12 parcelles de l'essai correspondant à 4 parcelles par modalité (figure 5.1 et photographie 5.1).

Tableau 5.1 : Principales caractéristiques physico-chimiques des boues et comparaison aux valeurs limites de l'arrêté du 8 Janvier 1998 en application du décret 97-1133

	C/N	N total g kg ⁻¹	Cd mg kg ⁻¹	Ni mg kg ⁻¹	Pb mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹
Boue campagnes 95-97	6,8	46	24	101	420	2347
Boue campagne 97-98	15,6	19,6	11,45	109	425	1831
Boue campagne 98-99	14,5	22	9,57	127	389	1738
Valeurs limites			2,0	200	800	3000

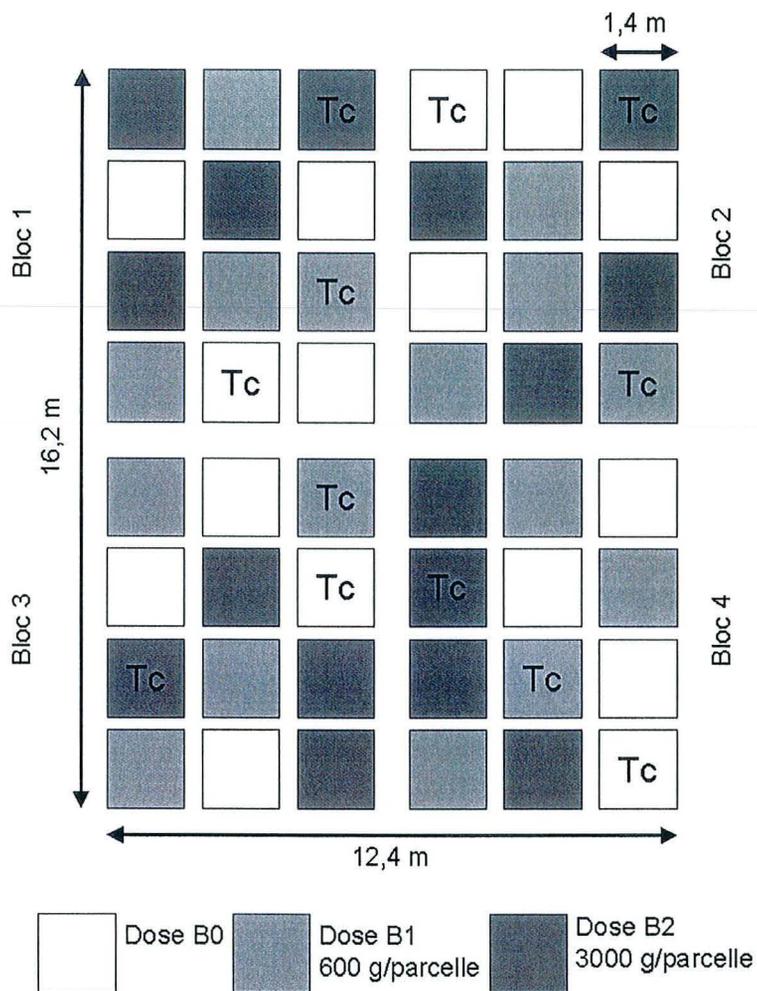


Figure 5.1 et Photographie 5.1 : Plan et vue aérienne de l'essai en condition de plein champ (d'après Schwartz, 1997). Les parcelles notées « Tc » sont celles cultivées durant la campagne 2001-2002 avec quatre populations de *Thlaspi caerulescens*

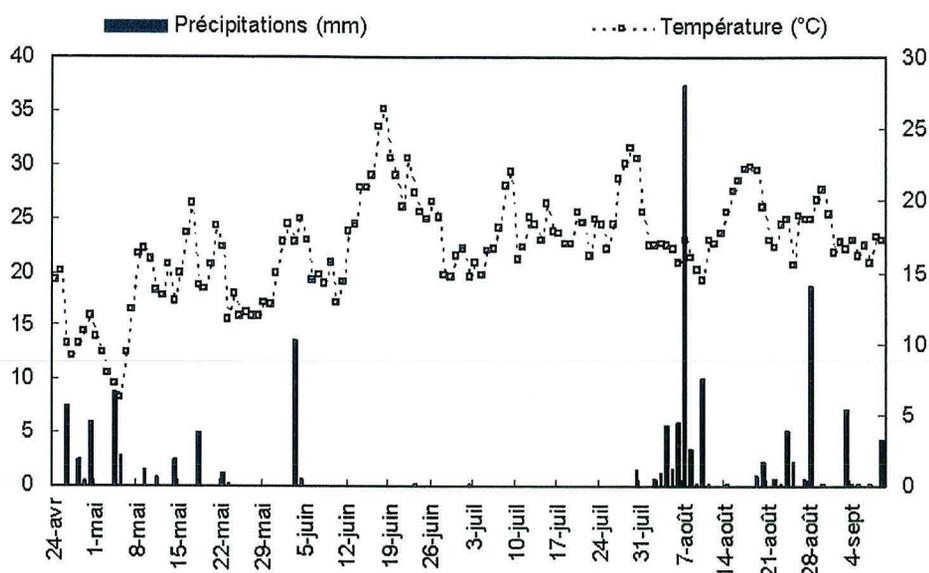


Figure 5.2 : Conditions météorologiques sur l'essai en parcelles durant la période de culture (2002)

1.2. Dispositif

Chacune des 12 parcelles retenues pour la culture a été subdivisée en quatre secteurs de dimensions 20 cm (L) x 20 cm (l) x 25 cm (P) ce qui correspond à une masse de terre sèche par microparcelle de 14 kg (densité apparente = 1,4). Chaque microparcelle a reçu une population de *T. caerulescens* (figure 5.3 et photographie 5.2). Les populations Tc-1, Tc-2 et Tc-3 sont hyperaccumulatrices de Cd et de Zn et sont originaires des sites miniers et de fonderie de Zn B3, C1-3 et G2 (chapitre 3). La population Tc-4 est hyperaccumulatrice de Ni et originaire d'un site de serpentine.

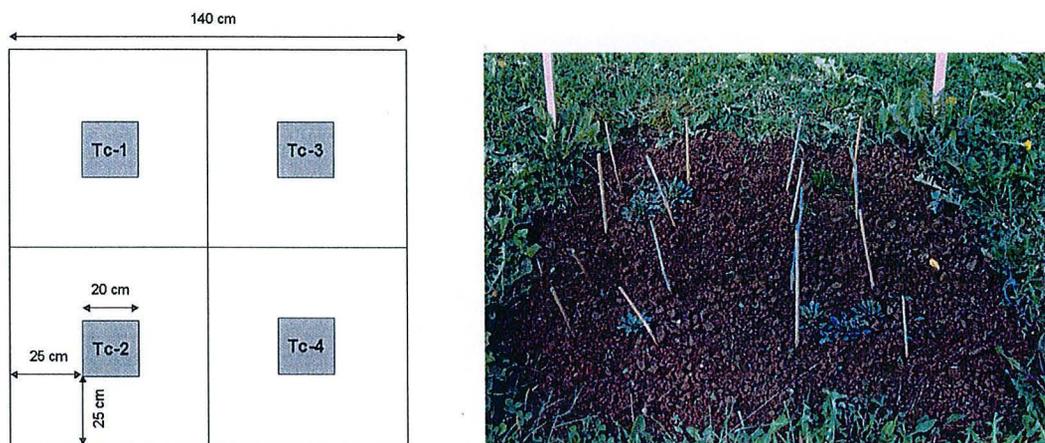


Figure 5.3 et Photographie 5.2 : Plan et vue d'une parcelle cultivée avec 4 populations de *Thlaspi caerulescens*

1.3. Culture

Une fertilisation uniforme de 130 kg ha^{-1} de sulfate d'ammonium a eu lieu chaque année au printemps entre 1995 et 1999. Aucune fertilisation n'a été apportée en 2000 ni en 2001. Le désherbage est effectué à la main. Les données météorologiques locales sont fournies par la station du centre INRA de Champenoux voisin de l'essai (figure 5.2).

Au printemps 2002, les 12 parcelles ont été bêchées manuellement pour permettre le semis de *T. caerulescens*. Le précédent cultural sur ces parcelles est décrit dans le tableau 5.2. Les concentrations en Cd total dans les terres au moment du semis sont respectivement de 0,24, 0,28 et 0,44 mg Cd kg^{-1} de terre sèche pour les modalités B0, B1 et B2. Le semis a

eu lieu le 24 avril 2002 de façon à obtenir 200 individus par mètre carré. Un traitement phytosanitaire contre les limaces a dû être réalisé suite à une attaque sévère des plantes. Aucun semis supplémentaire n'a toutefois été réalisé. La culture a été poursuivie durant 20 semaines.

Tableau 5.2 : Espèces végétales cultivées lors de la période 1995-2002 sur le sol agricole S4 amendé par une boue d'épuration urbaine chargée en métaux

Espèces végétales cultivées	
campagnes 1995-1997	<i>Brassica napus</i> (colza d'hiver) <i>Thlaspi caerulescens</i>
campagnes 1997-1999	<i>Thlaspi caerulescens</i>
campagne 1999-2000	<i>Lactuca sativa</i> (laitue)
campagne 2000-2001	Pas de culture
campagne 2001-2002	<i>Thlaspi caerulescens</i> (populations Tc-1, Tc-2, Tc-3 et Tc-4)

2. Résultats

2.1. Production de biomasse

De fortes différences de germination ont été observées (figure 5.4). Le nombre d'individus récoltés par micro-parcelle variait entre 0 et 12, les taux de germination les plus faibles étant observés avec la modalité B1. Toutefois, le taux de germination n'a pas été le seul paramètre à intervenir. Durant la période pluvieuse les plantes ont subi des attaques répétées par les limaces se traduisant par une réduction nette de la croissance voire par la mort de l'individu dans certains cas.

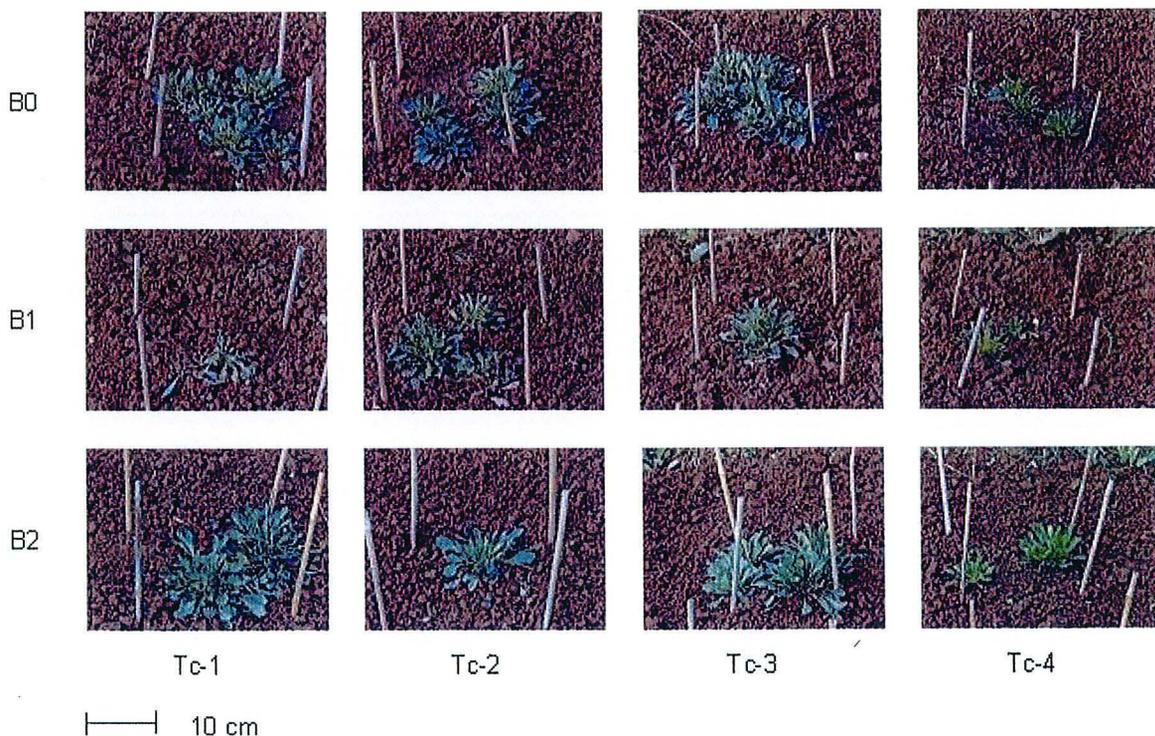


Figure 5.4 : Vue de l'essai en plein champ après 20 semaines de culture

Chapitre 5

***Réponse in situ de *Thlaspi caerulescens*
aux contaminations modérées***

De façon générale, la production de biomasse la plus forte a été observée avec la dose maximum de boue apportée, sauf pour la population Tc-2 (figure 5.5). L'augmentation de la croissance entre les modalités B0 et B2 varie entre un facteur 1,3 (Tc-4) et 2,6 (Tc-1). Les populations se comportent de façon similaire avec les trois modalités. La plus forte production de biomasse est systématiquement mesurée chez Tc-3 et la plus faible chez Tc-4.

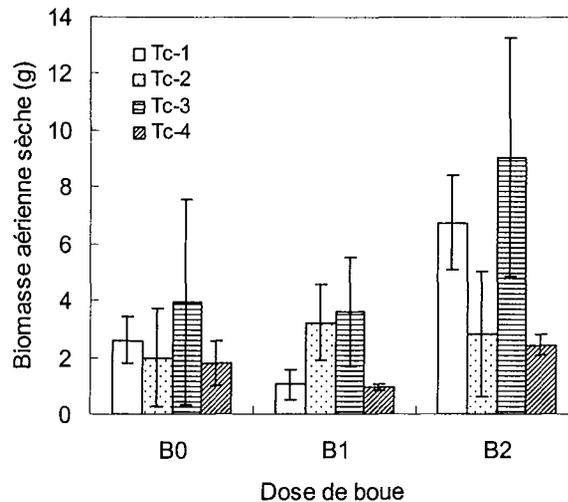


Figure 5.5 : Production de biomasse aérienne sèche par *Thlaspi caerulescens* après 20 semaines de culture sur la terre S4 en fonction de la dose de boue apportée

2.2. Concentrations des métaux dans les plantes

Les concentrations du Cd mesurées dans les différentes populations dans ces conditions de plein champ sont beaucoup plus faibles que celles obtenues en conditions contrôlées sur la terre S3 (figure 5.6). Les concentrations moyennes du Cd et du Zn dans les plantes augmentent avec les doses de boues. Elles varient entre 5,6 et 8,7 mg Cd kg⁻¹ MS et entre 326 et 602 mg Zn kg⁻¹ MS sur les parcelles non amendées et entre 22,2 et 40,8 mg Cd kg⁻¹ MS et entre 1 520 et 2 180 mg Zn kg⁻¹ MS sur les parcelles amendées avec la dose B2. De façon générale, les valeurs les plus élevées ont été mesurées pour la population Tc-3 et les plus faibles pour la population Tc-4.

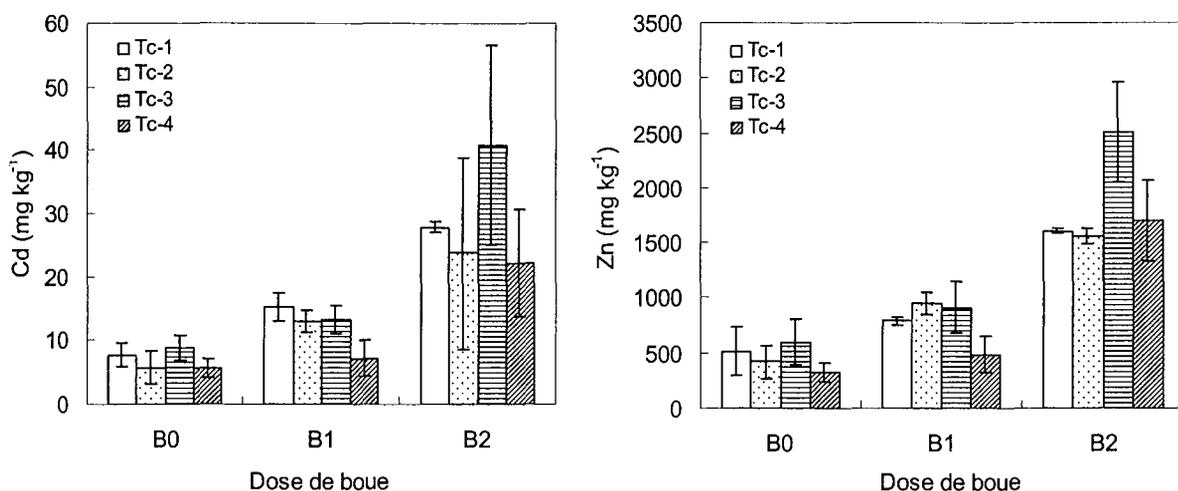


Figure 5.6 : Concentrations du Cd et du Zn (mg kg⁻¹) dans la biomasse aérienne sèche de 4 populations de *Thlaspi caerulescens* après 20 semaines de culture sur la terre S4 en fonction de la dose de boue apportée

Les concentrations en Zn dans les parties aériennes des quatre populations de *T. caerulescens* augmentent avec la biomasse produite par les plantes. Dans ces conditions, les individus les plus grands contribuent majoritairement à l'extraction du Zn du sol.

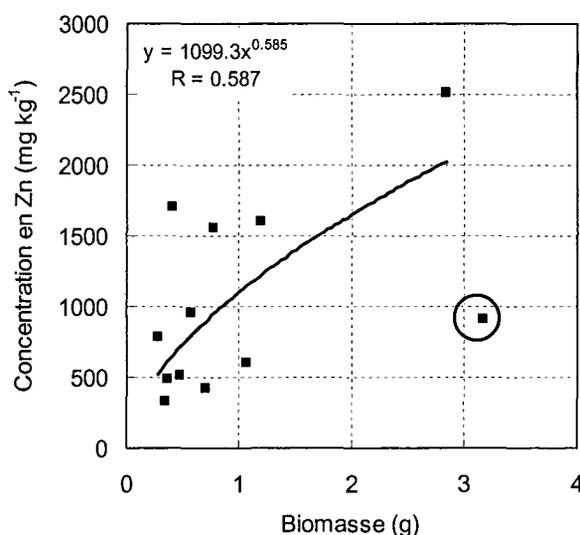


Figure 5.7 : Relation entre la biomasse (g) produite par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* et les concentrations du Zn (mg kg^{-1}) dans ses parties aériennes (le point encerclé ne participe pas à la régression)

Les quantités de métaux extraites par *T. caerulescens* en 20 semaines ont été calculées en rapportant les concentrations dans les plantes à la quantité de biomasse sèche produite (figure 5.8). Elles varient entre 0,01 et 0,04 mg par placette pour le Cd et entre 0,6 et 2,94 mg par placette pour le Zn sur les parcelles non amendées et entre 0,05 et 0,38 mg par placette pour le Cd et entre 4,2 et 23,7 mg par placette pour le Zn sur les parcelles amendées avec la dose B2. Les différences de comportement des quatre populations se distinguent clairement et il est alors possible de les classer selon l'ordre Tc-3 > Tc-1 > Tc-2 = Tc-4. Les quantités de Cd et de Zn extraites sur les parcelles amendées ou non mettent en évidence une absence d'interaction entre les deux métaux.

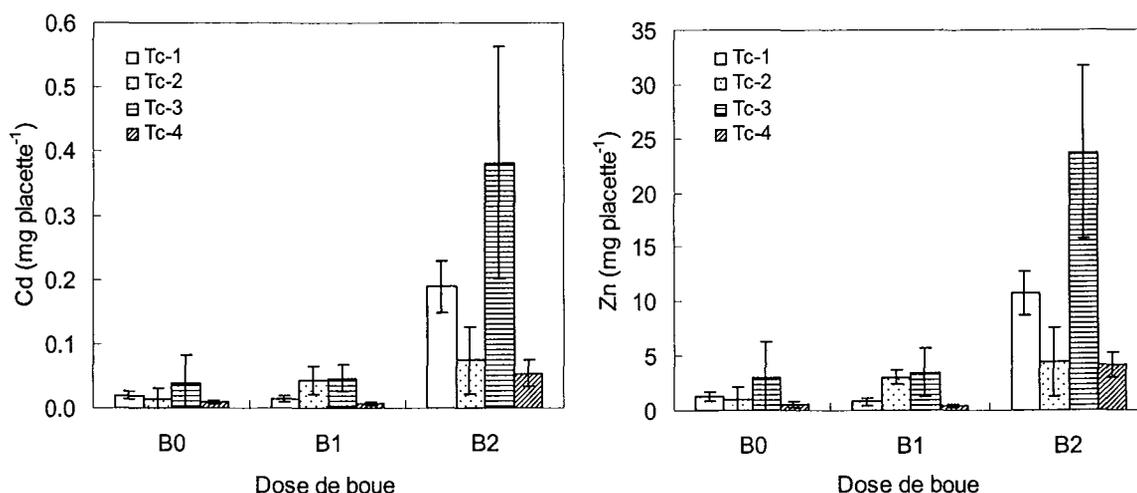


Figure 5.8 : Quantités de Cd et de Zn (mg par placette) extraites par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* après 20 semaines de culture sur la terre S4 en fonction de la dose de boue

Le prélèvement par *T. caerulescens* est de 0,9 à 6,2% du Cd total du sol ayant reçu la dose de boue la plus élevée (tableau 5.3). Ces valeurs sont proches de celles obtenues sur la terre S3 en conditions contrôlées. Lorsque l'on considère les quantités isotopiquement

échangeables du Cd, la part de métal prélevée atteint jusqu'à 12,7 à 25,7% du compartiment $E_{0-1\text{min}}$ pour Tc-1 et Tc-3 contre seulement 3,6 et 5% de ce même compartiment pour Tc-2 et Tc-4. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues sur la terre S3, ce qui s'explique par une biodisponibilité du Cd proportionnellement supérieure dans la terre S4 (88% du Cd total est échangeable en 3 mois).

Tableau 5.3 : Pourcentages du Cd total et des compartiments du Cd isotopiquement échangeable ($E_{0-1\text{min}}$ et $E_{3\text{mois}}$) prélevés par 4 populations de *Thlaspi caerulescens* après 20 semaines de culture sur la terre S4 amendée en boue urbaine compostée (B2)

Plante	Prélèvement du Cd par les plantes		
	% Cd total du sol	% $E_{0-1\text{min}}$	% $E_{3\text{mois}}$
Tc-1	3,1	12,7	3,7
Tc-2	1,2	5,1	1,5
Tc-3	6,2	25,7	7,6
Tc-4	0,9	3,6	1,1

2.3. Variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens* et biodisponibilité du Cd

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus lors des différentes cultures sur les terres S3 (chapitre 3, partie 2) et S4 nous permet de prendre en compte l'effet des conditions environnementales. Nous avons donc réalisé une analyse de variance de la concentration du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* à partir d'une classification à deux entrées (populations et milieux ; tableau 5.4) de façon à estimer la variance entre les populations, la variance due au milieu et la variance attribuable à l'interaction entre les milieux et les populations.

Tableau 5.4 : Paramètres d'entrée de l'analyse de variance

Paramètres	Niveaux	
Populations	4	Tc-1, Tc-2, Tc-3, Tc-4
Sols	4	S3 S4 : modalités B0, B1 et B2
Nombre de répétitions	4	

Les résultats nous montrent que 9% de la variance totale sont attribués aux seules populations tandis que 67% sont attribués au milieu. Ces résultats mettent encore une fois en évidence la prépondérance du milieu dans la variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. La variance due à l'interaction entre les milieux et les populations atteint 20%, soit deux fois plus que la variance des populations. La culture des 4 populations de *T. caerulescens* sur le sol agricole S4 nous permet de tester l'effet de l'augmentation de la biodisponibilité du Cd suite à l'apport de doses croissantes de boue urbaine sur les concentrations du Cd mesurées dans les tissus de la plante, en considérant toutes les conditions égales par ailleurs (figure 5.6). L'apport de boue à la dose B1 aboutit à une légère augmentation des concentrations du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens*, avec un effet de plus faible amplitude pour la population Tc-4. Un effet plus marqué est observé à partir de la dose B2, l'amplitude la plus élevée étant mesurée pour la population Tc-3. Une modification similaire de la biodisponibilité du Cd dans les sols n'aura donc pas le même effet sur les 4 populations. Ceci est également vérifié par l'évolution du classement des concentrations du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* en fonction de la biodisponibilité croissante du Cd dans les terres S3 et S4 (tableau 5.5).

Tableau 5.5 : Classement des concentrations du Cd dans les parties aériennes de quatre populations de *Thlaspi caerulescens* (Tc-1 à Tc-4) en fonction de la biodisponibilité du Cd mesurée dans les terres S3 et S4

Concentration croissante du Cd extractible dans les terres $\mu\text{g Cd kg}^{-1}$ terre (extraction H_2O)	Classement
S4 (B0) = 0,11	Tc-3 = Tc-1 = Tc-2 = Tc-4
S4 (B1) = 0,34	Tc-3 = Tc-2 = Tc-1 > Tc-4
S4 (B2) = 0,44	Tc-3 > Tc-1 = Tc-2 = Tc-4
S3 = 5,60	Tc-3 > Tc-2 > Tc-1 >> Tc-4

Sachant que la biodisponibilité du Cd est le principal facteur dans les sols pouvant influencer son extraction par *T. caerulescens*, nous avons représenté graphiquement l'évolution des concentrations du Cd dans les parties aériennes des 4 populations Tc-1 à Tc-4 (Cd_p en mg Cd kg^{-1} MS) en fonction des quantités de Cd extractibles à l'eau (C_{Cd} en mg Cd kg^{-1} sol sec) pour les différentes cultures (figure 5.9). Ce mode de représentation nous permet de mettre en évidence des réponses différentes vis-à-vis du Cd biodisponible des sols entre les 4 populations de *T. caerulescens*.

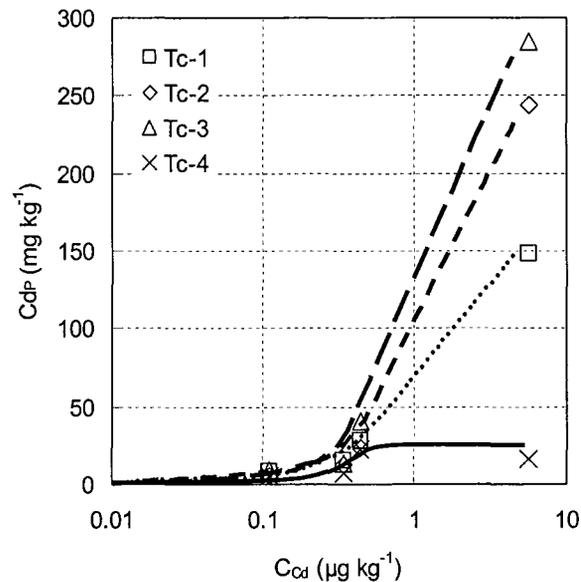


Figure 5.9: Concentration du Cd dans les parties aériennes (Cd_p) de 4 populations de *Thlaspi caerulescens* en fonction de la concentration du Cd du sol extractible à l'eau (C_{Cd})

2.4. Discussion

Dans les conditions de l'expérience de plein champ, les exportations de Cd et de Zn par *T. caerulescens* sont plus faibles que celles observées en conditions contrôlées, notamment avec une terre (S3) qui présente des concentrations en Cd et en Zn totales et biodisponibles plus élevées. Les différences entre les quatre populations étudiées sont aussi très faibles, et nivelées par une faible disponibilité des métaux. Toutefois, elle est très liée à la disponibilité des métaux. Nos résultats démontrent ainsi que c'est bien le milieu qui conditionne l'ampleur de l'hyperaccumulation.

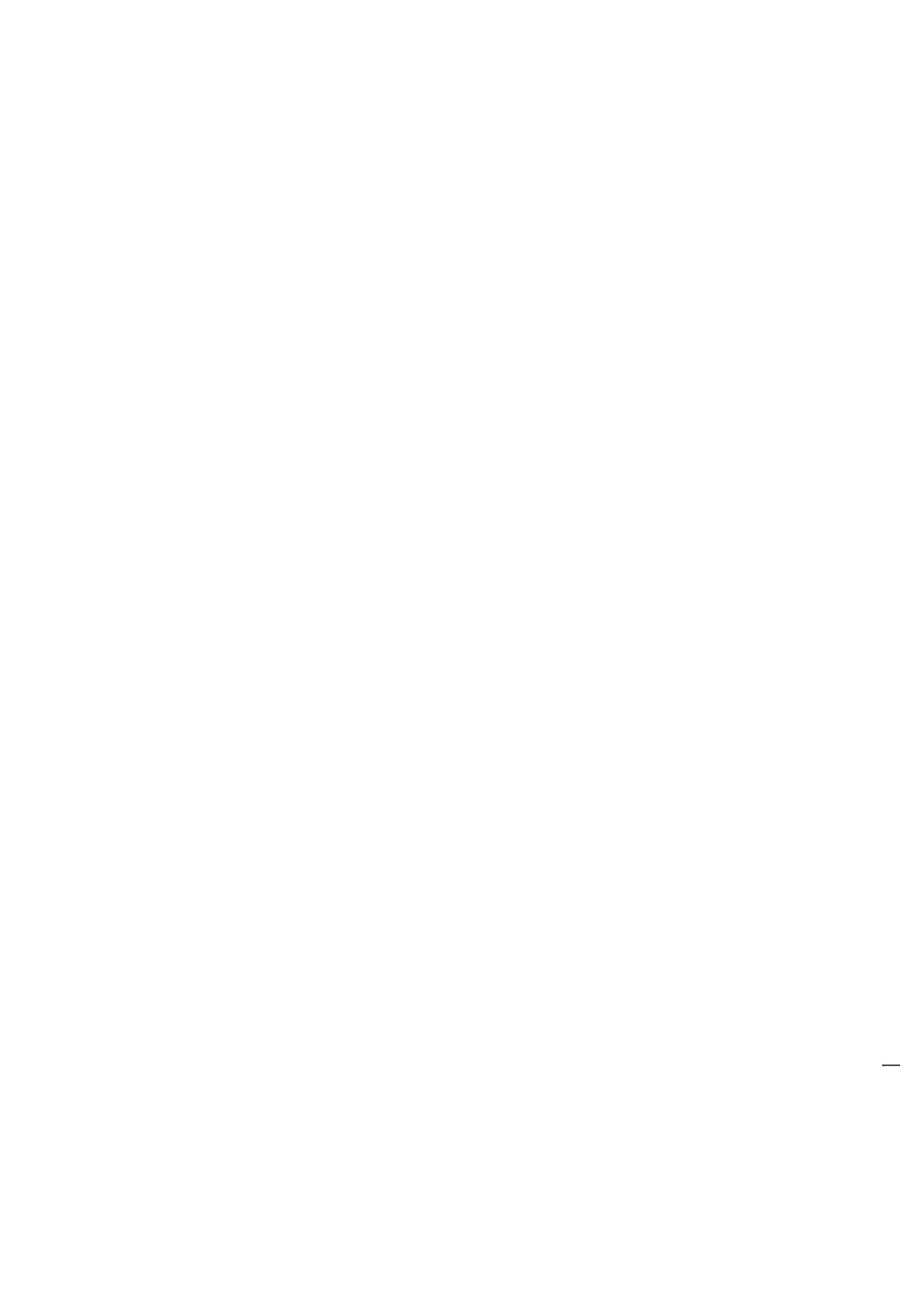
Nous avons également mis en évidence l'absence d'interaction entre le Zn et le Cd. Dans ces conditions de culture, le Zn n'interfère pas de façon significative sur l'absorption du Cd. Cela confirmerait la présence de deux transporteurs spécifiques indépendants.

La population Tc-4, hyperaccumulatrice de Ni, se démarque fortement des trois autres populations avec un effet de saturation de l'absorption du Cd dès les plus faibles concentrations. Ces deux groupes de populations se différencieraient par la présence ou non d'un transporteur spécifique au Cd. Entre les populations Tc-1 à Tc-3, les différences observées s'expliquent alors par des différences de flux d'absorption de l'ion Cd²⁺ par les racines. Il est possible que ces trois populations présentent des densités différentes du transporteur spécifique du Cd dans la membrane plasmique racinaire. La variabilité génétique entre ces populations proviendrait alors d'une différence dans l'expression du gène codant pour le transporteur du Cd. Nous pouvons donc classer les trois populations pour leur aptitude à hyperaccumuler le Cd dans l'ordre : Tc-3 > Tc-2 > Tc-1.

L'un des facteurs limitants majeur dans le procédé de phytoextraction serait la faible production de biomasse des plantes hyperaccumulatrices (Robinson *et al.*, 1998). La culture de *T. caerulescens* sur une terre agricole amendée ou non en boue urbaine compostée met en évidence l'effet positif de la fertilisation sur la production de biomasse. Toutefois, il est possible d'observer une relation entre la biomasse produite et les concentrations du Zn dans les plantes, indiquant un possible effet de la plus grande biodisponibilité du Zn avec les apports croissants en boue. Les différences de biomasse produite entre les quatre populations peuvent également être interprétées par une intensité de prédation plus forte vis-à-vis des plantes les moins chargées en métaux (Boyd et Martens, 1992). Lors de la culture des quatre populations de *T. caerulescens* en conditions contrôlées sur la terre S3, nous avons observé une augmentation des quantités de Cd extraites avec l'accroissement de la biomasse. La même observation a été faite avec le Zn lors de la culture des mêmes populations sur la terre S4 en conditions climatiques réelles. La biomasse des plantes apparaît également comme un facteur prépondérant dans l'hyperaccumulation des métaux par *T. caerulescens*.

3. Conclusion

La culture de *T. caerulescens* en conditions climatiques réelles sur une terre présentant des teneurs faibles en métaux biodisponibles confirme que la biodisponibilité gouverne l'hyperaccumulation chez cette espèce. Il apparaît aussi clairement que des populations originaires des sites miniers ou de fonderie de Zn n'ont pas développé les mêmes mécanismes d'absorption du Cd que les populations originaires des sites de serpentine. Ces deux groupes de populations se différencieraient alors par la présence ou non d'un transporteur spécifique au Cd. De plus, au sein de cet ensemble de populations, des différences génétiques existent. Le deuxième point mis en évidence concerne l'effet majeur de la production de biomasse sur l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. En conséquence, la biodisponibilité du Cd, et les paramètres des sols qui lui sont liés, ainsi que la croissance des plantes sont les principaux facteurs expliquant l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. Le chapitre suivant est consacré à l'élaboration d'un modèle simplifié de simulation de l'extraction du Cd des sols par *T. caerulescens*.



Chapitre 6

Modélisation simplifiée de la phytoextraction du Cd par *Thlaspi caerulescens*

L'évaluation de la faisabilité de la phytoextraction sur des terres contaminées en Cd nécessite, jusqu'à présent, la mise en œuvre de cultures préalables longues et coûteuses. L'utilisation de modèles simulant la phytoextraction permettrait alors d'évaluer la faisabilité de la technique pour une large gamme de sols à partir d'analyses élémentaires. Un premier système d'aide à la décision permettant d'évaluer la faisabilité biogéochimique et économique de la phytoextraction du Ni a été élaboré par Robinson *et al* (2003).

Notre objectif n'est pas de développer un modèle complexe qui prendrait en compte l'ensemble des mécanismes de la phytoextraction. Un tel travail demanderait notamment d'approfondir nos connaissances sur les paramètres de l'absorption du Cd par les différentes populations de *T. caerulescens* étudiées. Dès lors, nous nous sommes intéressés à mettre en œuvre un modèle simplifié permettant de travailler avec un nombre restreint de paramètres d'entrée choisis.

Le modèle est destiné à prévoir l'extraction du Cd par *T. caerulescens*. Il prend en compte deux variables essentielles : la concentration du Cd dans les parties aériennes et la production de biomasse foliaire. Pour estimer la concentration en Cd dans les feuilles des plantes, nous nous sommes basés sur la relation empirique que nous avons obtenue à partir de l'étude de *T. caerulescens* dans son milieu naturel. Le paramètre clé étant la biodisponibilité du métal dans les terres. L'analyse de la croissance des plantes a été réalisée lors des cultures successives de *T. caerulescens* en conditions contrôlées sur la terre S3. Nous en avons déduit une courbe de croissance fonction du temps et une biomasse optimale. Le produit des deux variables, concentration du Cd et biomasse, nous permet de calculer une quantité théorique de Cd extraite par une culture de *T. caerulescens*.

1. Matériels et méthodes

1.1. Concentration du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens*

Dans le chapitre 3, nous avons étudié les relations entre les paramètres du sol et les paramètres des plantes avec 23 couples sol – *T. caerulescens* prélevés dans leur milieu naturel (sites miniers et de fonderie de Zn). Une analyse multivariée nous a alors permis de mettre en évidence une relation forte entre la concentration du Cd dans les parties aériennes des plantes (Cd_p), d'une part, et le pH, la capacité d'échange cationique (CEC) et la concentration du Cd extractible par $CaCl_2$ 0,01 M (Cd_{EX}), d'autre part, telle que :

$$Cd_p = 0,837 + 0,301 * pH + 0,246 * \log(CEC) + 0,373 * \log(Cd_{EX}) \quad r = 0,788$$

Cette fonction montre que la concentration du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* est essentiellement dépendante de paramètres liés au sol. Ceux-ci sont rapidement et facilement mesurables, et permettent d'estimer une concentration du Cd théorique dans les parties aériennes de *T. caerulescens*.

Nous avons également démontré dans les chapitres 3 et 5 que les quatre populations de *T. caerulescens* étudiées présentaient des variations génétiques, la population Tc-3 étant plus efficace à extraire le Cd que les autres populations. Cependant, la disponibilité du Cd est le premier facteur explicatif de l'extraction, ce qui nous permet, en première approximation, de faire abstraction de la variabilité génétique.

1.2. Croissance des parties aériennes de *T. caerulescens*

Le deuxième point du modèle concerne la croissance et le développement des rosettes de l'hyperaccumulateur. L'estimation de la biomasse produite par bac a été réalisée par l'étude non destructive de l'occupation de la surface utilisant des clichés photographiques pris régulièrement et analysés à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (figure 6.1). A partir des données numériques fournies par le traitement des photographies, nous avons pu établir la courbe de croissance ainsi que l'évolution du taux de croissance de *T. caerulescens* au cours de sa culture durant 15 semaines sur la terre S3. La biomasse sèche totale a été mesurée la 15^{ème} semaine et attribuée à la surface totale occupée par les plantes à la même

date. Les biomasses intermédiaires ont alors été calculées en conservant le même rapport surface/biomasse.

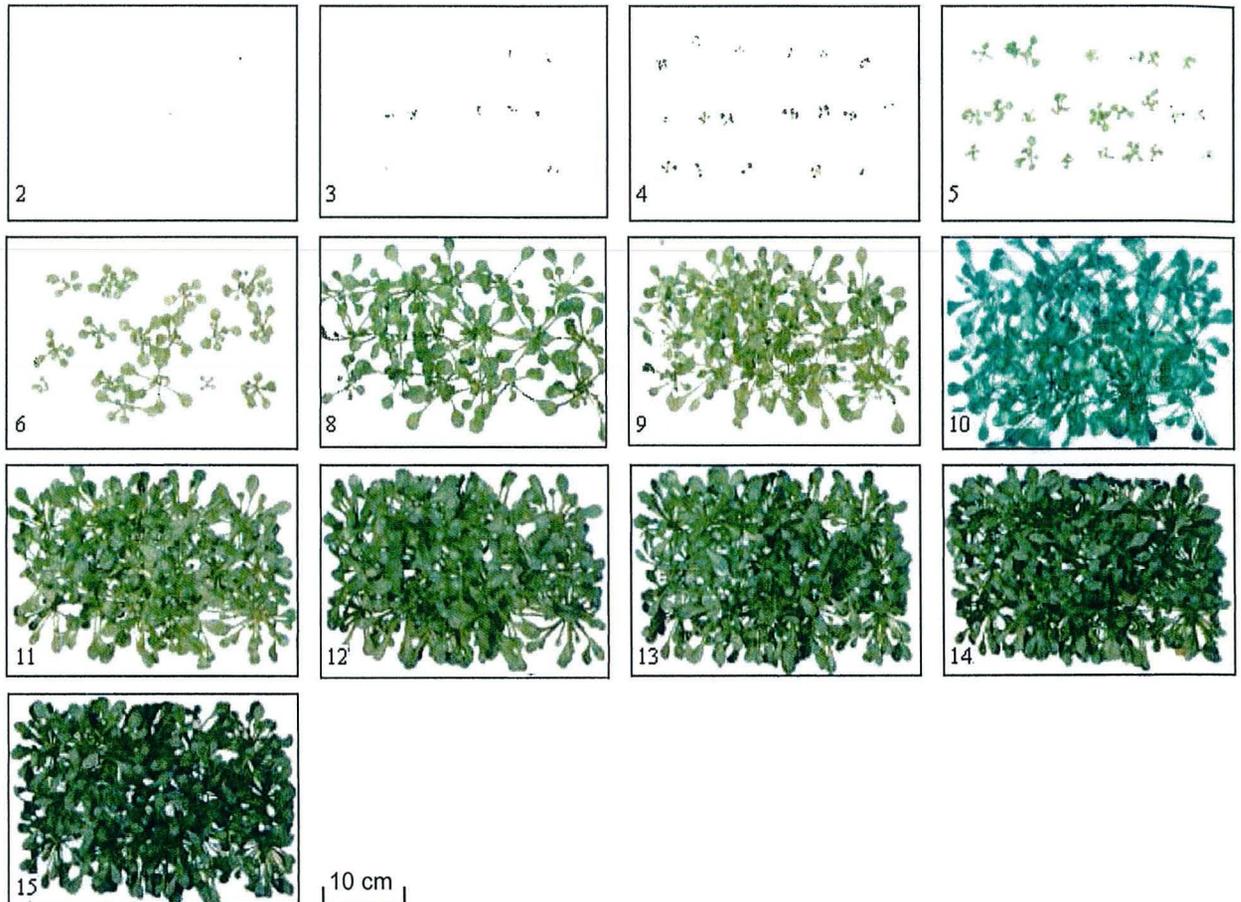


Figure 6.1 : Photographies d'un bac lysimétrique décrivant la cinétique de croissance de *Thlaspi caerulescens* durant 15 semaines sur la terre S3 (vue du dessus)

2. Résultats

2.1. Courbe de croissance de *T. caerulescens*

La courbe de croissance de *T. caerulescens* sur la terre S3 durant 15 semaines suit une fonction sigmoïde qui atteint un plateau en semaine 13 (figure 6.2a). Les biomasses ayant été estimées à partir de la surface occupée par les plantes, il nous a été impossible de prendre en compte les effets de recouvrement. Le plateau apparent ne reflète donc pas obligatoirement la réalité. Le recouvrement des individus en fin de croissance nous a très certainement conduit à sous-estimer la surface occupée par les plantes par rapport à la biomasse produite qui a été mesurée la 15^{ème} semaine. Cela signifie que nous aurions surestimé la biomasse produite durant la culture. Cependant, il a été démontré que la production de biomasse par *T. caerulescens* ralentit véritablement, les feuilles les plus âgées (sénescences) étant remplacées par de jeunes feuilles (Perronnet, 2000). Dans la suite de l'exposé, nous allons donc considérer que la croissance de *T. caerulescens* atteint effectivement un plateau.

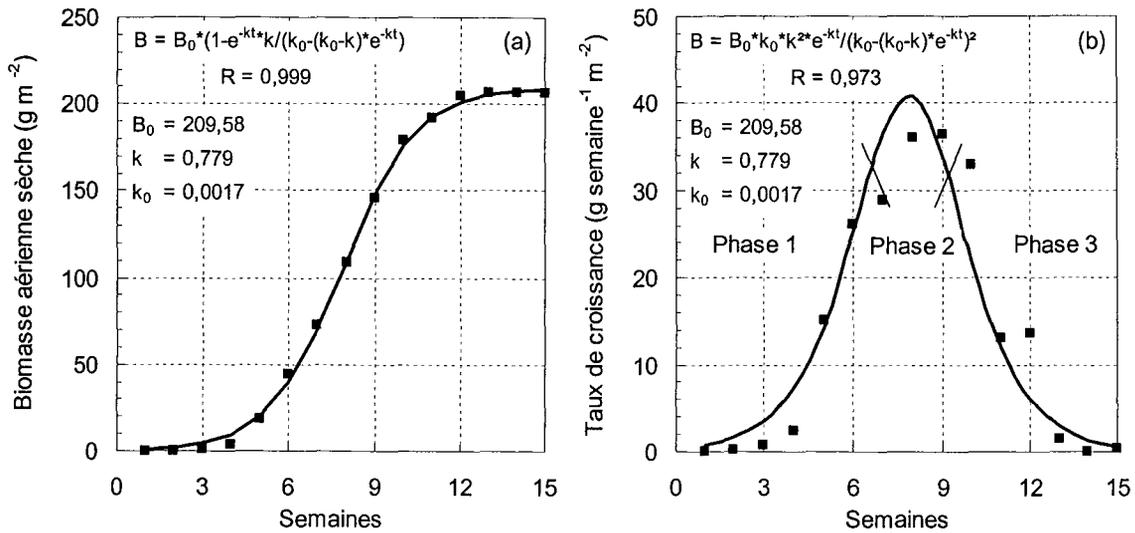


Figure 6.2 : Production de biomasse aérienne sèche (g m⁻², (a)) et taux de croissance (g semaine⁻¹ m⁻², (b)) de *Thlaspi caerulescens* durant 15 semaines de cultures sur la terre S3 (densité de semis = 200 plantes m⁻²)

La courbe de croissance de *T. caerulescens* sur la terre S3 peut être décrite selon une fonction sigmoïde telle que (figure 6.2a) :

$$B = B_0 (1 - e^{-kt} \times k / (k_0 - (k_0 - k) e^{-kt}))$$

- avec
- B = production de biomasse au temps t (g)
 - B₀ = production de biomasse maximale (g)
 - k et k₀ = constantes de vitesse de croissance (semaines⁻¹)
 - t = temps (semaines)

Nous pouvons ainsi décomposer la croissance de *T. caerulescens* en fonction du temps (exprimé en semaine) en trois phases (figure 6.2b) :

- une phase 1 durant laquelle la vitesse de croissance augmente. Cette phase s'étend entre la 1^{ère} semaine à partir de la date du semis jusqu'à la 7^{ème} semaine,
- une phase 2, de la 7^{ème} à la 9^{ème} semaine, durant laquelle le taux de croissance tend à rester constant,
- une phase 3, à partir de la 9^{ème} semaine, durant laquelle la vitesse de croissance diminue.

La connaissance de la croissance de *T. caerulescens* va avoir des implications sur les aspects pratiques de la mise en œuvre de la phytoextraction et sur les itinéraires techniques.

Ainsi, la vitesse de croissance augmente à partir de la 5^{ème} semaine après la date du semis. C'est donc à partir de cette date que les besoins en éléments nutritifs seront les plus élevés. Afin d'obtenir un effet optimal de la fertilisation, il est donc préférable de fractionner les apports à 5 et 8 semaines de culture.

Durant la phase 2, le taux de croissance est maximal avant de rapidement décliner. Si l'on considère que l'optimum de croissance de *T. caerulescens* correspond également à une concentration maximale du Cd dans ses parties aériennes (Schwartz, 1997), alors le rendement optimal d'extraction du Cd serait atteint durant cette phase. Cela signifie que maintenir une culture de *T. caerulescens* en place au-delà de cette phase ne permettra pas d'augmenter le rendement d'extraction. En outre, une culture de courte durée permettrait d'envisager deux cultures successives entre le début du printemps et la fin de l'été. Ces résultats ont également des implications pour une éventuelle phytoextraction assistée par

apport d'agents chélatants. Afin d'éviter tout risque de lessivage des métaux, les apports de chélatants devraient être réalisés au moment où la plante est à son optimum d'extraction.

2.2. Application du modèle simplifié : comparaison avec les résultats expérimentaux

Afin de tester notre modèle, nous avons utilisé les résultats obtenus sur plusieurs expérimentations à différentes échelles allant du pot à la micro-parcelle de terrain (tableau 6.1). Le calcul des quantités de Cd extraites suite à une culture de *T. caerulescens* est basé sur l'hypothèse que la concentration du Cd dans les parties aériennes de la plante (Cd_P) reste constante au cours de la culture, quelle que soit la concentration du métal biodisponible. En effet, Perronnet (2000) a mis en évidence un maintien de Cd_P lors de cultures de *T. caerulescens* dans deux terres contaminées à hauteur de 10 et 20 mg Cd total kg^{-1} sol sec. Lorsque les cultures dépassaient 12 semaines, nous avons considéré la biomasse égale à l'optimum de croissance, soit d'après nos résultats 200 $g m^{-2}$. Dans le cas contraire, nous avons utilisé la fonction décrivant la croissance de *T. caerulescens* pour calculer la production de biomasse.

Nous avons donc appliqué notre modèle simplifié aux différentes cultures que nous avons réalisé avec différents dispositifs allant de la culture en pots de très petite dimension (S3) à la culture en conditions climatiques réelles (S4) en passant par des dispositifs de taille intermédiaire (S1, S3 et S5). Lors de la culture de *T. caerulescens* en conditions contrôlées sur la terre S3 avec 20 g de terre (chapitre 3, partie II) nous avons utilisé quatre populations différentes. L'utilisation de notre modèle nous permet de calculer de façon très juste la quantité moyenne extraite par la culture indépendamment des variations génétiques.

Tableau 6.1 : Comparaison des valeurs de concentration du Cd ($mg kg^{-1}$ MS) dans les parties aériennes de *Thlaspi caerulescens* et des quantités de Cd extraites ($mg kg^{-1}$ sol sec) mesurées pour les terres S1, S3, S4 et S5 et calculées à partir d'un modèle simplifié.

Paramètres	S1	S3	S4	S5		
<u>Conditions de culture</u>						
Surface (m^2)	0,0078	0,0019	0,09	0,09	0,04	0,0078
Masse de terre (kg)	0,2	0,02	15	15	14	0,2
Durée de la culture (semaines)	20	4	15	15	20	20
<u>Paramètres d'entrée</u>						
CEC ($cmol kg^{-1}$)	11,9	6,9	6,9	6,9	11,0	11,1
pH	7,9	7,0	7,0	7,0	7,4	6,4
Cd_{Ex} ($mg l^{-1}$)	$7,1 \cdot 10^{-2}$	$8,1 \cdot 10^{-3}$	$8,1 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$
<u>Valeurs mesurées</u>						
Cd_P ($mg kg^{-1}$ MS)	1251	225 ^a (148 - 285)	157	130	31 ^a (24 - 41)	6
Biomasse ($g m^{-2}$)	189	9,14	262	224	155	117
Cd extrait ($mg kg^{-1}$ sol sec)	8,6	0,18 ^a	0,24	0,18	0,02 ^a	0,02
<u>Valeurs calculées par le modèle</u>						
^b Cd_P calculé ($mg kg^{-1}$)	1126	234	234	220	50	42
^c Biomasse ($g m^{-2}$)	200	7,33	200	200	200	200
Cd extrait ($mg kg^{-1}$ sol sec)	8,8	0,16	0,28	0,26	0,04	0,33

^a valeur moyenne sur trois populations de *Thlaspi caerulescens* (valeur min – valeur max)

^b $\log Cd_P = 0,301 * pH + 0,246 * \log CEC + 0,373 * \log Cd_{Ex} + 0,837$

^c au-delà de 12 semaines de culture, la biomasse est égale à l'optimum de croissance soit 200 $g m^{-2}$. Pour des temps de culture inférieurs, elle est calculée à partir de l'équation décrivant la croissance de *T. caerulescens*

La culture sur les terres S1 et S5 concerne un dispositif en pots avec 200 g de sol. Cette expérience n'est pas décrite dans ce manuscrit mais elle nous permet ici de comparer une terre fortement contaminée en métaux (S1) à une terre non contaminée (S5). Dans les deux cas, le modèle surestime la biomasse produite durant la culture, surtout dans le cas de la terre S5. La concentration en Cd dans les feuilles de *T. caerulescens* calculée par le modèle est très similaire à celle mesurée dans le cas de la terre S1. Par contre, elle est surestimée dans le cas de la terre S5, indiquant par là la limite du modèle lorsque la concentration du Cd biodisponible dans la terre est très faible.

Nous avons également simulé les deux premières cultures réalisées sur la terre S3 avec le dispositif pilote en bacs lysimétriques. Cette fois-ci la biomasse est sous-estimée lors de la première culture (262 g contre 200 g) tandis que la concentration en Cd dans les feuilles est surestimée (234 mg Cd kg⁻¹ MS contre 157 mg Cd kg⁻¹ MS). Au final, la quantité de Cd extraite reste tout de même très proche de celle mesurée. Lors de la deuxième culture, la concentration en Cd dans les feuilles est de nouveau largement surestimée (224 mg Cd kg⁻¹ MS contre 130 mg Cd kg⁻¹ MS) de sorte que la quantité de Cd extraite est également surestimée.

Enfin, la culture de *T. caerulescens* sur la terre S4 nous permet de prendre en compte l'effet des conditions climatiques réelles sur la modélisation de l'extraction des métaux. Notre modèle surestime alors la production de biomasse par les plantes ainsi que la concentration en Cd dans les feuilles. Toutefois, la quantité moyenne de Cd extraite par *T. caerulescens* (populations Tc-1 à Tc-3) calculée par le modèle (0,04) reste très proche de la valeur mesurée (0,02).

2.3. Analyse de sensibilité du modèle

L'équation empirique que nous avons développée pour estimer la concentration du Cd dans les feuilles de *T. caerulescens* est contrôlée principalement par le pH et la concentration du Cd extractible au CaCl₂ (Cd_{EX}). De ce fait, nous avons réalisé une analyse de sensibilité du modèle à partir des paramètres de la terre S3 (pH = 7 ; CEC = 6,9 cmol kg⁻¹ et Cd_{EX} = 0,0081 mg kg⁻¹) en faisant varier le pH de plus ou moins une unité et en multipliant et divisant Cd_{EX} par un facteur 1,5 à 3,5 (figure 6.3).

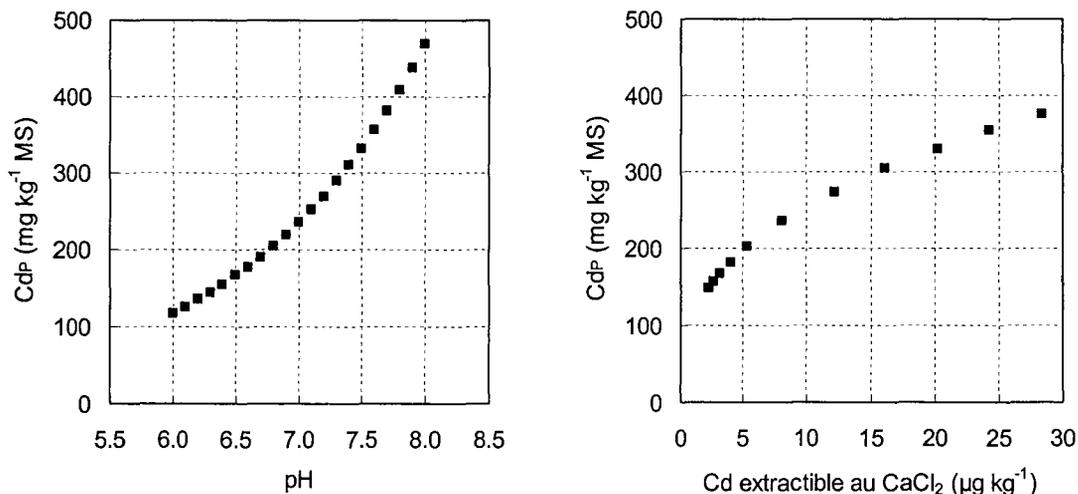


Figure 6.3 : Effet de la variation du pH du sol et de la concentration du Cd extractible au CaCl₂ sur l'évolution de la concentration du Cd dans les feuilles de *Thlaspi caerulescens* (Cd_P) calculée avec le modèle

Les résultats montrent que Cd_P est particulièrement sensible aux variations de pH du sol avec une variation d'un facteur 5 entre pH 6 et pH 8. Cependant, les variations de pH du sol ne varient pas sous l'effet de la culture (chapitre 3, partie II). Il serait plus intéressant de pouvoir mesurer l'effet de la variation du pH de la solution du sol sur la concentration en Cd

dans les feuilles de *T. caerulescens*. La variation du Cd extractible au CaCl_2 (Cd_{EX}) a également une forte influence sur la concentration du Cd dans les feuilles de *T. caerulescens*. Si l'on considère la concentration du Cd réellement mesurée dans les parties aériennes de *T. caerulescens* cultivée sur la terre S3 ($157 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$) cela correspondrait à une diminution de Cd_{EX} durant la culture d'un facteur 3 (figure 6.3). Il est vraisemblable que la diminution de la biodisponibilité du Cd durant la culture de *T. caerulescens* ne soit pas le seul facteur expliquant la valeur de Cd_p mesurée inférieure à la valeur calculée.

3. Discussion

Le calcul des quantités de Cd extraites suite à une culture de *T. caerulescens* a été basé sur l'hypothèse que la concentration du Cd dans les parties aériennes de la plante restait constante au cours de la culture, quelle que soit la concentration du métal biodisponible. En fait, les simulations réalisées avec la terre S3 dans différentes conditions de culture montrent que ce phénomène n'est pas toujours vérifié. En effet, nous avons mené tout d'abord une culture en pots avec 20 g de terre puis deux cultures successives en lysimètres avec 15 kg de terre. Dans le premier cas, la valeur de Cd_p mesurée atteint $225 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ après 4 semaines de culture. Puis, la valeur de Cd_p diminue lors des cultures à plus long terme. Cela correspond également avec la diminution du Cd soluble que nous avons observée durant les cultures. Pour les sols dont le pouvoir tampon ne permet pas de réapprovisionner instantanément la solution en Cd, la valeur de Cd_p va diminuer au cours du temps. Dans notre modèle, nous avons considéré Cd_p constante durant toute la culture. De ce fait, si la prédiction s'avère correcte pour un temps de culture court, elle surestime les quantités de Cd extraites pour des temps plus longs. Afin de mieux ajuster le modèle, il faudrait donc tenir compte de la diminution de Cd_p au cours du temps dans les sols faiblement tamponnés vis-à-vis des ions Cd^{2+} .

Une deuxième source d'erreur dans le modèle concerne la simulation de la croissance de *T. caerulescens*. En effet, nous avons établi une courbe moyenne de croissance correspondant à des conditions climatiques contrôlées (humidité du sol, température, photopériode) pouvant être considérées comme idéales, associées à une fertilisation raisonnée des plantes. Il est évident qu'en conditions climatiques réelles, il devient vite très difficile d'atteindre cet optimum. C'est ce que l'on observe lors de la culture sur la terre S4. L'établissement d'une courbe de croissance en conditions climatiques réelles permettrait de mieux prendre en compte les particularités du terrain. En outre, il est fort probable que la durée nécessaire pour atteindre l'optimum de croissance ne sera pas la même.

Durant la culture de *T. caerulescens* le pH de la solution du sol augmente et la disponibilité du Cd diminue. Nous avons également mis en évidence que le compartiment biodisponible du Cd est renouvelé, le pouvoir tampon du sol étant le principal facteur contrôlant ce renouvellement. Il faudra donc envisager des équations prenant en compte ces variations afin d'améliorer la sensibilité du modèle.

4. Conclusion

Notre modèle simplifié permet de prédire une quantité moyenne de Cd extraite par une culture de *T. caerulescens* du même ordre de grandeur que les valeurs mesurées quelles que soient les conditions de biodisponibilité des métaux ou les conditions de culture (conditions climatiques réelles ou contrôlées). Les principaux écarts sont rencontrés pour les terres présentant des concentrations du Cd biodisponible très faibles. En effet, les terres S4 et S5 ne présentent pas de contamination avérée en Cd (respectivement $0,2$ et $0,1 \text{ mg Cd total kg}^{-1}$), ce qui explique la plus grande difficulté à prédire le rendement d'extraction par *T. caerulescens*. De manière générale, ce modèle reste à valider dans des situations

contrastées par rapport à celles étudiées. La prise en compte de la variation de la biodisponibilité du Cd durant la culture devrait permettre d'améliorer la sensibilité du modèle.

Conclusion générale

Les plantes hyperaccumulatrices constituent à la fois un matériel remarquable d'investigation des propriétés de disponibilité des métaux des sols et un outil prometteur pour le traitement des sols pollués. Le travail que nous avons entrepris s'inscrit dans ce cadre et était destiné à contribuer à une meilleure description de la fourniture et des flux de métaux du sol aux plantes hyperaccumulatrices. En particulier, il s'agissait d'étudier les interactions entre la biodisponibilité du Cd dans les sols et son hyperaccumulation par *T. caerulescens*, plante hyperaccumulatrice modèle offrant un potentiel exceptionnel à extraire les métaux des sols. Nous nous sommes attachés aux questions suivantes, qui ont fait appel à des expérimentations en milieu naturel, en agrosystème et en conditions contrôlées de la chambre de culture et du laboratoire :

- Quel est le facteur prédominant expliquant la variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens* (paramètres du sol ou variations génétiques) ?
- Quel est l'impact des plantes hyperaccumulatrices sur les flux des éléments en traces dans les sols ?
- Quels sont les mécanismes de fourniture des métaux par la phase solide du sol à *T. caerulescens* ?
- La phytoextraction permet-elle d'abaisser durablement les compartiments biodisponibles des métaux ?

Ainsi, les résultats obtenus concernent *i)* les relations entre la variabilité de l'hyperaccumulation chez des populations contrastées de *T. caerulescens* et la biodisponibilité du Cd à partir d'études réalisées tant sur leur site d'origine qu'en conditions contrôlées sur une même terre *ii)* le renouvellement du compartiment biodisponible du Cd sous l'effet de cultures de *T. caerulescens* et *iii)* l'établissement d'un modèle prédictif du rendement de phytoextraction par *T. caerulescens*.

1. Variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens* et biodisponibilité du Cd

L'analyse de la variabilité de l'hyperaccumulation du Cd chez plusieurs populations de *T. caerulescens* dans leur milieu naturel (friches industrielles de mines de Zn/Pb et de fonderie de Zn ; site de serpentine à concentration élevée du Ni géochimique) montre que la concentration du Cd biodisponible est le premier facteur gouvernant l'absorption du métal par les plantes. Ainsi, il est possible de prédire la concentration du Cd dans les parties aériennes de *T. caerulescens* à partir de paramètres du sol facilement et rapidement mesurables tels que le Cd extractible au CaCl₂, le pH du sol et la capacité d'échange cationique. Cela signifie-t-il qu'il n'existe pas de variabilité génétique au sein des populations étudiées ?

Afin de déterminer la part des facteurs de l'environnement et des facteurs de la génétique dans la variabilité de l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*, nous avons cultivé des individus de 4 populations distinctes en conditions contrôlées et en conditions climatiques réelles. Nous avons ainsi pu établir que les 4 populations étudiées présentent des différences génétiques tant au niveau de l'aptitude des plantes à prélever le Cd qu'au niveau de la production de biomasse. Toutefois, la biodisponibilité du Cd reste le principal facteur gouvernant l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*. Nos résultats démontrent que les populations originaires de sites miniers de Zn et de fonderie de Zn (hyperaccumulatrices de Cd et de Zn) se distinguent très fortement de celle originaire d'un site de serpentine à teneur élevée en Ni (hyperaccumulatrice de Ni) quant à leur aptitude à hyperaccumuler le Cd. En effet, cette dernière population présente rapidement un phénomène de saturation de l'absorption du Cd avec l'augmentation de sa disponibilité dans les terres. Les populations hyperaccumulatrices de Cd et de Zn et celles hyperaccumulatrices de Ni se distingueraient alors par la présence ou non d'un transporteur spécifique du Cd dans la membrane plasmique racinaire des plantes. Parmi les populations hyperaccumulatrices de Cd, deux

groupes se distingueraient également. Dans le premier groupe, il existerait une interaction entre l'absorption du Zn et celle du Cd tandis que dans le deuxième groupe l'absorption du Cd ne serait pas contrôlée par la concentration du Zn dans le milieu ce qui impliquerait la présence de mécanismes particuliers d'absorption du Cd. S'agirait-il d'un transporteur spécifique particulier ou d'une expression différente du même transporteur ? Au sein du premier groupe, nos résultats montrent que les différences d'hyperaccumulation mesurées entre les populations s'expliqueraient, quant à elles, par des différences de densité du transporteur de Cd.

L'analyse de l'hyperaccumulation du Zn chez différentes populations de *T. caerulescens* en fonction des propriétés des sols ne nous a pas permis d'identifier un paramètre prépondérant expliquant la forte variabilité observée. Le Zn n'étant pas un facteur limitant dans les terres étudiées, nous pouvons considérer que, dans ces conditions, une grande part de la variabilité totale mesurée par la concentration du Zn dans les parties aériennes de *T. caerulescens*, peut être attribuée à la variabilité génétique entre les populations. Dans ces conditions, la population qui présente une concentration du Zn dans ses parties aériennes supérieure à 32 000 mg kg⁻¹ MS, pourrait présenter une concentration élevée en transporteurs spécifiques dans la membrane plasmique des racines, associée à un transport vers le xylème particulièrement efficace. Nos résultats montrent également que les concentrations du Zn et du Cd dans les racines de *T. caerulescens* évoluent de façon linéaire ce qui indique l'absence d'un effet antagoniste entre les deux métaux. Cela met en évidence la présence de deux transporteurs spécifiques au Cd et au Zn et indépendants l'un de l'autre. Chez certaines populations, la concentration du Cd dans les feuilles est indépendante de la concentration du Zn alors que la tendance générale montre une relation linéaire. Les deux groupes de populations se distinguent-ils alors par des mécanismes distincts d'absorption et de transport du Cd ?

Si la biodisponibilité des métaux est le premier facteur gouvernant l'hyperaccumulation chez *T. caerulescens*, des différences génétiques apparaissent entre les populations hyperaccumulatrices de Cd. Certaines populations présenteraient des mécanismes particuliers, d'absorption du Cd et de son transfert vers le xylème, indépendants de l'absorption du Zn. Il faudrait alors déterminer si ces différences de comportement entre les populations sont dues à la présence de transporteurs différents ou si d'autres mécanismes peuvent intervenir.

2. Renouvellement du compartiment biodisponible des sols

Durant la culture de *T. caerulescens*, la plante agit en premier lieu sur le compartiment soluble des métaux du sol. Durant la croissance des plantes, nous avons mesuré une diminution de la concentration du Cd soluble tandis que la concentration du Zn soluble était maintenue constante. Le flux d'absorption des métaux par les plantes est gouverné par les quantités de métaux libres (Cd²⁺ et Zn²⁺) disponibles à la surface des racines. Durant la phase active d'absorption des métaux par les plantes, la phase solide du sol réapprovisionne la solution en ions libres à partir du compartiment des métaux les plus échangeables. Selon la capacité tampon du sol, la concentration des ions libres dans la rhizosphère n'est pas maintenue constante ce qui a pour conséquence une diminution du flux d'absorption. C'est ce que nous avons observé pour le Cd. Durant la culture de *T. caerulescens* le pH de la solution du sol augmente fortement et participe ainsi à la diminution de la disponibilité du Cd. Dès lors, quel est le mécanisme intervenant dans l'augmentation du pH ? Nos résultats mettent en évidence l'existence d'une corrélation forte entre l'augmentation du pH et celle de la concentration du carbone organique soluble (COS), indiquant un possible rôle de ce COS dans la dissolution des minéraux. Ces composés organiques interviendraient également en diminuant l'activité spécifique du Cd dans la solution du sol par leurs propriétés à former des complexes organo-métalliques. Il serait nécessaire de connaître l'origine de ces composés

(exsudats racinaires ou matière organique du sol ?) et leur capacité réelle à s'associer au Cd. Si ces composés proviennent des racines des plantes, quel serait alors leur rôle ?

Outre le compartiment soluble, *T. caerulescens* agit également sur le compartiment biodisponible des métaux. Nos résultats montrent que la plante prélève majoritairement le Cd dans ce compartiment quelle que soit la population étudiée. Toutefois, il semblerait que les quatre populations étudiées accèdent aussi à une petite fraction du compartiment du Cd du sol non labile. Certaines populations présenteraient une aptitude plus forte à accéder au Cd du sol non labile, avec certains individus particulièrement efficaces.

Après la culture de *T. caerulescens*, le compartiment biodisponible du Cd peut, dans certains cas, être totalement réapprovisionné à partir des compartiments les moins échangeables. Les racines de l'hyperaccumulateur, laissées en place, contribuent également à réapprovisionner le compartiment biodisponible des métaux lors de leur décomposition. Au plus fort de la croissance des plantes, le prélèvement par les racines surpasse les apports par la matrice solide du sol de sorte que le compartiment soluble est fortement réduit. A l'arrêt de la culture, on observe un réajustement. Le compartiment soluble du Cd est très rapidement réapprovisionné à partir du compartiment biodisponible du Cd qui lui-même est réapprovisionné à partir des compartiments les moins échangeables. Toutefois, les échanges semblent se faire plus lentement. Lors de cultures successives, ce cycle se répète sans que nous ayons pu observer une diminution durable du compartiment biodisponible. La taille du compartiment biodisponible du Cd évoluerait donc selon un phénomène ondulatoire. Dans les terres étudiées, le pouvoir tampon était suffisant pour qu'aucune réduction importante de la biodisponibilité du Cd ne soit observée à moyen terme. Cela ne signifie pas pour autant que cette réduction n'existe pas. Il est en effet possible que sur de longues périodes de cultures (par exemple dix ans) le compartiment biodisponible du Cd soit significativement et durablement réduit, à l'instar de ce qui a été largement démontré dans le cas des essais agronomiques de longue durée sur la fertilité P et K des sols sans fertilisation.

3. Prédiction du rendement de phytoextraction

Nous avons démontré qu'il était possible de prédire l'hyperaccumulation du Cd à partir d'un modèle simplifié prenant en compte, d'une part, la biodisponibilité du Cd et les paramètres du sol qui lui sont liés (CEC et pH) et, d'autre part, la production de biomasse par *T. caerulescens*. Si ce modèle reste en bonne adéquation avec les résultats obtenus lors des différentes cultures, il mérite néanmoins quelques améliorations. Ainsi, il faudrait pouvoir tenir compte des variations génétiques entre les populations tant au niveau de leur capacité à accumuler le Cd qu'au niveau de la production de biomasse. Il serait également nécessaire de tenir compte de la réduction de la biodisponibilité du Cd durant la croissance de *T. caerulescens* en intégrant des équations décrivant les variations de pH de la solution ainsi que le renouvellement de la fraction biodisponible du Cd.

Si la biodisponibilité du Cd est un facteur déterminant dans le rendement de la phytoextraction des métaux par *T. caerulescens*, l'installation du système racinaire l'est tout autant. En effet, nous avons observé une réduction de la concentration du Zn dans les parties aériennes des plantes avec les cultures successives alors que le sol permettait de maintenir une concentration du Zn soluble constante. Il faudrait alors déterminer si cela est dû à une augmentation du rapport de la biomasse aérienne sur la biomasse racinaire ou à une réduction des flux d'absorption des métaux. Dans certains cas, la phytoextraction du Cd pourrait alors utiliser des agents chélatants, en tenant compte des risques de lixiviation accrue des métaux.

4. Optimisation de la phytoextraction

Le recensement des différentes populations de *T. caerulescens* et la définition de leur aptitude à prélever le Cd et le Zn du sol nous a permis de mettre en évidence le rôle majeur de la biodisponibilité des métaux dans l'hyperaccumulation. Toutefois, il existe des différences génétiques entre les populations. Dès lors, il est possible de cibler les populations les plus efficaces à extraire le Cd et le Zn des sols contaminés et de mettre en œuvre une sélection, à partir des individus les plus performants (biomasse et concentration en métaux élevées). Cela permettrait d'obtenir une population homogène à fort rendement d'extraction. En effet, il n'est pas envisageable de mettre en œuvre la phytoextraction à grande échelle sans avoir en parallèle une production de semences. Plusieurs outils peuvent être utilisés comme le génie génétique, l'hybridation avec des plantes à forte production de biomasse ou la sélection traditionnelle par croisement des individus les plus performants.

La culture de laitues sur des terres préalablement cultivées ou non avec *T. caerulescens* a mis en évidence une phytotoxicité de la terre traitée sur la croissance de la laitue. Les racines de *T. caerulescens* secrèteraient-elles des composés allélopathiques inhibant la croissance d'autres espèces ? Nous avons mesuré une augmentation des matières organiques en solution sous couvert de *T. caerulescens*. Quel est le rôle de cette matière organique ? Intervient-elle dans le phénomène d'allélopathie ? La diminution du rendement d'extraction avec les cultures de *T. caerulescens* et l'effet phytotoxique observé sur la croissance de la laitue nous indiquent qu'il serait nécessaire d'attendre que les racines laissées en place soient très largement dégradées avant d'établir la culture suivante ou d'extraire les racines dans la mesure où cela serait techniquement possible. Nous avons également observé que le travail du sol en profondeur favorisait la libération des métaux dans la solution du sol. Afin de ne pas disséminer les métaux dans l'environnement, il serait de ce fait préférable de ne pas réaliser ce type d'opération lorsque le sol reste sans végétation.

L'optimisation de la phytoextraction par *T. caerulescens* est donc dépendante de l'obtention d'une croissance racinaire et aérienne optimale associée à une concentration des métaux dans les parties aériennes des plantes maximale et constante durant une succession de cultures. Lors de la mise en œuvre de la phytoextraction, il sera possible d'intervenir à différents niveaux :

- sur la croissance aérienne et racinaire :
 - par une fertilisation et une irrigation raisonnées,
 - par l'amélioration des propriétés physiques du sol (réduction de la compaction, apports d'amendements organiques structurant, aération du sol),
- sur le flux d'absorption des métaux :
 - en ciblant la population la plus efficace pour un élément donné,
 - en favorisant la solubilisation des métaux, au moment où la plante les prélève pour éviter leur lessivage, par l'apport d'une fertilisation acidifiante ou d'agents chélatants,
- sur la quantité de métaux extraite par la culture en récoltant les parties aériennes des plantes lorsque le taux de croissance et la concentration du métal dans les tissus sont au maximum.

Références bibliographiques

- ABOUDRAR W., BOULARBAH A., SCHWARTZ C. et MOREL J.L.** 2003. Rhizosphere microflora of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proceedings of the 7th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, ICOBTE, June 15-19 2003, Uppsala, Sweden, Gobran G. et Lepp N. (Eds), 122-123.
- ABRAHAMS P.W.** 2002. Soils: their implications to human health. *Sci. Total Environ.*, 291(1-3): 1-32.
- ADAMO P. et VIOLANTE P.** 2000. Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Appl. Clay Sci.*, 16: 229-256.
- ADAMO P., DENAIX L., TERRIBILE F. et ZAMPELLA M.** 2003. Characterization of heavy metals in contaminated volcanic soils of the Solofrana river valley (southern Italy). *Geoderma*, 117(3-4): 347-366
- AGBENIN J.O., DE ABREU C.A. et VAN RAIJ B.** 1999. Extraction of phytoavailable trace metals from tropical soils by mixed ion exchange resin modified with inorganic and organic ligands. *Sci. Total Environ.*, 227(2-3): 187-196.
- AHNSTROM Z.S. et PARKER D.R.** 1999. Development and assessment of a sequential extraction procedure for the fractionation of soil cadmium. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1650-1658.
- ALLOWAY B.J.** 1995a. Chapter 3 : The origin of heavy metals in soils. In: *Heavy metals in soils*. Alloway B.J. (Ed), Blackie Academic and Professional, 38-57.
- ALLOWAY B.J.** 1995b. Heavy Metals in Soils. *Alloway B.J. Second Edition. Blackie Academic & Professional*, 368p.
- ALLOWAY B.J.** 1995c. Chapter 2 : Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: *Heavy Metals in Soils*. Alloway B.J. (Ed), Blackie Academic & Professional, 11-37.
- ARRÊTÉ DU 8 JANVIER 1998** fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97-1133 du 8 janvier 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. J.O. République Française du 31 décembre 1998, 1563-1571.
- ATKINS B.J.** 1973. Terminologie de l'analyse compartimentale. In: *Modèles à compartiments multiples pour les systèmes biologiques*. Gauthier-Villard (Ed), Methuen & Co. Ltd., Bordas, Belgium, 7-19.
- BAATH E.** 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and population (a review). *Water Air Soil Poll.*, 47: 335-379.
- BAIZE D.** 1993. Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français - Premiers résultats du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement de l'INRA*, 22: 37-46.
- BAIZE D.** 2000. Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français, résultats généraux du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement de l'INRA*, 39: 39-54.
- BAKER A.J.M.** 1981. Accumulators and Excluders – Strategies in the response of plants to heavy metal. *J. Plant Nutr.*, 3: 643-654.
- BAKER A.J.M. et PROCTOR J.** 1990. The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Syst. Evol.*, 173: 91-108.
- BAKER A.J.M., REEVES R.D. et MCGRATH S.P.** 1991. *In situ* decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal-accumulating plants - A feasibility study. In: *In situ Bioreclamation*. Hinchee R.E. et Olfenbittel R.F. (Eds), 539 p.
- BAKER A.J.M., MCGRATH S.P., SIDOLI C.M.D. et REEVES R.D.** 1994a. The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour. Conserv. Recy.*, 11: 41-49.
- BAKER A.J.M., REEVES R.D. et HAJAR A.S.M.** 1994b. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol.*, 127: 61-68.
- BAKER A.J.M., MOREL J.L. et SCHWARTZ C.** 1997. Des plantes pour dépolluer les friches industrielles. *Biofutur*, 169: 30-33.
- BAKER A.J.M. et BROOKS R.R.** 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126.
- BALABANE M., FAIVRE D., VAN OORT F. et DAHAMANI-MULLER H.** 1999. Mutual effect of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metallophyte grassland. *Environ. Pollut.*, 105: 45-54.
- BANFIELD J.F., WELCH S.A., TAUNTON A.E., SANTELLI C.M. et BARKER W.W.** 1999. Exploring microbial controls on mineral weathering. In: *Geochemistry of the Earth's Surface*. Årmansson E. (Ed), Balkema, 353-356.
- BAÑUELOS G.S., CARDON G., MACKAY B., BEN-ASHER J., WU L., BEUSELINCK P., AKOHOUE S. et ZAMBRZUSKI S.** 1993. Plant and Environmental Interactions – Boron and Selenium Removal in Boron-Laden Soils by Four Sprinkler Irrigated Plant Species. *J. Environ. Qual.*, 22: 786-792.

- BAÑUELOS G.S. et AJWA H.A.** 1999. Trace elements in soils and plants : an overview. *J. Environ. Sci. Heal. A.*, 34(4): 951-974.
- BARAJAS-ACEVES M., GRACE C., ANSORENA J., DENDOOVEN L. et BROOKES P.C.** 1999. Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentrations in soils around a mine spoil tip. *Soil Biol. Biochem.*, 31(6): 867-876.
- BARBARICK K.A., IPPOLITO J.A. et WESTFALL D.G.** 1998. Extractable trace elements in the soil profile after years of biosolids application. *J. Environ. Qual.*, 27: 801-805.
- BARBER S.A.** 1995. Soil Nutrient Bioavailability : A mechanistic Approach. *Second Edition. J. Wiley & Sons*, 414p.
- BASTIAN K.C. et ALLEMAN J.E.** 1998. Microtox^(TM) characterization of foundry sand residuals. *Waste Manage.*, 18(4): 227-234.
- BAVEYE P., MCBRIDE M.B., BOULDIN D., HINESLY T.D., DAHDOH M.S.A. et ABDEL-SABOUR M.F.** 1999. Mass balance and distribution of sludge-borne trace elements in a silt loam soil following long-term applications of sewage sludge. *Sci. Total Environ.*, 227(1): 13-28.
- BENEDETTI M.F., MILNE C.J., KINNIBURGH D.G., VAN RIEMSDIJK W.H. et KOOPAL L.K.** 1995. Metal ion binding to humic substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model. *Environ. Sci. Technol.*, 29(2): 446-457.
- BENETT F.A., TYLER E.K., BROOKS R.R., GREGG P.E.H. et STEWART R.B.** 1998. Fertilisation of Hyperaccumulators to Enhance their Potential for Phytoremediation and Phytomining. In: *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals, their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. Brooks R. (Ed), 249-259.
- BERMOND A. et MALENFANT C.** 1990. Estimation des cations métalliques liés à la matière organique à l'aide des réactifs chimiques : approche cinétique. *Science du Sol*, 28(1): 43-51.
- BERMOND A.** 1992. Thermodynamics applied to the study of the limits of sequential extraction procedures used for the speciation of trace elements in sediments and soils. *Environ. Techn.*, 13: 1175-1179.
- BERNAL M.P. et MCGRATH S.P.** 1994. Effects of pH and heavy metal concentration in solution culture on the proton release, growth and elemental composition of *Alyssum murale* and *Raphanus sativus* L. *Plant Soil*, 166: 88-92.
- BESNARD E., CHENU C. et ROBERT M.** 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environ. Pollut.*, 112(3): 329-337.
- BEVERIDGE A., WALLER P. et PICKERING W.F.** 1989. Evaluation of "labile" metal in sediments by use of ion-exchange resins. *Talanta*, 36(5): 535-542.
- BITTON G., JUNG K. et KOOPMAN B.** 1994. Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27(1): 25-28.
- BLAUDEZ D., BOTTON B. et CHALOT M.** 2000. Effects of heavy metals on nitrogen uptake by *Paxillus involutus* and mycorrhizal birch seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 33(1): 61-67.
- BOEKHOLD A.E., TEMMINGHOFF E.J.M. ET VAN DER ZEE S.**, 1993, Influence of electrolyte composition and pH on cadmium sorption by an acid sandy soil, *J. Soil Sci.*, 44: 85-96
- BOISSON J., RUTTENS A. , MENCH M. et VANGRONSVELD J.** 1999. Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils. Part 1. Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation. *Environ. Pollut.*, 104(2): 225-233.
- BOSECKER K.** 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, 20(3-4): 591-604.
- BOULARBAH A., BITTON G., MOREL J.L. et SCHWARTZ C.** 2000. Assessment of metal accumulation in Plants using MetPAD, a toxicity test specific for heavy metal toxicity. *Environ. Toxicol.*, 15(5): 449-455.
- BOULARBAH A., BITTON G., SCHWARTZ C., ABOUDRAR W. et MOREL J.L.** 2003. Assessment of metal accumulation in plants growing on contaminated soils. Proceedings of the 7th International Conference in the Biogeochemistry of Trace Elements, ICOBTE, June 15-19 2003, Uppsala, Sweden, Gobran G. et Lepp N. (Eds), 132-133.
- BOUWER E., DURANT N., WILSON L., ZHANG W. et CUNNINGHAM A.** 1994. Degradation of xenobiotic compounds in situ: Capabilities and limits. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15(2-3): 307-317.
- BOYD R.S. et MARTENS S.N.** 1994. Nickel hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* var. *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore. *Oikos*, 70: 21-25.

- BOYD R.S. et MARTENS S.N.** 1992. The Raison d'Être for Metal hyperaccumulation by Plants. In: *The vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. Baker A.J.M. et al. (Eds), 279-289.
- BOYD S.B., SHAW J.J. et MARTENS S.N.** 1994. Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) against pathogens. *Amer. J. Bot.*, 81: 294-300.
- BRANTLEY S.L., LIERMANN L., KALINOWSKI B.E., GIVENS S., PANTANO N et BARNES A.S.** 1999. Abiotic vs. biotic dissolution of hornblende. In: *Geochemistry of the Earth's Surface*. Årmansson E. (Ed), Balkema, 357-359.
- BREWER E.P., SAUNDERS J.A., ANGLE J.S., CHANEY R.L. et MCINTOSH M.S.** 1999. Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 761-771.
- BROHOLM M.M. et ARVIN E.** 2000. Biodegradation of phenols in a sandstone aquifer under aerobic conditions and mixed nitrate and iron reducing conditions. *J. Contam. Hydrol.*, 44(3-4): 239-273.
- BROHON B. et GOURDON R.** 2000. Influence of soil microbial activity level on the determination of contaminated soil toxicity using Lumistox and MetPlate bioassays. *Soil Biol. Biochem.*, 32(6): 853-857.
- BROOKS R., TROW J.M., VEILLON J.M. et JAFFRÉ T.** 1981. Studies on manganese-accumulating *Alyxia* from New Caledonia. *Taxon*, 30: 420-423.
- BROOKS R.** 1983. Biological Methods of Prospecting for Minerals. *John Wiley, New York*, 322p
- BROOKS R.** 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: *Plants that hyperaccumulate heavy metal*. Brooks R. (Ed), CAB International, Wallingford, UK, 55-94.
- BROWN S.L., CHANEY R.L., ANGLE J.S. et BAKER A.J.M.** 1994. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and Blader Champion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 23: 1151-1157.
- BUATIER M.D., SOBANSKA S. et ELSASS F.** 2001. TEM-EDX investigation on Zn- and Pb-contaminated soils. *Appl. Geochem.*, 16(9-10): 1165-1177.
- BURT R., WILSON M.A., KECK T.J., DOUGHERTY B.D., STROM D.E. et LINDAHL J.A.** 2003. Trace element speciation in selected smelter-contaminated soils in Anaconda and Deer Lodge Valley, Montana, USA. *Adv. Environ. Res.*, 8(3): 51-67.
- CAILLE N.** 2002. Mobilité et phytodisponibilité du mercure dans des sédiments de curage. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, Nancy, 167p.
- CAMBIER P.** 1994. Contamination of soils by heavy metals and other trace elements : a chemical perspective. *Anal. Mag.*, 22(2): 21-24.
- CATALDO D.A. et WILDUNG R.E.** 1978. Soil and plant factors influencing the accumulation of heavy metals by plants. *Environ. Heal. Persp.*, 27: 149-159.
- CAVALLARO N. et MCBRIDE M.** 1978. Copper and cadmium adsorption characteristics of selected acid and calcareous soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42: 550-556.
- CAVALLARO N. et MCBRIDE M.** 1980. Activities of Cu²⁺ and Cd²⁺ in soil solutions as affected by pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44: 729-732.
- CAVALLARO N. et MCBRIDE M.** 1984. Zinc and copper sorption and fixation by an acid soil clay : effect of selective dissolutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48: 1050-1054.
- CHANEY R.L.** 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. In: *Land Treat of Hazard Wastes*. Parr J.F. et al. (Eds), Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ., 50-76.
- CIESLINSKI G., VAN REES K.C.J., SZMIGIELSKA A.M., KRISHNAMURTI G.S.R. et HUANG P.M.** 1998. Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant Soil*, 203: 109-117.
- CLAPHAM A.R. et AKEROYD J.R.** 1993. *Thlaspi*. In: *Flora Europaea. 1. Ed. 2*. Tutin T.G. (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, 384-388.
- CONIL P. et CLOZEL B.** 1999. Méthodes physiques de séparation des constituants d'un sol contaminé : une première étape pour déterminer la spéciation des métaux. In: *Spéciation des métaux dans les sols*. ECRIN A. (Eds), Paris, 296p.
- CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE DE FRANCE.** 1996. Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. *Tec & Doc. Paris*. 236p.
- COSTA G.** 1992. Réponses physiologiques de *Lactuca sativa* (L.) et de *Lupinus albus* (L.) aux faibles concentrations en cadmium. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 158p.

- COSTA G. et MOREL J.L.** 1993. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. *J. Plant Nutr.*, 17(4): 627-637.
- CUNNINGHAM S.D. et BERTI W.R.** 1993. Remediation of contaminated soils with green plants : an overview. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Pl.*, 29: 207-212.
- DA SILVA W.G.P., CAMPOS R.C. et MIEKELEY N.** 1998. A simple digestion procedure for the determination of cadmium, copper, molybdenum and vanadium in plants by graphite furnace atomic absorption spectrometry and mass inductively coupled plasma spectrometry. *Anal. Lett.*, 31(6): 1061-1070.
- DAHMANI-MULLER H., VAN OORT F., GÉLIE B. et BALABANE M.** 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ. Pollut.*, 109: 231-238.
- DEGRYSE F., BROOS K., SMOLDERS E. et MERCKX R.** 2003. Soil solution concentration of Cd and Zn can be predicted with CaCl₂ soil extract. *Eur. J. Soil Sci.*, 54: 149-157.
- DEL CASTILHO P., CHARDON W.J. et SALOMONS W.** 1993. Influence of cattle-manure slurry application on the solubility of cadmium, copper, and zinc in a manured acidic, loamy-sand soil. *J. Environ. Qual.*, 22: 689-697.
- DELORME T.A., GAGLIARDI J.V., ANGLE J.S. et CHANEY R.L.** 2001. Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. and the non metal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. *Can. J. Microbiol.*, 47(8): 773-776.
- DEROME J. et LINDROOS A.J.** 1998. Effects of heavy metal contamination on macronutrient availability and acidification parameters in forest soil in the vicinity of the Herjavalta Cu-Ni smelter, SW Finland. *Environ. Pollut.*, 99: 225-232.
- DINKELAKER B., RÖMHELD V. et MARSCHNER H.** 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus Albus* L.). *Plant Cell Environ.*, 12: 285-292.
- DIOT F.** 1991. Contribution à l'étude de la dynamique du soufre en sols cultivés lorrains. Thèse de doctorat de l'INPL, Nancy, 149p.
- DOONG R.A., WU Y.W. et LET W.G.** 1998. Surfactant enhanced remediation of cadmium contaminated soils. *Water Sci. Technol.*, 37(8): 65-71.
- DUDKA S., PIOTROWSKA M. et TERELAK H.** 1996. Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environ. Pollut.*, 94(2): 181-188.
- DVORAKOVA M.** 1968. Zur Nomenklatur einiger Taxa aus dem Formenkreis von *Thlaspi alpestre* (L.) L. *Folia Geobot. Phytotaxon. (Praha)*, 3: 341-343.
- EBBS S.D., LASAT M.M., BRADY D.J., CORNISH J., GORDON R. et KOCHIAN L.V.** 1997. Phytoextraction of cadmium and zinc from contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 26: 1424-1430.
- ECHEVARRIA G.** 1996. Contribution à la prévision des transferts sol-plante des radionucléides. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 219p.
- ECHEVARRIA G., MOREL J.L., FARDEAU J.C. et LECLERC-CESSAC E.** 1998. Assessment of phytoavailability of Nickel in soils. *J. Environ. Qual.*, 27: 1064-1070.
- ENFIELD C.G. et YATES S.R.** 1990. Organic Chemical Transport to Groundwater. In: *Pesticides in the Soil Environment : Process, Impacts, and Modelling*. Cheng H.H.E. (Ed), Soil Science Society of America, Madison, 271-302.
- ENSLEY B.D.** 2000. Rationale for use of phytoremediation. In: *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean Up the Environment*. Raskin I. et Ensley B.D. (Eds), John Wiley & Sons, Inc, New York, 3-11.
- ERNST W.H.O.** 1990. Ecological aspects of sulfur metabolism. In: *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. Rennenberg H. et al. (Eds), SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 131-144.
- ESCARRÉ J., LEFÈVRE C., LEBLANC M., LEPART J. et DELAY B.** 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the mediterranean area : implications for phytoremediation. *New Phytol.*, 145: 429-435.
- FALCONER D.S.** 1974. Introduction à la génétique quantitative. *Masson et C^{ie} (Eds). Paris*. 284 p.
- FARDEAU J.C. et JAPPÉ J.** 1976. Nouvelle méthode de détermination du phosphore assimilable par les plantes : Extrapolation des cinétiques de dilution isotopique. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 282: 1137-1140.
- FARDEAU J.C., HÉTIER J.M. et JAPPÉ J.** 1979. Potassium assimilable du sol : Identification du compartiment des ions isotopiquement diluables. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 288: 1039-1042.
- FARDEAU J.C.** 1981. Cinétiques de dilution isotopique et phosphore assimilable des sols. Thèse de doctorat d'Etat de Paris VI, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, France, 198p.

- FARDEAU J.C., MOREL C. et BONIFACE R.** 1991. Cinétiques de transfert des ions phosphate vers la solution du sol : paramètres caractéristiques. *Agronomie*, 11: 787-797.
- FARDEAU J.C.** 1993. Le phosphore assimilable des sols : sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments. *Agronomie*, 13: 317-331.
- FELIX H.** 1997. Field Trials for *in situ* Decontamination of Heavy Metal Polluted Soils using Crops of Metal-Accumulating Plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 160: 525-529.
- FLORENTIN L., SCHWARTZ C. et MOREL J.L.** 1998. Pedology and industrial soils. Proc. of the 16th World Congress of Soil Science, Montpellier, France.
- FOTOVAT A. et NAIDU R.**, 1998, Changes in the composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metal in alkaline sodic and acidic soils, *Geoderma*, 84: 213-234.
- FRÉROT H., PETIT C., LEFÈBVRE C., GRUBER W., COLLIN C. et ESCARRÉ J.** 2003. Zinc and cadmium accumulation in controlled crosses between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol.*, 157(3): 643-648.
- FREY B., KELLER C., ZIEROLD K. et SCHULIN R.** 2000. Distribution of zinc in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.*, 23: 675-687.
- GARCIA-SANCHEZ A., ALASTUEY A. et QUEROL X.** 1999. Heavy metal adsorption by different minerals : application to the remediation of polluted soils. The environmental impact of the mine tailings accident in Aznalcollar (South-West Spain). *Sci. Total Environ.*, 242(1-3): 179-188.
- GÉRARD E.** 2000. Caractérisation du cadmium phytodisponible des sols par des méthodes isotopiques. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 153p.
- GÉRARD E., ECHEVARRIA G., STERCKEMAN T. et MOREL J.L.** 2000. Cadmium availability to three plant species varying in cadmium accumulation pattern. *J. Environ. Qual.*, 29: 1117-1123.
- GÉRARD E., ECHEVARRIA G., MOREL C., STERCKEMAN T. et MOREL J.L.** 2001. Isotopic exchange kinetics method for assessing cadmium availability in soils. In: *Trace Elements in Soils : Bioavailability, Flux and Transfert*. Iskandar I.K. et Kirkham M.B. (Eds), CRC Press LLC, 127-143.
- GLASS D.J.** 2000. Economic potential of phytoremediation. In: *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean Up the Environment*. Raskin I. et Ensley B.D. (Eds), John Wiley & Sons, Inc, New York, 15-31.
- GODO G.H. et REISENAUER H.M.** 1980. Plant effects on soil manganese availability. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44: 993-995.
- GRIMAL J.Y.** 1994. Influence de l'exsudation racinaire de *Zea mays* L. sur la mobilisation de formes de phosphore difficilement biodisponibles. Thèse de Doctorat de l'INPL, Nancy, 139p.
- GUCKERT A. et MOREL J.L.** 1979. Bilan de 5 années d'utilisation de boues résiduaires urbaines sur plantes de grande culture dans les conditions agro-climatiques lorraines. In: *First European Symposium Treatment and Use of Sewage Sludge*. Alexandre D. et Hott H. (Eds), Ministère de l'Environnement, France-C.E.E, 269-283.
- GUILLERME A.** 2003. Consequences of ancient anthropogenic activities on soil contamination. Proceedings of the 2nd International Conference on Soils of Urban, Industrial, Traffic and Mining Areas, SUITMA July 9-11 2003, Nancy, France, p25.
- GUPTA K.C. et JEANNE D'ARC M.** 2000. Effect of concentration of ion exchanger, plasticizer and molecular weight of cyanocopolymers on selectivity and sensitivity of Cd(II) ion selective electrode. *Talanta*, 52(6): 1087-1103.
- HAMMER D. et KELLER C.** 2002. Changes in the rhizosphere of the heavy metal accumulating plants as evidenced by chemical extractants. *J. Environ. Qual.*, 31: 1561-1569.
- HAMMER D. et KELLER C.** 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Thlaspi caerulescens* in field trials. *Soil Use Manage.*, 19(2): 144-149.
- HAMON R.E. et MCLAUGHLIN M.J.** 1999. Use of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* for bioavailable contaminant stripping. Proc. 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, ICOBTE, Vienna, Austria, 908-909.
- HAMON R.E., MCLAUGHLIN M.J. et COZENS G.** 2002. Mechanisms of attenuation of metal availability in *in situ* remediation treatments. *Environ. Sci. Technol.*, 36(18): 3991-3996.
- HARPER M.P., DAVISON W., ZHANG H. et TYCH W.** 1998. Kinetics of metal exchange between solids and solutions in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 62(16): 2757-2770.
- HARPER M.P., DAVISON W. et TYCH W.** 2000. DIFS-a modelling and simulation tool for DGT induced trace metal remobilisation in sediments and soils. *Environ. Modell. Softw.*, 15: 55-66.

- HARTER R.D. et NAIDU R.** 1995. Role of metal-organic complexation in metal sorption by soils. *Adv. Agron.*, 55(219-263):
- HESTERBERG D., SAYERS D.A., ZHOU W., PLUMMER G.M. et ROBARGE W.P.** 1997. X-ray Absorption Spectroscopy of Lead and Zinc Speciation in a Contaminated Groundwater Aquifer. *Environ. Sci. Technol.*, 31(10): 2840-2846.
- HESTERBERG D.** 1998. Biogeochemical cycles and processes leading to changes in mobility of chemicals in soils. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 67: 121-133.
- HINSINGER P. et GILKES R.J.** 1997. Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in an acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma*, 75: 231-249.
- HINSINGER P., BARROS O.N.F., BENEDETTI M.F., NOACK Y. et CALLOT G.** 2001. Plant induced weathering of a basaltic rock : experimental evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65(1): 137-152.
- HUTCHINSON J.J., YOUNG S.D., MCGRATH S.P., WEST H.M., BLACK C.R. et BAKER A.J.M.** 2000. Determining uptake of non-labile soil cadmium by *Thlaspi caerulescens* using isotopic dilution techniques. *New Phytol.*, 146: 453-460.
- IERADI L.A., CRISTALDI M., MASCANZONI D., CARDARELLI E., GROSSI R. et CAMPANELLA L.** 1996. Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environ. Pollut.* 92(3): 323-328.
- IWAHORI K., TAKEUCHI F., KAMIMURA K. et SUGIO T.** 2000. Ferrous iron-dependent volatilization of mercury by the plasma membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(9): 3823-3827.
- JAFFRÉ T. et SCHMID M.** 1974. Accumulation du nickel par une rubiacée de Nouvelle Calédonie : *Psychotria douarrei* (G. Beauvisage) Däniker. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 278: 1727-1730.
- JAHRAUSCH-WEHRHEIM B., MOCQUOT B. et MENCH M.** 1999. Absorption and translocation of sludge-borne zinc in field-grown maize (*Zea mays* L.). *Eur. J. Agron.*, 11(1): 23-33.
- JONES D.L. et DARRAH P.R.** 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil*, 166: 247-257.
- JONGMANS A.G., VAN BREEMEN N., LUNDSTROM U., VAN HEES P.A.W., FINLAY R.D., SRINIVASAN M., UNESTAM T., GIESLER R., MELKERUD P.-A. et OLSSON M.** 1997. Rock-eating fungi. *Nature*, 389: 682-683.
- JORDAN A.** 1846. Observation sur plusieurs plantes nouvelles, rare ou critique de la France. II. *Annales de la Société Linéenne de Lyon*, 3: 9-12.
- JUILLOT F.** 1998. Localisation et spéciation de l'arsenic, du plomb, et du zinc dans des sites et sols contaminés. Comparaison avec un sol développé sur une anomalie géochimique naturelle en plomb. Thèse de Doctorat, Université Denis-Diderot, Paris, France, 243p.
- JUNG M.C. et THORNTON I.** 1997. Environmental contamination and seasonal variation of metals in soils, plants and water in the paddy fields around a Pb-Zn mine in Korea. *Sci. Total Environ.*, 198: 105-121.
- JUSTE C.** 1990. Eléments pour l'établissement d'un bilan des oligo-éléments. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 76: 135-146.
- JUSTE C., CHASSIN P., GOMEZ A., LINERES M., MOCQUOT B., FEIX I. et WIART J.** 1995. Les micro-polluants dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. Valorisation agricole des boues d'épuration, Ademe-INRA, 209.
- KABATA-PENDIAS A.** 2001. Trace elements in soils and plants. *Third edition. CRC Press*, 413p.
- KAH M.** 2003. Caractérisation du cadmium des sols par cinétique d'échange isotopique. *DEA National de Science du Sol*, 20p.
- KAHLE H. et BRECKLE S.W.** 1989. Single and combined effects of lead and cadmium on young beech trees (*Fagus sylvatica* L.). Air pollution and forest decline. Proc. 14th Int. Meeting for specialists in air pollution effects on forest ecosystems, IUFRO P2.05, Interlaken, Switzerland, Bucher J.B. et Bucher-Wallin I. (Eds), 442-444.
- KELLER C. et HAMMER D.** 2003. Mobility and bioavailability of Cd, Cu and Zn in soils after repeated croppings of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proceedings of the 7th International Conference in the Biogeochemistry of Trace Elements, ICOBTE, June 15-19 2003, Uppsala, Sweden, Gobran G. et Lepp N. (Eds), 100-101.
- KELLER C., HAMMER D., KAYSER A., RICHNER W., BRODBECK M. et SENNHAUSER M.** 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant Soil*, 249(1): 67-81.
- KERKEB L. et KRÄMER U.** 2003. The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiol.*, 131: 716-724.
- KHALID B.A., GAMBRELL R.P. et PATRICK JR W.H.** 1981. Chemical availability of cadmium in Mississippi river sediment. *J. Environ. Qual.*, 10(4): 523-528.

- KINNIBURGH D.G., MILNE C.J., BENEDETTI M.F., PINHEIRO J.P., FILIUS J., KOOPAL L.K. et VAN RIEMSDIJK W.H. 1996. Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donan model. *Environ. Sci. Technol.*, 30(5): 1687-1698.
- KNIGHT B., ZHAO F.J., MCGRATH S.P. et SHEN Z.G. 1997. Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil*, 197: 71-78.
- KOCH M., MUMMENHOFF K. et HURKA H. 1998. Systematics and evolutionary history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in western Europe: evidence from genetic studies based isozyme analysis. *Biochem. Syst. Ecol.*, 26: 823-838.
- KOCHIAN L.V. 1991. Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. In: *Micronutrients in Agriculture*. Mortvedt J.J. et al. (Eds), Soil Science Society of America, Madison, 229-296.
- KONING M., HUPE K. et STEGMANN R. 2000. Thermal Processes, Scrubbing/Extraction, Bioremediation and Disposal. In: *Biotechnology – Environmental Processes II, Soil Decontamination*. Rehm H.J. et Reed G. (Eds), 305-317.
- KOOKANA R.S. et NAIDU R., 1998, Effect of soil solution composition on cadmium transport through variable charge soils, *Geoderma*, 84: 235-248.
- KRÄMER U., COTTER-HOWELLS J.D., CHARNOCK J.M., BAKER A.J.M. et SMITH A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379: 635-638.
- KREBS W., BROMBACHER C., BOSSHARD P.P., BACHOFEN R. et BRANDL H. 1997. Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 20(3-4): 605-617.
- KRISHNAMURTI G.S.R., CIESLINSKI G., HUANG P.M. et VAN REES K.C.J. 1997. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: implication in cadmium availability. *J. Environ. Qual.*, 26: 271-277.
- KRISHNAMURTI G.S.R. et NAIDU R. 2003. Solid-solution equilibria of cadmium in soils. *Geoderma*, 113(1-2): 17-30.
- KÜPPER H., ZHAO F.-J. et MCGRATH S.P. 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.*, 119: 305-311.
- LASAT M.M., BAKER A.J.M. et KOCHIAN L.V. 1996. Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol.*, 112: 1715-1722.
- LASAT M.M., BAKER A.J.M. et KOCHIAN L.V. 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.*, 118(3): 875-883.
- LASAT M.M. 2000. The use of plants for removal of toxic metals from contaminated soil. *EPA Technology Innovation Report*, 36p.
- LASAT M.M., PENCE N.S., GARVIN D.F., EBBS S.D. et KOCHIAN L. 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 51(342): 71-79.
- LAVADO R.S.A., PORCELLI C. et ALVAREZ R. 1999. Concentration and distribution of extractable elements in a soil as affected by tillage systems and fertilization. *Sci. Total Environ.*, 232: 185-191.
- LE HECHO I., TELLIER S. et ASTRUC M. 1998. Industrial site soils contaminated with arsenic or chromium : Evaluation of the electrokinetic method. *Environ. Technol.*, 19(11): 1095-1102.
- LEBOURG A., STERCKEMAN T., CIESIELSKI H. et PROIX N. 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie*, 16: 201-215.
- LEBOURG A. 1998. Etude de l'extraction des métaux en traces de sols pollués en vue de la détermination de leur biodisponibilité. Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies, Lille, 154p.
- LECOMTE P. 1995. Les sites pollués – Traitement des sols et des eaux souterraines. *Lavoisier. Tech & Doc*, 198p.
- LICHTER J. 1998. Rates of weathering and chemical depletion in soils across a chronosequence of Lake Michigan sand dunes. *Geoderma*, 85: 255-282.
- LIU A. et GONZALEZ R.D. 2000. Modeling adsorption of copper (II), cadmium (II) and lead (II) on purified humic acid. *Langmuir*, 16: 3902-3909.
- LLOYD J.R. et LOVLEY D.R. 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(3): 248-253.
- LOMBI E., ZHAO F.J., DUNHAM S.J. et MCGRATH S.P. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol.*, 145: 11-20.

- LOMBI E., ZHAO F.J., MCGRATH S.P., YOUNG S.D. et SACCHI G.A.** 2001. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.*, **149**: 53-60.
- LOPEZ P.L. et GRAHAM E.R.** 1970. Isotopic exchange studies of micronutrients in soils. *Soil Sci.*, **110**: 24-30.
- LOTHENBACH B., FURRER G., SCHAERLI H. et SCHULIN R.** 1999. Immobilization of zinc and cadmium by the montmorillonite compounds: effects of aging and subsequent acidification. *Environ. Sci. Technol.*, **33(17)**: 2945-2952.
- LUO Y.M., CHRISTIE P. et BAKER A.J.M.** 2000. Soil solution Zn and pH dynamics in non-rhizosphere soil and in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* grown in an Zn/Cd-contaminated soil. *Chemosphere*, **41**: 161-164.
- MANCEAU A., HARGÉ J.C., SARRET G., HAZEMANN J.L., BOISSET M., MENCH M. et CAMBIER P.** 1999. Direct determination of heavy metal speciation in soils by EXAFS spectroscopy. In: *Spéciation des métaux dans les sols*. ECRIN A. (Eds), Paris, 157-178.
- MARCEAU P., BROQUET P. et BATICLE P.** 1999. Dépollution par méthode électrocinétique d'un matériau argileux dopé au cadmium. Essai pilote. *C.R. Acad. Sc., Paris*, **328**: 37-43.
- MARSCHNER H., RÖMHELD V. et OSSENBERG-NEUHAUS H.** 1982. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Z. Pflanzenphysiol.*, **105**: 407-416.
- MARSCHNER H. et RÖMHELD V.** 1983. In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface : Effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**: 241-251.
- MARSCHNER H.** 1986. Mineral Nutrition in Higher Plant. *Academic Press*, 674p.
- MARSCHNER H., RÖMHELD V., HORST W.J. et MARTIN P.** 1986. Root-induced changes in the rhizosphere : importance for the mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **149**: 441-456.
- MARSCHNER H.** 1988. Mechanisms of manganese acquisition by roots from soils. In: *Manganese in soils and plants*. Graham R.D. (Ed), Kluwer Academic Publication, Dordrecht, 191-204.
- MARSCHNER H.** 1991. Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In: *Plant Roots : The Hidden Half*. Waisel Y. et al. (Eds), Dekker, M., 503-528.
- MARTENS S.N. et BOYD R.S.** 1994. The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia*, **98**: 379-384.
- MARTINEZ C.E. et MOTTO H.L.** 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ. Pollut.*, **107**: 153-158.
- MATHYS W.** 1977. The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants. *Physiol. Plantarum*, **40**: 130-136.
- MCBRIDE M., TYLER L.D. et HOVDE D.A.**, 1981, Cadmium adsorption by soils and uptake by plants as affected by soil chemical properties, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 739-744.
- MCBRIDE M., SAUVÉ S. et HENDERSHOT W.** 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd, and Pb in contaminated soils. *Eur. J. Soil Sci.*, **48**: 337-346.
- MCCARTHY J.F. et ZACHARA J.M.** 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, **23**: 496-502.
- MCCARTY P.L.** 1991. Engineering concepts for in situ bioremediation. *J. Hazard. Mater.*, **28**: 1-11.
- MCENROE N.A. et HELMISAARI H.S.** 2001. Decomposition of coniferous forest litter along a heavy metal pollution gradient, south-west Finland. *Environ. Pollut.*, **113**: 11-18.
- MCGRATH S.P.** 1987. Long-term studies of metal transfers following application of sewage sludge. In: *Pollutant transport and fate in ecosystems*. Coughtrey P.J. et al. (Eds), Blackwell Scientific Publications, 301-317.
- MCGRATH S.P., SIDOLI C.M.D., BAKER A.J.M. et REEVES R.D.** 1993. The potential for the use of metal-accumulating plants for the *in situ* remediation of metal-polluted soils. In: *Integrated Soil and Sediment Research : A Basis for Proper Protection*. Eijackers H.J.P. et Hamers T. (Eds), 673-676.
- MCGRATH S.P., SHEN Z.G. et ZHAO F.J.** 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil*, **188**: 153-159.
- MEERTS P. et VAN ISACKER N.** 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metalcolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecol.*, **133**: 221-231.
- MENCH M., MOREL J.L. et GUCKERT A.** 1987. Metal binding properties of high molecular weight soluble exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils*, **3**: 165-169.
- MENCH M., MOREL J.L., GUCKERT A. et GUILLET B.** 1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight. *J. Soil Sci.*, **39**: 521-527.

- MENCH M., MARTIN E. et GOMEZ A.** 1990. Identification des exsudats racinaires solubles et étude comparée de leur effet potentiel sur l'accumulation du cadmium et du nickel chez le maïs (*Zea mays* L.) et le tabac (*Nicotiana tabacum* L. et *Nicotiana rustica* L.). In: *Secrétariat d'Etat à l'Environnement, Service de la Recherche, des Etudes et du Traitement de l'Information. Convention d'Etude n° 86, 184/2629.*
- MENCH M.** 1992. Dynamique des éléments en traces à l'interface sol-racine (rhizosphère). In: *Le point sur...Le fonctionnement des systèmes racinaires.* Pickard D. et Combe L. (Eds), INRA publication.
- MEYER F.K.** 1973. Conspectus der "*Thlaspi*" - Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. *Feddes Repert.*, **84**: 449-470.
- MILLS W.B., LIU S. et FONG F.K.** 1991. Literature review and model (COMET) for colloid / metals transport in porous media. *Ground Water*, **29**: 199-208.
- MITCHELL L.G., GRANT C.A. et RACZ G.J.** 2000. Effect of nitrogen application on concentration of cadmium and nutrient ions in soil solution and in durum wheat. *Can. J. Soil Sci.*, **80**: 107-115.
- MOREL J.L. et GUCKERT A.** 1984. Evolution en plein champ de la solubilité dans DTPA des métaux lourds du sol introduits par des épandages de boues urbaines chaulées. *Agronomie*, **4(4)**: 377-386.
- MOREL J.L., MENCH M. et GUCKERT A.** 1986. Measurements of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils*, **2**: 29-34.
- MOREL J.L., MENCH M. et GUCKERT A.** 1987. Dynamique des métaux lourds dans la rhizosphère : rôle des exsudats racinaires. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **24(3)**: 485-492.
- MOREL J.L., PIERRAT J.C. et GUCKERT A.** 1988. Effet et arrière effet de l'épandage de boues urbaines conditionnées à la chaux et au chlorure ferrique sur la teneur en métaux lourds d'un maïs. *Agronomie*, **8(2)**: 107-113.
- MOREL J.L., BITTON G., SCHWARTZ C. et SCHIAVON M.** 1997. Bioremediation of soils and waters contaminated with micropollutants : which role for plants? *Ecotoxicology : Responses, Biomarkers and Risk Assessment*, OECD Workshop, Fair Haven, New Jersey, Zelikoff J.T. (Ed), SOS Publications, 37-74.
- MORGAN H., SMART G.A. et SHERLOCK J.C.** 1988. Intakes of metal. Morgan H (Ed). *The Shipham Report. Sci. Total Environ.*, **75**: 71-100.
- MORGAN P. et WATKINSON R.J.** 1989. Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. *FEMS Microbiol. Lett.*, **63(4)**: 277-300.
- NAIDU R., BOLAN N.S., KOOKANA R.S. et TILLER K.**, 1994, Ionic strength and pH effects on the sorption of Cd and the surface charge of soils, *Eur. J. Soil Sci.*, **45**: 419-429.
- NAIDU R. et HARTER R.D.** 1998. Effect of different organic ligands on cadmium sorption by and extractability from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **62**: 644-650.
- NEDELKOSKA T.V. et DORAN P.M.** 2000. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.*, **67**: 607-615.
- NRIAGU J.O.** 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature*, **279**: 409-411.
- NYER E.K.** 1993. *Practical Techniques for Groundwater and Soil Remediation.* Miller G. Lewis publishers, 214p.
- PARDO R., BARRADO E., LOURDES P. et VEGA M.** 1990. Determination and speciation of heavy metals in sediments of the Pisuerga river. *Water Res.*, **24(3)**: 373-379.
- PARDO R., BARRADO E., VEGA M., DEBAN L. et TASCÓN M. L.** 1994. Voltammetric complexation capacity of waters of the Pisuerga river. *Water Res.*, **28(10)**: 2139-2146.
- PEIJNENBURG W. et JAGER T.** 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, **56(1)**: 63-77.
- PENCE N.S., LARSEN P.B., EBBS S.D., LETHAM D.L., LASAT M.M., GARVIN D.F., EIDE D. et KOCHIAN L.V.** 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.*, **97(9)**: 4956-4960.
- PENNANEN T.** 2001. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH--a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog(R) and 3H-thymidine incorporation methods in field studies. *Geoderma*, **100(1-2)**: 91-126.
- PERRIGUEY J.** 2002. Evaluation du modèle Barber-Cushman pour la simulation du transfert de cadmium dans le système sol-plante. *DEA National de Sciences du sol*, 22p.
- PERRONNET K.** 2000. Disponibilité dans les sols du cadmium et du zinc hyperaccumulés dans les organes de *Thlaspi caerulescens*. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, Nancy, 135p.

- PERRONNET K., SCHWARTZ C., GÉRARD E. et MOREL J.L. 2000. Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil. *Plant Soil*, 227(1-2): 257-263.
- PETERS R.W. 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. *J. Hazard. Mater.*, 66: 151-210.
- PICHEL J. et PICHEL T.M. 1997. Comparison of solvents for *ex situ* removal of chromium and lead from contaminated soil. *Environ. Eng. Sci.*, 14(2): 97-104.
- PICKERING W.F. 1986. Metal ion speciation - soils and sediments (a review). *Ore Geol. Rev.* 1: 83-146.
- POLLARD A.J. et BAKER A.J.M. 1997. Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol.*, 135: 655-658.
- QIAN J., WANG Z., SHAN X., TU Q., WEN B. et CHEN B. 1996. Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical fractionation and multiple regression analysis. *Environ. Pollut.*, 91(3): 309-315.
- RANDRIAMANANA E. 2001. Effet de cultures successives de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens* sur la disponibilité du Cd du sol. Stage de Maîtrise, IUP Génie de l'Environnement, Université de Metz, 55p.
- REDDY K.R., DONAHUE M., SAICHEK R.E. et SASAOKA R. 1999. Preliminary assessment of electrokinetic remediation of soil and sludge contaminated with mixed waste. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, 49: 823-830.
- REEVES R. et BAKER A. 2000. Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean Up the Environment*. Raskin I. et Ensley B.D. (Eds), John Wiley & Sons, Inc, New York, 193-229.
- REEVES R. 2003. Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant Soil*, 249(1): 57-65.
- REEVES R.D. et BROOKS R. 1983. European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *J. Geochem. Explor.*, 18: 275-283.
- REEVES R.D., SCHWARTZ C., MOREL J.L. et EDMONDSON J. 2001. Distribution and metal-accumulating behaviour of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. *Int. J. Phytoremediat.*, 3: 145-172.
- ROBERT M. et JUSTE C. 1998. Chapitre 1 : Origine et distribution des éléments en traces dans les sols. In: *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Bourrelier P.H. et J. B. (Eds), Lavoisier Tec & Doc, 1-65.
- ROBERT M. et JUSTE C. 1999. Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In: *Spéciation des métaux dans les sols*. ECRIN A. (Eds), Paris, 15-37.
- ROBINSON B., FERNÁNDEZ J.E., MADEJÓN P., MARAÑÓN T., MURILLO J.M., GREEN S. et CLOTHIER B. 2003. Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant Soil*, 249(1): 117-125.
- ROBINSON B.H., LEBLANC M., PETIT D., BROOKS R.R., KIRKMAN J.H. et GREGG P.E.H. 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant Soil*, 203: 47-56.
- RÖHMELD V. et MARSCHNER H. 1986a. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. In: *Advances in Plant Nutrition*. Tinker P.B. et Läuchli A. (Eds), Praeger Scientific, New York, 155-204.
- RÖHMELD V. et MARSCHNER H. 1986b. Evidence for the existence of a specific uptake system for iron phyrosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol.*, 80: 175-180.
- ROVIRA A.D. 1969. plant root exudates. *Bot. Rev.*, 35: 35-53.
- ROVIRA A.D., FOSTER R.C. et MARTIN J.K. 1979. Note on terminology : origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: *The soil-root interface*. Harley L. et Russell R.S. (Eds), Academic Press, New York, 1-4.
- RUSSELL D.J. et ALBERTI G. 1998. Effects of long-term, geogenic heavy metal contamination on soil organic matter and microarthropod communities, in particular Collembola. *Appl. Soil Ecol.*, 9(1-3): 483-488.
- SALEMAA M., VANHA-MAJAMAA I. et DEROME J. 2001. Understorey vegetation along a heavy-metal pollution gradient in SW Finland. *Environ. Pollut.*, 112: 339-350.
- SALMINEN J. et HAIMI J. 1999. Horizontal distribution of copper, nickel and enchytraeid worms in polluted soil. *Environ. Pollut.*, 104(3): 351-358.
- SALT D., BLAYLOCK M., KUMAR N.P.B.A., DUSHENKOV V., ENSLEY B.D., CHET I. et RASKIN I. 1995. Phytoremediation : a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnol.*, 13: 468-474.
- SALT D. et BAKER A.J.M. 2000. Phytoremediation of metals. In: *Biotechnology Environmental Processes II, Soil Decontamination*. Rehm H.J. et Reed G. (Eds), 385-397.
- SALT D.E., BENHAMOU N., LESZCZYŃECKA M., RASKIN I. et CHET I. 1999. A possible role for rhizobacteria in water treatment by plant roots. *Int. J. Phytoremediat.*, 1(1): 67-79.

- SALT D.E., KATO N., KRÄMER U., SMITH R.D. et RASKIN I.** 2000. The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. LCC C.P. (Eds), 189-199.
- SANKA M., STRNAD M., VONDRA J. et PATERSON E.** 1995. Sources of soil and plant contamination in an urban environment and possible assessment methods. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 59: 327-343.
- SAPPIN-DIDIER V. et GOMEZ A.** 1994. Réhabilitation des sols pollués par des métaux toxiques. Exemple de l'apport de grenaille d'acier. *Anal. Mag.*, 22(2): 28-30.
- SAUVÉ S., MCBRIDE M. et HENDERSHOT W.** 1995. Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 373-379.
- SAUVÉ S., MARTINEZ C.E., MCBRIDE M. et HENDERSHOT W.** 2000a. Adsorption of free lead (Pb^{+2}) by pedogenic oxides, ferrihydrite, and leaf compost. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64(2): 595-599.
- SAUVÉ S., NORVELL W.A., MCBRIDE M. et HENDERSHOT W.** 2000b. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environ. Sci. Technol.*, 34(2): 291-296.
- SCHOLTUS N.** 2003. Altération pédogénétique des argillites du callovo-Oxfordien soumise à la végétalisation. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, Nancy, 169p.
- SCHWARTZ C.** 1997. Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, Nancy, 180p.
- SCHWARTZ C., FETZER K.D. et MOREL J.L.** 1997. Factors of contamination of garden soils by heavy metals. 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, ICOBTE '97, Paris, France, 9p.
- SCHWARTZ C. et MOREL J.L.** 1998. How can agronomical practices improve phytoremediation of heavy metal contaminated soils ? Proceedings of the 6th Int FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, ConSoil'98, London, Telford T. (Ed), 609-617.
- SCHWARTZ C., LEYVAL C. et MOREL J.L.** 1999a. Réhabilitation des sols urbains : intérêt de la voie biologique. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 85(2): 153-161.
- SCHWARTZ C., MOREL J.L., SAUMIER S., WHITING S.N. et BAKER A.J.M.** 1999b. Root development of the Zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant Soil*, 208: 103-115.
- SCHWARTZ C., FLORENTIN L., CHARPENTIER D., MUZIKA S. et MOREL J.L.** 2001a. Le pédologue en milieux industriels et urbains. I. Sols d'une friche industrielle. *Etude et Gestion des Sols*, 8(2): 135-148.
- SCHWARTZ C., GÉRARD E., PERRONNET K. et MOREL J.L.** 2001b. Measurement of *in situ* phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former zinc smelter. *Sci. Total Environ.*, 279(1-3): 215-221.
- SCHWARTZ C., GUIMONT S., SAISON C., PERRONNET K. et MOREL J.L.** 2001c. Phytoextraction of Cd and Zn by the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by plant size and origin. *S. Afr. J. Sci.*, 97: 561-564.
- SCHWARTZ C., ECHEVARRIA G. et MOREL J.L.** 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil*, 249(1): 27-35.
- SHALLARI S.** 1997. Disponibilité du nickel pour l'hyperaccumulateur *Alyssum murale*. Thèse de Doctorat de l'INPL, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 125p.
- SHALLARI S., SCHWARTZ C., HASKO A. et MOREL J.L.** 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci. Total Environ.*, 209: 133-142.
- SHEN Z.G., ZHAQ F.J. et MCGRATH S.P.** 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant Cell Environ.*, 20: 898-906.
- SHUMAN L.M.** 1999. Organic waste amendments effect on zinc fractions of two soils. *J. Environ. Qual.*, 28: 1442-1447.
- SINAJ S., MÄCHLER F. et FROSSARD E.** 1999. Assessment of isotopically exchangeable zinc in polluted and non polluted soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1618-1625.
- SLAVEK J., WALLER P. et PICKERING W.F.** 1990. Labile metal content of sediments--fractionation scheme based on ion-exchange resins. *Talanta*, 37(4): 397-406.
- SMOLDERS E., BRANS K., FÖLDI A. et MERCKX R.** 1999. Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 78-85.
- SRIVASTAVA S., PRAKASH S. et SRIVASTAVA M.M.** 1999. Chromium mobilization and plant availability: the impact of organic complexing ligands. *Plant Soil*, 212: 203-208.

- STAHL R.S. et JAMES B.R.** 1991. Zinc sorption by B horizon soils as a function of pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **55**: 1592-1597.
- STEELE M.C. et PICHEL J.** 1998. Ex-situ remediation of a metal-contaminated Superfund soil using selective extractants. *J. Environ. Eng.*, **124(7)**: 639-645.
- TAKAGI S.** 1976. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **22**: 423-433.
- TERRY N., CARLSON C., RAAB T.K. et ZAYED A.M.** 1992. Rates of selenium volatilization among crop species. *J. Environ. Qual.*, **21**: 341-344.
- TESSIER A., CAMPBELL P.G.C. et BISSON N.** 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, **51**: 844-850.
- THIRY M. et VAN OORT F.** 1999. De l'échantillonnage à la spéciation : pertinence des analyses minéralogiques par diffraction des rayons X dans les sites et sols pollués par des métaux. In: *Spéciation des métaux dans les sols*. ECRIN A. (Eds), Paris, 96-107.
- THORNTON I.** 1988. Metal content of soils and dusts. Morgan H (Ed). The Shipham Report. *Sci. Total Environ.*, **75**: 21-39.
- TIFFIN L.O.** 1976. The form and the distribution of metals in plants : an overview. Biological implications of Metals in the Environment. Energy Research and Development Administration Symposium, Richland, Drucker H. et Wildung R.E. (Eds), 315-333.
- TIPPING E., RIEUWERTS J., PAN G., ASHMORE M.R., LOFTS S., HILL M.T.R., FARAGO M.E. et THORNTON I.** 2003. The solid-solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environ. Pollut.*, **125(2)**: 213-225.
- TOLRÀ R.P., POSCHENRIEDER C., ALONSO R., BARCELO D. et BARCELO R.** 2001. Influence of zinc hyperaccumulation on glucosinolates in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.*, **151**: 621-626.
- TORRES M.O. et VARENNES A.** 1998. Remediation of a sandy soil artificially contaminated with copper using polyacrylate polymer. *Soil Use Manage.*, **14(2)**: 106-110.
- TU C., ZHENG C.R. et CHEN H.M.** 2000. Effect of applying chemical fertilizers on forms of lead and cadmium in red soil. *Chemosphere*, **41**: 133-138.
- UHLIG C., SALEMAA M., VANHA-MAJAMAA I. et DEROME J.** 2001. Element distribution in *Empetrum nigrum* microsites at heavy metal contaminated sites in Harjavalta, western Finland. *Environ. Pollut.*, **112(3)**: 435-442.
- URASA I.T. et MACHA S.F.** 1999. Investigations into heavy metal uptake by waste water sludges. *Water Air Soil Pollut.*, **109(1-4)**: 207-218.
- UREN N.C. et REISENAUER H.M.** 1988. The role of root exudates in nutrient acquisition. *Adv. Plant Nutr.*, **3**: 79-114.
- VAN DER LEE J. et DE WINDT L.** 1999. CHESS Tutorial and Cookbook. *Ecole des Mines de Paris*, Fontainebleau, France, 77 p.
- VANGRONSVELD J., STERCKX J., VAN ASSCHE F. et CLIJSTER H.** 1995a. Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping ground: effects of revegetation and metal immobilization by beringite. *J. Geochem. Explor.*, **52**: 221-229.
- VANGRONSVELD J., VAN ASSCHE F. et CLIJSTER H.** 1995b. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environ. Pollut.*, **87**: 51-59.
- VÁZQUEZ M.D., BARCELO D., POSCHENRIEDER C., MADICO J., HATTON P., BAKER A.J.M. et COPE G.H.** 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that hyperaccumulate both metals. *J. Plant Physiol.*, **140**: 350-355.
- VON WIRÉN N.** 1994. Iron efficiency in graminaceous plant species and the role of the microbial degradation of phytosidérophores in iron acquisition. Dissertation Universität Hohenheim, Institut für Pflanzenernährung, Stuttgart, 130p.
- VOUTSA D., GRIMANIS A. et SAMARA C.** 1996. Trace elements in vegetables grown in an industrial area in relation to soil and air particulate matter. *Environ. Pollut.*, **94(3)**: 325-335.
- WASAY S.A., BARRINGTON S.F. et TOKUNAGA S.** 1998. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *Environ. Techn.*, **19(4)**: 369-379.
- WATKINSON J.H. et KEAR M.J.** 1996. Sulfate and mineralisable organic sulfur in pastoral soils of New Zealand. II. A soil test for mineralisable organic sulfur. *Aust. J. Soil. Res.*, **34**: 405-412.

- WENZEL W., BUNKOWSKI M., PUSCHENREITER M. et HORAK O. 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ. Pollut.*, 123: 131-138.
- WHITE M., BACKER F., CHANEY R.L. et DECKER A.M. 1981a. Metal complexation in the xylem fluid. II. Theoretical equilibrium model and computational computer program. *Plant Physiol.*, 67: 301-310.
- WHITE M., DECKER A.M. et CHANEY R.L. 1981b. Metal complexation in the xylem fluid. I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. *Plant Physiol.*, 67: 292-300.
- WHITING S. 1998. Metal mobilisation and uptake by the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. University of Sheffield, UK, 208p.
- WHITING S., LEAKE J.R., MCGRATH S.P. et BAKER A.J.M. 2000. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.*, 145: 199-210.
- WHITING S., DE SOUZA M.P. et TERRY N. 2001a. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *T. caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 3144-3150.
- WHITING S., LEAKE J.R., MCGRATH S.P. et BAKER A.J.M. 2001b. Zinc accumulation by *T. caerulescens* from soils with different Zn availability: a pot study. *Plant Soil*, 236: 11-18.
- WONG J.S.H., HICKS R.E. et PROBSTEIN R.F. 1997. EDTA-enhanced electroremediation of metal-contaminated soils. Electrochemical decontamination of soil and water. *J. Hazard. Mater.*, 55(1-3): 61-79.
- WU Q.T. 1989. Biodisponibilité du cadmium dans des systèmes sol-plante. Thèse de Doctorat de l'INPL, Nancy,
- YANG Z.M., SIVAGURU M., HORST W.J. et MATSUMOTO H. 2000. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum*, 110: 72-77.
- YIN Y., IMPELLITTERI C.A., YOU S.-J. et ALLEN H.E., 2002, The importance of organic matter distribution and extract soil:solution ratio on the desorption of heavy metals from soils, *Sci. Total Environ.*, 287(1-2): 107-119.
- ZACHARA J.M., SMITH S.C., RESCH C.T. et COWAN C.E., 1993, Cadmium sorption on specimen and soil smectites in sodium and calcium electrolytes, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 57: 1492-1501.
- ZHANG H., DAVISON W., KNIGHT B. et MCGRATH P. 1998. *In situ* measurements of solution concentration and fluxes of trace metals in soils using DGT. *Environ. Sci. Technol.*, 32(5): 704-710.
- ZHANG T.C. et PANG H. 1999. Applications of microelectrode techniques to measure pH and oxidation-reduction potential in rhizosphere soil. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 1293-1299.
- ZHANG P. et RYAN J.A. 1998. Formation of pyromorphite in anglesite-hydroxyapatite suspensions under varying pH conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 32(21): 3318-3324.
- ZHAO F., HAMON R.E., LOMBI E., MCLAUGHLIN M.J. et MCGRATH P. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 53(368): 535-543.
- ZHAO F.J., LOMBI E. et MCGRATH S.P. 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil*, 249(1): 37-43.
- ZORNOZA P., ROBLES S. et MARTIN N. 1999. Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants. *Plant Soil*, 208(2): 221-226.



Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques agronomiques des terres métallifères prospectées

		A1	A2	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2
A		2,7	22,7	7,6	10,4	5,1	4,4	5,9	15	1,5
LF		4,1	13,5	10,4	12,0	4,5	3,2	6,2	18,7	2,5
LG	%	4,6	7,2	9,3	11,2	7,4	5,1	12,7	9,3	1,1
SF		25,2	13,5	12,2	27,4	39,5	33,7	54,4	18,9	9,0
SG		63,4	43,1	60,5	39,0	43,5	53,6	20,8	31,8	85,9
pH eau		7,2	7,6	7,4	7,2	7,4	7,5	7,4	7,9	8,3
CaCO ₃ total	%	4,4	7,3	64,4	52,0	80,9	84,7	81,5	37,4	79,6
CaCO ₃ actif	%		<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3
P ₂ O ₅ Olsen	‰	0,010	0,007	0,002	0,018	0,002	0,003	0,002	0,008	0,002
S-SO ₄	mg kg ⁻¹	19,5	13,3	133,1	102,6	333,5	52,3	198,2	15,7	11,0
CEC		2,4	8,8	9,1	8,0	0,5	2,2	0,8	7,0	0,5
Ca		4,4	18,3	7,5	8,3	4,7	2,6	2,5	7,7	0,9
Na	cmol kg ⁻¹	0,019	0,019	0,017	0,024	0,011	0,007	0,028	0,022	0,008
Mg		0,21	1,39	2,58	2,35	1,51	1,04	1,54	1,99	0,59
K		0,091	0,314	0,100	0,282	0,025	0,028	0,051	0,191	0,017
Corg		1,63	2,13	2,70	3,37	0,74	0,80	0,38	2,63	0,68
MO	%	2,81	3,67	4,65	5,79	1,27	1,37	0,65	4,53	1,18
Norg		0,072	0,111	0,106	0,198	0,020	0,047	0,024	0,162	0,010
C/N		22,7	19,2	25,5	17,0	37,0	16,9	15,7	16,2	68,5
Cu		28,5	12,6	49,4	118	36,4	15,5	48,2	9,5	5,2
Zn		15800	7280	29400	13300	7810	6790	7970	32200	30900
Ni	HF mg kg ⁻¹	14,6	18,4	8,0	8,4	5,2	4,0	4,6	13,0	2,0
Pb		2590	971	9660	7730	1950	2020	2970	1970	483
Cd		82,8	50,0	108,5	74,1	49,5	39,7	58,1	50,9	81,3

		C'2	C3	D1	D2	E1	E2	F1	G1	G2
A		2,0	6,0	14,5	11,4	11,3	8,0	16,4	10,4	13,1
LF		2,4	10,6	16,6	29,0	14,9	9,6	35,4	38,4	18,0
LG	%	9,0	7,5	15,8	21,9	13,9	10,4	22,2	16,9	14,3
SF		3,5	14,3	22,4	12,6	31,5	21,8	15,9	10,0	11,9
SG		91,2	61,6	30,7	25,1	28,4	50,2	10,1	24,3	42,7
pH eau		8,3	7,6	7,0	7,2	7,4	7,1	7,4	6,9	6,1
CaCO ₃ total	%	77,7	65,3	13,0	15,2	42,3	34,0	0,2	1,9	0,3
CaCO ₃ actif	%	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3		
P ₂ O ₅ Olsen	‰	0,034	0,014	0,049	0,033	0,017	0,029	0,007	0,017	0,036
S-SO ₄	mg kg ⁻¹	11,5	75,0	50,7	19,9	73,2	98,7	18,5	50,0	21,8
CEC		0,7	2,0	35,5	9,7	4,1	2,5	26,7	8,5	21,1
Ca		1,7	4,5	23,9	4,1	3,7	3,2	2,9	4,3	13,3
Na	cmol kg ⁻¹	0,008	0,009	0,063	0,019	0,015	0,008	0,048	0,030	0,031
Mg		0,56	0,60	5,83	0,68	0,57	0,40	24,40	0,59	2,72
K		0,019	0,079	0,505	0,149	0,076	0,083	0,202	0,221	0,293
Corg		0,80	1,72	13,20	4,82	3,82	1,95	2,88	8,42	7,42
MO	%	1,38	2,96	22,70	8,29	6,59	3,36	4,95	14,48	12,76
Norg		0,029	0,086	0,839	0,302	0,096	0,059	0,308	0,246	0,509
C/N		27,7	20,0	15,7	16,0	39,9	33,1	9,35	34,2	14,6
Cu		4,1	9,4	174,0	210,0	88,5	128,0	40,2	4610,0	361,0
Zn		29000	96100	56900	82700	35400	41500	379	35600	7230
Ni	HF mg kg ⁻¹	2,3	5,4	33,5	64,1	23,7	32,7	1840,0	81,9	40,4
Pb		553	25700	24500	27300	25200	13600	81	21800	2020
Cd		77,4	214,5	276,4	348,3	301,1	274,8	1,6	215,8	66,3

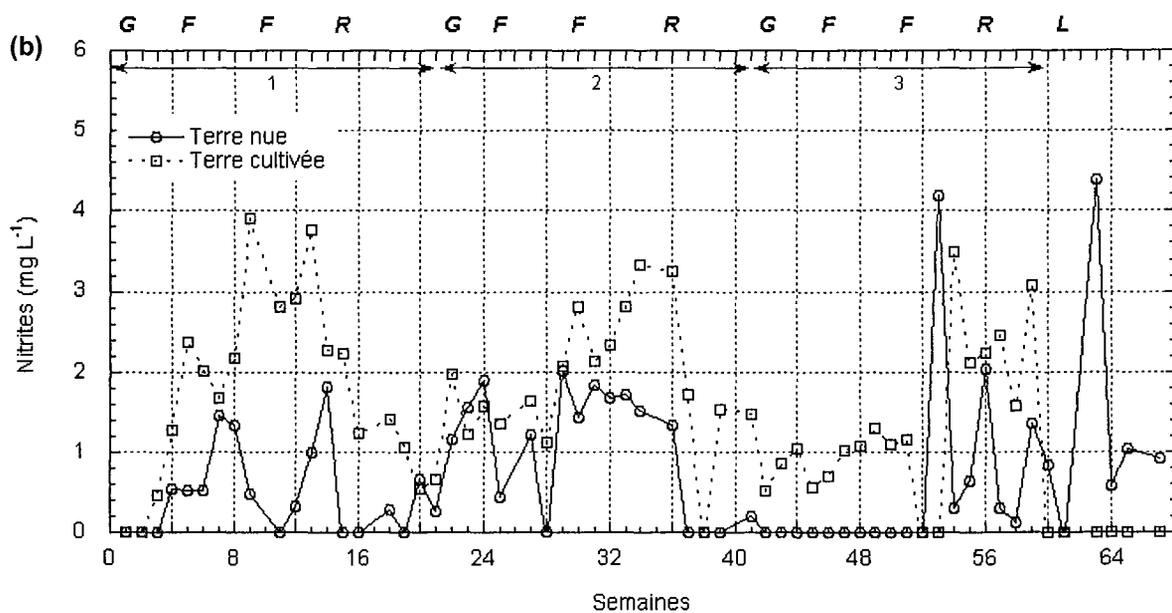
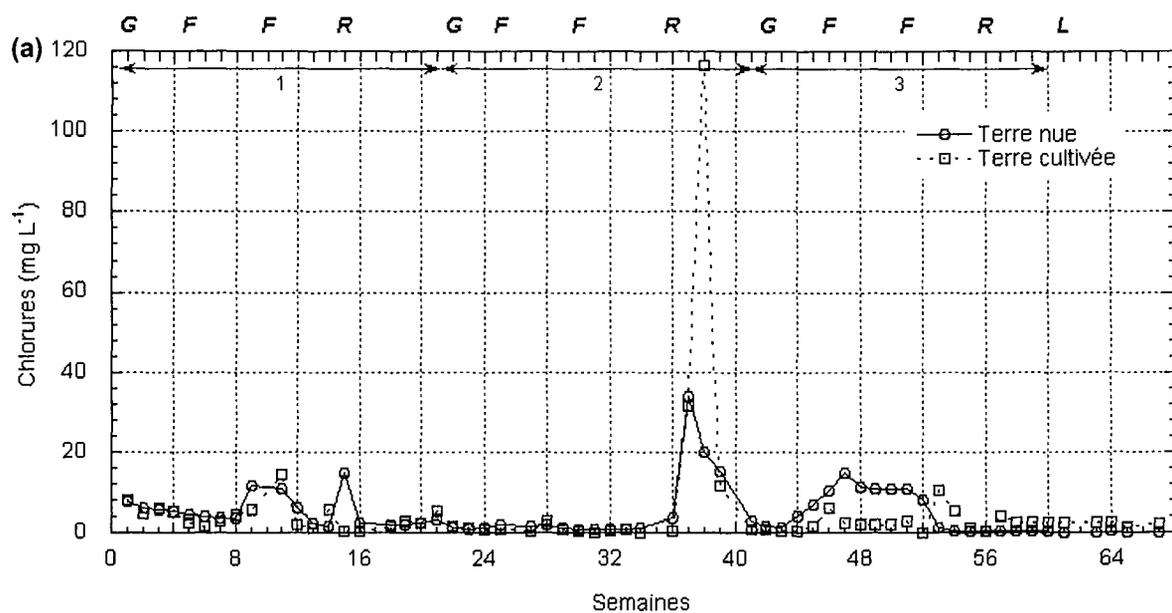
		G3	G4	H1	H2	I1	I2
A		10,1	12,2	3,9	8,3	10,6	8,2
LF		17,9	22,1	4,8	12,8	16,2	31,3
LG	%	11,8	12,5	4,0	9,0	20,6	15,0
SF		13,8	12,0	16,1	11,4	26,1	18,5
SG		46,4	41,2	71,2	58,5	26,5	27,0
pH eau		5,8	6,7	7,4	6,5	6,7	7,0
CaCO ₃ total	%	0,2	0,4	4,5	0,2	10,5	28,4
CaCO ₃ actif	%					<1,3	2,6
P ₂ O ₅ Olsen	‰	0,077	0,016	0,011	0,011	0,033	0,090
S-SO ₄	mg kg ⁻¹	26,4	19,6	14,8	8,0	25,5	213,0
CEC		14,3	8,7	3,6	4,2	9,4	2,8
Ca		4,5	5,1	1,6	2,1	2,8	3,0
Na	cmol kg ⁻¹	0,044	0,021	0,004	0,015	0,010	0,040
Mg		1,40	0,88	0,58	0,28	0,79	0,39
K		0,410	0,238	0,113	0,096	0,289	0,191
Corg		13,59	7,14	1,59	1,44	5,84	3,73
MO	%	23,37	12,28	2,74	2,48	10,04	6,41
Norg		0,536	0,272	0,081	0,078	0,386	0,135
C/N		25,4	26,3	19,6	18,5	15,1	27,6
Cu		1090,0	443,0	49,8	27,4	64,3	207,0
Zn		15400	15400	20900	707	34700	75500
Ni	HF mg kg ⁻¹	52,3	46,3	27,5	26,1	28	51,6
Pb		5360	3570	4380	18800	12100	143000
Cd		148,1	126,6	73,3	2,8	149,2	295,9

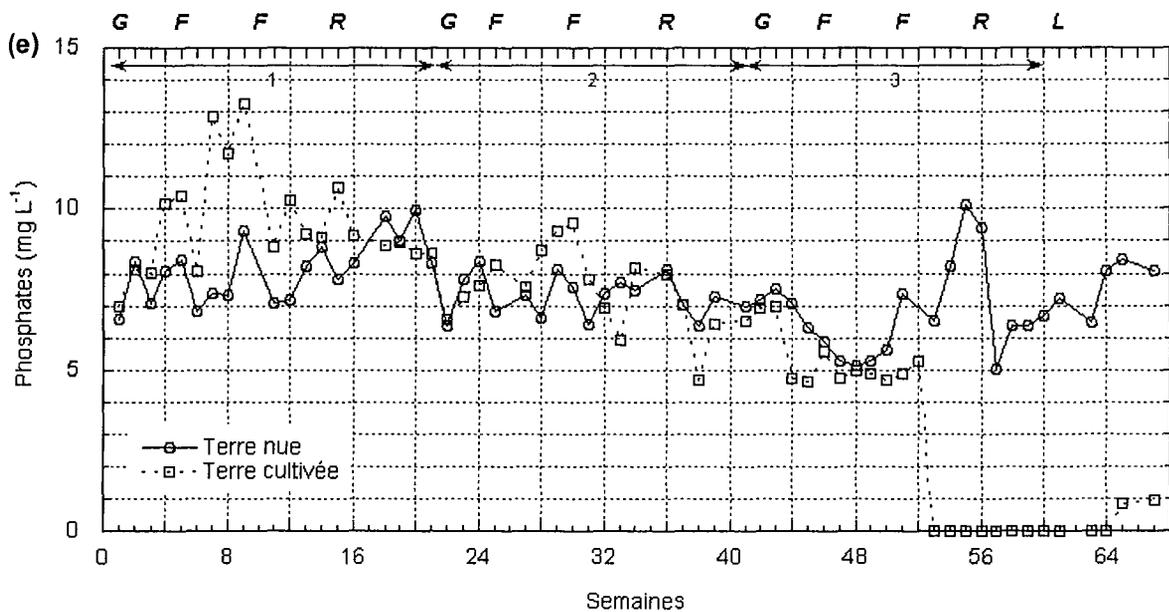
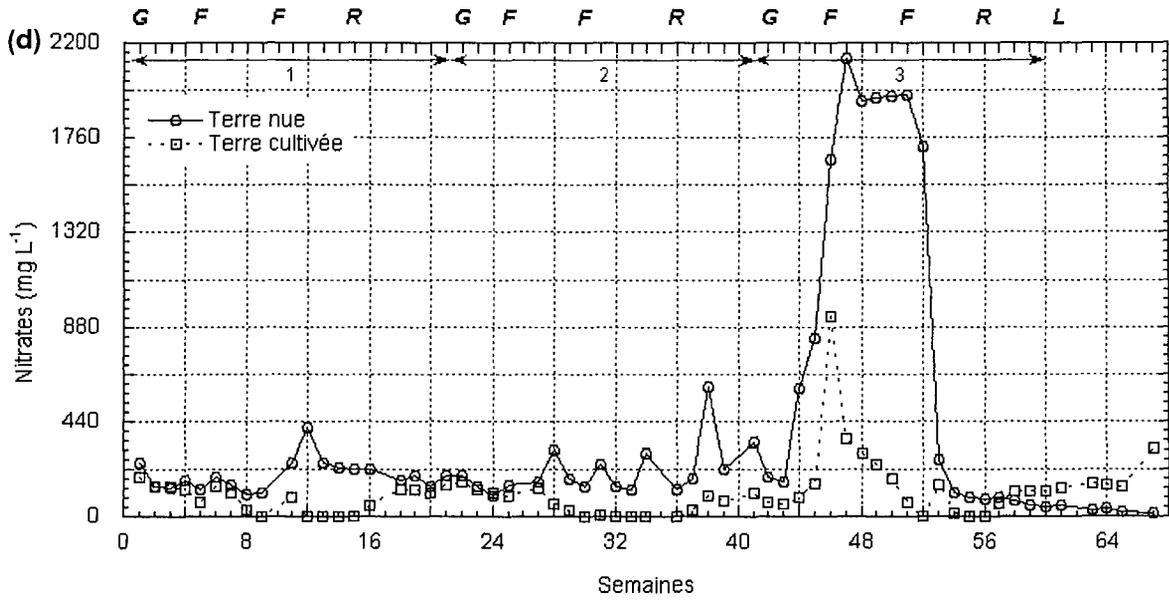
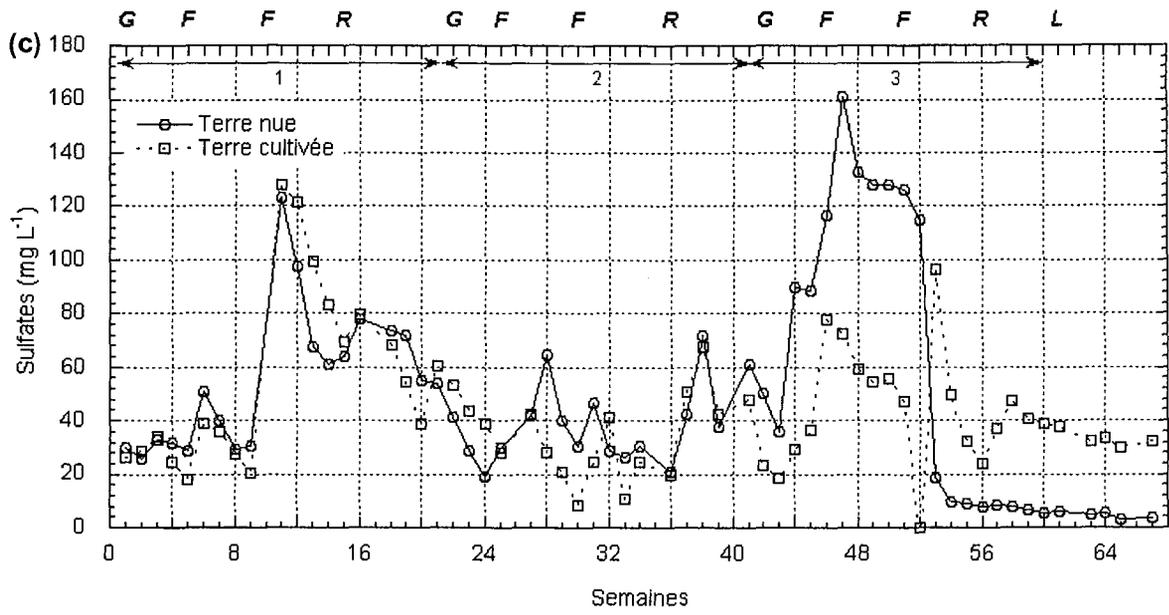
Annexe 2 : Paramètres de cinétique d'échange isotopique des terres métallifères prospectées
(moyenne \pm écart type)

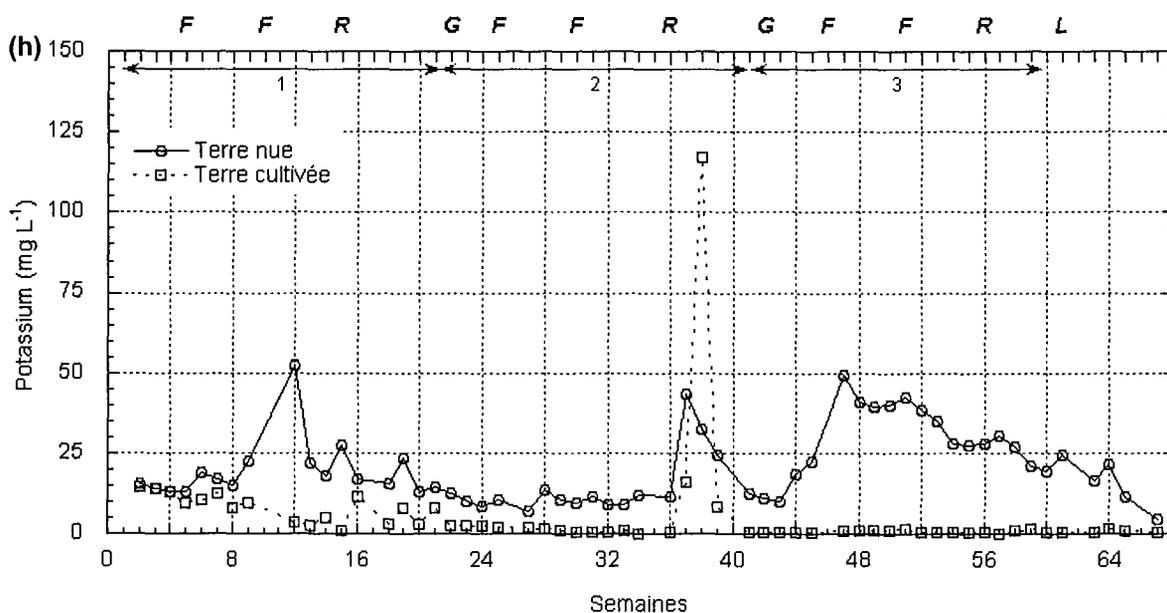
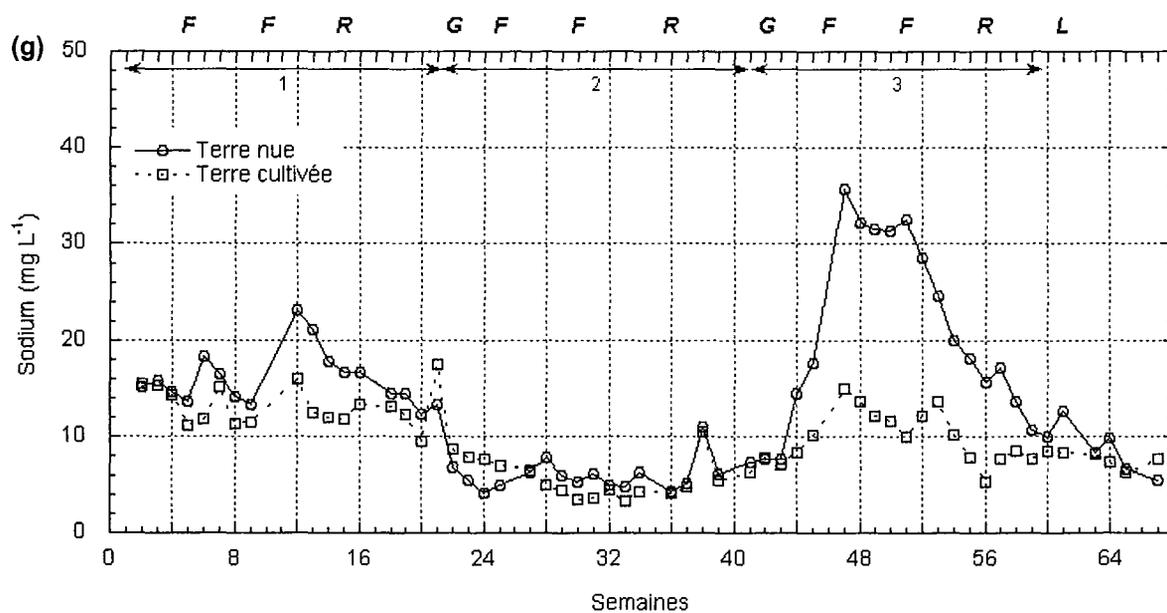
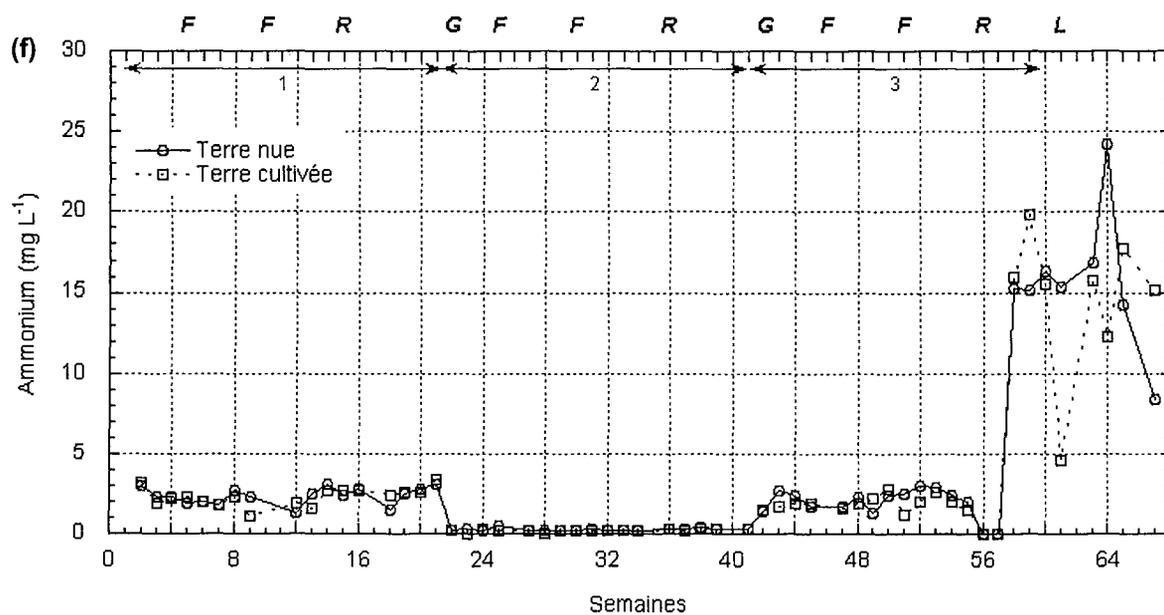
	C _{Cd} μg l ⁻¹	n	r ₁ /R	FC l kg ⁻¹	E _{0-1min} mg kg ⁻¹	E _{1min-24h} mg kg ⁻¹	E _{24h-3mois} mg kg ⁻¹	E _{3mois-1an} mg kg ⁻¹	E _{>1 an} mg kg ⁻¹	Cd total mg kg ⁻¹
A1	589,0 ± 11,8	0,20 ± 0,01	0,57 ± 0,01	5,48 ± 0,18	6,39 ± 0,21	15,70 ± 1,19	17,32 ± 1,31	5,85 ± 0,29	37,12 ± 2,77	82,4
A2	200,0 ± 4,0	0,21 ± 0,03	0,17 ± 0,03	15,87 ± 2,06	9,75 ± 1,26	16,33 ± 2,53	10,52 ± 1,11	2,57 ± 0,17	10,81 ± 2,90	50,0
B1	177,0 ± 3,5	0,34 ± 0,02	0,17 ± 0,02	19,64 ± 0,97	2,11 ± 0,10	19,07 ± 2,83	36,44 ± 3,86	12,43 ± 0,09	38,45 ± 6,72	108,5
B2	131,9 ± 2,6	0,28 ± 0,01	0,13 ± 0,01	25,06 ± 1,49	3,88 ± 0,23	18,40 ± 1,05	22,53 ± 0,84	6,63 ± 0,10	22,71 ± 1,83	74,1
B3	331,5 ± 6,6	0,41 ± 0,03	0,32 ± 0,03	10,37 ± 0,27	1,67 ± 0,04	17,98 ± 2,89	19,87 ± 0,30	3,71 ± 0,73	6,29 ± 2,05	49,5
B4	427,0 ± 8,5	0,35 ± 0,01	0,43 ± 0,01	7,55 ± 0,14	1,89 ± 0,04	13,05 ± 0,53	14,49 ± 0,24	3,25 ± 0,11	7,05 ± 0,64	39,7
B5	402,6 ± 8,0	0,32 ± 0,01	0,40 ± 0,01	8,17 ± 0,17	2,66 ± 0,06	16,27 ± 0,86	20,02 ± 0,70	5,24 ± 0,09	13,92 ± 1,43	58,1
C1	94,6 ± 1,9	0,34 ± 0,02	0,09 ± 0,02	34,23 ± 1,06	3,49 ± 0,11	20,21 ± 1,98	16,95 ± 0,26	3,32 ± 0,37	6,97 ± 1,72	50,9
C2	438,1 ± 8,8	0,47 ± 0,03	0,41 ± 0,03	8,59 ± 2,48	0,87 ± 0,07	18,79 ± 4,02	38,90 ± 2,63	8,94 ± 1,53	13,83 ± 5,10	81,3
C2'	259,5 ± 5,2	0,44 ± 0,03	0,26 ± 0,03	1,10 ± 0,01	1,10 ± 0,01	18,57 ± 3,33	34,62 ± 2,53	8,35 ± 1,08	14,75 ± 4,77	77,4
C3	280,0 ± 5,6	0,46 ± 0,01	0,27 ± 0,01	12,61 ± 0,67	1,21 ± 0,06	27,09 ± 2,27	87,68 ± 4,38	31,97 ± 0,52	66,55 ± 6,20	214,5
D1	129,2 ± 2,6	1,30 ± 1,31	1,84 ± 1,31	17,13 ± 7,22	4,80 ± 2,02	179,58 ± 85,01	74,07 ± 64,63	8,22 ± 9,38	9,73 ± 13,14	276,4
D2	226,6 ± 4,5	0,15 ± 0,02	0,23 ± 0,02	13,90 ± 0,80	19,46 ± 1,11	32,57 ± 6,37	37,43 ± 9,80	14,64 ± 3,89	244,20 ± 19,06	348,3
E1	449,4 ± 9,0	0,13 ± 0,02	0,45 ± 0,02	6,95 ± 0,22	18,37 ± 0,57	25,75 ± 4,05	27,81 ± 5,74	10,75 ± 2,28	218,42 ± 11,65	301,1
E2	698,2 ± 14,0	0,11 ± 0,01	0,68 ± 0,01	4,69 ± 0,12	12,63 ± 0,31	14,43 ± 2,12	15,27 ± 2,95	6,02 ± 1,25	226,45 ± 6,16	274,1
F1	15,5 ± 0,3	1,23 ± 0,64	0,01 ± 0,64	232,94 ± 56,56	0,94 ± 0,23	0,67 ± 0,23	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,6
G1	369,8 ± 7,4	0,14 ± 0,01	0,37 ± 0,01	8,32 ± 0,15	18,78 ± 0,33	25,52 ± 3,40	25,56 ± 3,96	9,33 ± 1,35	136,62 ± 8,74	215,8
G2	152,7 ± 3,0	0,21 ± 0,03	0,14 ± 0,03	10,29 ± 0,93	10,29 ± 0,93	19,76 ± 2,31	14,85 ± 1,45	3,93 ± 0,11	17,50 ± 3,09	66,3
G3	304,9 ± 6,1	0,15 ± 0,00	0,31 ± 0,00	9,83 ± 0,12	14,89 ± 0,18	22,65 ± 0,82	22,16 ± 0,96	7,75 ± 0,30	80,65 ± 1,92	148,1
G4	218,4 ± 4,4	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,02	12,25 ± 0,40	26,99 ± 0,89	38,87 ± 3,43	25,05 ± 1,22	6,37 ± 0,09	29,32 ± 4,05	126,6
H1	439,6 ± 8,8	0,13 ± 0,03	0,42 ± 0,03	7,06 ± 0,35	8,61 ± 0,42	10,32 ± 2,75	9,43 ± 2,85	3,23 ± 0,87	41,71 ± 6,10	73,29
H2	644,0 ± 12,9	0,07 ± 0,03	0,69 ± 0,03	4,10 ± 0,23	0,42 ± 0,02	0,22 ± 0,10	0,18 ± 0,09	0,06 ± 0,03	1,91 ± 0,20	2,8
I1	365,7 ± 7,3	0,09 ± 0,00	0,34 ± 0,00	8,97 ± 0,47	13,13 ± 0,68	10,19 ± 0,64	9,07 ± 0,58	3,30 ± 0,21	113,51 ± 1,97	149,2
I2	499,5 ± 10,0	0,11 ± 0,01	0,52 ± 0,01	6,25 ± 0,19	7,14 ± 0,22	7,89 ± 0,54	8,49 ± 0,80	3,43 ± 0,36	268,95 ± 1,70	295,9

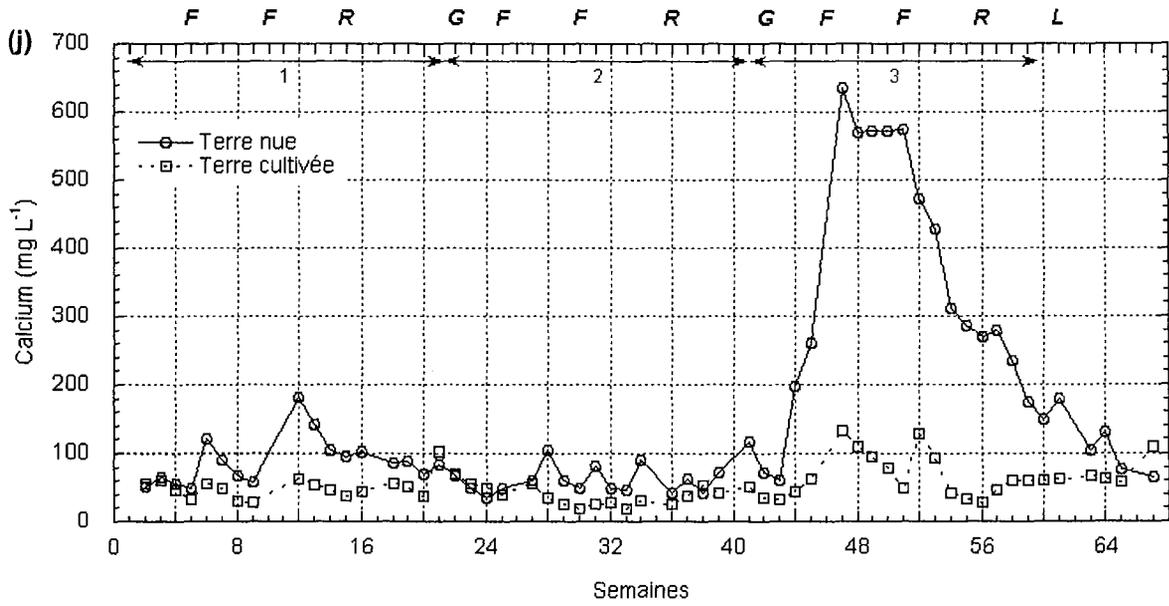
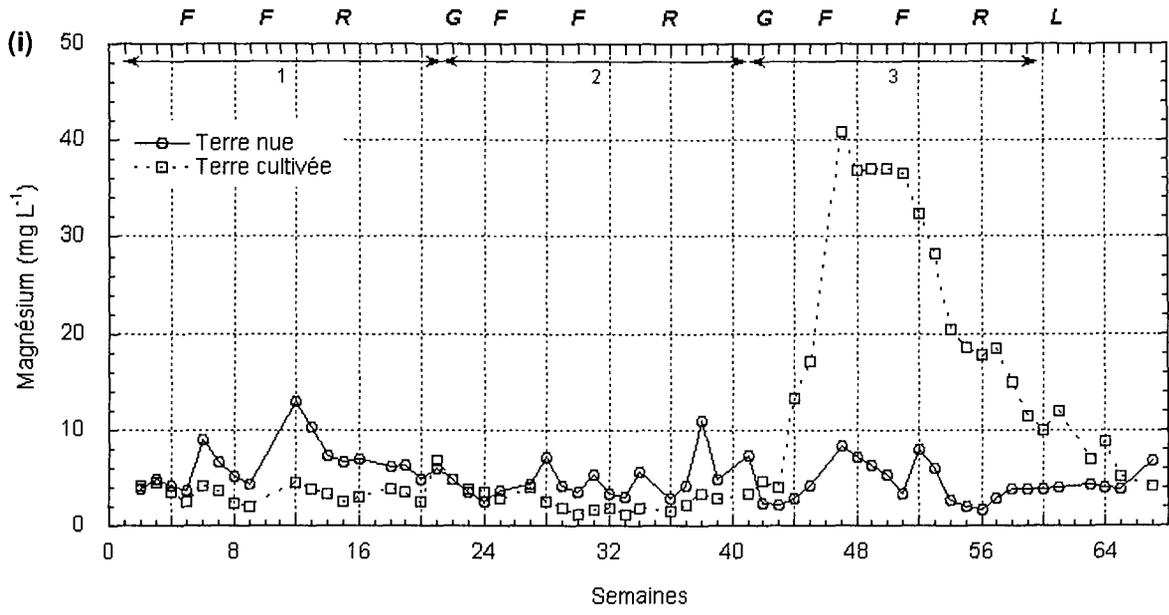
Annexe 3 : Evolution des concentrations en éléments majeurs dans la solution de la terre S3 sous l'effet de cultures successives de *Thlaspi caerulescens* et d'une culture de laitue

- (a) Concentrations en chlorures
- (b) Concentrations en nitrites
- (c) Concentrations en sulfates
- (d) Concentrations en nitrates
- (e) Concentrations en phosphates
- (f) Concentrations en ammonium
- (g) Concentrations en sodium
- (h) Concentrations en potassium
- (i) Concentrations en magnésium
- (j) Concentrations en calcium











**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Sylvain PELLERIN, Directeur de Recherche, INRA, Villenave d'Ornon

Monsieur Jean-Charles MUNCH, Professeur, Institut für Bodenökologie, Neuherberg, Allemagne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame SCHMITT épouse SIRGUEY Catherine

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

« Dynamique du Cd disponible du sol sous l'influence de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens* »

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANCEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

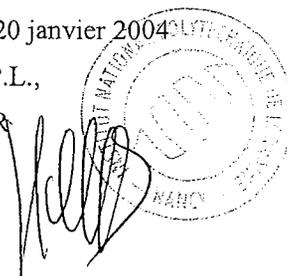
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

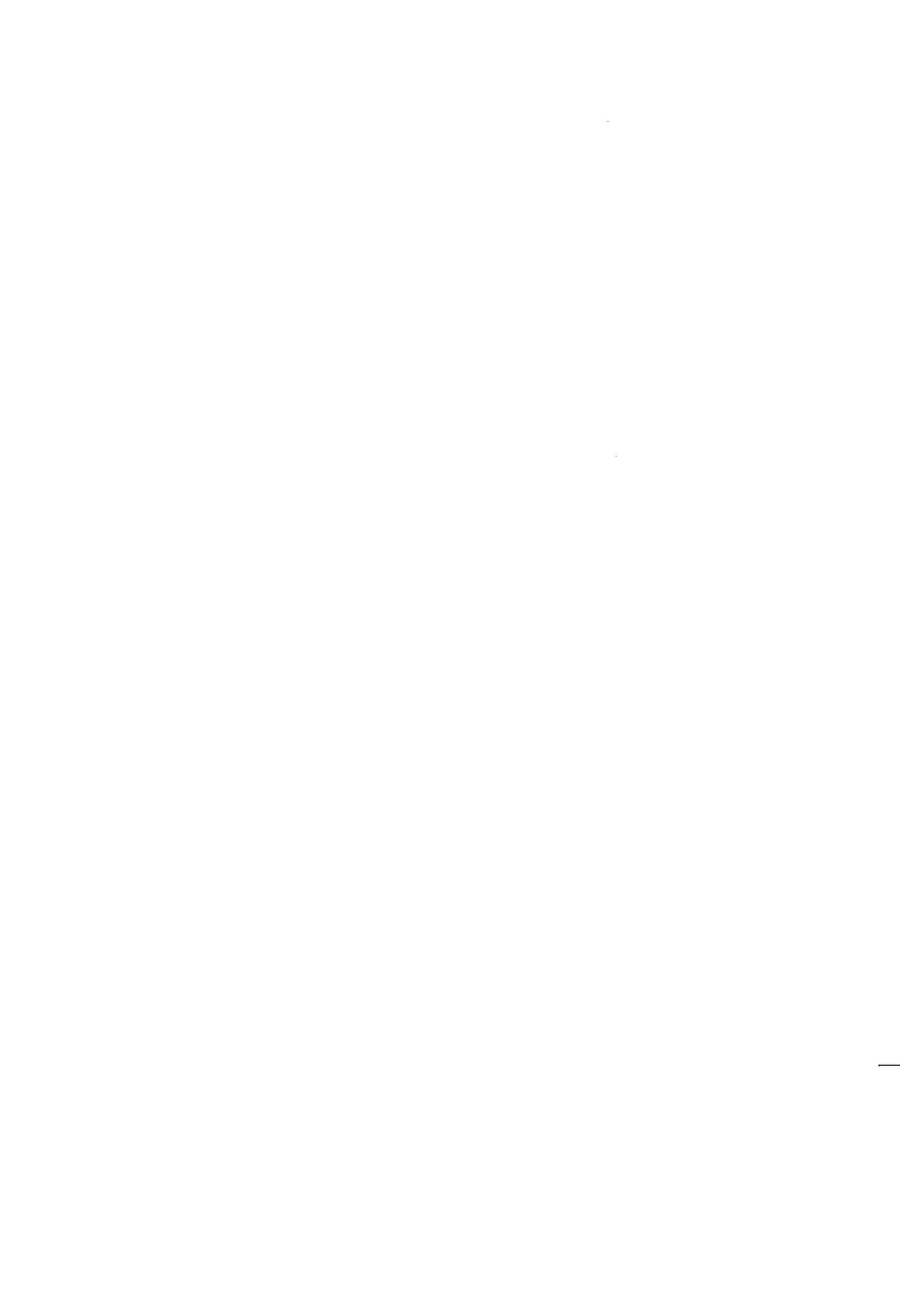
Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 20 janvier 2004

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER





La plante hyperaccumulatrice de Zn et de Cd, *Thlaspi caerulescens*, est l'un des candidats les plus prometteurs en vue d'une application à grande échelle de la phytoextraction. Ce travail a été entrepris afin de mieux comprendre les interactions entre la fourniture des métaux par la phase solide du sol, ou biodisponibilité, et l'hyperaccumulation du Cd par *T. caerulescens* dans le cadre de scénarios de phytoextraction. Des populations contrastées de *T. caerulescens* ont été étudiées dans leur milieu naturel (friches industrielles de mines de Zn/Pb et de fonderie de Zn ; site de serpentine à concentration élevée du Ni géochimique). Les relations existant entre les paramètres du sol, et en particulier la biodisponibilité des métaux, et l'hyperaccumulation chez ces plantes ont été analysées. Quatre populations ont été sélectionnées pour leur aptitude différente à accumuler les métaux. Cent individus de chaque population ont été cultivés en vases de végétation afin de mettre en évidence des différences génétiques entre les populations. Des individus des mêmes populations ont également été cultivés en conditions climatiques réelles. L'impact de *T. caerulescens* sur le compartiment biodisponible des métaux a été étudié à l'aide de cultures successives d'une même population dans des systèmes lysimétriques équipés pour suivre l'évolution des compartiments eau-sol-plantes des métaux. Nos résultats montrent que la concentration du Cd biodisponible est le principal facteur gouvernant l'absorption du métal. Ainsi, il est possible de prédire la concentration du Cd dans les feuilles de *T. caerulescens* à partir de paramètres du sol facilement et rapidement mesurables (Cd extractible au CaCl₂, pH et CEC). Nous avons également mis en évidence des différences génétiques. Les populations hyperaccumulatrices de Cd et de Zn se distingueraient alors de celles hyperaccumulatrices de Ni par la présence d'un transporteur efficace du Cd dans la membrane plasmique racinaire des plantes. Parmi les populations hyperaccumulatrices de Cd, certaines présenteraient une absorption et une translocation du Cd plus efficace et indépendante de l'absorption du Zn, suggérant des mécanismes distincts. Il a également été montré qu'une faible fraction du Cd prélevé par *T. caerulescens* proviendrait du compartiment du Cd du sol non labile. Au cours de la phytoextraction, les plantes agissent en premier lieu sur le compartiment soluble des métaux du sol, celui-ci étant réapprovisionné par le compartiment biodisponible. En fonction de la capacité tampon des terres, le compartiment biodisponible du Cd pourra être plus ou moins réapprovisionné par ceux moins échangeables. Enfin, nous avons démontré qu'il était possible de prédire le rendement d'extraction du Cd à partir d'un modèle simplifié prenant en compte la biodisponibilité du Cd, la CEC, le pH et la production de biomasse par *T. caerulescens*.

Effect of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* on the bioavailable Cd dynamic in soils

The Zn- and Cd- hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* is one of the most promising candidates for *in situ* phytoextraction. This work was undertaken to better understand the interactions between the bioavailable Cd in soil and the hyperaccumulation of Cd by *T. caerulescens*. Contrasted populations of *T. caerulescens* were studied in their natural environment and the relationships between the soil parameters, particularly the metal bioavailability, and hyperaccumulation were analysed. Four populations were selected according to their ability to hyperaccumulate Cd. Hundred plants of each population were cultivated in pots to assess genetic differences. The four populations were also grown under natural climatic conditions. The effect of *T. caerulescens* on the bioavailable compartments of soil metals was studied during successive crops in a lysimetric device equipped to follow the evolution of the soil-water-plant compartments of metals. Our results demonstrated that Cd accumulation by *T. caerulescens* is mainly explained by the soil Cd bioavailability. The Cd concentration in shoots could be predicted using easily and quickly measurable soil parameters (CaCl₂ extractable Cd, pH and CEC). Genetic differences between populations were also recorded. The Cd and Zn hyperaccumulating populations seemed to differ from the Ni hyperaccumulating populations by a particularly efficient transporter of Cd in the root cell membrane. Also, some Cd hyperaccumulating populations appeared to present a more efficient Cd absorption and translocation than others. The Cd absorption was independent of Zn absorption which suggested different mechanisms. It was also shown that a small fraction of the Cd extracted by *T. caerulescens* originated from the non available soil Cd compartment. During the phytoextraction, the plant firstly deplete the soluble compartment, which is then replenished by the bioavailable compartment. This one would be replenished by the less available compartment according to the buffer capacity of the soil. Finally, we demonstrated that it is possible to predict Cd phytoextraction based on a simplified model using soil Cd bioavailability, soil pH, CEC and *T. caerulescens* biomass production.

Discipline : Sciences Agronomiques

Mots-clés : *Thlaspi caerulescens*, cadmium, zinc, phytoextraction, rhizosphère, dynamique des métaux, modélisation

Laboratoire Sols et Environnement UMR 1120 ENSAIA-INPL/INRA- 2, av de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy cedex