



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>

U.F.R Sciences et Techniques Biologiques
E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement
D.F.D. Biologie Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université
en Biologie Forestière

par **Aude MIGEON**

*Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du
peuplier aux métaux : bases physiologiques et exploitation
en phytoremédiation*

Soutenue publiquement le 6 juillet 2009

Membres du jury :

Président :	M. Pierre RICHAUD	Chercheur, CEA, Cadarache
Rapporteurs :	M. Francis DOUAY M. Michel MENCH	Enseignant-chercheur, ISA, Lille Directeur de Recherches, INRA, Bordeaux
Examineurs :	M. Damien BLAUDEZ Mme Frédérique CADIERE M. Michel CHALOT M. Jean-François HAUSMAN	Maître de Conférences, Nancy-Université Ingénieur, ADEME, Angers Professeur, Nancy-Université Chercheur, CRPGL, Belvaux (Luxembourg)

Remerciements

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

✚ *Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury Francis DOUAY, Michel MENCH, Frédérique CADIERE, Pierre RICHAUD et Jean-François HAUSMAN d'avoir accepté de juger mon travail.*

✚ *Je remercie également mon directeur de thèse, Michel pour m'avoir accueilli au sein de son équipe au cours de cette thèse. Michel, je te remercie également pour m'avoir conseillé, pour m'avoir accompagné sur le superbe site de Métaleurop et sur les sites de Leforest et Pierrelaye même si ça te faisait éternuer...Merci aussi à mon directeur de thèse « officieux » et collègue de bureau, Damien. Tu as été très présent tout au long de cette thèse même si ton nom ne figure pas officiellement sur les papiers. C'est sûr que tu ne vois pas toujours le côté positif des choses mais tes remarques ont été très constructives, enfin j'espère que tu as été satisfait du résultat... Si je dois comparer votre contribution à un arbre je dirais que vous êtes la bouture de peuplier, point de départ de tout ce travail.*

✚ *Un grand merci à Barbara pour m'avoir initiée aux CDFs en m'apprenant toutes ces techniques de biologie moléculaire et toujours avec le sourire. Tu as été la première feuille à apparaître sur la bouture plantée par Michel et Damien ! Tu t'es envolée bien loin depuis.*

✚ *Merci à Annick, Claire et Bernard Botton pour leur gentillesse et leur intérêt pour mon travail. Un grand merci à Chantal pour son soutien.*

✚ *Je remercie Mélanie, Marc et Jérémy pour leur gentillesse et pour m'avoir aidé au début de ma thèse. Je remercie plus particulièrement Jérémy qui s'est avéré être un véritable coach pour moi ! Tous les trois vous représentez les feuilles sénescentes de l'arbre, après avoir donné tout ce que vous pouviez pour dépolluer le sol contaminé vous vous êtes envolés vers de nouveaux horizons... Marc au Luxembourg... Jé et Mél à l'étage du dessous...*

✚ *Eva, Didier et Loïc, vous représentez les feuilles matures qui n'ont pas encore assez accumulé de métaux pour vous envoler, mais la sénescence va vite arriver... Vous avez réussi à mettre une sacrée ambiance dans ce labo... les pauses sont animées avec vous ! Didier Mr anti-plantes... pourtant je continue à le dire « vive le peuplier »... Loïc le bricoleur de la bande et toujours prêt à aider... Eva la fan de Laccaria...! Merci également à Laurence qui n'est qu'à l'état de bourgeon... le débourrement est proche... rassures toi...*

✚ *Un grand merci à Frédéric, le meilleur technicien... qui m'a aidé à broyer des milliers d'échantillons dans la joie et la bonne humeur... qui m'a aidé à soulever les 20L des bacs de N^{FT}... même si tu avais mal au dos ! Maintenant est venue l'ère de la métatranscriptomique... Les peupliers vont te manquer j'en suis sûre !*

■ Merci à Elena, ma nouvelle collègue de bureau, toujours si gentille et à l'écoute... Merci aussi pour tes bons chocolats venus d'Italie.

■ Et merci à mon ex-collègue de bureau, Hélène, qui est devenue une amie par la suite... Comme quoi la phytoremédiation crée des liens!

■ Un énorme merci à Pierre, le roi de l'ICP...il aurait fallu que je calcule exactement le nombre d'échantillons analysés mais je pense qu'on doit être dans les 3000...feuilles, tiges, racines, sol...Et toujours avec une de ces efficacités! Merci de n'avoir pas fait renvoyer mes colis remplis d'heures de travail...

■ D'autres personnes extérieures à l'équipe ont également apporté leur pierre à l'édifice. Je tiens à les remercier chaleureusement ici :

■ Valérie Legué pour ses conseils très utiles pour la microscopie confocale

■ Jacques Banvoy (UMR1137), pour son aide précieuse dans l'entretien de la chambre phytotronique

■ Jean-Yves Gautry et Alain Berthelot du FCBA, pour la fourniture de boutures de peupliers essentielles pour mes expériences

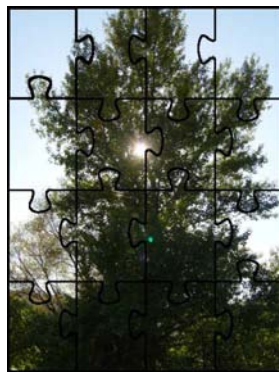
■ Brahime El Adib et Jean- Nicolas Audinot (CRPGL, Luxembourg) pour la localisation des métaux dans les feuilles de peuplier

■ Christophe Rose (UMR1137 INRA Nancy) pour les analyses de microscopie électronique à balayage.

■ Sans oublier l'ADEME, le Conseil Régional de Lorraine qui représentent les racines, nécessaires à la nutrition de l'arbre (et à l'apport des métaux...)

■ Enfin je tiens à remercier également tous ceux qui m'ont soutenu moralement : mes parents, Mag et Lolo, Sylvie... Merci aussi à mon petit châton mâle que le vent a bien voulu mener jusqu'à moi... Le peuplier fût notre 1^{er} lien...

Un puzzle au sens figuré est un problème difficile à résoudre en raison des nombreux éléments qu'il fait intervenir. Une thèse c'est un peu comme un puzzle... toutes les pièces sont nécessaires pour obtenir quelque chose de complet au final. Je remercie donc toutes les pièces qui font partie de ce puzzle... Et devinez à quoi ressemble ce puzzle...



Abréviations

ADEME	agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
AFNOR	association française de normalisation
B	bore
BRGM	bureau de recherches géologiques et minières
Ca	calcium
Cd	cadmium
CDF	cation diffusion facilitator
CEC	capacité d'échange cationique
Cl	chlore
Co	cobalt
Cr	chrome
CRPGL	centre de recherche public-Gabriel Lippmann
Cu	cuivre
Cv	cultivar
DPPR	direction de la prévention des pollutions et des risques
DTPA	diethylenetriaminepentacetic acid
EDDHA	ethylenediamine di o-hydroxyphenylacetic acid
EDDS	ethylene diamine disuccinate
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
EGTA	ethylene glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetra acetic acid
Eh	potentiel d'oxydo-réduction.
F	fluor
FB	facteur de bioconcentration
FCBA	forêt cellulose bois-construction ameublement
Fe	fer
FPGN	fond pédo-géochimique naturel
Hg	mercure
I	iode
INERIS	institut national de l'environnement industriel et des risques
INRA	institut national de la recherche agronomique
INRS	institut national de recherche sur la sécurité
IRT	iron-regulated transporter
K	potassium
Li	lithium
MEEDDAT	ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de l'aménagement du territoire
Mg	magnésium
Mn	manganèse
Mo	molybdène
MS	matière sèche
MTP	metal tolerance protein
n	nombre d'échantillons

Na	sodium
Ni	nickel
Nramp	natural resistance associated macrophage protein
Pb	plomb
Rb	rubidium
Se	sélénium
Si	silicium
SIMS	spectrométrie de masse à ionisation secondaire
Sr	strontium
TC	transport commission
TCR	taillis à courte rotation
Ti	titane
Tl	thallium
TTCR	taillis à très courte rotation
TF	translocation factor
V	vanadium
ZIP	ZRT-IRT-like proteins
Zn	zinc
ZRT	zinc-regulated transporter

Objectifs	1
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	11
I.1. Les métaux lourds dans l'environnement	13
I.1.1. Les origines des métaux lourds dans le sol	13
I.1.1.1. <i>Origines naturelles des métaux lourds</i>	15
I.1.1.2. <i>Origines anthropiques des métaux lourds</i>	17
I.1.1.3. <i>Les sites pollués en France</i>	21
I.1.1.4. <i>Normes françaises et normes européennes</i>	23
I.1.1.5. <i>Les acteurs de la politique de traitement des sites pollués</i>	27
I.1.2. Le comportement des métaux dans le sol	31
I.1.2.1. <i>Facteurs liés au sol intervenant dans la biodisponibilité des métaux lourds</i> ..	31
I.1.2.2. <i>Interactions entre métaux</i>	35
I.1.2.3. <i>Influence des micro-organismes</i>	37
I.1.3. L'absorption des métaux par les végétaux	37
I.1.3.1. <i>L'absorption des métaux par les racines et translocation vers les parties</i> <i>aériennes</i>	37
I.1.3.2. <i>L'absorption des métaux par les feuilles</i>	39
I.1.3.3. <i>Les teneurs en éléments métalliques dans les végétaux (Tableau 11)</i>	41
I.1.4. Les transporteurs de métaux	43
I.1.4.1. <i>Classification des transporteurs : le système TC</i>	45
I.1.4.2. <i>La famille des CDFs (cation diffusion facilitator)</i>	47
I.1.4.3. <i>La famille des ZIPs (ZRT-IRT-like proteins)</i>	49
I.1.4.4. <i>Les autres familles de transporteurs de métaux</i>	53
I.2. Les solutions pour dépolluer les sols contaminés	55
I.2.1. Les différentes techniques de mise en œuvre pour la dépollution d'un sol	57
I.2.1.1. <i>Installation de traitement biologique (biocentre, centre de traitement et de</i> <i>valorisation des terres)</i>	57
I.2.1.2. <i>Choix d'une technique appropriée</i>	59
I.2.2. La phytoremédiation	61
I.2.2.1. <i>La phytoextraction</i>	63
I.2.2.2. <i>La phytostabilisation</i>	71
I.2.2.3. <i>La rhizofiltration</i>	75
I.2.2.4. <i>La phytodégradation</i>	79
I.2.2.5. <i>La phytovolatilisation</i>	81
I.2.2.6. <i>Bases de données disponibles sur la phytoremédiation : l'exemple de</i> <i>PHYTOREM[®]</i>	85
I.2.2.7. <i>Programmes de recherche et développement nationaux et internationaux</i>	85
I.3. Le peuplier	91
CHAPITRE II : Matériels et méthodes	97
II. 1. Les sites d'étude	99
II.1.1. Le site de Pierrelaye-Bessancourt	99
II.1.1.1. <i>Historique du site</i>	99
II.1.1.2. <i>Etat des lieux actuel</i>	101

II.1.2. Le site de Métaleurop	103
II.1.2.1. <i>Historique du site</i>	105
II.1.2.2. <i>Etat des lieux actuel</i>	107
II.2. Matériel biologique et sols	111
II.2.1. Matériel végétal et sol issus de sites expérimentaux	111
II.2.1.1. <i>Espèces ligneuses du site de Métaleurop (hors PHYTOPOP)</i>	111
II.2.1.2. <i>Peupliers du site de Micheville</i>	113
II.2.1.3. <i>Espèces ligneuses et sols de sites témoins</i>	115
II.2.1.4. <i>Peupliers de la parcelle expérimentale de Leforest (62) (PHYTOPOP)</i>	115
II.2.1.5. <i>Peupliers de la parcelle expérimentale de Pierrelaye (95) (PHYTOPOP)</i> ...	117
II.2.2. Peupliers cultivés en laboratoire.....	119
II.2.3. Microorganismes utilisés.....	119
II.2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	119
II.2.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
II.2.4. Plasmides utilisés.....	121
II.2.4.1. Plasmides de clonage.....	121
II.2.4.2. Plasmides navette <i>E. coli</i> - <i>S. cerevisiae</i>	121
II.2.4.3. Plasmides navette Plante- <i>E. coli</i>	123
II.3. Méthodes	125
II.3.1. Techniques de culture de peuplier en laboratoire.....	125
II.3.1.1. <i>Culture hydroponique</i>	125
II.3.1.2. <i>Culture en pots</i>	129
II.3.2. Techniques d'analyse des sols	133
II.3.2.1. <i>Granulométrie</i>	133
II.3.2.2. <i>Carbone organique et azote total</i>	135
II.3.2.3. <i>Capacité d'échange cationique (CEC) méthode Metson</i>	135
II.3.2.4. <i>Détermination du pH</i>	135
II.3.2.5. <i>Détermination de la fraction des éléments échangeables du sol</i>	135
II.3.3. Analyse des teneurs en métaux dans les tissus végétaux et le sol par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry).....	137
II.3.4. Techniques d'analyse de la localisation tissulaire des éléments métalliques.....	139
II.3.4.1. <i>Microscope électronique à Balayage (MEB)</i>	139
II.3.4.2. <i>Spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS)</i>	139
II.3.5. Techniques d'extraction et d'analyse des acides nucléiques.....	141
II.3.5.1. <i>Extraction des acides nucléiques</i>	141
II.3.5.2. <i>Transcription Reverse (RT)</i>	143
II.3.5.3. <i>Mesure de taux de transcrits par Reverse Transcriptase et Réaction en Chaîne par Polymérase (RT-PCR)</i>	145
II.3.5.4. <i>Techniques de clonage</i>	149
II.3.6. Expression hétérologue dans <i>S.cerevisiae</i>	153
II.3.6.1. <i>Transformation de S. cerevisiae</i>	153
II.3.6.2. <i>Tests de complémentation</i>	155
II.3.7. Localisation de transporteurs par fusion GFP par expression dans un système hétérologue.....	157
II.3.8. Expression transitoire des fusions protéines-GFP chez <i>A. thaliana</i>	157
II.3.8.1. <i>Préparation des protoplastes</i>	157
II.3.8.2. <i>Transformation des protoplastes</i>	159
II.3.9. Analyses bioinformatiques	159
II.3.10. Analyses statistiques.....	163
CHAPITRE III : Mise en évidence du potentiel accumulateur de métaux chez le peuplier..	165

III.1. Teneurs en métaux de végétaux prélevés sur sites témoins	167
III.1.1. Prélèvements réalisés en juin 2005 sur le site témoin de Métaleurop.....	167
III.1.2. Prélèvements réalisés en juin 2005 sur un site témoin situé en Lorraine (Champenoux).....	167
III.2. Teneurs en métaux de végétaux prélevés sur le site de Métaleurop	169
III.2.1. Niveau de contamination des sols	169
III.2.2. Teneurs en métaux dans les tissus des espèces ligneuses	171
III.2.2.1. <i>Zinc</i>	171
III.2.2.2. <i>Cadmium</i>	173
III.2.2.3. <i>Plomb</i>	173
III.2.2.4. <i>Cuivre, manganèse et chrome</i>	173
III.2.3. Variation saisonnière de la teneur en métaux des espèces ligneuses	175
III.2.4. Variation annuelle de la teneur en métaux des espèces ligneuses.....	175
III.2.5. Corrélations entre les teneurs en métaux dans les différents tissus.....	177
III.3. Teneurs en métaux dans les feuilles de peuplier d'un autre site pollué : Micheville (54)	177
III.4. Discussion sur les résultats obtenus sur les sites témoins et pollués.....	179
CHAPITRE IV : Exploitation en phytoremédiation de la variabilité génétique du peuplier. 187	
IV.1. Teneurs en métaux de feuilles de peupliers prélevés sur la parcelle expérimentale de Leforest (62).....	189
IV.1.1. Teneurs en métaux dans le sol	189
IV.1.2. Teneurs en métaux et facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars prélevés octobre 2007)	191
IV.1.2.1. <i>Teneurs en métaux dans les feuilles des différents cultivars</i>	191
IV.1.2.2. <i>Facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars</i>	195
IV.1.3. Teneurs en métaux et facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars prélevés en juillet 2008.....	197
IV.1.3.1. <i>Cadmium</i>	197
IV.1.3.2. <i>Zinc</i>	197
IV.2.1. Teneurs en métaux dans le sol	199
IV.2.2. Teneurs en métaux et facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars en octobre 2007	199
IV.2.2.1. <i>Teneurs en métaux</i>	199
IV.2.2.2. <i>Facteurs de bioconcentration</i>	201
IV.2.3. Facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars prélevés en juillet 2008.....	203
IV.2.3.1. <i>Cadmium</i>	203
IV.2.3.2. <i>Zinc</i>	205
IV.2.4. Teneurs en Cd et en Zn dans les feuilles matures et sénescents.....	205
IV.2.4.1. <i>Cadmium</i>	205
IV.2.4.2. <i>Zinc</i>	205
IV.3. Discussion sur les résultats obtenus sur les parcelles expérimentales de Leforest et et Pierrelaye.....	207
CHAPITRE V : Réponses du peuplier à une exposition métallique en conditions contrôlées 215	
V.1. Teneurs en métaux de plusieurs cultivars de peupliers cultivés en hydroponie.....	217
V.1.1. Essais préliminaires	217
V.1.1.1. <i>Cadmium</i>	219
V.1.1.2. <i>Zinc</i>	219
V.1.1.3. <i>Nickel</i>	219
V.1.1.4. <i>Cuivre</i>	221

V.1.2. Etude des teneurs en métaux dans les feuilles de 25 cultivars de peuplier	221
V.1.2.1. <i>Cadmium</i>	223
V.1.2.2. <i>Zinc</i>	223
V.1.2.3. <i>Cuivre et nickel</i>	223
V.1.2.4. <i>Plomb</i>	225
V.1.2.5. <i>Mesure de la biomasse</i>	225
V.1.3. Influence du pH sur l'accumulation de métaux pour le Lena et le Skado.....	227
V.1.4. Effet d'une concentration croissante en Cd sur les cultivars Lena et Skado.....	229
V.1.4.1. <i>Paramètres physiologiques</i>	229
V.1.4.2. <i>Teneurs en métaux dans les feuilles</i>	231
V.1.5. Comparaison des résultats de culture hydroponique avec ceux obtenus sur sites expérimentaux	233
V.2. Etude des cultivars Skado et Lena cultivés en pots sur sol pollué (Pierrelaye et Leforest) et dans des conditions hydriques différentes	237
V.2.1. Paramètres physiologiques	237
V.2.2. Teneurs en métaux dans les sols.....	239
V.2.3. Teneurs en métaux dans les feuilles, les tiges et les racines de Lena et Skado... 241	
V.2.3.1. <i>Cadmium</i>	241
V.2.3.2. <i>Zinc</i>	243
V.2.3.3. <i>Chrome</i>	245
V.2.3.4. <i>Cuivre</i>	247
V.2.3.5. <i>Nickel</i>	247
V.2.4. Comparaison des données sur sites expérimentaux et en pots	247
V.3. Localisation des métaux dans les feuilles et les tiges de peuplier	249
V.3.1. Observations au microscope électronique à balayage	249
V.3.2. Observations de feuilles de cv. Lena avec un IMS6f modifié (IMS-LAM).....	251
V.3.2.1. <i>Observation de feuilles de Lena témoin (ayant poussé sur sol non pollué)</i> .251	
V.3.2.2. <i>Teneurs en métaux mesurés pour les peupliers ayant poussé sur le sol de Leforest</i>	251
V.3.2.3. <i>Observations de coupes de feuilles de Lena ayant poussé sur le sol de Leforest</i>	259
CHAPITRE VI : Etude phylogénétique et caractérisation fonctionnelle des transporteurs de métaux	257
VI.1. Analyse phylogénétique des transporteurs des familles CDF et ZIP	259
VI.1.1. Analyse phylogénétique des transporteurs de métaux de la famille CDF	259
VI.1.2. Analyse phylogénétique des transporteurs de métaux de la famille ZIP	263
VI.1.3. Discussion sur l'analyse phylogénétique des transporteurs des familles ZIP et CDF	271
VI.2. Expression des gènes de la famille MTP	273
VI.2.1. Expression des MTPs chez <i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i> (clone 717-1B4) et <i>P. trichocarpa</i> (clone Nisqually)	273
VI.2.2. Expression des MTPs en condition de stress métallique	275
VI.2.3. Discussion sur les mesures d'expression des MTPs	279
VI.3. Caractérisation fonctionnelle de quelques transporteurs de la famille CDF.....	281
VI.4. Localisation d'un transporteur de Mn	283
Conclusions générales et perspectives	285
Références bibliographiques	305
Annexes	325
Publication.....	345

La toxicité engendrée par les métaux lourds, présents dans de nombreux sols contaminés par des activités industrielles, constitue un risque environnemental important pour l'homme. La phytoremédiation utilise des plantes capables de prélever des métaux toxiques et de les accumuler dans leurs parties aériennes (phytoextraction), d'assainir des eaux polluées (phytofiltration), de transformer les polluants du sol pour les rendre moins nocifs (phytodégradation), ou encore d'immobiliser les métaux au niveau du système racinaire de la plante afin d'empêcher sa dispersion par lessivage dans les nappes phréatiques (phytostabilisation) (Lasat, 2002 ; Pilon-Smits, 2005). Elle constitue une technologie émergente efficace et applicable à un certain nombre de polluants et de sites de caractéristiques différentes (Lasat, 2002; Pilon-Smits & Pilon, 2002). Le concept de la phytoremédiation s'est généralisé dans le monde depuis 2000 grâce à plusieurs programmes de recherche, mais c'est surtout aux Etats-Unis qu'elle a été mise en application à grande échelle. La phytoremédiation constitue une alternative aux méthodes conventionnelles de restauration des sols contaminés qui nécessitent le plus souvent le creusement de la zone contaminée, le transport de la terre vers un autre site pour le traitement chimique et l'incinération ou l'enfouissement. L'avantage majeur de la phytoremédiation apparaît donc très nettement, avec un coût de 10 à 100 fois moins élevé que le coût des traitements traditionnels. Elle constitue une excellente utilisation des ressources naturelles existantes puisque la biomasse produite peut être valorisée.

Les plantes potentiellement intéressantes pour la phytoremédiation (hypertolérantes et hyperaccumulatrices) répondent rarement aux attentes des industriels, notamment de par leur faible biomasse. Parmi les espèces alternatives se trouve le peuplier qui présente, eu égard à sa vitesse de croissance et sa rusticité, un intérêt potentiel non négligeable. De nombreux travaux mettent en lumière les possibilités d'épuration offertes par la culture de peuplier, notamment par la décontamination des sites pollués par du zinc (Di Baccio et al., 2003 ; Sebastiani et al., 2004), du cadmium (Robinson et al., 2000), du chrome (Pulford et al., 2001), du cuivre (Castiglione et al., 2009), du mercure (Rugh et al., 1998) ou des composés organiques (Pulford & Watson, 2003).

L'objectif général de ce projet de thèse était d'étudier, d'expliquer et d'exploiter la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux. La sélection de cultivars de peuplier présentant des caractères de tolérance aux métaux, sur la base de leurs performances à décontaminer des sols ou des eaux polluées, pourra constituer une véritable alternative à la production de plantes transgéniques et contribuer à la conservation et à l'exploitation des

ressources génétiques naturelles. Les objectifs spécifiques du projet de thèse sont décrits ci-dessous.

1. Mise en évidence du potentiel accumulateur de métaux chez le peuplier

Avant de rechercher les cultivars potentiellement les plus adaptés en phytoremédiation il était nécessaire de démontrer le potentiel accumulateur du peuplier en comparant celui-ci à d'autres espèces ligneuses. Pour ce faire, nous avons prélevé des feuilles et des tiges de différents individus sur des sites contaminés (Site de Micheville- Lorraine- ; Site Métaleurop- Pas de Calais) ainsi que des échantillons de sol qui ont été analysés en ICP-AES. En effet, ces sites présentent des polycontaminations métalliques (teneurs élevées en Zn, Cd et Pb sur le site de Métaleurop contaminé par des retombées atmosphériques des industries métallurgiques). Nous avons également prélevé ces mêmes espèces sur des sites non contaminés qui permettent d'établir les teneurs en métaux physiologiques de celles-ci.

2. Exploitation en phytoremédiation de la variabilité génétique du peuplier *in situ*

Après avoir démontré le potentiel accumulateur du peuplier, il était opportun de tester différents cultivars de peuplier pour déterminer quels étaient les plus appropriés pour la phytoextraction des métaux lourds. Pour ce faire, une douzaine de cultivars ont été transférés en situation de polycontamination métallique réelle dans le cadre du projet ANR PHYTOPOP sur deux sites dont l'origine et la nature de pollution diffèrent. De plus, une implantation d'itinéraires structuraux différenciés sur la base de la densité de plantation a été mise en place. Ceci devrait permettre de trouver le meilleur compromis coût/efficacité de ces types de plantation. Des méthodes « statiques » d'évaluation de l'efficacité de phytoextraction du sol ont été mises en œuvre : la teneur en métaux dans le sol et dans les feuilles a été analysée par ICP-AES afin d'évaluer l'efficacité de décontamination du substrat.

3. Réponses du peuplier à une exposition métallique en conditions contrôlées

Parallèlement au criblage de peuplier sur sites expérimentaux, nous avons testé ces mêmes cultivars en laboratoire. Le criblage a été réalisé sur 25 cultivars (fournis par le FCBA) cultivés en culture hydroponique. Nous avons adapté cette technique de culture hydroponique et plus particulièrement de NFT (Nutrient Film Technique) à partir de données

disponibles sur le saule (Watson et al., 2003). Une autre technique de criblage a été tentée en parallèle, il s'agissait de cultiver des peupliers en chambre phytotronique avec du sol provenant de sites contaminés afin de comparer les résultats obtenus par ces deux méthodes de culture en laboratoire.

Une étude de localisation des métaux dans les feuilles et les tiges de peupliers soumis à une polycontamination métallique a également été entreprise par Spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire (SIMS) et Microscopie Electronique à Balayage (MEB) dans le but de localiser les métaux au niveau tissulaire.

4. Etude phylogénétique et caractérisation fonctionnelle de transporteurs de métaux

Afin de mettre en évidence des déterminants de la tolérance aux métaux, les cibles moléculaires privilégiées (Mäser et al., 2001) que sont les protéines des familles CDF (Cation Diffusion Facilitator) et ZIP (Zrt-Irt like Proteins) ont été étudiées. En effet, la meilleure tolérance aux métaux est, entre autres, la résultante de l'activité de transporteurs régissant l'absorption des métaux, la séquestration de ces ions dans la vacuole ou d'autres organites, leur mobilisation et leur translocation vers les parties aériennes. D'autres familles de transporteurs (ATPases et Nramp) sont étudiées dans le cadre du projet PHYTOPOP par d'autres partenaires.

Nous avons étudié le potentiel génétique du peuplier pour les familles CDF et ZIP. Les mesures d'expression et la caractérisation fonctionnelle de membres de la famille CDF ont ensuite été entreprises. Les gènes issus de l'annotation du génome de *Populus trichocarpa* et appartenant à cette famille clairement identifiés comme étant impliqués dans l'accumulation et la tolérance aux métaux chez d'autres espèces végétales, ont été clonés et caractérisés, après étude détaillée des banques de données EST de peuplier. Les gènes exprimés ont été étudiés plus en détail et une fois l'étape de clonage réalisée, la spécificité de ce gène par rapport aux métaux a été étudiée par complémentation fonctionnelle chez la levure (Blaudez et al., 2003; Thomine et al., 2000; Verret et al., 2004).

Afin de déterminer le potentiel des gènes cibles à constituer des gènes marqueurs pour la phytoremédiation, leur expression a été mesurée sur différents peupliers prélevés *in situ* et cultivés en laboratoire par RT-PCR. En effet, la surexpression (Blaudez et al., 2003 ; Becher et al., 2004 ; Verret et al., 2004 ; Weber et al., 2004) ou la sous-expression de certains de ces

gènes (Thomine et al., 2000) contribuent au phénotype de tolérance accrue aux métaux. La mesure de l'expression de ces gènes s'avère par conséquent être un outil de choix.

Enfin, la localisation de ces transporteurs permet de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des métaux. La localisation a été étudiée par fusion GFP par expression dans un système hétérologue qu'est la levure et par expression transitoire des fusions GFP dans les protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*.

Avant de présenter les résultats répondant aux différents objectifs décrits précédemment il est important, au travers d'une synthèse bibliographique de resituer les différentes études entreprises dans un contexte plus global.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

1 1.0079 H HYDROGÈNE																	2 4.0026 He Hélium
3 6.941 Li LITHIUM	4 9.0122 Be Béryllium											5 10.811 B Bore	6 12.011 C Carbone	7 14.007 N Azote	8 15.999 O Oxygène	9 18.998 F Fluor	10 20.180 Ne Néon
11 22.990 Na Sodium	12 24.305 Mg Magnésium											13 26.982 Al Aluminium	14 28.086 Si Silicium	15 30.974 P Phosphore	16 32.06 S Sulfure	17 35.453 Cl Chlore	18 39.948 Ar Argon
19 39.098 K Potassium	20 40.078 Ca Calcium	21 44.956 Sc Scandium	22 47.867 Ti Titane	23 50.942 V Vanadium	24 51.996 Cr Chrom	25 54.938 Mn Manganèse	26 55.845 Fe Fer	27 58.933 Co Cobalt	28 58.693 Ni Nickel	29 63.546 Cu Cuivre	30 65.39 Zn Zinc	31 69.723 Ga Gallium	32 72.64 Ge Germanium	33 74.922 As Arsenic	34 78.96 Se Sélénium	35 79.904 Br Brome	36 85.00 Kr Krypton
37 85.468 Rb Rubidium	38 87.62 Sr Strontium	39 88.906 Y Yttrium	40 91.224 Zr Zirconium	41 92.906 Nb Niobium	42 95.94 Mo Molibdène	43 (90) Tc Technetium	44 101.07 Ru Ruthénium	45 102.91 Rh Rhodium	46 106.42 Pd Paladium	47 107.87 Ag Argent	48 112.41 Cd Cadmium	49 114.82 In Indium	50 118.71 Sn Étain	51 121.76 Sb Antimoine	52 127.6 Te Tellure	53 126.90 I Iode	54 131.29 Xe Xénon
55 132.91 Cs Césium	56 137.33 Ba Baryum	57-71 La-Lu Lanthanoïdes	72 178.49 Hf Hafnium	73 180.95 Ta Tantalum	74 183.84 W Wolfram	75 186.21 Re Rhenium	76 190.23 Os Osmium	77 193.22 Ir Iridium	78 195.08 Pt Platine	79 196.97 Au Or	80 200.59 Hg Mercure	81 204.38 Tl Thallium	82 207.2 Pb Plomb	83 208.98 Bi Bismuth	84 (209) Po Polonium	85 (210) At Astatin	86 (222) Rn Radon
87 (223) Fr Francium	88 (226) Ra Radium	89-103 Ac-Lr Actinoïdes	104 (261) Rf Rutherfordium	105 (262) Db Dubnium	106 (263) Sg Seaborgium	107 (264) Bh Bohrium	108 (277) Hs Hassium	109 (265) Mt Meitnerium	110 (266) Uun Ununium	111 (272) Uub Unbium	112 (285) Uuq Unquadium						

Figure 1: Tableau périodique des éléments de Mendeleïev. La ligne violette délimite les métaux des métalloïdes et non-métaux. Les métaux avec un fond turquoise sont souvent des polluants des écosystèmes et sont cités comme toxiques pour l'homme et son environnement.

Tableau 1: Classification des oligo-éléments et des contaminants stricts chez l'homme et chez les plantes supérieures (Modifié d'après Bargagli, 1998).

Pour l'homme	
Oligo-éléments à risque élevé de carence	Cu, Zn, Se, Cr, Mo
Oligo-éléments à faible risque de carence	Ni, Co, As
Contaminants stricts	Pb, Cd, Hg, Tl
Pour les plantes supérieures (Bargagli, 1998)	
Éléments essentiels	B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn
Éléments bénéfiques	Cl, Cr, F, I, Li, Na, Ni, Rb, Se, Si, Sr, Ti, V
Contaminants stricts	Br, Cd, Pb, Hg

Tableau 2: Nombre de publications recensées lors de l'utilisation de mots clés "phytoremediation" + "heavy metals" ou "trace elements" sur la base de données SCOPUS (<http://www.scopus.com/scopus/home.url>).

Phytoremediation	2008	2009	2007	1994-2009
+ Heavy metals	177	67	161	1071
+ Trace elements	13	8	10	88

I.1. Les métaux lourds dans l'environnement

Les éléments sont dits traces par rapport à leur concentration massique dans un certain milieu. Lorsque leur teneur est inférieure à un pour mille dans la croûte terrestre, ce sont des éléments traces de la croûte. Lorsque leur concentration est inférieure à 0,1 pour mille dans les êtres vivants (parfois on parle de 1% pour les plantes), ils sont qualifiés d'éléments traces pour les êtres vivants. Certains métaux sont des éléments majeurs (Ca, Mg, K), d'autres des éléments traces (Zn, Cd, Cu, Co, Cr, Tl, Hg, Ni, Mo, Pb).

Les oligo-éléments sont des éléments métalliques indispensables aux êtres vivants. On ne retrouve pas les mêmes oligo-éléments chez l'homme, les animaux et les plantes. Les éléments dont le caractère essentiel pour les êtres vivants n'a pas été démontré sont appelés contaminants stricts (Tableau 1).

Par définition, les métaux lourds sont des métaux formant des précipités insolubles avec les sulfures. D'autres définitions existent, on peut dire que ce sont les métaux dont la masse volumique est supérieure à 6 g mL^{-1} (parfois la définition donne une limite de 4,5 ou $5,0 \text{ g mL}^{-1}$) et de numéro atomique supérieur à 20 (Figure 1).

L'appellation métaux lourds est souvent discutée car les métaux lourds sont réputés toxiques alors que certains sont des oligo-éléments (Cu, Fe, Zn). De plus, certains éléments sont déclarés métaux lourds alors que ce sont des métalloïdes (Se, As) ou qu'ils ne sont pas « lourds » (Be, Al). Certains préfèrent donc parler d'éléments traces. Nous parlerons ici de métaux lourds car c'est la terminologie la plus couramment utilisée si nous considérons le nombre de résultats obtenus lors d'une recherche par mots clés sur les bases de données scientifiques (Tableau 2).

I.1.1. Les origines des métaux lourds dans le sol

La pollution métallique des sols due à des activités humaines (agricoles, domestiques et industrielles) est souvent citée dans les médias et la bibliographie scientifique. Cependant, les métaux existent naturellement dans les sols car ils sont présents dans la roche mère qui subit notamment des phénomènes d'érosion et d'altération. De plus, les normes relatives aux pollutions métalliques des sols varient beaucoup selon les pays.

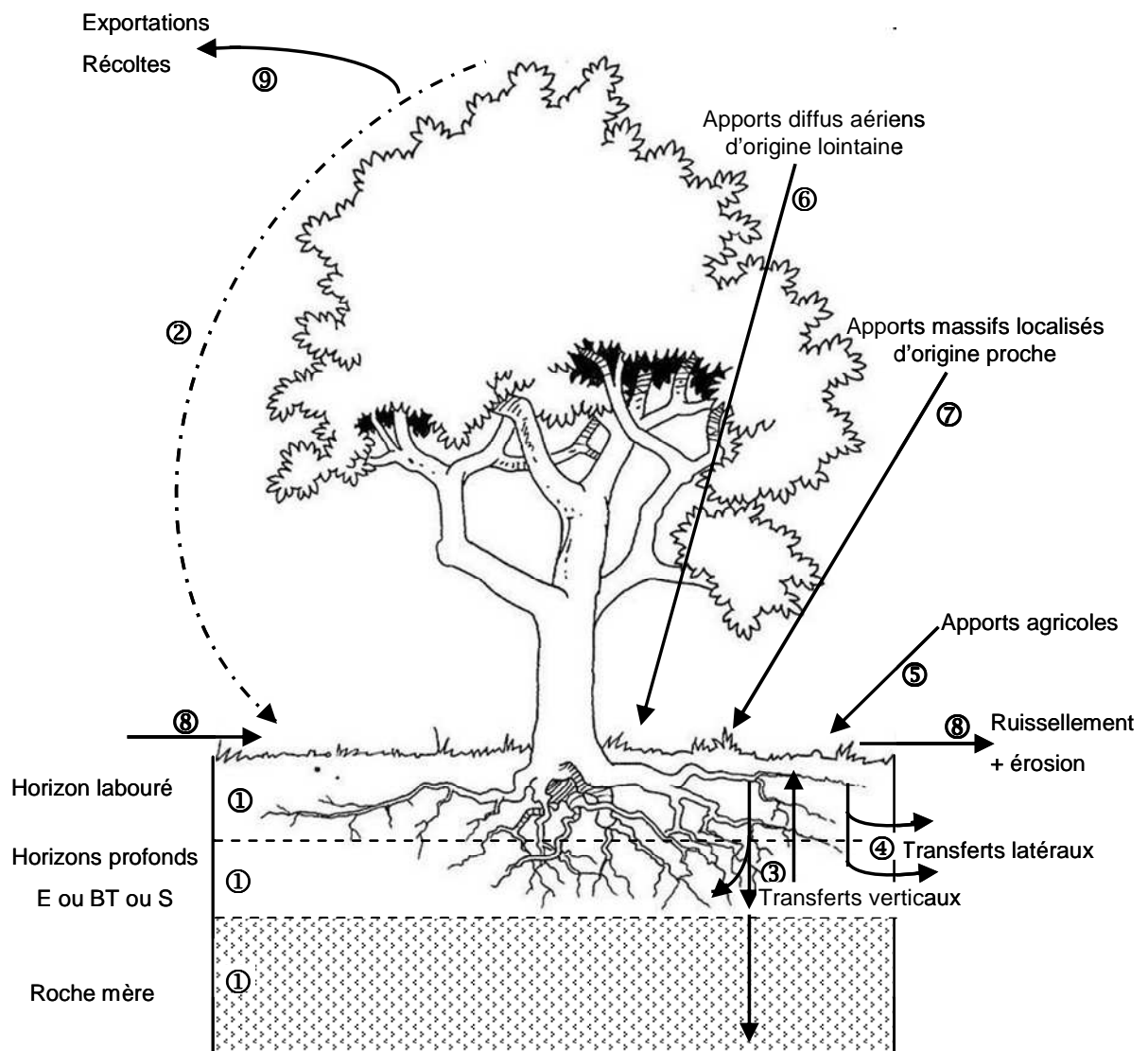


Figure 2: Schéma de l'acquisition des teneurs totales en métaux lourds dans les sols. (D'après Baize, 1997).

Tableau 3: Teneurs totales (en mg kg MS⁻¹) en métaux lourds dans des sols français. Population générale de 815 échantillons; horizons notoirement contaminés exclus (D'après Baize, 2000).

	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Mn	Fe
Nombre de valeurs	768	695	791	787	797	790	804	735	767
minimum	< 0,02	< 1	< 2	< 2	< 2	2,2	< 5	< 10	0,05
médiane	0,16	14,0	66,3	12,8	31,0	34,1	80	754	3,24
moyenne	0,42	17,1	75,0	14,9	41,3	64,8	149	1585	3,65
maximum	6,99	148,0	691,0	107,0	478,0	3 088	3 820	24 975	19,16

1.1.1.1. Origines naturelles des métaux lourds

Le fond pédo-géochimique naturel (FPGN) d'un sol est la concentration naturelle d'une substance dans un horizon de sol, résultant uniquement de l'évolution géologique et pédologique, à l'exclusion de tout apport d'origine anthropique (Figure 2). D'un point à un autre d'un territoire, ce FPGN peut varier très largement, en fonction de la nature du matériau parental (héritage) et du type de sol qui s'y est développé (Baize, 2002).

Le phénomène majeur intervenant dans le FPGN est l'héritage reçu de la roche mère (Figure 2,①). En effet, selon la composition chimique initiale de la roche à partir de laquelle il s'est formé, un sol sera plus ou moins riche en oligo-éléments et en métaux lourds. En France, les roches sont très variées à la fois par leur faciès lithologique (granites, gneiss, grès, craies, schistes...) et par leur composition chimique (Baize, 1997). Les teneurs mesurées sur 815 échantillons de sol français considérés comme non contaminés montrent une forte variabilité (Tableau 3). Certains métaux comme le Cd sont faiblement concentrés (0,16 mg kg MS⁻¹), d'autres comme le Mn sont fortement concentrés (754 mg kg MS⁻¹) (Baize, 2000).

Un autre phénomène intervenant dans la constitution du FPGN est le cycle biogéochimique dans les sols et dans les plantes (Figure 2,②). Les éléments sont absorbés par les racines des plantes et sont transloqués vers les organes aériens de la plante. En fin de cycle les éléments retournent ensuite dans le sol par décomposition des racines et des parties aériennes. Ce cycle peut être rompu lorsque les récoltes sont exportées.

Le troisième phénomène qui intervient correspond aux transferts pédologiques verticaux (Figure 2,③). En France, les précipitations annuelles sont en général supérieures à l'évapotranspiration végétale. Aussi, de nombreux sols sont dits lessivés (ou luvisols) et les métaux lourds peuvent alors migrer vers les horizons profonds. Les formes solubles peuvent également migrer vers les nappes phréatiques. Les transferts pédologiques peuvent également se faire latéralement (Figure 2,④).

Parmi les apports diffus aériens d'origine lointaine se trouvent les poussières libérées par l'activité volcanique, les embruns maritimes et les vents lointains (Figure 2,⑤). Ces apports ont une importance non négligeable sur le long terme.

I.1.1.2. Origines anthropiques des métaux lourds

Les sols sont soumis à des apports de métaux lourds plus ou moins importants résultant de l'activité humaine. Ces métaux peuvent être absorbés par les plantes cultivées ou les fourrages, contaminant la chaîne alimentaire des animaux et de l'homme. Ces métaux peuvent également migrer vers les nappes phréatiques ou les eaux souterraines.

Les apports en métaux lourds peuvent venir de l'agriculture de part les impuretés présentes dans les engrais, les amendements calcaires, les fumiers, les lisiers (Figure 2, ⑤) (Franklin et al., 2005). Ces apports peuvent aussi résulter d'une activité urbaine, industrielle (déchets d'entreprises agro-alimentaires, boues de stations d'épuration, composts) ou minière.

Une autre source de métaux lourds est représentée par les apports diffus aériens d'origine lointaine (Figure 2, ⑥). Il s'agit des poussières et aérosols provenant des chauffages, des activités industrielles, des moteurs automobiles (Sezgin et al., 2004). Ces apports se déposent aussi bien sur des cultures maraîchères que sur des forêts et prairies ou encore dans les jardins des particuliers. Ceux-ci sont véhiculés par les gouttes de pluie, le brouillard, les poussières.

Les apports en métaux lourds peuvent aussi être massifs et d'origine proche (Figure 2, ⑦). Ces apports peuvent être accidentels ou résulter d'activité industrielle de longue durée sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement. C'est le cas notamment de Noyelles-Godault (62). Les teneurs en Pb et Cd mesurées dans les dix premiers centimètres des sols environnant l'usine de Métaleurop dépendaient de la distance mais aussi de l'orientation par rapport à la source d'émission (Godin et al., 1985).

Il peut également y avoir des transferts latéraux par ruissellement ou érosion à la surface (Figure 2, ⑧). Enfin, les exportations peuvent avoir lieu par les récoltes ce qui donne lieu à une rupture du cycle bio-géochimique (Figure 2, ⑨). En effet, dans tous les produits récoltés (fourrages, épis de maïs ou de blé) des métaux lourds sont exportés dans les aliments. Les exportations *via* les végétaux dépassent rarement 1% par rapport au stock d'éléments présents dans l'horizon de surface labouré des sols (Mench, 1993). Cependant, ce taux varie en fonction des espèces et nous en parleront plus longuement dans le paragraphe consacré à la phytoremédiation.

Nous nous contentons de détailler les principaux polluants métalliques des sols que nous avons étudié par la suite à savoir Cd, Zn et Pb.

✧ Le cadmium

Les apports anthropiques de Cd résultent de trois groupes d'activités (Baize, 1997) :

- les épandages et les amendements agricoles : le Cd peut être assez abondant dans les engrais phosphatés et atteindre 10 g Cd ha^{-1} (Loganathan & Hedley, 1997). Il est également apporté par l'épandage de déchets d'élevage et lors du chaulage.
- les sources industrielles : le Cd est un sous-produit du raffinage du Zn et peut être libéré lors de la métallurgie du Fe et de l'acier et lors de l'affinage du Pb.
- de nombreuses activités urbaines et le trafic routier libèrent du Cd dans l'environnement : incinération des déchets domestiques, combustion des carburants fossiles, boues des stations d'épuration, usure des pneus de voitures, piles.

Le Cd n'existe pas à l'état natif. Son minerai, la greenockite CdS est très rare. Cependant, le Cd est présent dans presque tous les minerais de Zn. Il est également présent dans les minerais de Pb et de Cu ainsi que dans les phosphates naturels. La mobilité du Cd dans les sols dépend fortement du pH, un pH acide favorisant la phytodisponibilité de celui-ci.

✧ Le zinc

Les apports anthropiques de Zn résultent également de trois groupes d'activités majeures (Baize, 1997) :

- les sources minières et industrielles : traitement du minerai, raffinage, galvanisation du fer, gouttières, toitures, fabrication de piles électriques, pigments, matières plastiques, caoutchouc.
- les épandages agricoles : on retrouve le Zn en abondance dans les lisiers car le Zn est un constituant de l'alimentation des porcs.
- de nombreuses activités urbaines et le trafic routier libèrent du Zn dans l'environnement : toitures, gouttières, usure des pneus de voitures, incinération des déchets domestiques.

Le minerai le plus utilisé est le sulfure de zinc appelé blende ou sphalérite (ZnS). Sous l'ancien vocable de calamine on trouve la smithsonite (carbonate de zinc : ZnCO_3) et l'hémimorphite (silicate de zinc : $\text{Zn}_4\text{Si}_2\text{O}_7(\text{OH})_2, \text{H}_2\text{O}$), la calamine autrefois très utilisée n'est aujourd'hui plus très exploitée. Le Zn est très mobile. Les formes les plus mobiles du Zn seraient facilement adsorbées par les constituants organiques et minéraux des sols. Le Zn a tendance à s'accumuler dans les horizons de surface (Baize, 1997). Les meilleures corrélations se font avec le Cd et le Pb. De plus, la teneur en Zn total est fortement influencée par la teneur en argile du sol.

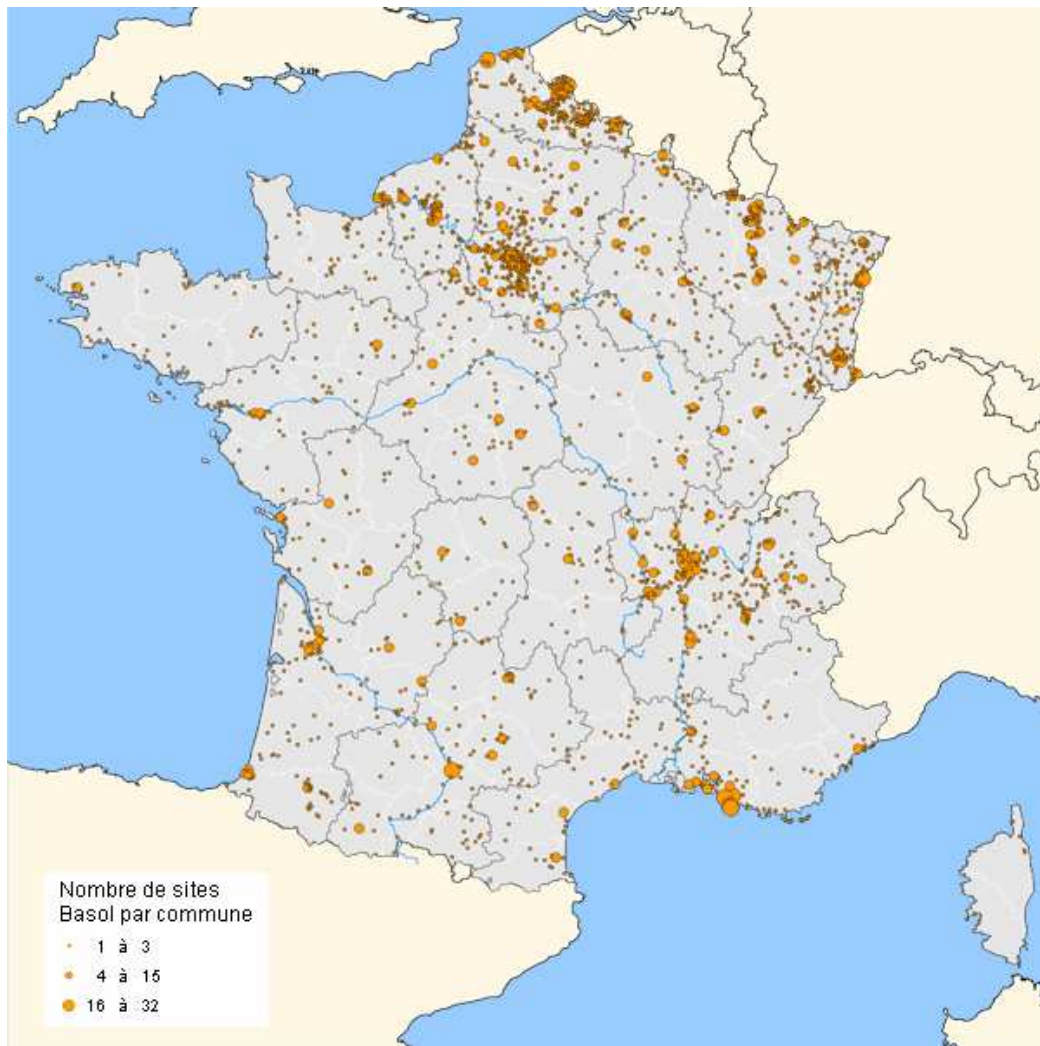


Figure 3: Les sites et sols pollués en 2005. Ce sont des sites sur lesquels l'Etat a entrepris des actions de remédiation au 1er septembre 2005. (Source Ministère en charge de l'écologie, Basol, 2005).

✦ Le plomb

Les apports anthropiques de Pb résultent de cinq groupes d'activités (Baize, 1997) :

- les sources principales sont liées à l'utilisation de composés organo-métalliques comme anti-détonnants dans les moteurs à explosion. Le métal est alors rejeté par les gaz d'échappement.
- Les sources industrielles : libération de Pb par les usines de traitement du minerai ou lors de recyclage des batteries.
- Les déblais des mines et les poussières des crassiers.
- Les boues de stations d'épuration.
- Certains pesticides étaient fabriqués à base de Pb.

La teneur en Pb est également proportionnelle à la teneur en argile. Le Pb est un des polluants métalliques les moins mobiles dans le sol car il est très fortement lié aux matières organiques.

✦ Les autres métaux

Les sols que nous avons étudiés contiennent également d'autres métaux comme le Cu, le Cr, le Ni que nous ne les détaillerons pas davantage dans cette partie.

1.1.1.3. Les sites pollués en France (Figure 6)

Selon la définition du Ministère en charge de l'écologie « Un site pollué est un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement. Ces situations sont souvent dues à d'anciennes pratiques sommaires d'élimination des déchets, mais aussi à des fuites ou à des épandages de produits chimiques, accidentels ou pas. Il existe également autour de certains sites des contaminations dues à des retombées de rejets atmosphériques accumulés au cours des années voir des décennies. La pollution présente un caractère concentré, à savoir des teneurs souvent élevées et sur une surface réduite (quelques dizaines d'hectares au maximum). Elle se différencie des pollutions diffuses, comme celles dues à certaines pratiques agricoles ou aux retombées de la pollution automobile près des grands axes routiers. De par l'origine industrielle de la pollution, la législation relative aux installations classées est la réglementation qui est le plus souvent utilisable pour traiter les situations correspondantes ». Les sites pollués sont nombreux mais bien répertoriés en France et font l'objet d'un suivi détaillé (Figure 3).

Tableau 4: Différentes normes et références françaises de teneurs totales en métaux lourds dans les sols exprimées en mg kg MS⁻¹ (D'après Baize, 2002).

	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	Se
P. Godin (1983)									
Seuil d'anomalie	2	30	150	100	50	100	300		
Seuil d'investigation	4	60	300	200	100	200	600		
Seuil de traitement	10	150	750	500	250	500	1500		
Seuil d'urgence	20	300	1500	1000	500	1000	3000		
Norme AFNOR NF U 44-041 (1985)	2		150	100	50	100	300	1	10
Article 11 de l'arrêté du 8/01/1998	2		150	100	50	100	300		

I.1.1.4. Normes françaises et normes européennes

Les normes françaises

L'épandage des boues de stations d'épuration sur les terrains agricoles fait l'objet d'une controverse à cause des métaux lourds. C'est pourquoi une norme (NF U 44-041) définissant des valeurs limites autorisées dans les boues et dans les sols susceptibles de les accueillir, a été mise en place le 11 juillet 1985 (Tableau 4). Elle concernait les « boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines » considérées comme des « matières fertilisantes » et devant donc répondre à certaines spécifications. Son application a été rendue obligatoire en France par l'arrêté interministériel du 29 août 1988 (n°INDD 8800582 A). Ce dernier avait pour but de transposer dans la réglementation française la directive européenne du 12 juin 1986, modifiée le 2 décembre 1988 (n° 86/278/CEE). Il semble que la norme ait repris telles quelles les propositions de seuil d'anomalie faites par Godin en 1984. Ce dernier s'était inspiré de valeurs émanant des travaux d'une commission AFNOR et de tableaux provisoires établis dans d'autres pays européens définissant 3 types d'usages : pour la production maraîchère, pour les autres productions agricoles liées à l'alimentation et pour les autres usages.

Cette norme tient compte de quatre concentrations de référence (Baize, 2002):

- ♣ seuil d'anomalie : concentration maximale rencontrée dans les sols courants ;
- ♣ seuil d'investigation : concentration du sol au-delà de laquelle une étude approfondie du site est nécessaire ;
- ♣ seuil de traitement : concentration du sol au-delà de laquelle un traitement est nécessaire ;
- ♣ seuil d'urgence : concentration du sol au-delà de laquelle un traitement s'impose dans un délai de 3 mois.

Dans le texte de la norme AFNOR, il est prévu d'effectuer une analyse de la teneur en métaux lourds avant le 1^{er} épandage, puis tous les 10 ans. De plus, le pH du sol après épandage doit impérativement être maintenu supérieur ou égal à 6. En effet, les métaux sont d'autant moins mobiles et biodisponibles dans les sols que le pH est neutre ou alcalin (Baize, 2002).

Dans la nouvelle réglementation, l'article 11 de l'arrêté du 8 janvier 1998 est formel : « les boues ne peuvent être répandues si les teneurs en éléments traces métalliques dans les sols dépassent l'une des valeurs limites figurant au tableau 2 de l'annexe I de cet arrêté

Tableau 5: Valeurs cibles néerlandaises pour les éléments traces pour quelques types de sols. Valeurs en mg kg MS⁻¹ (Smit, 1998).
A= pourcentage de particules inférieures à 2µm ; H= pourcentage de matières organiques.

	« Sol standard » A=25 ; H=10	Sol sableux A=3 ; H=2	Sol argileux A=30 ; H=5
As	29	17	29
Cd	0.80	0.46	0.71
Cr	100	56	110
Cu	36	17	36
Hg	0.30	0.21	0.31
Ni	35	13	40
Pb	85	55	85
Zn	140	62	147.5

Tableau 6: "valeurs de référence" d'échantillons de sols standard (10% d'argile et 2% de matières organiques) légalement adoptés en Flandre (en mg kg MS⁻¹) et valeurs seuils de réhabilitation des sols, en fonction de l'usage envisagé du site réhabilité.

	« valeurs de référence »	Valeurs seuils de réhabilitation des sols en fonction de l'usage envisagé pour le site				
		Parc naturel	Agriculture	Zones résidentielles	Zones de récréation	Zones industrielles
As	19	45	45	110	200	300
Cd	0.8	2	2	6	15	30
Cr	37	130	130	300	500	800
Cu	17	200	200	400	500	800
Hg	0.55	10	10	15	20	30
Ni	9	100	100	470	550	700
Pb	40	200	200	400	1500	2500
Zn	62	600	600	1000	1000	3000

(Tableau 4, dernière ligne). On retrouve exactement les mêmes valeurs que pour la norme AFNOR U 44-041 mais le selenium (Se) a disparu. La dénomination officielle est à partir de cet arrêté « valeurs limites » et il est à noter que des dérogations peuvent être accordées par le préfet s'il est démontré que les métaux lourds d'un sol particulier ne sont pas biodisponibles. Une modification concernant le pH a également été mise en place : « les boues ne doivent pas être épandues sur des sols dont le pH avant épandage est inférieur à 6 ».

Cependant, il ne faut pas négliger le fait que les valeurs limites (Tableau 4) ne sont pas des seuils de toxicité. Par exemple, des sols forestiers et des sols cultivés du Jura français contiennent naturellement jusqu'à 20 mg Cd kg MS⁻¹ sans que n'apparaisse aucun symptôme de toxicité sur les végétaux (Prudente, 1999). Il en est de même pour les sols de la plate-forme sinémurienne en Bourgogne qui sont fortement chargés en métaux lourds et ne présentent aucune anomalie dans la composition des grains de blé (Mench et al., 1997). Il faut donc considérer les valeurs des fonds pédo-géochimiques naturels locaux pour parler de pollution d'un sol en particulier.

Les normes des autres pays

Nous ne présentons ici que certaines particularités des réglementations de trois pays voisins qui ont choisi de moduler leurs valeurs seuils ou leurs valeurs de référence en fonction de propriétés pédologiques ou de l'usage envisagé du terrain (Baize, 2002).

*** Normes aux Pays-Bas (Smit, 1998)**

Comparées aux valeurs limites de la directive européenne ou à celles du Royaume-Uni ou d'Allemagne, les valeurs cibles néerlandaises sont assez sévères (Tableau 5). Le but principal de cette législation est d'obtenir et de maintenir une qualité « multifonctionnelle » des sols. Le gouvernement néerlandais tient compte de la teneur en argile et du taux de matières organiques pour préciser la nature du sol plutôt que le pH car ces 2 paramètres sont en général plus stables (Baize, 2002).

*** Normes en Belgique (région flamande)**

En Flandre, comme aux Pays-Bas, les autorités sont fortement défavorables à l'épandage agricole des boues d'épuration (Andersen-ADEME, 1999). Le sol « standard » contient 10% d'argile et 2% de matières organiques. Ce sol est donc très sableux d'où des normes différentes des normes françaises. Les « valeurs de référence » correspondent à des moyennes de sites éloignés de toute source de pollution (Tableau 6).

Tableau 7: Valeurs indicatives relatives aux "métaux lourds" de l'Ordonnance suisse sur les atteintes portées au sol en mg kg MS⁻¹ (Osol, juillet 1998).

	Teneur totale	Teneur soluble
Cr	50	-
Ni	50	0.2
Cu	40	0.7
Zn	150	0.5
Mo	5	-
Cd	0.8	0.02
Hg	0.5	-
Pb	50	-
F	700	20

Tableau 8: Valeurs limites proposées pour les concentrations en métaux traces dans le sol. Révision de la directive européenne de 1986 (86/278/EEC).

	Valeurs limites (en mg kg MS ⁻¹)				
	Directive 86/278/EEC	6<pH<7	5<pH<6	6<pH<7	pH>7
Cd	1 - 3		0.5	1	1.5
Cu	50 – 140		20	50	100
Hg	1 – 1.5		0.1	0.5	1
Ni	30 – 75		15	50	70
Pb	50 – 300		70	70	100
Zn	150 - 300		60	150	200

* Normes en Suisse (OFEV)

La confédération helvétique était régie depuis 1998 par une ordonnance « sur les atteintes portées au sol » (Osol, Tableau 7). L'épandage des boues d'épuration est dorénavant interdit depuis le mois de mai 2003 dans les cultures maraîchères et fourragères. Concernant les autres surfaces fertilisables, l'épandage est interdit depuis octobre 2006. L'interdiction de la valorisation des boues dans l'agriculture rend nécessaire l'incinération de toutes les boues produites en Suisse, soit 4 millions de m³ ou 200 000 tonnes de matière sèche par année (Source : Office fédéral de l'environnement, OFEV).

La norme européenne 86/278/EEC

En janvier 2000, un processus de révision de la directive européenne de 1986 (86/278/EEC) sur la gestion des boues d'épuration urbaines a été mis en route (Tableau 8). Les nouveautés proposées portent notamment sur des valeurs limites différentes selon le pH du sol, de plus en plus exigeantes à mesure que le pH du sol est bas et donc le danger de phytodisponibilité plus élevé (<http://europa.eu.int/comm/environment/waste/index.htm>).

1.1.1.5. Les acteurs de la politique de traitement des sites pollués

Les grandes orientations de la politique nationale de traitement des sites et sols pollués sont fixées par le ministère en charge de l'écologie et plus particulièrement, par la Direction de la prévention des pollutions et des risques (DPPR). Dans le cadre de leurs travaux, les services ministériels sont assistés, au plan technique par diverses structures publiques.

Ainsi, le Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM), l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) et l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) participent directement à l'élaboration de la réglementation relative à la réhabilitation des sites et à la rédaction de guides méthodologiques permettant sa mise en œuvre efficace.

L'Agence De l'Environnement Et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) a la charge de mener des actions pour la protection des sols et la remise en état des sites pollués. Ces actions recouvrent à la fois la prévention de la pollution des sols et la gestion durable des sols agricoles ainsi que la mise en sécurité et la réhabilitation des sites et sols pollués généralement par les activités industrielles. Elles visent à l'évaluation de l'extension de la

contamination, des impacts sanitaires et environnementaux liés et à la prévention de la pollution des sols. Elle est également amenée à réaliser des documents guides portant sur les techniques de dépollution ainsi que sur les mesures d'hygiène et de sécurité applicables aux chantiers de dépollution.

Par ailleurs, le Groupement d'Intérêt Scientifique Sites, Sols et Sédiments Pollués (GIS 3SP) occupe une place importante dans la réalisation des études à caractère méthodologique et fédère les efforts de recherche de différents partenaires publics et privés dans le cadre du pôle de compétence « Sites et sédiments pollués ».

Le Groupe d'Intérêt Scientifique « sol » (GIS sol) soutient, quant à lui, la constitution de la Base de Données des Analyses de Terre (BDTA), laquelle compte à ce jour 300000 échantillons.

Enfin, l'Association Française de Normalisation (AFNOR), le BRGM, l'INERIS et l'Institut National de Recherche sur la Sécurité (INRS) contribuent à la normalisation des outils utilisés dans le cadre de la gestion des sites pollués. Le recours aux normes ou aux documents guides édités par l'American Society for Testing and Material (ASTM) ou par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA) peut s'avérer nécessaire.

En parallèle, outre les programmes de recherche conduits par les organismes français comme le CNRS, le BRGM, l'INRA, l'INERIS et l'ADEME ou le Groupement d'intérêt scientifique sur les friches industrielles (GISFI), différents projets ont été engagés au niveau européen, nous en donnons ici une liste non exhaustive :

- ♣ DIFPOLMINE, *Diffuse Pollution from Mining Activities*
- ♣ GRACOS, *Groundwater Risk Assessment at Contaminated Sites*
- ♣ INCORE, *Integrated Concept for Groundwater Remediation*
- ♣ PHYLES, *Phytoextraction of Lead of Soil*, projet environnement Life
- ♣ RESCUE, *Regeneration of European Sites in Cities and Urban Environment*
- ♣ SNOWMAN, *Sustainable Management of Soil and Groundwater*
- ♣ TERRANOVA, *Controlled Environment Biopiling for Contaminated Land Treatment*

Tableau 9: Principaux facteurs liés au sol contrôlant le transfert des métaux lourds du sol vers le végétal (D'après Leschber et al., 1984; Rose et al., 1979).

		Transfert très faible	Transfert faible	Transfert moyen	Transfert élevé	Transfert très élevé
pH	neutre-alkalin	Cr, Hg, Cu, Ni, Co	Pb, Zn, Cd, Tl, As			Se, Mo
	acide	Se, Mo		Cu, Pb, Cr, As	Zn, Cd, Hg, Co, Ni, Tl	
Eh	oxydant	Cr	Pb	Cu, Co, Hg, Ni, Zn, Cd, As	Mo, Se	
	réducteur	Cr, Hg, Cu, Se, Mo, Cd, Pb, As	Zn, Co, Ni			
CEC	élevée	Cu, Ni, Pb	As, Co, Cr, Hg, Ni, Tl, Cd, Mo, Se, Zn			
	faible				As, Co, Cr, Hg, Ni, Tl, Cd, Mo, Se, Zn	Cu, Ni, Pb

CEC= capacité d'échange cationique

Eh= potentiel d'oxydo-réduction.

I.1.2. Le comportement des métaux dans le sol

I.1.2.1. Facteurs liés au sol intervenant dans la biodisponibilité des métaux lourds

La répartition des métaux lourds entre la phase solide et la phase liquide du sol est fortement influencée par les propriétés du sol telles que le pH, la teneur en matière organique, la force ionique de la solution du sol, les oxydes de Mn et de Fe, le potentiel redox et la nature des surfaces de sorption du sol. Nous ne verrons ici que les facteurs qui influencent le plus la biodisponibilité des métaux pour les végétaux.

Définition de la biodisponibilité des métaux et de la phytodisponibilité

La biodisponibilité est l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment quelconque du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, mésofaune) (Juste, 1988). La biodisponibilité permet d'évaluer à la fois le danger et le risque d'une contamination (Peijnenburg et al., 2007). La phytodisponibilité peut être définie comme l'aptitude d'un élément à être transféré vers la plante durant son développement. Certains facteurs sont connus pour affecter la solubilité et la phytodisponibilité des métaux lourds, c'est le cas notamment des caractéristiques chimiques des métaux, de leurs teneurs, du pH, de la CEC, du potentiel redox, de la texture du sol, de sa teneur en argile et en matière organique. La température du sol peut également avoir une influence sur l'accumulation des métaux lourds dans les cultures (Prasad, 2004).

L'influence du pH

Un pH bas augmente en général la phytodisponibilité des métaux lourds. En effet, plus le sol est acide, plus le transfert de Cd, Cu, Pb, Cr, Co, Zn, Hg, Ni, Tl, As vers la plante est important, car ces éléments sont davantage solubles (Tableau 9).

Le transfert du Cd et du Zn du sol vers les racines est principalement contrôlé par le pH (Wu, 1989). En effet, le prélèvement des métaux lourds est significativement plus important en dessous de pH 6.

La solubilité du Cu est quant à elle peu dépendante du pH car d'un côté le Cu a tendance à être plus soluble en milieu acide, et de l'autre il est complexé par les matières organiques solubles pour des pH supérieurs à 6,5 (Barber, 1995).

Quant le pH du sol est supérieur à 7 la solution du sol contient surtout des carbonates et des bicarbonates et la plupart des métaux lourds ne sont alors pas disponibles pour les plantes. Cependant, il existe des exceptions. En effet, le Mo et le Se sont moins disponibles pour la plante aux pH faibles car au lieu d'être sous forme de cations, ils sont sous forme d'anions (Morel, 1997). L'As, le Mo, le Se et certaines formes de Cr sont plus phytodisponibles pour des sols alcalins et calcaires (Bargagli, 1998).

Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh)

Les conditions, lorsqu'elles sont soit réductrices (Eh faible) soit oxydantes (Eh élevé) vont avoir un effet sur la biodisponibilité des éléments métalliques (Tableau 9). Il est toutefois difficile de dégager de grandes tendances étant donné le nombre de facteurs intervenant.

Action directe d'Eh : les anions oxygénés (As, Mo, Se), le Cr et le Hg changent de degré d'oxydation selon le potentiel d'oxydo-réduction du sol ce qui induit une modification de leur solubilité.

Action indirecte d'Eh : le Cd, le Cu, le Co, le Ni, le Pb et le Zn sont divalents dans les conditions « classiques » de sol. Les effets du potentiel d'oxydo-réduction sont indirects car ils agissent notamment par action sur les oxydes de Fe et de Mn et sur la matière organique.

La capacité d'échange cationique (CEC)

La CEC correspond à la quantité de charges positives portées par les cations susceptibles d'être fixés, de façon réversible, sur les sites chargés négativement de certains constituants du sol. On distingue les sites à charges permanentes dont le nombre varie peu avec les conditions de milieu (minéraux philliteux) et les sites à charges variables (matière organique) dont la quantité est fortement liée au pH. Pour les pays tempérés les cations dissous dans la solution du sol sont attirés par des composants chargés négativement (argiles, oxydes de métaux, matières organiques; Bargagli, 1998). Une CEC élevée indique que la possibilité de fixation sur les charges négatives augmente. Plus la CEC est élevée, plus les cations métalliques (Cd, Pb, Cr, Co, Zn, Hg, Cu, Tl) sont adsorbés ou complexés par les matières organiques, les argiles et les oxydes donc moins assimilables par les plantes (Tableau 9).

Tableau 10: Interactions positives et négatives entre métaux lourds (D'après Tremel-Schaub & Feix, 2005).

Elément	Interaction négative (Inhibition du transfert)	Interaction positive ou négative selon conditions	Interaction positive (Stimulation du transfert)
Ca	Cd, Co, Cr, Ni, Pb	Cu, Zn	
Mg	Cr	Zn	
P	As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Se, Fe	Cu, Mo, Zn	
K	Hg, Cd, Cr, Mo, Tl		
S	As, Mo, Pb, Se, Zn		
N		Cu	Mo, Cd
Cd	Zn, Fe, Ca, P, K, Mn		
Al	Cu		
W	Mo, Se		
Mn	Cu, Zn, As, Cr, Mo, Cd		
Fe	Zn, Cr, Mo, Cd, P		
Al	Cu		
Cu	Mo, Zn, Al, Mn	Cd, Ca, P, N	Cd
Co	Ca		
Cr	Ca, Mg, P, K, Mn, Fe		
Ni	Ca, P		
Pb	Ca, P, S		
Zn	S, Mn, Fe	Ca, Mg, P	
As	P, S, Mn		
Hg	P, K		
Se	P, S, W		
Mo	K, S, W, Mn, Fe	P	N
Tl	K		

Depuis de nombreuses années, les chercheurs essaient de mimer l'absorption des métaux du sol par le végétal. La majorité d'entre eux utilisent pour cela des extractants chimiques. Parmi eux, CaCl_2 et DTPA (diethylenetriaminepentacetic acid) sont les plus cités dans la littérature dans le cadre d'étude de phytodisponibilité des métaux (Esnaola & Millan, 1998 ; Maiz et al., 2000 ; Meers et al., 2005; Wang et al., 2004).

La prédiction de la biodisponibilité des métaux n'est pas simple car le comportement des métaux dans les sols est lié aux paramètres physico-chimiques du sol (pH, teneur en matières organiques, en argile...) mais également à la plante et à sa rhizosphère.

En effet, la mobilité et la disponibilité des métaux dans la rhizosphère peuvent être influencées par l'activité racinaire. Cette activité modifie les concentrations ioniques de la rhizosphère, le potentiel rédox, le pH, ou encore forme des complexes organo-métalliques (Collins et al., 2003).

Les micro-organismes, associés ou non aux racines des végétaux peuvent également influencer le comportement des métaux aux alentours des racines. Ceci est du à la mise en place de divers mécanismes intervenant dans les processus de solubilisation ou d'insolubilisation des métaux dans le sol (Deneux-Mustin, 2003).

1.1.2.2. Interactions entre métaux

Les éléments présents dans la rhizosphère vont interagir entre eux de deux façons : par interaction négative ou positive (Tableau 10). Un élément peut soit stimuler, soit inhiber l'absorption d'un autre élément. Il se peut aussi que l'absence d'un élément aggrave la toxicité d'un autre élément. De plus, l'effet physiologique combiné de 2 éléments (ou plus) peut être plus grand (interactions synergiques) ou plus petit (interactions antagonistes) que la somme des effets physiologiques séparés de chaque élément (Bargagli, 1998). Nous n'évoquerons ici que des principaux effets connus à ce jour.

Les éléments nutritifs tels que le Mg, le Ca et le P peuvent inhiber l'absorption des métaux lourds et vice-versa. En effet, ceux-ci peuvent entrer en compétition pour des mécanismes de transport communs et utiliser les mêmes protéines de transport.

Les phosphates, quand ils sont présents en grande quantité, ont tendance à inhiber l'absorption du Zn et du Cd. Le P interfère également avec l'Al (Prasad, 2004).

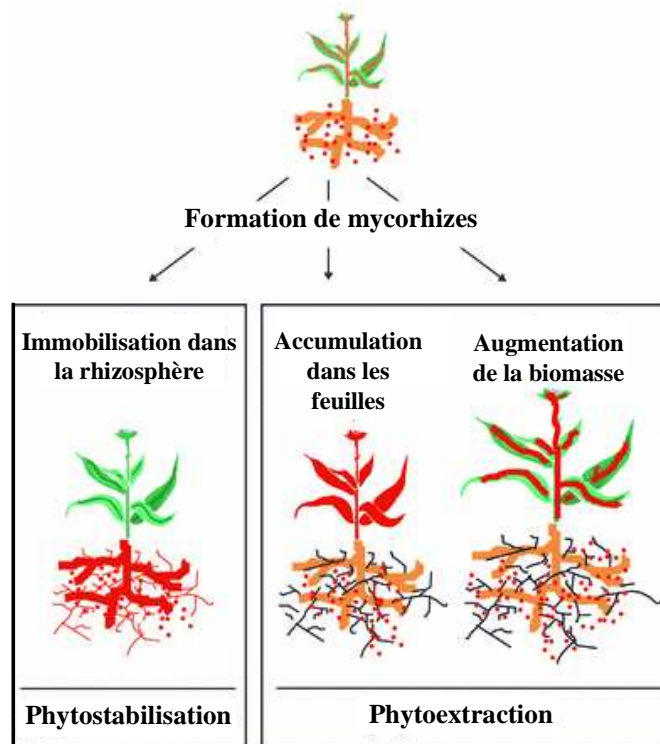


Figure 4: Contribution de la mycorhization dans l'absorption des métaux lourds. Les métaux peuvent être immobilisés au niveau des racines (phytostabilisation) ou être transloqués vers les parties aériennes (phytoextraction). Les mycorhizes peuvent également être bénéfiques pour la croissance de la plante et donc augmenter sa biomasse (D'après Gohre & Paszkowski, 2006).

L'effet du Ca sur les métaux lourds dépend des espèces, en effet il n'y a pas d'effet du Ca sur le prélèvement racinaire du Cd chez la betterave alors qu'il augmente l'absorption de Cd chez le bouleau et diminue son absorption chez le saule (Prasad, 2004).

Le Zn diminue l'absorption du Cd. Cependant, la teneur en Zn chez certaines espèces décroît lorsque l'absorption de Cd, Pb et Cu augmente (Prasad, 2004).

I.1.2.3. Influence des micro-organismes

De nombreux micro-organismes sont présents au niveau de la rhizosphère. Ceux-ci vont influencer les flux et les cycles des éléments métalliques en les mobilisant, en les complexant ou en les accumulant grâce à des processus métaboliques bactériens (Bargagli, 1998). La solubilisation des métaux se trouve alors modifiée par ces micro-organismes surtout par minéralisation de la matière organique, par complexation des éléments métalliques, par modification du pH ce qui tend à modifier leur absorption par la plante. Il peut y avoir également excrétion de ligands organiques ou sidérophores qui maintiennent les métaux en solution.

Les mycorhizes sont par définition une symbiose formée par les champignons avec les racines des végétaux. La plupart des plantes cultivées (environ 80%) forment des mycorhizes leur permettant d'augmenter leur surface d'échange avec le sol et de favoriser également l'absorption de P, mais aussi de métaux lourds comme le Cu et le Zn (Smits & Read, 1997).

De nombreuses données sur l'utilisation des mycorhizes en phytoremédiation sont disponibles (Gohre & Paszkowski, 2006). Les mycorhizes peuvent être utilisées tant en phytoextraction qu'en phytostabilisation (Figure 4), ceci dépend de nombreux facteurs et notamment de l'espèce fongique utilisée (Christie et al., 2004 ; Gaur & Adholeya, 2004; Khan, 2005). Nous ne détaillerons pas davantage l'utilisation de ces champignons étant donné que nous ne nous y sommes pas intéressés dans le cadre de cette thèse.

I.1.3. L'absorption des métaux par les végétaux

I.1.3.1. L'absorption des métaux par les racines et translocation vers les parties aériennes

L'absorption des éléments métalliques ainsi que leur translocation vers les parties aériennes varie à la fois entre éléments et entre espèces végétales (Prasad, 2004).

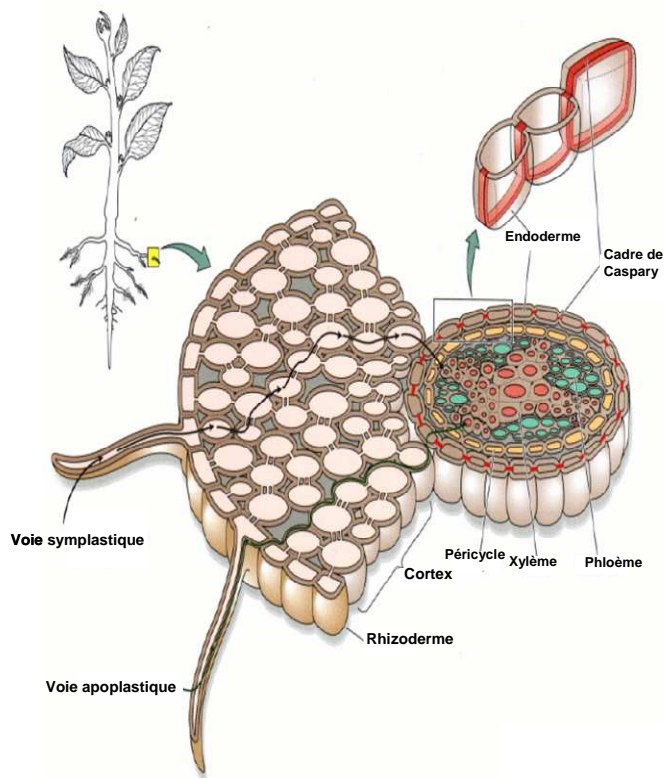


Figure 5: Transport radial dans la racine. Le transport des éléments au niveau des racines peut se faire par voie apoplastique (passage entre les cellules) ou par voie symplastique (passage dans les cellules) (D'après Taiz & Zeiger 2006).

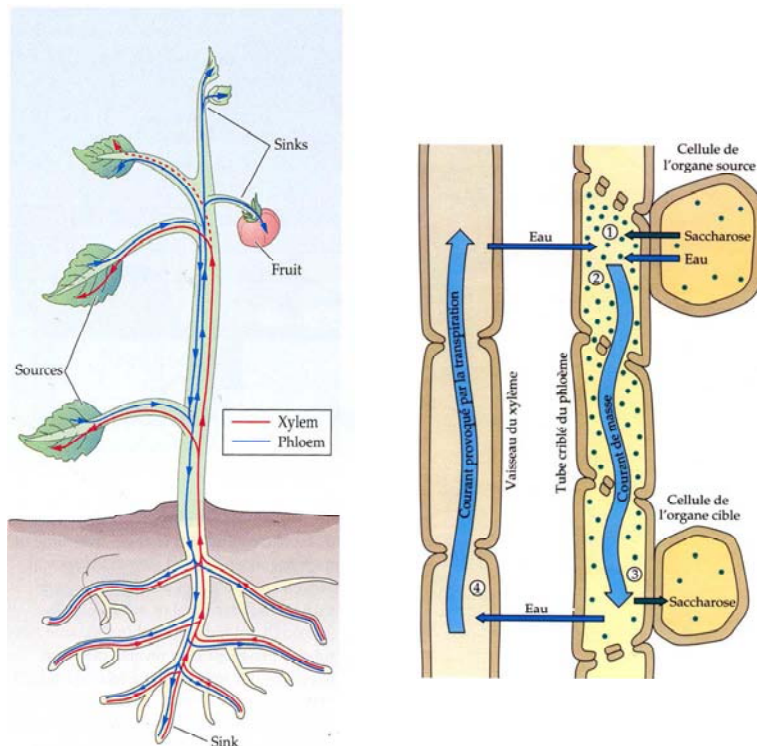


Figure 6: Transport vertical dans la plante entière. Le transport des éléments minéraux se fait grâce à la sève brute et à la sève élaborée dans le xylème et le phloème (D'après Meyer et al., 2008).

Au niveau de la racine, les éléments métalliques peuvent être transportés par voie symplastique (à l'intérieur de la cellule) et apoplastique (à l'extérieur de la cellule) (Figure 5, Barber, 1995).

Le symplasma se définit comme étant le matériel intracellulaire (délimité par la membrane plasmique). Les éléments métalliques traversent la paroi, puis la membrane plasmique et migrent via les plasmodesmes (Figure 5, Tremel-Schaub & Feix, 2005). L'absorption est bien réelle car les métaux se trouvent alors dans le milieu interne de la cellule. Cette absorption peut être passive (le long d'un gradient électrochimique), passive avec dépense d'énergie (pompe à protons) ou active avec dépense d'énergie (*via* un transporteur). Le Cd serait absorbé de manière passive dans 30% des cas (Prasad, 2004).











L'apoplasme est constitué de la paroi perméable et des espaces entre les cellules (Figure 5, Tremel-Schaub & Feix, 2005). On ne parle pas de véritable absorption des éléments mais plutôt de prélèvement car l'apoplasme n'est pas considéré comme étant à l'intérieur strict de la plante. Ce type de transport ne se poursuit que jusqu'à la rencontre de l'endoderme à cadre de Caspary. En effet, à ce niveau les cellules sont recouvertes d'une substance lipidique imperméable, la subérine. Une alternative à cet obstacle est d'absorber les métaux au niveau des parties les plus jeunes des racines qui sont moins subérifiées. La poursuite du transport des éléments se fait donc par l'intérieur des cellules racinaires jusqu'à atteindre les vaisseaux conducteurs de la sève brute.

La sève xylémienne est le principal moyen de transport des ions minéraux des racines vers les parties aériennes (Figure 6). La circulation de la sève brute se fait par poussée racinaire et par appel foliaire lors de la transpiration (Soltner, 1999). Les éléments sont alors distribués dans tous les organes de la plante. Le transport des éléments métalliques dans le phloème est bien plus difficile car celui-ci est constitué de cellules vivantes contenant des substances et des ions qui permettent la fixation des ions métalliques (Tremel-Schaub & Feix, 2005).

1.1.3.2. L'absorption des métaux par les feuilles

L'absorption des métaux par voie aérienne se limite aux cas de forte pollution atmosphérique. Les éléments essentiels ou non essentiels sous forme de poussière ou de gaz pénètrent dans les feuilles à travers les stomates sous forme d'ions après passage à travers la cuticule (Prasad, 2004). La cuticule fonctionne comme un faible échangeur de cations et sa

Tableau 11: Principaux éléments métalliques essentiels ou non essentiels présents dans les végétaux (D'après Larcher, 2003 ; Benton, 1998 ; Kabata-Pendias, 1992).

Eléments métalliques	Ordre de grandeur de la teneur normale en mg kg MS ⁻¹	Ordre de grandeur d'un teneur excessive ou toxique en mg.kg ⁻¹ de masse sèche	Rôles principaux dans le métabolisme végétal des assimilats	Symptômes d'un excès de métaux chez les Angiospermes
				Témoin : 
Cd	0,05 à 0,2	5 à 30	<ul style="list-style-type: none"> •Élément non-essentiel donc n'a pas de rôle essentiel dans le métabolisme. •Forme facilement des complexes avec les métallothionéines. 	<ul style="list-style-type: none"> •Chlorose et enroulement des feuilles, brunissement sur les bords des feuilles •Réduction générale de la croissance 
Co	0,02 à 1	15 à 50	<ul style="list-style-type: none"> • Constituant de la cobalamine (Vit B₁₂) indispensable à la fixation d'azote atmosphérique par les bactéries des légumineuses 	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorose entre les nervures, blanchissement des bords des feuilles 
Cr	0,1 à 0,5	5 à 30	<ul style="list-style-type: none"> •Élément non-essentiel donc n'a pas de rôle essentiel dans le métabolisme. 	<ul style="list-style-type: none"> •Chlorose et nécrose des jeunes feuilles 
Cu	5 à 30	20 à 200	<ul style="list-style-type: none"> •Constituant d'enzymes (cytochrome oxydase, phénol oxydases) et de la superoxyde dismutase •Activateur d'enzymes impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction 	<ul style="list-style-type: none"> •Jeunes feuilles vert foncé avec des points nécrosés 
Mn	30 à 300	400 à 1000	<ul style="list-style-type: none"> •Lié au complexe de dégagement d'O₂ du photosystème II •Cofacteur d'enzymes du cycle de Krebs •Métabolisme primaire 	<ul style="list-style-type: none"> •Croissance stoppée •Chlorose et nécrose des jeunes feuilles 
Mo	0,2 à 5	10 à 50	<ul style="list-style-type: none"> •Constituant d'enzymes du métabolisme azoté (nitrate réductase, nitrogénase) •Assimilation de l'azote et du phosphore et absorption du fer 	<ul style="list-style-type: none"> •Chlorose entre les nervures chez les feuilles âgées puis chez les jeunes feuilles 
Ni	0,1 à 5	10 à 100	<ul style="list-style-type: none"> •Constituant essentiel de l'uréase •Intervient dans le métabolisme des produits de fixation de l'azote atmosphérique 	<ul style="list-style-type: none"> •Chlorose entre les nervures des feuilles jeunes, feuilles gris-vert 
Pb	5 à 10	30 à 300	<ul style="list-style-type: none"> •Élément non-essentiel donc n'a pas de rôle essentiel dans le métabolisme. 	<ul style="list-style-type: none"> •Feuilles vert foncé, flétrissement des vieilles 
Zn	27 à 150	100 à 400	<ul style="list-style-type: none"> •Constituant d'enzymes (anhydrase carbonique, superoxyde dismutase, alcool déshydrogénase). •Activateur d'enzyme (peptidases) •Biosynthèse de l'AIA 	<ul style="list-style-type: none"> •Retard de croissance •Perturbation de la fructification •Feuilles âgées blanc vert 

perméabilité est supérieure pour les cations par rapport aux anions et celle-ci est plus importante au niveau des stomates (Tremel-Schaub & Feix, 2005).

La majeure partie du Cd ou du Pb prélevée par la plante est stockée dans la cuticule et les parois cellulaires sous forme insoluble et ne pénètre donc pas davantage dans la plante (OFEFP, 1996 ; Tremel-Schaub & Feix, 2005). De nombreux paramètres interviennent dans l'absorption des éléments métalliques au niveau des feuilles : la densité stomatique, le pourcentage d'humidité du dépôt, l'élément métallique en lui-même (le Cd, le Zn et le Cu pénètrent plus facilement dans la feuille que le Pb qui reste fixé au niveau de la cuticule (Kabata-Pendias, 1992)), l'espèce végétale (composition de sa cuticule variable entre espèces) et enfin les stress dus à l'environnement (modification de la perméabilité foliaire).

I.1.3.3. Les teneurs en éléments métalliques dans les végétaux (Tableau 11)

Les éléments nécessaires pour assurer la croissance et le développement de la plante sont dits essentiels. Ils sont traditionnellement subdivisés en 2 catégories : les macro-éléments et les micro- ou oligo-éléments. Ce classement est le reflet des concentrations relatives de ces éléments dans les tissus végétaux.

Les macroéléments (exprimés en % de matière sèche) comprennent l'N (1 à 3%), le K (2 à 4%), le Ca (1 à 2%), le Mg (0,1 à 0,7%), le S (0,1 à 0,6%) et le P (0,1 à 0,5%). On peut y ajouter Na, Cl et Si qui se rencontrent à des taux très variables suivant les végétaux.

Les micro-éléments comprennent une vingtaine d'éléments qui sont classés ici par concentration décroissante : Fe, Mn, Zn, Cu, B, Al, Ni, Co, Mo, I, Br, F.

Les autres contaminants métalliques ne sont pas essentiels pour la plante. Nous pouvons constater que les teneurs normalement retrouvées chez les plantes ainsi que leurs teneurs observées lors de contamination des sols varient considérablement (Tableau 11). Ces teneurs dépendent de l'espèce végétale, de la variété mais aussi l'âge. Les données concernant les principales fonctions ainsi que les principaux symptômes recensés sont consignés dans le Tableau 11. Nous ne les détaillerons donc pas davantage ici et nous nous concentrerons sur les caractéristiques particulières de phytodisponibilité de ces métaux.

Le Cd est très phytodisponible et peut s'accumuler à la fois dans les racines et dans les parties aériennes. Sa biodisponibilité est plus importante pour des pH acides et elle peut diminuer si on ajoute de la chaux, du Cu ou du Zn au sol.

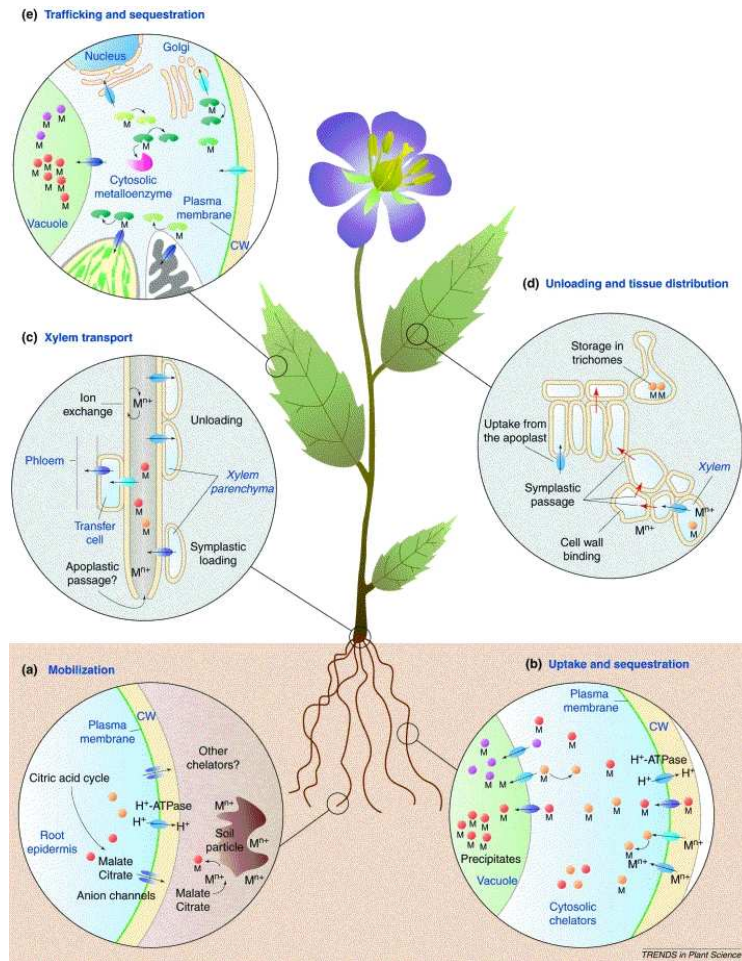


Figure 7: Mécanismes moléculaires impliqués dans l'accumulation des métaux (M) chez les plantes. Les ions métalliques sont mobilisés par la sécrétion de chélateurs (a) et sont ensuite absorbés grâce à des systèmes de transport localisés sur la membrane plasmique avant d'être chélatés et/ou transportés vers la vacuole (b). Ensuite, les métaux sont transportés des racines vers les parties aériennes via le xylème (c). Une fois dans la feuille, les métaux se déplacent entre les cellules grâce aux plasmodesmes avant d'être stockés dans les trichomes (d) ou dans les organites internes comme l'appareil de Golgi, la vacuole, le réticulum endoplasmique (e). (D'après Clemens, 2002).

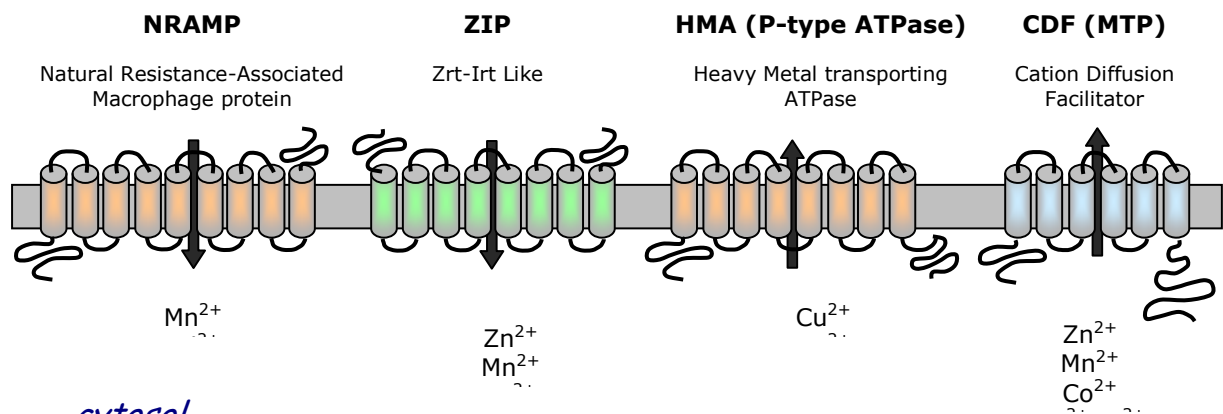


Figure 8: Principales familles de transporteurs de métaux chez les plantes.

La disponibilité du Co dépend des oxydes de Mn qui fixent le Co (Farago, 1994).

La phytodisponibilité du Cr augmente en cas de déficience en Fe de la plante. Le Cr(III) s'accumule dans les racines alors que le Cr(VI) est transloqué vers les parties aériennes (Merian, 1991).

Le Cu voit sa phytodisponibilité diminuer avec le chaulage ou avec l'apport de matières organiques. Le Zn ralentit l'absorption du Cu. Le Cu a tendance à s'accumuler dans les racines (Tremel-Schaub & Feix, 2005).

Le Ni est facilement prélevé par la plante, cela devient évident quand on considère le nombre d'espèces hyperaccumulatrices de Ni. La phytodisponibilité est plus importante à faible pH.

La biodisponibilité du Pb est également dépendante du pH (Siberlin, 1996). Le Pb est fixé par les oxydes de Fe et d'Al (Tremel-Schaub & Feix, 2005).

Comme pour la plupart des éléments métalliques, la phytodisponibilité du Zn dépend surtout du pH. Le Zn se concentre surtout dans les racines mais est également présent dans les parties aériennes. Le chaulage, un apport d'argile, de Fe ou de P diminuent le transfert du Zn vers les plantes (Tremel-Schaub & Feix, 2005).

I.1.4. Les transporteurs de métaux

Comme exposé précédemment, le Cu, le Fe, le Co, le Ni, le Mn et le Zn sont des éléments métalliques essentiels pour les métabolismes cellulaires des végétaux car ce sont des cofacteurs catalytiques ou structuraux de facteurs de transcription et d'autres protéines et ils sont essentiels à la fois pour les fonctions chloroplastiques et mitochondriales (Vallee & Auld, 1990). Etant donné que ces métaux sont essentiels pour des processus métaboliques, les plantes ont besoin de systèmes capables de maintenir leurs concentrations à des niveaux optimaux pour la plante même quand l'apport est faible et nécessitent un système de transport au niveau de la membrane plasmique. De plus, pour éviter la toxicité liée à ces métaux, la plante doit aussi posséder des systèmes de transport qui contrôlent la concentration intracellulaire en expulsant les métaux indésirables ou en les stockant dans des compartiments intracellulaires.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'absorption et l'accumulation des métaux de transition chez les plantes sont variés (Figure 7). Les ions métalliques sont mobilisés par la sécrétion de chélateurs et par l'acidification du sol, puis sont absorbés par différents systèmes de transport. Dans les cellules, les métaux sont chélatés et peuvent être stockés dans la vacuole. Ils peuvent être transférés dans les parties aériennes en passant par

Tableau 12: Classification selon le système TC des familles de transporteurs répertoriés chez les plantes. Cette classification est consultable sur le site: <http://plantst.genomics.purdue.edu/plantst/html/classification.shtml>.

Numéro TC	Famille
1.A.1	Voltage Gated Ion Channel (VIC)
1.A.4	Transient Receptor Potential Ca ²⁺ Channel (TRP-CC) Family
1.A.8	The Major Intrinsic Protein (MIP) Family
1.A.10	The Glutamate-gated Ion Channel (GIC) Family
1.A.11	The Chloride Channel (CIC) Family
1.A.13	The Epithelial Chloride Channel (E-CIC) Family
1.A.14	The Non-selective Cation Channel-1 (NSCC1) Family
1.A.15	The Non-selective Cation Channel-2 (NSCC2) Family
1.A.16	The Yeast Stretch Activated Ca ²⁺ Channel (Mid1) Family
1.A.17	The Chloroplast Outer Envelope Solute Channel (CSC) Family
1.A.18	The Chloroplast Envelope Anion Channel-forming (Tic110) Family
1.A.20	The Cytochrome b558 (CytB) H ⁺ -channel Family
1.A.31	The Annexin (Annexin) Family
1.A.35	The CorA Metal Ion Transporter (MIT) Family
1.B.8	The Mitochondrial and Plastid Porin (MPP) Family
1.B.28	The Plastid Outer Envelope Porin of 24kDa (OEP24) Family
1.C.6	The Yeast Killer Toxin (YKT-K1) Family
1.C.35	The Amoebapore (Amoebapore) Family
1.C.40	The Bactericidal Permeability-Increasing Protein (BPIP) Family
1.C.44	The Plant Thionin (PT) Family
2.A.1	Major Facilitator (MFS) Superfamily
2.A.2	The Glycoside-Pentoside-Hexuronide (GPH) Symporter Family
2.A.3	The Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Family
2.A.4	The Cation Diffusion Facilitator (CDF) Family
2.A.5	The ZIP (ZRT IRT-like Protein) Family
2.A.6	The Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) Superfamily
2.A.7	The Drug/Metabolite Transporter(DMT) Superfamily
2.A.9	The Cytochrome Oxidase Biogenesis (Oxa1) Family
2.A.12	The ATP:ADP Antiporter (AAA) Family
2.A.16	The Tellurite-resistance/Dicarboxylate Transporter (TDT) Family
2.A.17	The Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) Family
2.A.18	The Amino Acid/Auxin Permease (AAP) Family
2.A.19	The Ca ²⁺ :Cation Antiporter (CaCA) Family
2.A.20	The Inorganic Phosphate Transporter (PiT) Family
2.A.21	The Solute:Sodium Symporter (SSS) Family
2.A.28	The Bile Acid:Na ⁺ Symporter (BASS) Family
2.A.29	The Mitochondrial Carrier (MC) Family
2.A.30	The Cation-Chloride Cotransporter (CCC) Family
2.A.31	The Anion Exchanger (AE) Family
2.A.36	The Monovalent Cation:Proton Antiporter-1 (CPA1) Family
2.A.37	The Monovalent Cation:Proton Antiporter-2 (CPA2) Family
2.A.38	The K ⁺ Transporter (Trk) Family
2.A.39	The Nucleobase:Cation Symporter-1 (NCS1) Family

Numéro TC	Famille
2.A.40	The Nucleobase:Cation Symporter-2 (NCS2) Family
2.A.44	The Formate-Nitrite Transporter (FNT) Family
2.A.47	The Divalent Anion:Na ⁺ Symporter (DASS) Family
2.A.49	The Ammonium Transporter (Amt) Family
2.A.50	The Glycerol Uptake (GUP) Family
2.A.53	The Sulfate Permease (SuP) Family
2.A.54	The Mitochondrial Tricarboxylate Carrier (MTC) Family
2.A.55	The Metal Ion (Mn ²⁺ -iron) Transporter (Nramp) Family
2.A.57	The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT) Family
2.A.59	The Arsenical Resistance-3 (ACR3) Family
2.A.60	The Organo Anion Transporter (OAT) Family
2.A.66	The Multi Antimicrobial Extrusion (MATE) Family
2.A.67	The Oligopeptide Transporter (OPT) Family
2.A.69	The Auxin Efflux Carrier (AEC) Family
2.A.71	The Folate-Biopterin Transporter (FBT) Family
2.A.72	The K ⁺ Uptake Permease (KUP) Family
3.A.1	The ATP-Binding Cassette (ABC) Superfamily
3.A.2	The F-type, V-type and A-type ATPase (F-ATPase) Superfamily
3.A.3	The P-Type ATPase (P-ATPase) Superfamily
3.A.5	The Type II (General) Secretory Pathway (IISP) Family

l'apoplasme ou le symplasme sous forme chélatés. Une fois dans les cellules des tissus foliaires, ils sont pris en charge et détoxifiés par différents systèmes (Clemens, 2002).

La vacuole est le plus gros compartiment cellulaire d'une plante puisqu'elle représente jusqu'à 80% de son volume. Celle-ci constitue un réservoir de métabolites et de nutriments, elle intervient également dans l'homéostasie des ions (Martinoia et al., 2000). Certains transporteurs ont été caractérisés et semblent avoir une localisation vacuolaire (Blaudez et al., 2003; Van der Zaal et al., 1999). Par exemple, chez le genre *Thlaspi*, la compartimentation se réalise dans les vacuoles (Persans et al., 2001).

En théorie 90% du contenu métallique d'une plante est localisé dans les racines. Cependant chez les espèces hyperaccumulatrices le ratio des concentrations en métaux dans la feuille par rapport aux racines sera supérieur à 1 (Weber et al., 2004). En effet, les plantes diffèrent dans leur capacité à transloquer les métaux lourds de la racine à la feuille. C'est pourquoi le Pb, le Cr et le Cu seront plutôt retrouvés dans les racines alors que le Cd, le Ni et le Zn seront au niveau des tissus aériens (Pulford & Watson, 2003).

Les principales familles de transporteurs de métaux impliquées dans ces mécanismes sont les ZIPs (ZRT-IRT-like Proteins), les CDFs (Cation Diffusion Facilitator) (Colangelo & Gueriot, 2006), les Nramp (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) et les P_{1B}-ATPases (Figure 8).

1.1.4.1. Classification des transporteurs : le système TC

Une classification simple des systèmes de transports a été développée (Saier, 2000 ; Busch & Saier, 2002) et approuvée par le comité « International Union of Biochemistry and Molecular Biology ». La nomenclature de ce système de classification TC (Transport Commission) est homologue au système de classification enzymatique EC (Enzyme Commission) déjà établi en 1992. Comme le système EC, la classification TC prend en compte les données concernant la fonction des transporteurs mais également des informations phylogénétiques, il est désigné par quatre chiffres et une lettre.

Ce système de classification est consultable sur le site internet <http://plantst.genomics.purdue.edu/plantst/html/classification.shtml> (Saier et al., 2006).

Les systèmes de transport sont classés selon cinq critères, chacun de ces critères correspondant à un des cinq chiffres ou lettres. Le premier chiffre désigne la classe du

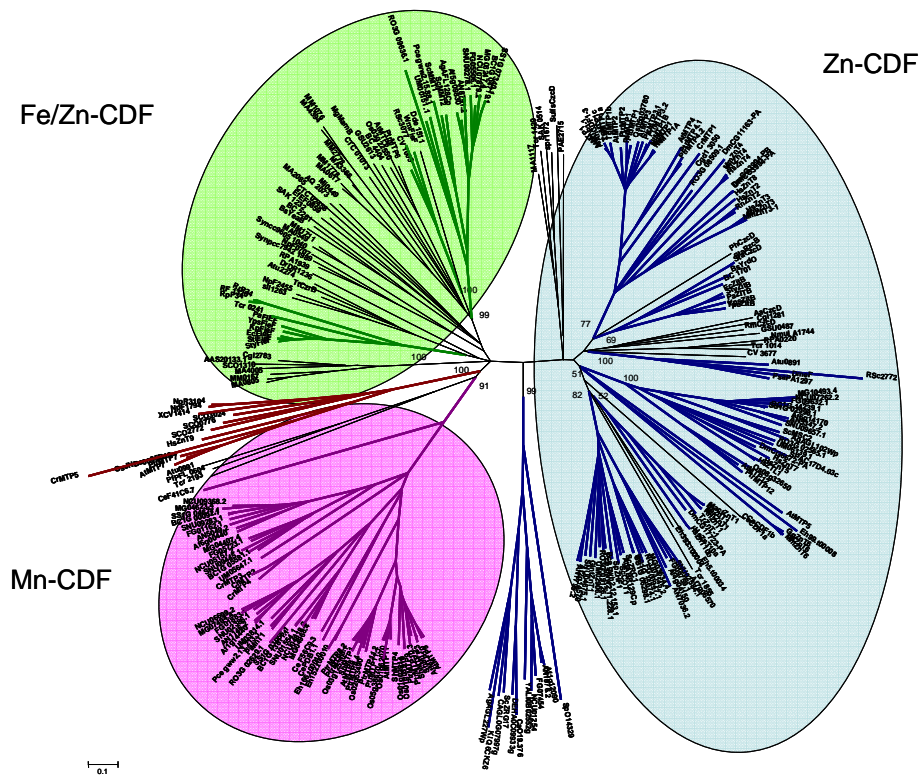


Figure 9: Arbre phylogénétique de la famille CDF. Trois grands groupes apparaissent: les transporteurs de Mn (en mauve), de Fe et Zn (en vert) et de Zn (en bleu). (Montanini et al., 2007).

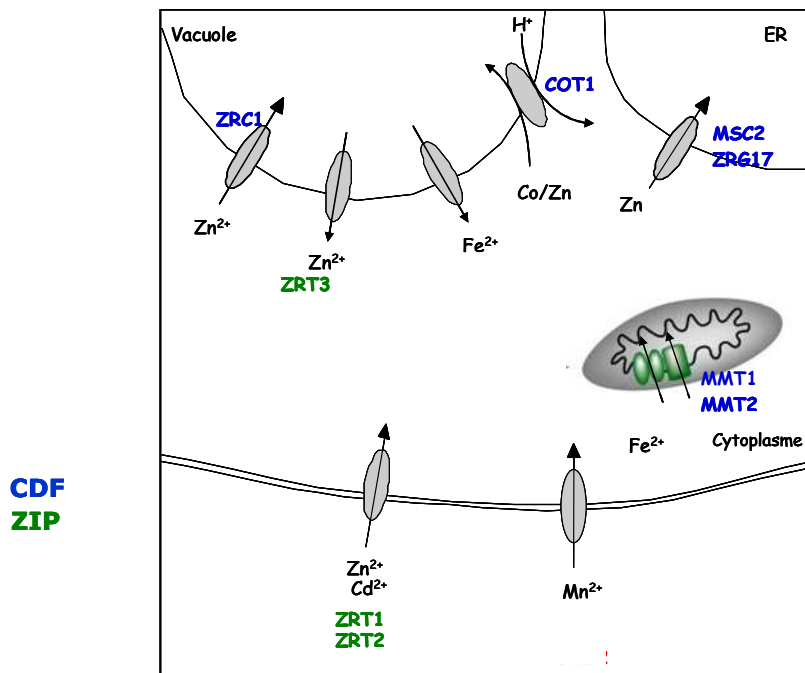


Figure 10: Localisation cellulaire et spécificité des transporteurs de métaux chez la levure. Sont représentés ici les transporteurs des familles CDF et ZIP.

transporteur, suivi d'une lettre qui désigne la sous-classe. Les derniers chiffres désignent la famille, la sous-famille et le substrat transporté.

Le Tableau 12 présente les familles de transporteurs actuellement répertoriées chez les végétaux.

I.1.4.2. La famille des CDFs (cation diffusion facilitator)

Les CDFs (TC 2.A.4) présents chez les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères ont été découverts par Nies et Silver en 1995. Ce sont majoritairement des antiports $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ (MacDiarmid et al., 2002) catalysant l'efflux de cations métalliques tels que Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} , depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou vers les compartiments subcellulaires (Delhaize et al., 2003 ; Hall & Williams, 2003). La majorité des CDFs possède 6 domaines transmembranaires (TMDs) putatifs et des extrémités N et C terminales cytoplasmiques. Une séquence signature entre les domaines transmembranaires I et II a été proposée par Paulsen et Saier en 1997. De plus, il a été démontré qu'un domaine C-terminal, riche en résidus histidine et caractéristique d'efflux de cations était présent chez tous les membres (Mäser et al., 2000). Les domaines transmembranaires I, II, V et VI, impliqués dans le transfert du métal, sont très conservés (Haney et al., 2005 ; Montanini et al., 2007).

Chez les plantes, les CDFs sont usuellement appelés MTPs (Metal Tolerance Proteins) et ZnT chez les vertébrés (Zinc transporter) ou SLC30 (Solute carrier family 30). Une étude phylogénétique récente montre que les CDFs peuvent être répartis selon leur spécificité de substrat en 3 grands groupes : les Mn-CDFs, les Fe/Zn CDFs et les Zn-CDFs (Figure 9 ; Montanini et al., 2007).

Certains membres eucaryotiques de la famille CDF ont été caractérisés fonctionnellement. Chez les mammifères, ZnT1 est localisé au niveau de la membrane plasmique et joue un rôle dans l'efflux du Zn (Palmiter & Findley, 1995). ZnT2, présentant une structure similaire à celle de ZnT1, est localisé sur les membranes de vésicules internes et participe à la séquestration du Zn dans ces vésicules (Palmiter et al., 1996). Il a également été démontré que d'autres ZnT sont impliqués dans l'efflux du Zn en dehors des cellules ou dans les compartiments intracellulaires.

Chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) les transporteurs de la famille CDF COT1, ZRC1, MSC2, ZRG17, MMT1 et MMT2 ont également été caractérisés (Figure 10). Il apparaît que ScMMT1 et ScMMT2 sont des transporteurs de Fe (Li & Kaplan, 1997). ScMSC2 est un transporteur de Zn localisé au niveau du reticulum endoplasmique et du noyau (Li & Kaplan, 2001). ScCOT1 est un transporteur de Co, de Zn et de Cd (Conklin et al., 1992) alors que ScZRC1 transporte le Zn et le Co (Kamizono et al., 1989) ; tous deux sont localisés au niveau des vacuoles. ScZRG17 est également un transporteur de Zn (Ellis et al., 2005).

Certains MTPs ont été caractérisés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Le premier CDF identifié chez *Arabidopsis* a été nommé ZAT1 (ZAT pour Zinc Transporter of *Arabidopsis*) par Van der Zaal et al. (1999). ZAT possède six domaines transmembranaires putatifs et une région riche en histidine entre les domaines IV et V. Cependant, l'appellation ZAT étant réservée à *Arabidopsis*, il a fallu adapter le nom à toutes les plantes d'où l'idée de parler de MTPs, aussi ZAT1 correspond maintenant à AtMTP1.

La tolérance au Zn conférée par les protéines MTP1 (Mäser, et al., 2001) est souvent due au transport du Zn vers la vacuole (Becher et al., 2004; Blaudez et al., 2003; Persans et al., 2001; Van der Zaal et al., 1999). Plusieurs MTPs, AtMTP1, AtMTP3, PtdMTP1, ont été caractérisés comme des transporteurs de Zn (Bloss et al., 2002 ; Arrivault et al., 2006 ; Blaudez et al., 2003).

Enfin, d'autres MTPs, comme AtMTP8, AtMTP11, ShMTP1 - ShMTP4, sont impliqués dans le transport du Mn (Delhaize et al., 2003). Des études menées sur le peuplier, confirment que PtMTP11.1 et PtMTP11.2 sont des transporteurs de Mn localisés au niveau de l'appareil de Golgi (Peiter et al., 2007).

1.1.4.3. La famille des ZIPs (ZRT-IRT-like proteins)

Les transporteurs de la famille ZIP (TC 2.A.5) regroupent les homologues de ScZRT1 et ScZRT2 (Zinc-Regulated Transporter) qui sont respectivement des transporteurs de Zn à forte et à faible affinité (Zhao & Eide, 1996) et les homologues de AtIRT1 (Iron-Regulated Transporter) qui est un transporteur de cations exprimé dans les racines de plantes carencées en Fe (Eide et al., 1996). Il a été démontré que ces protéines transportaient le Zn et/ou d'autres ions métalliques depuis l'espace extracellulaire ou les organites vers le cytoplasme.

Comme les CDFs, les ZIPs sont présents chez les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères (Gaither & Eide, 2001). La plupart des protéines de la famille ZIP possède huit domaines transmembranaires putatifs et des topologies similaires avec des extrémités C et N terminales localisées au niveau du côté extracytoplasmique de la membrane (Guerinot, 2000). La différence de taille des ZIPs (309 à 476 acides aminés) est principalement due à la longueur de la région variable constituée par les domaines transmembranaires III et IV. Dans la plupart des cas, cette région variable contient un domaine putatif cytoplasmique de fixation du métal riche en résidus histidine (Ya-Fen Lin et al., 2009).

Les ZIPs sont impliqués dans le transport du Zn, du Fe, du Mn et du Cd. Ces transporteurs se différencient principalement par leur spectre et leur spécificité de substrat (Guerinot, 2000). Chez *S. cerevisiae*, il a été mis en évidence que ScZRT1 et ScZRT2 étaient des transporteurs de Zn au niveau de la membrane plasmique (MacDiarmid et al., 2002 et Figure 10). ScZRT3 transporte le Zn de la vacuole vers le cytoplasme (MacDiarmid et al., 2000) alors que ScLIV1 exporte le Zn vers le réticulum endoplasmique. On peut également noter que l'homologue de ce transporteur est présent chez tous les eucaryotes (Kumanovics et al., 2006). ScATX2 est quant à lui impliqué dans l'homéostasie du Mn (Lin & Culotta, 1996).

Chez *A. thaliana*, plusieurs membres ZIP ont été caractérisés. AtIrt1 est considéré comme le principal transporteur de forte affinité de Fe²⁺ au niveau de l'absorption racinaire (Vert et al., 2002). Les plantes surexprimant AtIrt1 accumulent également le Zn et le Cd lors de carence en Fe ce qui signifie que AtIRT1 prend également en charge le Zn et le Cd (Connolly et al., 2002). D'autre part, d'autres études ont démontré que AtIRT1 pouvait également transporter le Co et le Mn (Eide et al., 1996; Korshunova et al., 1999; Vert et al., 2002). AtIRT2, tout comme AtIRT1, est induit lors d'une carence en Fe. Cependant, AtIRT2 est plus spécifique car il transporte uniquement le Fe et le Zn (Vert et al., 2001). AtIRT3 est un transporteur de Fe et de Zn localisé sur la membrane plasmique (Ya-Fen Lin et al., 2009). D'autres membres ZIP, AtZIP1 et AtZIP3, sont surtout exprimés dans les racines des plantes carencées en Zn et jouent donc un rôle dans le transport de cet élément (Grotz et al., 1998). Bien qu'étant aussi exprimé dans les racines de plantes carencées en Zn, AtZIP4 est un transporteur de Zn et de Cu (Wintz et al., 2003). AtZIP7 est exprimé à la fois dans les racines et dans les parties aériennes en cas de carence en Zn (Grotz et al., 1998).

Les transporteurs de la famille ZIP n'ont pas été uniquement caractérisés chez *Arabidopsis* mais également chez d'autres dicotylédones ainsi que chez des monocotylédones.

En effet chez *Oryza sativa*, OsIRT1 et OsIRT2 ont également été caractérisés comme étant des transporteurs de Fe exprimés en cas de carence en Fe (Bughio et al., 2002 ; Ishimaru et al., 2006). OsIRT2 est un transporteur de plus faible affinité qu'OsIRT1 (Ishimaru et al., 2006). OsZIP1, OsZIP3 et OsZIP4 sont surexprimés dans les feuilles et dans les parties aériennes lors de carence en Zn (Ramesh et al., 2003 ; Ishimaru et al., 2005). De plus, OsZIP2 est surexprimé uniquement dans les racines et OsZIP5 uniquement dans les parties aériennes en cas de carence en Zn (Bughio et al., 2002). OsZIP7.1 est surexprimé dans les parties aériennes en cas de carence en Zn alors qu'OsZIP7.2 est surexprimé dans les racines lors de carence en Fe (Yang et al., 2009).

Chez *Thlaspi caerulescens*, TcZNT1 et TcZNT2 ont été caractérisés comme étant des transporteurs à forte affinité de Zn et de faible affinité de Cd (Pence et al., 2000). Chez une espèce non-accumulatrice (*Thlaspi arvense*), ces transporteurs ne sont exprimés qu'en cas de carence en Zn (Assuncao et al., 2001).

Enfin, chez *Medicago truncatula*, MtZIP1, MtZIP5 et MtZIP6 transportent du Zn, MtZIP4 et MtZIP7 transportent du Mn alors que MtZIP3, MtZIP5 et MtZIP6 transportent du Fe (Lopez-Millan et al., 2004).

I.1.4.4. Les autres familles de transporteurs de métaux

La famille des ATPases comprend des transporteurs qui ont pour rôle de maintenir l'homéostasie des métaux. Ils doivent donc maintenir une concentration idéale et prévenir l'accumulation de ces ions à des niveaux toxiques.

La famille Nramp est impliquée dans le transport d'ions métalliques divalents. Cette famille a été très conservée au cours de l'évolution.

Nous nous sommes limités à l'analyse des transporteurs des familles CDF et ZIP, les familles des ATPases et Nramp étant analysées par d'autres membres du projet PHYTOPOP.

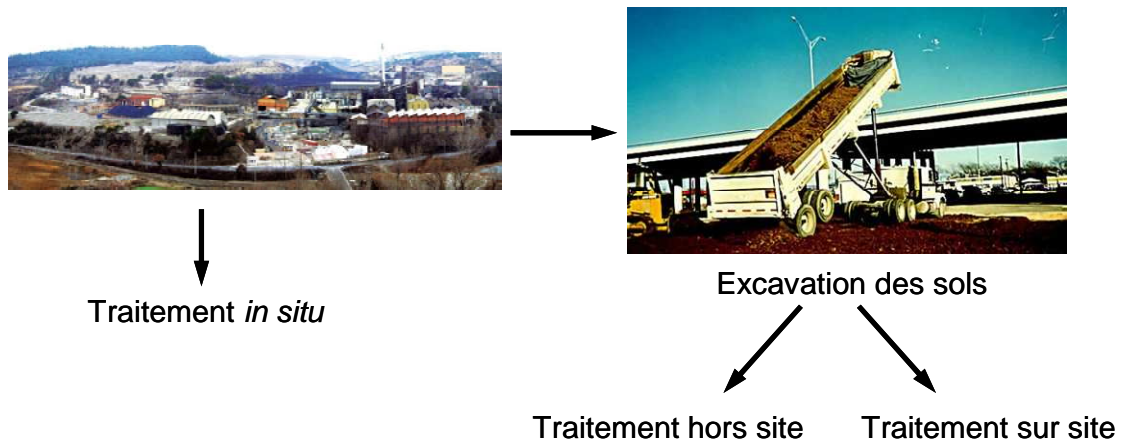


Figure 11: Techniques de décontamination des sols pollués. Les techniques de traitement des sols pollués sont classées en trois grandes catégories : les procédés physicochimiques, thermiques et biologiques. Elles se distinguent par leur mode de mise en œuvre : techniques *ex situ* (hors site et sur site) ou techniques *in situ*.

I.2. Les solutions pour dépolluer les sols contaminés

La décontamination est un ensemble de procédés consistant à épurer ou tout au moins à isoler un milieu ayant été exposé à une pollution chronique ou récurrente l'ayant rendu inutilisable pour des activités domestiques, agricoles ou industrielles. Le traitement concerne des terres excavées ou des sols et nappes phréatiques encore en place.

Opération difficile et généralement coûteuse, la décontamination est liée à la nature du polluant et au degré de contamination, de plus l'assainissement d'un sol doit commencer par une étude préalable approfondie car il faut bien évaluer les avantages et les inconvénients des diverses méthodes. Pour résoudre un problème de décontamination d'un sol, il n'existe pas de solution exclusive. Le traitement à mettre en œuvre est souvent la combinaison de plusieurs techniques. Dans une logique de développement durable et lorsqu'ils restent compatibles avec les usages et les délais envisagés, la réhabilitation d'un site doit privilégier le traitement *in situ* ou la régénération naturelle à l'excavation systématique des terres. (Circulaire du 18 octobre 2005 relative à la mise en œuvre des nouvelles dispositions introduites dans le décret n°77-1133 du 21 septembre 1977 concernant la cessation d'activité des installations classées - Choix des usages, BO MEDD n°06-2 du 30 janvier 2006).

Il est possible de distinguer trois types de techniques de traitements :

- les traitements physico-chimiques (venting, lavage des sols, stripping, malaxage, géo membrane, détournement hydraulique...)
- les traitements biologiques (bio lixiviation, bio venting, bio réacteur, bioremédiation...)
- les traitements thermiques (incinération, gazéification et post combustion, désorption thermique, vitrification).

Trois techniques de mise en œuvre sont envisageables selon le type de pollution (Figure 11).

- *in situ*
- sur le site après excavation des terres
- hors site

Nous nous limiterons à détailler les techniques de décontamination biologiques.



Figure 12: Image de biotertre (ou biopile).

Tableau 13: Comparaison des différentes techniques de traitement hors site (estimations de 2006, source: ADEME).

Type d'installation hors site	Proportion des cas de traitements toutes catégories	Quantité de sol dépollué par an	Coût par tonne
Traitement biologique	17 %	376100 t	45-85 €
Stockage de déchets dangereux	2,7 %	59600 t	70-130 €
Désorption thermique	2,9 %	116300 t	55-100 €
Incinération	0,9 %	19000 t	350-500 €
Lavage de terres	2,8 %	2000 t	250-650 €
Stockage de déchets non dangereux	10,3 %	228300 t	50-90 €

I.2.1. Les différentes techniques de mise en œuvre pour la dépollution d'un sol

I.2.1.1. Installation de traitement biologique (biocentre, centre de traitement et de valorisation des terres)

La technique consiste à optimiser la dégradation biologique des polluants contenus dans les sols par leur mise en biotertres (nommé aussi biopiles) dans une installation adaptée (Figure 12).

Afin d'optimiser le traitement biologique, il est nécessaire d'effectuer un prétraitement des sols afin de travailler avec une granulométrie et une structure de sol homogènes. Le prétraitement se fait soit à l'arrivée des sols sur le centre soit au moment de la constitution du biotertre.

Le traitement biologique des sols pollués consiste en la dégradation des polluants (essentiellement des hydrocarbures) par des bactéries ou des champignons. Pour permettre une bonne dégradation, une aération forcée est mise en place dans le biotertre. Il peut être nécessaire d'ajouter des bactéries exogènes aux sols pollués, des nutriments ou encore des agents structurants. Les micro-organismes responsables de la biodégradation sont soit endogènes (ceux présents naturellement dans les sols pollués) soit exogènes (ajoutés aux sols pollués). Le développement de l'activité microbienne nécessite de maintenir des conditions d'humidité suffisantes.

Les quantités de sols traitées sont de quelques dizaines de tonnes à quelques milliers. Les biotertres sont installés sur une plateforme étanche permettant la collecte et le recyclage ou le traitement des lixiviats. Ils peuvent être bâchés ou sous hangar.

Les polluants doivent être partiellement ou totalement métabolisables par les micro-organismes. Ce sont essentiellement des composés organiques ou xénobiotiques : hydrocarbures pétroliers (essences, gazole, fioul, pétrole brut), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), solvants chlorés, autres composés: alcools, glycols, cétones, phénols, cyanures, PCB (polychlorobiphényles), PCP (polychlorophénols), pesticides.

La durée du traitement varie de 2 mois à 1 an et le rendement du traitement biologique varie en fonction des concentrations en polluants, de leur nature, de leur toxicité, ainsi que de la biodégradabilité de ceux-ci. C'est la technique hors-site la moins onéreuse et la plus utilisée (Tableau 13).

I.2.1.2. Choix d'une technique appropriée

C'est le caractère physico-chimique du polluant dont est sujette la réhabilitation qui est le paramètre capital dans le choix d'une méthode. Un site contaminé étant constitué d'un sol contenant des polluants, d'éventuelles installations ainsi que d'une nappe phréatique, d'eaux superficielles et d'un environnement atmosphérique éventuellement menacé, quatre types de critères présideront au choix d'une technique d'assainissement adaptée :

- ceux concernant les polluants eux-mêmes (nature, quantité, concentration, localisation, état physico-chimique, mobilité, dégradabilité)
- ceux concernant le site (accessibilité, surface, caractéristiques bio-physico-chimiques, bâtiments)
- ceux concernant l'environnement du site (population, activités, écosystème)
- des critères plus généraux concernant le contexte économique et réglementaire ainsi que la destination future du site.

D'une façon générale, le choix d'un procédé dépend avant tout des caractéristiques initiales du sol pollué considéré et des conditions technico-économiques d'élimination. Combinant des essais de laboratoire et sur le terrain, des études de faisabilité et d'applicabilité permettront d'identifier, parmi tous les traitements existants, ceux qui sont envisageables pour un site donné. Parmi ceux-ci, celui qui respectera au mieux les contraintes économiques, environnementales, politiques, sociales et culturelles du lieu sera retenu dans un premier temps.

La performance de celui-ci sera ensuite confirmée par l'établissement d'un bilan environnemental global des opérations qu'il implique, à savoir :

- traitement du site pollué : risques et impacts pour la population et les écosystèmes avoisinants avant, pendant et après le traitement
- traitement des polluants : émissions polluantes, impacts et risques pour la population et les écosystèmes liés au traitement et au transport des polluants et de leurs résidus ainsi qu'à leur éventuel stockage final
- chaîne de traitements mise en œuvre : énergie consommée, matières premières nécessaires et émissions polluantes résultantes ; impacts et risques pour la population et les écosystèmes.

Ces différents procédés, qui font appel à des traitements thermiques, biologiques ou chimiques impliquent des coûts dont une estimation est fournie dans le Tableau 13.

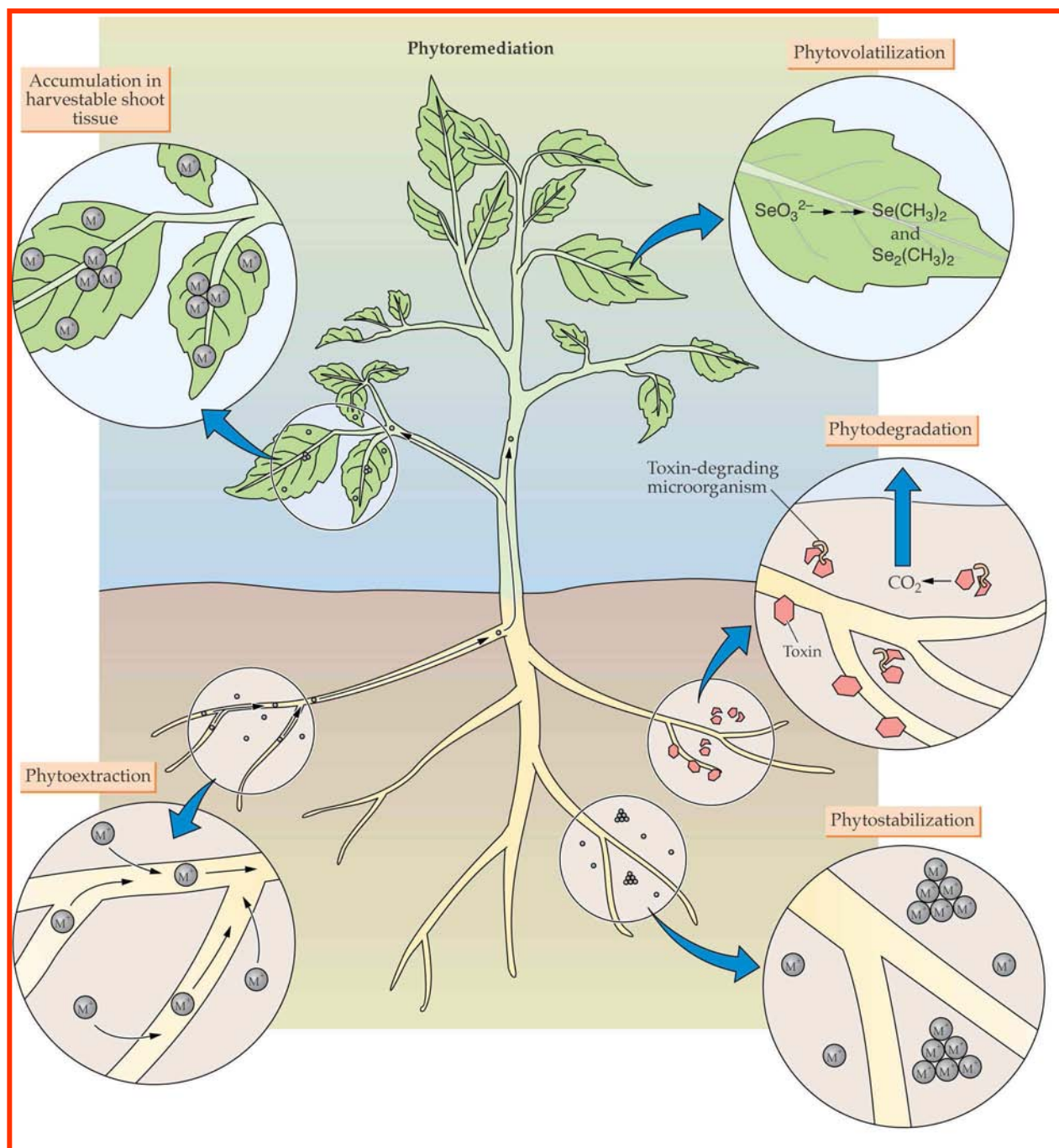


Figure 13: Les différents types de phytoremédiation. Nous pouvons ainsi distinguer la phytoextraction (extraction des métaux du sol pour les accumuler dans les parties aériennes de la plante), la phytostabilisation (la mobilité des métaux est réduite, ceux-ci restent emprisonnés au niveau des racines), la phytodégradation (dégradation des polluants à l'aide d'enzymes) et enfin la phytovolatilisation (les éléments toxiques comme le Se sont transformés en éléments volatiles moins toxiques) (D'après Buchanan et al., 2002).

I.2.2. La phytoremédiation

La phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour absorber, dégrader ou immobiliser les contaminants du sol. Cette technique est considérée comme très prometteuse pour la remédiation des sites pollués (Garbisu & Alkorta, 2001). Elle peut être utilisée pour dépolluer des surfaces contaminées par des polluants qui sont présents dans le sol, dans l'air et dans l'eau (Salt et al., 1998). Comme nous l'avons vu précédemment la remédiation par des techniques physico-chimiques est assez onéreuse. En effet, les coûts de la croissance d'une culture sont minimes comparés au fait d'éliminer et de remplacer la terre. Cependant, il est vrai que les durées de décontamination sont plus importantes dans le cas de la phytoremédiation. Cet obstacle n'est pourtant pas considéré comme un problème tant que les coûts restent moindres et que les risques pour la population humaine et les écosystèmes sont négligeables (Chaney et al., 1997).

Il existe plusieurs classifications pour les techniques de phytoremédiation. Nous citons ici les plus employées (Figure 13):

- La phytoextraction : utilisation des plantes pour retirer les contaminants du sol. Les plantes assurent le transport des polluants et leur transfert vers les parties aériennes. Le terme peut être utilisé à la fois pour les polluants organiques et les polluants inorganiques.
- La phytostabilisation : utilisation des plantes pour réduire la biodisponibilité des polluants dans l'environnement. Les polluants sont immobilisés au niveau du système racinaire de la plante.
- La phytovolatilisation : utilisation des plantes pour volatiliser les polluants (Se, Hg). Les plantes extraient les polluants au niveau du sol et les volatilisent au niveau du feuillage.
- La phytodégradation : utilisation des plantes pour dégrader les polluants organiques *via* des processus métaboliques à l'intérieur de la plante. Quand les racines des plantes sont exploitées avec leurs microorganismes rhizosphériques associés pour dépolluer des sols contaminés par des polluants organiques il est possible d'utiliser les termes de bioremédiation assistée par les plantes, de dégradation assistée par les plantes, de phytostimulation, de rhizodégradation.

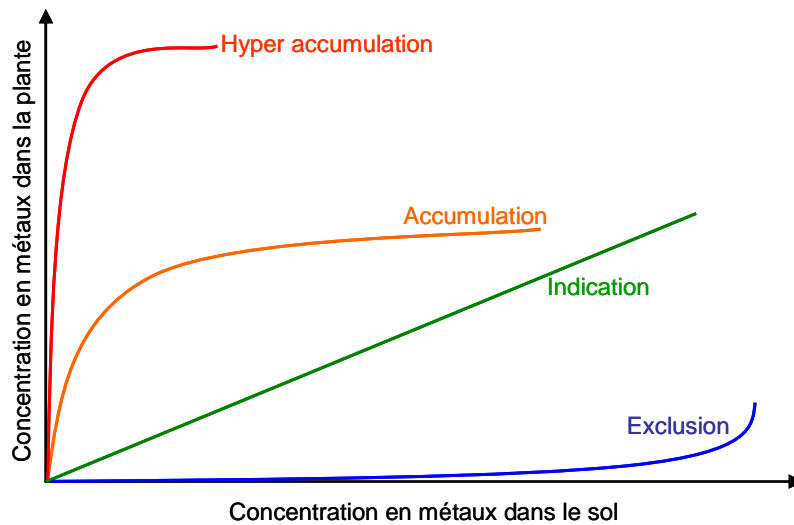


Figure 14: Les différentes réponses des plantes à l'accroissement de la concentration des métaux dans le sol (modifié d'après Baker, 1991).

Tableau 14: Plantes utilisées en phytoremédiation (D'après Prasad, 2004).

Espèce	Fonction dans la phytoremédiation
<i>Alyssum sp.</i>	Accumulatrice de Ni
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Accumulatrice de ^{137}Cs
<i>Armeria maritima</i>	Accumulatrice de Pb
<i>Azolla pinnata</i>	Accumulatrice de Pb, Cu, Cd, Fe
<i>Brassica juncea</i>	Hyperaccumulatrice de métaux lourds
<i>Cannabis sativa</i>	Hyperaccumulatrice de métaux lourds
<i>Cardamonopsis halleri</i>	Hyperaccumulatrice de métaux lourds
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Accumulatrice de métaux lourds
<i>Datura innoxia</i>	Accumulatrice de Ba
<i>Eichhornia crassipes</i>	Accumulatrice de Pb, Cu, Cd et Fe
<i>Helianthus annuus</i>	Accumulatrice de Pb, U et ^{137}Cs
<i>Hydrocotyle umbrellata</i>	Accumulatrice de Pb, Cu, Cd et Fe
<i>Lemna minor</i>	Accumulatrice de Pb, Cu, Cd et Fe
<i>Salix sp.</i>	Phytoextraction de métaux lourds
<i>Typha sp.</i>	Volatilisation de Se
<i>Thlaspi sp.</i>	Accumulatrice de Zn, Pb, et Cd

Certains auteurs distinguent aussi la phytoremédiation directe de la phytoremédiation indirecte (Stomp et al., 1994) :

- Directe : les plantes participent directement à l'absorption des contaminants suivie de l'immobilisation ou la dégradation dans la plante.
- Indirecte : les plantes participent à la détoxification des polluants *via* leurs microorganismes associés qui sont responsables de la décontamination.

Le Tableau 14 illustre un panel de plantes utilisées en phytoremédiation.

Des études écologiques ont révélé l'existence de communautés végétales spécifiques, qui sont endémiques des sols pollués au Zn, Cu et Ni. Différents écotypes de ces espèces sont retrouvés sur des sols non pollués par les métaux. Pour les plantes endémiques des sols pollués, la tolérance aux métaux est indispensable. Un gradient entre écotypes de faible et de forte tolérance peut être mis en évidence. Les plantes ont développé des mécanismes leur permettant de tolérer de fortes teneurs en métaux dans les sols. Chez certaines espèces, la tolérance est tributaire d'une séquestration des métaux au niveau du système racinaire, c'est le cas notamment de *Festuca rubra*, utilisée pour prévenir l'érosion des sols contaminés, on parle alors de plante excluante (Figure 14). Un autre groupe de plantes, nommées accumulatrices ne vont pas empêcher la pénétration des métaux par les racines mais vont au contraire accumuler les métaux dans leurs tissus aériens, nous pouvons ainsi distinguer des plantes accumulatrices et des plantes hyperaccumulatrices selon la teneur en métaux accumulée (Figure 14). De plus, il existe un troisième groupe de plantes nommées indicatrices qui reflètent la concentration en métal dans le sol.

1.2.2.1. La phytoextraction

La phytoextraction (Figure 15) est l'utilisation de plantes pour absorber les contaminants du sol par leurs racines et les transporter jusqu'à leurs parties aériennes (Banuelos et al., 1999; Huang & Cunningham, 1996 ; Raskin, 1995 ; Salt et al., 1995). C'est la technique de phytoremédiation la plus connue. Parfois les termes de phytoremédiation et de phytoextraction sont utilisés comme s'ils étaient synonymes. En pratique, les plantes accumulatrices sont plantées ou transférées sur des sols pollués et sont cultivées selon les pratiques agricoles adaptées à l'espèce. Si la biodisponibilité des métaux dans le sol n'est pas satisfaisante il est possible d'augmenter celle-ci *via* des agents chélatants ou acidifiants (Huang & Cunningham, 1996 ; Lasat et al., 1998). Il reste à déterminer le devenir de ces

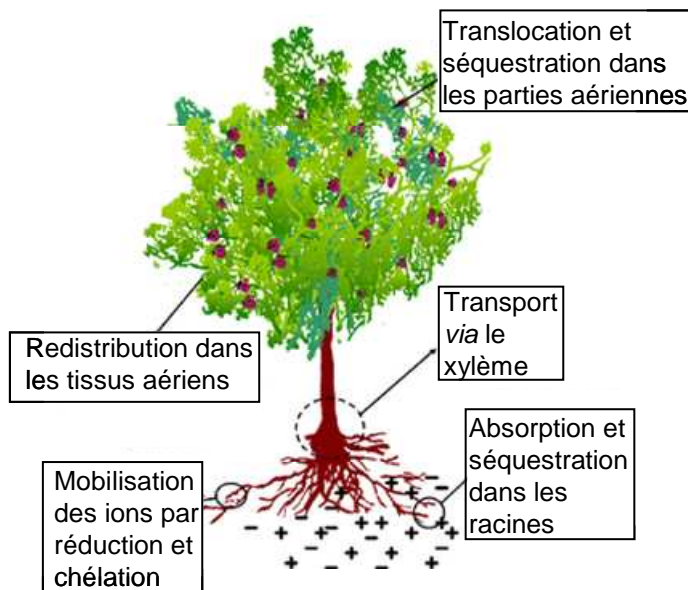


Figure 15: Principaux mécanismes impliqués dans la phytoextraction. Ces mécanismes ont pour but d'absorber les métaux au niveau du système racinaire et de les transférer vers les parties aériennes de la plante (D'après Padmavathiamma & Li, 2007).

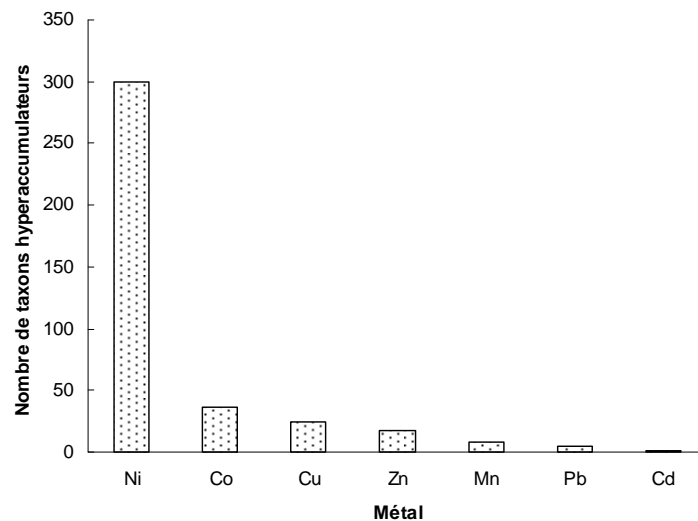


Figure 16: Taxons d'angiospermes qui hyperaccumulent des métaux. Les familles prédominantes sont les Astéraceae, les Brassicaceae, les Cyperaceae, les Cunouniaceae, les Caryophyllaceae, les Fabaceae, les Flavourtiaceae, les Lamiaceae, les Poaceae, les Violaceae (Prasad, 2004).

parties aériennes qui ont accumulé les métaux une fois que la plante aura atteint son optimum de croissance. Des recherches sur le sujet montrent que l'incinération de ces tissus réduit nettement le volume de déchets par rapport aux autres techniques de remédiation (Kumar et al., 1995). Dans le cas des métaux précieux, ces cendres peuvent être facilement revalorisées, on parle dans ce cas de phytomining (Brooks et al., 1998).

Pour atteindre des niveaux acceptables d'accumulation il faudra attendre plusieurs cycles de végétation et cela représente le principal inconvénient de cette technique (Kumar et al., 1995). C'est pourquoi la phytoextraction n'est applicable que pour des sols modérément pollués. L'efficacité de dépollution dépend à la fois de la teneur initiale en métaux, mais également de la durée nécessaire pour produire une biomasse suffisante et de l'efficacité d'absorption des métaux par la plante qui dépend également de la biodisponibilité de ces métaux. On estime qu'il faut entre 1 et 20 ans pour décontaminer un sol modérément pollué (Kumar et al., 1995; Blaylock & Huang, 2000).

Les plantes utilisées pour la phytoextraction doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- Tolérance à un niveau élevé de métal
- Accumulation raisonnable du métal
- Croissance rapide
- Production importante de biomasse
- Développement racinaire important

I.2.2.1.1. Les plantes hyperaccumulatrices

Les plantes qui accumulent des métaux ont attiré l'attention des scientifiques du monde entier. Brooks (1998) définit les hyperaccumulatrices comme des plantes qui contiennent plus de 10 mg Hg kg⁻¹, plus de 100 mg Cd kg⁻¹, plus de 1000 mg kg⁻¹ (0,1% de masse sèche) de Co, Cu, Cr, Ni ou Pb ou plus de 10000 mg kg⁻¹ (1,0% de masse sèche) de Mn ou de Zn dans leur matière sèche. Les hyperaccumulatrices ont été isolées dans la nature sur des aires de forte pollution aux métaux lourds (Baker & Brooks, 1989 ; Vázquez et al., 1992 ; Homer et al., 1991; Brown et al., 1995 ; De Varennes et al., 1996; Kramer et al., 1997; Robinson et al., 1997a; Robinson et al., 1997b; Brooks, 1998 ; Lasat et al., 2000; Pence et al., 2000). Les premières espèces découvertes appartiennent aux genres *Thlaspi* (accumulent le Zn, le Cd et le Pb) et *Alyssum* (accumule le Ni). Il a été démontré que *Thlaspi caerulescens* accumulait le Zn, qu'*Armeria maritima* accumulait le Pb et que deux espèces trouvées en Afrique (*Aeolanhus biformifolius* et *Haumaniastrum katangense*) accumulaient le Cu et le

Tableau 15: Quelques espèces hyperaccumulatrices étudiées depuis quelques années

Espèce	Métal	Teneur foliaire (mg kg MS⁻¹)	Référence
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zn	39600	Reeves &Brooks (1983)
	Cd	1800	Baker &Walker (1990)
<i>Ipomea alpina</i>	Cu	12300	Baker &Walker (1990)
<i>Haumaniastrum robertii</i>	Co	10200	Brooks (1998)
<i>Astragalus racemosus</i>	Se	14900	Beath et al. (1937)
<i>Berkheya coddii</i>	Ni	5500	Robinson et al. (1997)

Co (Raskin et al., 1994).

Des études plus récentes ont montré l'existence d'autres hyperaccumulatrices comme *Brassica juncea* et *Brassica nigra* accumulant le Pb. Il a également été démontré que *Pelargonium sp. Frensham* accumulait de grandes quantités de Cd, Pb, Ni et Cu en conditions de cultures contrôlées (Saxena et al., 1999).

L'intérêt pour la phytoremédiation n'a cessé de croître depuis l'identification de plantes hyperaccumulatrices (Figure 16). En effet, les plantes hyperaccumulatrices sont capables d'accumuler des teneurs en métaux 100 fois plus importantes que les teneurs mesurées dans les plantes non accumulatrices. A ce jour, environ 400 espèces d'au moins 45 familles sont considérées comme hyperaccumulatrices (Tableaux 14 & 15). La plupart des hyperaccumulatrices concentrent le Ni, une trentaine absorbent le Co, le Cu, et le Zn (Figure 16). En revanche, très peu d'espèces accumulent le Mn ou le Cd et aucune hyperaccumulatrice spécifique au Pb n'a été mise en évidence.

L'hyperaccumulatrice la plus connue est sans doute *Thlaspi caerulescens*. Alors que la plupart des plantes présentent des symptômes de toxicité à partir d'une accumulation de Zn de l'ordre de 100 mg kg MS⁻¹, il a été démontré que *T. caerulescens* pouvait accumuler 26000 mg Zn kg MS⁻¹ sans montrer aucun symptôme de toxicité (Brown et al., 1995). Il est possible que les plantes hyperaccumulatrices aient un besoin en Zn plus important que les espèces non accumulatrices. En effet, beaucoup d'hyperaccumulatrices comme *T. caerulescens* sont retrouvées naturellement sur des sols miniers (riches en Pb, Zn et Cd). C'est pourquoi de nombreuses études se sont focalisées sur la détermination de plantes endémiques aux sols riches en métaux (Baker & Proctor, 1990).

Le potentiel commercial des espèces hyperaccumulatrices dépend de leur taux d'accumulation de métal et de leur taux de croissance. Ce potentiel se calcule en multipliant la teneur en métal (mg de métal par kilogramme de tissu végétal) par la croissance (kg de végétal par hectare et par an) ce qui mène à une teneur en métal extraite du sol par année.

Ce taux devrait être de plusieurs centaines voire de 1000 kg ha⁻¹ an⁻¹ pour être rentable et correspondrait à une durée de traitement de 15 à 20 ans dépendant à la fois de la teneur en métal et de la profondeur de pollution de celui-ci (Cunningham et al., 1995). Cependant, la biomasse de ces plantes hyperaccumulatrices n'est pas assez importante pour répondre aux

demandes commerciales d'où l'intérêt nouveau pour des plantes qui accumulent moins mais qui ont une biomasse bien plus élevée.

I.2.2.1.2. Les plantes accumulatrices de forte biomasse

Une plante doit donc produire beaucoup de biomasse et accumuler beaucoup de métaux. C'est en partant de ces critères qu'est venue l'idée de s'intéresser aux plantes qui accumulaient des quantités moins importantes de métaux mais qui présentaient une biomasse bien plus importante. En effet, *B. juncea* (Ebbs et al., 1997) concentre 3 fois moins de Zn que *T. caerulescens* mais reste plus efficace pour dépolluer un sol car sa biomasse est 10 fois plus importante que celle de *T. caerulescens*. De plus, d'autres critères doivent être pris en considération : la plante doit tolérer le métal (Blaylock & Huang, 2000) mais aussi les conditions défavorables du sol (pH, salinité, structure du sol, contenu hydrique), produire un système racinaire abondant et résister aux maladies et aux insectes.

C'est au regard de ces critères qu'a émergé l'idée d'utiliser des arbres en phytoremédiation (Pulford & Watson, 2003). Beaucoup d'espèces ou de clones de la famille des Salicacées ont la capacité d'accumuler de fortes teneurs en Cd et en Zn dans leurs parties aériennes (Landberg & Greger, 1996 ; Lunackova et al., 2003 ; Rosselli et al., 2003). De nombreux génotypes de *Salix viminalis* ont été testés pour leur capacité à accumuler le Cd. Le meilleur génotype de *Salix* est capable d'extraire 216 g Cd ha⁻¹ an⁻¹, alors que l'hyperaccumulatrice *T. caerulescens* en accumulait 35 g ha⁻¹ an⁻¹ et *Alyssum murale* 43 g ha⁻¹ an⁻¹ dans les mêmes conditions de culture. Les peupliers sont également de bons accumulateurs de Cd, les teneurs en Cd dans les feuilles de *P. trichocarpa* x *P. deltoides* atteignent 209 mg kg MS⁻¹ sur des sols contenant environ 300 mg Cd kg MS⁻¹ (Robinson et al., 2000). Ce point sera développé dans le § I.3.

I.2.2.1.3. La phytoextraction assistée

Si la biodisponibilité n'est pas suffisante pour que la plante absorbe les polluants, il est possible d'ajouter des agents chélatants ou acidifiants (Cunningham & Ow, 1996 ; Huang et al., 1997 ; Lasat et al., 1998). Les conséquences sur les communautés microbiennes de l'ajout d'agents chélatants ne sont pas assez prises en compte. Certains chélateurs synthétiques

(Wu et al., 1999) sont capables d'induire la phytoextraction peuvent former des complexes chimiques et microbiologiques stables avec les métaux lourds menaçants la qualité du sol. Ces agents chélatants comme l'EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid), EGTA (ethylene glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetra acetic acid), EDDHA (ethylenediamine di o-hydroxyphenylacetic acid), EDDS (ethylene diamine disuccinate) et acide citrique peuvent améliorer la phytoextraction en mobilisant les métaux et en augmentant l'accumulation de ceux-ci (Cooper et al., 1999; Tandy et al., 2006). L'EDTA est en général plus efficace dans la solubilisation des métaux du sol, l'EDDS est moins nocif pour l'environnement et plus efficace pour induire l'accumulation métallique dans les parties aériennes de *Brachiaria decumbens* (Santos et al., 2006). Cependant, il y a un risque de lessivage des métaux dans la nappe phréatique ainsi que la persistance des complexes agents chélatants-métaux dans les sols contaminés (Lombi et al., 2001).

1.2.2.2. La phytostabilisation

La phytostabilisation utilise les plantes pour immobiliser les contaminants dans le sol grâce à l'absorption et l'accumulation dans les racines, l'adsorption au niveau des racines ou la précipitation dans la zone racinaire provoquant une stabilisation physique des sols (Figure 17).

Des espèces tolérantes aux métaux peuvent être utilisées pour restaurer la végétation sur des sites pollués en diminuant la migration des polluants par le vent, l'érosion et la contamination des nappes phréatiques (Stoltz & Greger, 2002). Contrairement aux autres techniques de phytoremédiation, la phytostabilisation n'a pas pour but de décontaminer un sol mais d'en réduire les risques pour la santé humaine et l'environnement.

La phytostabilisation est surtout efficace pour les sols de texture fine avec de fortes teneurs en matière organique mais elle est utilisable également sur la plupart des sites contaminés en surface (Cunningham, 1997). Cependant, cette technique n'est pas applicable à tous les sites car il arrive que la croissance et la survie des plantes ne soient pas possibles (Berti & Cunningham, 2000). Par rapport aux autres techniques de remédiation des sols, la phytostabilisation est d'un coût moindre, plus simple à mettre en place et visuellement plus attrayante (Berti & Cunningham, 2000 ; Schnoor, 2000).

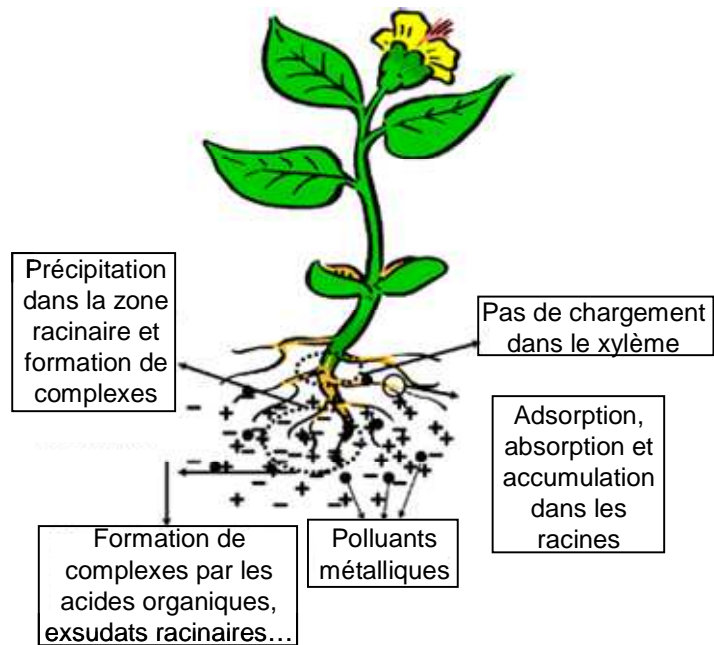


Figure 17: Principaux mécanismes impliqués dans la phytostabilisation. Ces mécanismes ont pour but d'immobiliser les métaux au niveau du système racinaire par formation de complexes organo-métalliques ou encore par absorption des métaux et stockage au niveau des vacuoles racinaires (D'après Padmavathiamma & Li, 2007).

Les caractéristiques des plantes adaptées à la phytostabilisation incluent une tolérance à de fortes concentrations en contaminants, une production importante de biomasse racinaire pour mobiliser les contaminants par absorption, précipitation ou réduction et une rétention des polluants au niveau des racines.

Les potentiels de phytostabilisation de 36 plantes (dont 17 espèces) ayant poussé sur des sites pollués ont été évalués par Yoon et al. (2006). Il est nécessaire que ces plantes aient un facteur de bioconcentration racinaire élevé (FB : ratio entre les teneurs en métaux dans les racines et dans le sol) et un faible facteur de translocation (TF, ratio entre les teneurs en métaux dans les feuilles et dans les racines). Une étude en champ (Smith & Bradshaw, 1992) sur sol pollué par des déchets miniers contenant du Cu, du Pb et du Zn montre une phytostabilisation possible par des graminées (*Agrostis tenuis* cv. Goginan pour des sols acides pollués au Zn et au Pb, *Agrostis tenuis* cv. Pary pour des sols pollués au Cu, *Festuca rubra* cv. Merlin pour des sols calcaires pollués au Zn et au Pb). Cette étude a mené au développement commercial de deux cultivars d'*Agrostis tenuis* Sibth et d'un cultivar de *Festuca rubra* L. qui sont utilisés dans la phytostabilisation de sols pollués au Pb, Cu et Zn.

La phytostabilisation implique également l'utilisation d'amendements qui vont promouvoir la formation de complexes métalliques insolubles qui réduisent la biodisponibilité et l'absorption des métaux et donc leur impact sur la chaîne alimentaire (Adriano et al., 2004; Cunningham et al., 1995). Pour favoriser une immobilisation, il est possible de modifier les propriétés physico-chimiques du complexe métallique en introduisant un anion polyvalent comme le phosphate qui augmente l'adsorption du métal par induction d'une charge négative des anions et une précipitation du métal (Bolan et al., 2003 ; Tableau 16). L'addition de chaux et de matière organique comme le compost mène à une augmentation du pH du sol (Kuo et al., 1985) et constitue une pratique habituelle pour l'immobilisation des métaux ce qui facilite la revégétalisation des sols contaminés (Williamson & Johnson, 1985). L'acidification des sols augmente la biodisponibilité des métaux mais le chaulage peut aider à limiter ce phénomène. L'ajout de matière organique peut aussi modifier la biodisponibilité des métaux c'est le cas notamment pour le Cu (Clemente et al., 2003). La biodisponibilité du Cu ne diminue pas quand le pH augmente ou après chaulage ce qui indique que les traitements à partir de matière organique peuvent avoir un effet significatif sur la biodisponibilité du Cu. Il a été démontré que l'absorption d'As était plus élevée lors d'ajout de fertilisants organiques (Mains et al., 2006b, Tableau 16).

Tableau 16: Résumé des principales études récentes sur la phytostabilisation.

Espèces	Métaux	Résultats (teneurs mesurées)	Limitations	Références
<i>Horedeum vulgare</i> , <i>Lupinus angustifolius</i> , <i>Secale cereale</i>	As	126 mg kg ⁻¹ dans les parties aériennes et 469 mg kg ⁻¹ dans les racines	Les quantités variables d'amendements font varier l'absorption d'As	Mains et al., 2006a,b
<i>Lolium italicum</i> et <i>Festuca arundinaceae</i>	Pb et Zn	Les teneurs en Pb et Zn dans les parties aériennes diminuent en présence de compost. Ainsi le contenu en Pb passe de 218 à 32 mg kg ⁻¹ dans les feuilles et de 7232 à 1196 mg kg ⁻¹ dans les racines. La teneur en Zn passe de 4190 à 624 mg kg ⁻¹ dans les feuilles et de 7120 à 1993 mg kg ⁻¹ dans les racines	Teneurs en Pb et Zn encore trop élevées pour les herbivores	Rizzi et al., 2004
<i>B. juncea</i>	Cd Zn, Cu, Mn, Fe,Pb et Cd	Immobilisation du Cd par le phosphate. Diminution des concentrations dans le sol de 363 à 166 mg Zn kg ⁻¹ , de 36 à 31 mg Cu kg ⁻¹ , de 1,94 à 1,48 mg Pb kg ⁻¹ , de 1,6 à 0,86 mg Cd kg ⁻¹ .	La biodisponibilité du Cu ne diminue pas même avec un pH plus haut et de la chaux	Bolan et al., 2003 ; Clemente et al., 2003; Clemente et al., 2006
<i>Anthyllis vulneraria</i> , <i>Festuca arvernensis</i> , <i>Koeleria vallesiana</i> , <i>Armeria arenaria</i> .	Zn, Cd et Pb	<i>Festuca</i> et <i>Koeleria</i> en co-culture avec <i>Anthyllis</i> montrent des teneurs en Zn, Pb et Cd plus faibles que quand elles sont cultivées seules. Pour <i>Festuca</i> la teneur en Zn passe de 2885 à 1469 mg kg ⁻¹ , celle de Pb de 1002 à 376 mg kg ⁻¹ et celle de Cd de 19 à 8 mg kg ⁻¹ . Pour <i>Koeleria</i> la teneur en Zn passe de 3514 à 2786 mg kg ⁻¹ , celle de Pb de 1960 à 1477 mg kg ⁻¹ et celle de Cd de 34 à 26 mg kg ⁻¹	<i>Armeria</i> réduit la reprise des graines d' <i>Anthyllis</i>	Frérot et al., 2006
<i>H. hirta</i> et <i>Z. fabago</i>	Pb, Zn et Cu	<i>H. hirta</i> accumule environ 150 mg Pb kg ⁻¹ à la fois dans ses parties aériennes et ses racines. Les concentrations en Zn sont de 750 mg kg ⁻¹ dans les feuilles de <i>Z. fabago</i> .	Toute la surface du site n'est pas colonisée par <i>H. hirta</i> et <i>Z. fabago</i> .	Conesa et al., 2006

Certaines plantes reconnues comme étant hyper-tolérantes peuvent être utilisées en phytostabilisation (Boularbah et al., 2006). Deux espèces *Hyparrhenia hirta* et *Zygophyllum fabago* colonisent naturellement des sols miniers du sud-est de l'Espagne et tolèrent de fortes concentrations en métaux dans le sol. Ces espèces n'absorbent pas de grandes quantités de métaux ce qui fait d'elles de bonnes candidates en phytostabilisation (Conesa et al., 2007).

Des études de phytostabilisation dans la région méditerranéenne ont montré que certaines espèces peuvent phytostabiliser un sol si et seulement si elles étaient associées à une autre espèce donnée. C'est le cas de *Festuca arvernensis* et *Koeleria vallesiana* qui accumuleront moins de métaux dans leur parties aériennes si elles sont cultivées avec *Anthyllis vulneraria* (Frérot et al., 2006). Il est donc préférable d'identifier les espèces qui se retrouvent naturellement sur des sites contaminés car elles sont écologiquement plus adaptées au site que les espèces introduites.

Des études sont également menées sur des plantes ligneuses (Bidar, 2007). En effet, il a été démontré que *Sambucus nigra* et *Robinia pseudoacacia* étaient présentes naturellement et avec un fort taux de recouvrement sur le site de Métaleurop. Ces dernières, se développent naturellement sur les sols contaminés par les métaux lourds. *S. nigra*, très répandu en Europe continentale, est l'une des espèces capable de revégétaliser naturellement les friches (Vandecasteele et al., 2002), ainsi que les sols perturbés et eutrophiques (Atkinson and Atkinson, 2002). De même, *R. pseudoacacia* est connu pour se développer sur des déchets de fonderies de fer et d'acier (Remon et al., 2005). Les transferts vers les parties aériennes de *S. nigra* étant inférieures à celles de *R. pseudoacacia*, il semblerait ce *S. nigra* soit une meilleure candidate à la phytostabilisation.

1.2.2.3. La rhizofiltration

La phytofiltration est l'utilisation de plantes (rhizofiltration) ou des semis (blastofiltration) pour absorber ou adsorber les polluants, surtout les métaux contenus dans les milieux aquatiques (Prasad & De Oliveira Freitas, 2003). Les racines des plantes ou les semis vont absorber, précipiter et concentrer les métaux présents dans l'eau (Dushenkov & Kapulnik, 2000). Les mécanismes impliqués dans la biosorption incluent la chemisorption, la

Tableau 17: Résumé des principales études menées sur la rhizofiltration

Espèces	Métaux	Résultats	Références
<i>B. juncea</i> , <i>H. annuus</i>	Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, et Zn	Les racines de <i>B. juncea</i> concentrent les métaux 131 à 563 fois par rapport à la solution initiale	Dushenkov et al., 1995
<i>Helianthus annuus</i>	U	La concentration en U dans l'eau diminue de 21-874 $\mu\text{g l}^{-1}$ à $<20 \mu\text{g l}^{-1}$	Dushenkov et al., 1997a,b
<i>Eichhornia crassipes</i>	As, Cd Cr, Cu, Ni, et Se	Les teneurs en Cd dans les feuilles sont de 371 mg kg^{-1} et 6103 mg kg MS^{-1} dans les racines. De même pour Cr, on a respectivement 119 et 3951 mg kg MS^{-1} . Cd, Cr, Cu, Ni et As sont bien accumulés dans les racines. Le Se est plus accumulé dans les feuilles	Zhu et al., 1999
<i>Lemna minor</i>	Hg	Hg est fortement absorbé (jusque 2000 mg kg MS^{-1})	Mo et al., 1989
<i>Lemna minor</i> L., <i>Azolla pinnata</i>	Fe et Cu	Le Fe diminue de moitié la teneur en Cu quand les deux métaux sont présents	Jain et al., 1989

compléxation, l'échange d'ions, la micro-précipitation, l'adsorption de surface (Gardea-Torresdey et al., 2004)

La rhizofiltration utilise les plantes terrestres plutôt que les plantes aquatiques car leur système racinaire est plus développé. Les polluants métalliques présents dans le milieu aquatique sont le plus souvent retirés par précipitation ou floculation, l'étape suivante étant la sédimentation et ensuite la formation de boue (Ensley, 2000). Le procédé est basé sur l'utilisation de plantes cultivées en culture hydroponique puis transplantées dans des eaux polluées. Ces plantes vont alors concentrer les métaux dans leurs racines (Salt et al., 1995 ; Zhu et al., 1999). Les exsudats racinaires et les changements de pH au niveau de la rhizosphère engendrés par la rhizofiltration peuvent également faire précipiter les métaux sur les racines. Quand les racines sont saturées en métaux les plantes sont collectées et les métaux sont traités (Flathman & Lanza, 1998; Zhu et al., 1999).

Dushenkov et al. (1995), Salt et al. (1995) et Flathman & Lanza (1998) affirment que les plantes adaptées à la rhizoremédiation doivent accumuler les métaux uniquement dans leurs racines. Dushenkov et al. (1995) explique que la translocation des métaux vers les parties aériennes diminue l'efficacité de rhizofiltration. Cependant, Zhu et al. (1999) suggère que l'efficacité de rhizofiltration peut être augmentée en utilisant des plantes avec une plus forte capacité d'absorption.

Certaines plantes aquatiques peuvent absorber les métaux contenus dans l'eau, c'est le cas notamment de la jacinthe d'eau *Eichhornia crassipes* (Kay et al., 1984 ; Zhu et al., 1999), d'*Hydrocotyle umbellata* L. (Dierberg et al., 1987) et de *Lemna minor* L. (Mo et al., 1989). Cependant, ces plantes ont un potentiel de rhizofiltration limité car leur système racinaire n'est pas assez développé (Dushenkov et al., 1995). La forte teneur en eau de ces plantes aquatiques est un inconvénient pour leur séchage, compostage ou encore leur incinération. Au regard de ces limitations, Zhu et al. (1999) suggère que la jacinthe d'eau reste efficace pour l'absorption des éléments traces dans l'eau (Tableau 17). Le tournesol (*Helianthus annuus*) et la moutarde d'Inde (*Brassica juncea* Czern.) sont les meilleures candidates parmi les plantes terrestres pour décontaminer les eaux. Les racines de la moutarde d'Inde sont efficaces pour l'absorption de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn alors que le tournesol absorbe le Pb (Dushenkov et al., 1995 ; Tableau 17), l'U, le ¹³⁷Cs et ⁹⁰Sr (Dushenkov et al., 1997b ; Tableau 17).

La rhizofiltration est une technologie intéressante pour le traitement des eaux de surface et des eaux souterraines contenant de faibles quantités de métaux lourds comme le Cr, le Pb et le Zn (Ensley, 2000). La commercialisation de cette technique est favorisée par ses avantages tant économiques que techniques comme la possibilité d'absorber plusieurs métaux, la capacité de traiter de gros volumes, de réduire les volumes des boues secondaires et de plus elle est bien appréciée par la population (Dushenkov et al., 1995). Cependant, cette technique de phytoremédiation présente quelques failles comme le fait de devoir produire les plantes par culture hydroponique ce qui nécessite de la main d'œuvre et un équipement particulier ce qui augmente les coûts.

1.2.2.4. La phytodégradation

La phytodégradation ou phytostimulation est l'utilisation de plantes pour dégrader les polluants organiques difficilement biodégradables tels que les hydrocarbures. Les deux termes sont souvent mélangés mais il existe une distinction. En effet, la phytodégradation est la dégradation des composés par le métabolisme de la plante alors que la phytostimulation est la stimulation de la flore du sol capable de dégrader les composés organiques. Les plantes peuvent croître sur un sol contaminé par les hydrocarbures jusqu'à un certain seuil. Une concentration de 7 tonnes par hectare permet une croissance normale de la plante et un rythme de dégradation élevé par les micro-organismes se développant dans la rhizosphère (Chaîneau et al., 2000).

Dans la rhizosphère, les champignons (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*,...) ou certaines bactéries (*Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, ...) ont la capacité de dégrader les composés organiques présents dans le sol. En effet, ceux-ci étant hétérotrophes, ils se nourrissent de cette matière organique après l'avoir dégradée grâce à des enzymes digestives qu'ils sécrètent. Cependant, les organismes ne dégradent pas tous les composés organiques. Ces micro-organismes sont naturellement présents dans le sol, et effectuent, par conséquent, naturellement la dégradation. Cependant, il a été montré que lorsque certaines plantes étaient présentes, cette biodégradation se faisait plus efficacement.

Tableau 18: Exemples d'enzymes produites par les plantes pouvant dégrader des composés organiques (D'après Susarla et al., 2002).

Enzymes	Plantes connues pour produire une activité enzymatique	Applications
Déshalogénase	Divers hybrides de peuplier, Algues, <i>Myriophyllum aquaticum</i>	Déshalogénéation des composés chlorés
Laccase	<i>Nitella sp.</i> , <i>Myriophyllum aquaticum</i>	Clivage du cycle aromatique du TNT
Nitrilase	<i>Salix sp.</i>	Clivage des groupes aromatiques avec cyanure
Nitroréductase	<i>Populus sp.</i> , <i>Nitella sp.</i> , <i>Myriophyllum aquaticum</i>	Réduction des groupements nitrés sur les explosifs et autres composés nitrés
Peroxydase	<i>Armoracia rusticana</i>	Dégradation des phénols
Phosphatase	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Clive les groupements phosphate des pesticides organo-phosphates

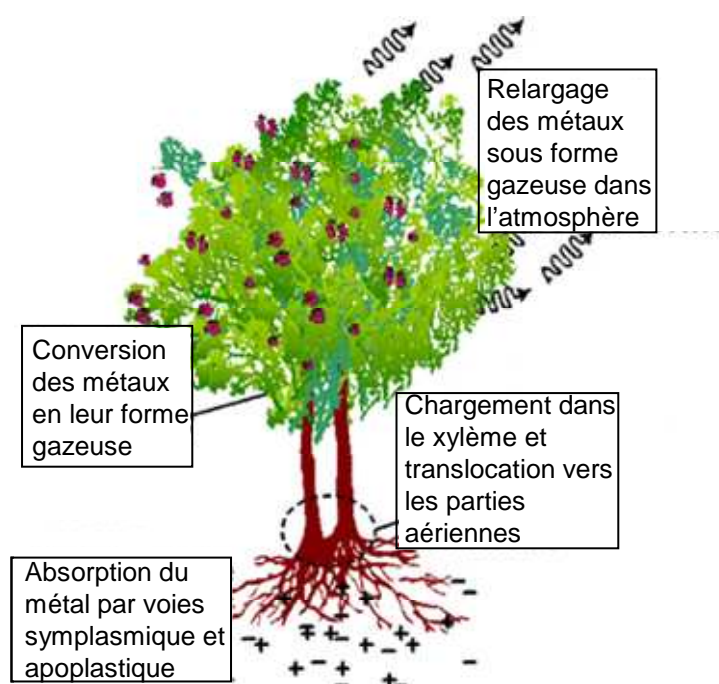


Figure 18: Principaux mécanismes impliqués dans la phytovolatilisation. Ces mécanismes ont pour but d'absorber les métaux au niveau de leur système racinaire, de les convertir en forme gazeuse et de les relarguer dans l'atmosphère (D'après Padmavathiamma & Li, 2007).

Les plantes peuvent également dégrader les polluants organiques grâce à l'action de leurs enzymes ou de co-facteurs de celles-ci (Dec & Bollag, 1994 ; Strand et al., 1995). Dec & Bollag (1994) ont décrit des plantes qui pouvaient casser les cycles aromatiques en absence de micro-organismes. Les polychlorobiphényles (PCB) sont métabolisés par les tissus végétaux. Les phénols sont dégradés par des plantes comme le raifort, la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et le radis blanc (*Raphanus sativus*) qui contiennent de la peroxidase (Dec & Bollag, 1994 ; Roper et al., 1996). Les peupliers (*Populus sp.*) sont capables de transformer le trichloroéthylène du sol et des eaux souterraines (Newman et al., 1997; Strand, et al., 1995).

Les enzymes (Tableau 18) les plus intéressantes en phytoremédiation sont (Susarla et al., 2002):

- La déshalogénase qui transforme les composés chlorés
- La peroxydase qui transforme les composés phénoliques
- La nitroréductase qui transforme les explosifs et autres composés nitrés
- La nitrilase qui transforme les composés aromatiques avec cyanure
- La phosphatase qui transforme les pesticides organo-phosphates

1.2.2.5. La phytovolatilisation

Certains contaminants métalliques comme l'As, Hg et Se peuvent être présents sous forme gazeuse dans l'environnement. Il existe des plantes naturelles ou génétiquement modifiées capables d'absorber les formes élémentaires de ces métaux dans le sol et de les convertir en forme gazeuse pour les relarguer dans l'atmosphère. On parle dans ce cas de phytovolatilisation (Figure 18). Cette technique de phytoremédiation est la plus controversée. Le Hg et le Se sont toxiques (Suszcynsky & Shann, 1995) et il persiste des doutes sur le fait que leur relargage dans l'atmosphère soit bon pour la santé humaine (Watanabe, 1997).

Le composé volatil de Se relargué par *Astragalus racemosus* qui est un accumulateur de Se est le diméthyl disélénide (Evans et al., 1968). Le Se relargué par la luzerne qui n'est pas une plante accumulatrice de Se est du diméthyl sélénide. Par conséquent les composés volatiles relargués ne sont pas les mêmes pour les plantes accumulatrices et les plantes non

accumulatrices de Se mais dans les deux cas il y a volatilisation du Se (Lewis et al., 1966). Des études plus récentes ont été menées (Banuelos et al., 1993; Lewis et al., 1966 ; Terry et al., 1992) car cet élément pose de nombreux problèmes dans les régions où les sols sont riches en Se (Brooks, 1998). Les membres de la famille des Brassicaceae sont capables de relarguer 40 g de Se par hectare et par jour sous forme de composés gazeux (Terry et al., 1992). Certaines plantes aquatiques, les massettes (*Typha latifolia* L.) ont également un potentiel de phytoremédiation du Se (Pilon-Smits et al., 1999).

Contrairement aux plantes utilisées pour la volatilisation du Se, celles capables de volatiliser le Hg sont génétiquement modifiées. *Arabidopsis thaliana* L. et *Nicotiana tabaccum* L. ont été génétiquement modifiées avec les gènes bactériens de lyase organomercurienne (*MerB*) et de réductase mercurique (*MerA*) (Heaton et al., 1998; Rugh et al., 1998). Ces plantes absorbent le Hg élémentaire Hg(II) et le méthylmercure (MeHg) du sol et relarguent du Hg volatile Hg(0) depuis leurs feuilles en direction de l'atmosphère (Heaton et al., 1998).

Les composés volatils du Se comme le diméthyl sélénide sont 500 à 600 fois moins toxiques que la forme inorganique du Se retrouvée dans le sol (Desouza et al., 2000). La volatilisation du Se et du Hg est une solution de longue durée pour un site étant donné que les formes inorganiques de ces éléments sont absorbées pour relarguer des composés volatiles qui ne se redéposent pas sur le site (Atkinson et al., 1990 ; Heaton et al., 1998). De plus, il n'y a plus besoin de beaucoup de main d'œuvre une fois que les végétaux sont en place et surtout il n'est pas nécessaire de traiter ceux-ci en fin cycle (Heaton et al., 1998).

La volatilisation de l'As est moins étudiée car il semblerait que l'As soit surtout accumulé au niveau du système racinaire et que seules d'infimes quantités sont transloquées vers les parties aériennes. Cependant, les plantes peuvent contribuer à la biotransformation de l'As grâce aux bactéries rhizosphériques qui augmentent le rendement de volatilisation (Salt et al., 1998).

Certains auteurs suggèrent que la phytovolatilisation ne modifierait pas fondamentalement le pool atmosphérique des contaminants. Cependant, la phytovolatilisation doit être évitée sur des sites proches de la population et sur les zones où les conditions météorologiques favorisent le dépôt rapide des composés volatiles (Heaton et al., 1998). De plus, les conséquences du relargage des composés volatiles dans l'atmosphère ne doivent pas être négligées.

Tableau 19: Plantes les plus intéressantes en phytoremédiation recensées dans la base de données PHYTOREM. (D'après McIntyre, 2003).

Elément	Plante présentant la plus forte concentration	Origine	Concentration la plus élevée (mg kg MS⁻¹)
Al	<i>Solidago hispida</i>	Canada	6820
As	<i>Agrostis tenuis (capillaris)</i>	Culture	2000
Cd	<i>Vallisneria spiralis</i>	Inde	6242
Co	<i>Haumanistrum robertii</i>	Afrique	10200
Cr	<i>Medicago sativa</i>	Culture	7700
Cu	<i>Larrea tridentata</i>	Etats-Unis	23700
Hg	<i>Pistia stratiotes</i>	Tropiques	1100
Mn	<i>Macdemia neurophylla</i>	Nouvelle Calédonie	51800
Mo	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Europe	1500-1800
Ni	<i>Psychotria douarrei</i>	Nouvelle Calédonie	4500
Pb	<i>Brassica juncea</i>	Culture	26200
U	<i>Helianthus annuus</i>	Culture	>15000
Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Europe	52000

I.2.2.6. Bases de données disponibles sur la phytoremédiation : l'exemple de PHYTOREM[®]

PHYTOREM[®] est une base de données intégralement accessible qui renferme de vastes informations sur l'aptitude de nombreuses plantes à tolérer, accumuler ou hyperaccumuler les 19 métaux lourds les plus couramment observés dans les sites contaminés (McIntyre, 2003). Elle répertorie 775 espèces de plantes vasculaires, provenant de 39 ordres, possédant un certain niveau de pouvoir d'extraction. On y trouve aussi des renseignements sur les aptitudes à la restauration de quelques bryophytes (mousses) et de quelques espèces d'algues, de champignons et de bactéries. Il existe également une base de données appelée PHYTOPET[®] qui spécifie plus de 60 plantes différentes qui possèdent la capacité de tolérer ou d'accumuler l'ensemble des hydrocarbures pétroliers de masse moléculaire élevée. Nous ne présenterons ici que l'exemple de PHYTOREM[®] qui porte sur les métaux lourds. Les métaux inclus dans cette base de données sont Al, As, Be, Cd, Cs, Co, Cu, Cr, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, Pd, Pt, Ra, Sr, U, Zn.

Pour les plantes vasculaires, la base de données inclut à la fois les plantes sauvages et les plantes cultivées. Les plantes sont classées selon leurs capacités à accumuler, hyperaccumuler, précipiter ou tolérer des métaux lourds. Dans la plupart des cas, les plantes sont considérées comme des accumulatrices si elles contiennent 100 à 200 mg kg MS⁻¹ de métaux. Elles sont par contre considérées comme des hyperaccumulatrices si elles contiennent plus de 1000 mg kg⁻¹ de MS pour la plupart des métaux et 10000 mg Mn kg MS⁻¹ ou 100 mg Cd kg MS⁻¹. 465 espèces de plantes ont des capacités d'accumulation limitées à un élément. Par contre, 66 espèces ont la capacité d'accumuler deux éléments alors que 25 peuvent accumuler trois éléments.

I.2.2.7. Programmes de recherche et développement nationaux et internationaux

I.2.2.7.1. Programmes de recherche nationaux

*1) ANR - Agence Nationale de la Recherche (www.agence-nationale-recherche.fr):
Programme PRECODD*

Le programme PRECODD couvre les technologies de l'environnement centrées sur la réduction à la source, le traitement et la mesure des émissions polluantes d'origines

industrielles et urbaines. PRECODD est un programme de recherche technologique en partenariat public/privé qui vise à favoriser un partenariat entre les principales parties prenantes (organismes de recherche, grandes entreprises, PME, pouvoirs publics en tant que donneurs d'ordre) dans le secteur des écotechnologies.

Une grande partie de mon travail de thèse s'insère dans un projet ANR PRECODD nommé PHYTOPOP. L'objectif général de ce projet était d'évaluer l'efficacité du peuplier pour la dépollution de sites pollués par les métaux et notamment de rechercher les solutions les plus adaptées à la phytoextraction, au traitement et à la valorisation de la biomasse produite. Les trois objectifs spécifiques sont les suivants :

1. L'implantation d'itinéraires culturaux différenciés, sur la base de la densité de population, qui permettront de définir, à terme, le meilleur compromis coût/efficacité de ces types de plantation. Deux densités de plantations ont été mises en place sur le site expérimental de Pierrelaye : TCR (Taillis à Courte Rotation ; 1000 tiges/ha, rotations de 7 à 8 ans) et TTCR (Taillis à Très Courte Rotation ; 10000 tiges/ha ; rotations de 2 à 3 ans). Les TTCR peuvent ainsi mobiliser rapidement de grandes quantités de biomasse. Les rendements de biomasse sont de l'ordre de $10 \text{ t ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ avec les espèces couramment utilisées mais peuvent atteindre $20 \text{ t ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ avec des cultivars plus performants. Il était nécessaire de tester un nombre conséquent de cultivars pour tester leur comportement sur sol pollué.

2. L'étude des conditions possibles de valorisation de la biomasse produite. La biomasse susceptible de fixer les éléments polluants des sols est constituée de la biomasse pérenne (bois, tronc, racines), dont la gestion est bien connue et de la biomasse annuelle (feuilles). Les techniques à employer pour la récolte de la biomasse annuelle sont étudiées dans le cadre de ce projet afin d'optimiser les conditions de récolte. Il est nécessaire de suivre le cheminement des polluants que cette biomasse aura fixés dans le cycle de combustion, et en particulier dans les cendres et dans les fumées produites tout en testant l'effet de filtres applicables dans ces chaudières. Une étude de la qualité des cendres produites permettra par ailleurs de fixer les filières de valorisation ou d'élimination requises.

3. L'identification de marqueurs moléculaires de la tolérance aux métaux. La sélection *in fine* des peupliers d'intérêt pour la phytoremédiation se fera sur la base de leurs performances à décontaminer des sols pollués. Des gènes cibles ont été sélectionnés, appartenant à des familles de transporteurs de métaux et dont les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles sont étudiées. Mon projet de thèse s'inscrivait parfaitement dans ce troisième objectif.

Tableau 20: Quelques études en champ de phytoremédiation sur sites pollués aux métaux lourds.

Contaminant	Espèce et détails	Institution/Industrie/Compagnie	Localisation
Métaux lourds	<i>Brassica juncea</i> et <i>Helianthus annuus</i>	Edenspace system corporation, Reston, VA, USA	Plusieurs sites aux USA
As	<i>Pteris vittata</i>		New Jersey, USA
Cd, Zn, Pb	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Dr Chaney et al.	St Paul, Minnesota, USA
Pb, Cd	<i>Brassica juncea</i>	Phytotech, Florida State University, IETU	Katowice, Pologne
Zn, Cd	<i>Salix viminalis</i>	Swiss Federal Institute of Technology	Suisse sur une ancienne décharge
Ni, Cu, Zn, Cd	<i>Salix sp.</i>	University of Glasgow	Dépôt d'eaux usées (Angleterre)
Zn	<i>Helianthus annuus</i> <i>Zea mays</i> , <i>Arabidopsis halleri</i>	International Graduate School Zittau	Décharge de Zn, République Tchèque
Cu, Zn, Cd	<i>Nicotiana tabacum</i>	Plusieurs institutions	Dornach, Suisse
Zn, Cu, Pb, Cd	Graminées	Limburgs University	Site pollué par usine de Zn Lommel, Belgique
Zn, Cu, Pb, Cd	Graminées	Limburgs University	Terrain de jeu contaminé Overperlt, Belgique
Zn, Cu, Pb, Cd	<i>Brassica napus</i>	Limburgs University	Sol contaminé au Zn, Cd Balen, Belgique
Pb,Cd,Zn, Cu, As, Sb, Ti	Plantes variées	Plusieurs institutions	Mine d'Aznalcollar, Espagne
Pb	<i>Brassica juncea</i> et <i>Helianthus annuus</i>		Site de Daimler Chrysler's Detroit Forge, USA
Pb	<i>Brassica juncea</i> et <i>Helianthus annuus</i>		Installation industrielle, Connecticut, USA
Pb	<i>Brassica juncea</i>		Trenton, NJ, USA

2) *BRGM-Géosciences pour une Terre durable (www.brgm.fr).*

Le programme de recherche du spécialiste français des géosciences est réparti dans 57 projets présentés selon 9 domaines : cartes et informations géologiques, eau, ressources minérales, risques naturels, environnements pollués, énergie, métrologie, modélisation, géologie-biologie.

3) *GISFI - Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (www.gisfi.fr)*

Le GISFI est basé sur trois thématiques : dynamique des pollutions et risques associés, technologies de traitement, conception de cahier des charges pour la requalification durable des espaces dégradés.

4) *RECORD - Recherche coopérative sur les déchets et l'environnement (www.record-net.org)*

RECORD est un réseau ouvert à toute organisation publique ou privée. Il permet la réalisation de recherches dans le cadre d'une coopération tripartite tout à fait originale entre industries, organismes publics et chercheurs. Outre les programmes réalisés, cette coopération fait de RECORD un lieu privilégié d'échanges ainsi qu'un outil de veille technologique et scientifique.

Au programme de 2008, 13 projets s'organisant parmi les axes thématiques suivants :

- Connaissance et caractérisation des déchets et des pollutions (31%)
- Traitement et valorisation des déchets et des sols (38%)
- Evaluation des impacts sanitaires (16%)
- Evaluation des impacts environnementaux (15%)

I.2.2.7.2. Programmes de recherche internationaux

Des programmes de recherche internationaux sont également en cours. Quelques exemples des études menées sont consignés dans le Tableau 20.



Populus deltoides

Populus nigra

Populus trichocarpa

Populus alba

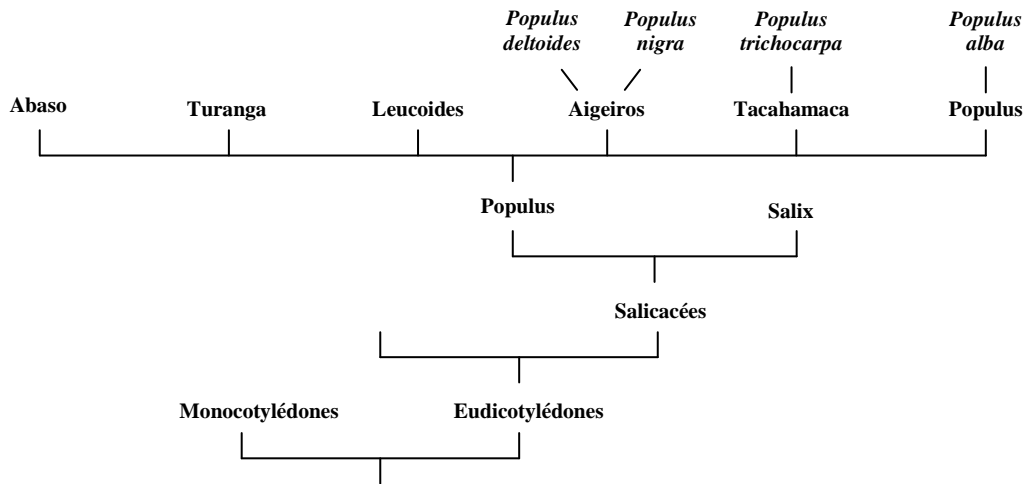


Figure 19: Les différentes espèces de peuplier. Le peuplier appartient avec le genre *Salix* à la famille des *Salicacées*. Les différentes espèces de peuplier se répartissent en 6 sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques. Les 4 espèces de peuplier les plus populaires sont indiquées au sein des populations auxquelles elles appartiennent (D'après Eckenwalder, 1996).

I.2.2.7.3. Réseau de phytoremédiation européen

En Europe, un réseau dédié à la phytoremédiation existe depuis 1998. Le COST Action 837 (<http://lbewww.epfl.ch/COST837>) regroupe des scientifiques de tous bords dans une approche transversale et interdisciplinaire de la phytoremédiation.

Plusieurs programmes européens sont actuellement en cours dans le cadre du 7ème PCRD. Le projet Phytodec (<http://www.Phytodec.nl>), par exemple, a pour objectif la mise au point d'un outil d'aide à la décision en phytoremédiation par comparaison avec les techniques de génie civil plus couramment utilisées.

Aux Etats Unis, de nombreuses recherches fondamentales et appliquées sont réalisées et financées par des départements du gouvernement (Département de l'Agriculture et Département de l'Energie) ou des agences gouvernementales (Agence de Protection de l'Environnement EPA, <http://es.epa.gov>). Aux Etats Unis, plus de 200 projets sont actuellement menés grandeur nature.

En Europe comme aux Etats Unis, la phytostabilisation a fait ses preuves. En Europe, l'exemple le plus démonstratif est celui de Maatheide en Belgique. Le traitement de ce site, très fortement contaminé en Zn et en Cd, a été réalisé par ajout d'un résidu d'incinération, la béringite, et revégétalisé. Le suivi des paramètres écologiques et chimiques de ce site pendant 10 ans atteste le succès de cette expérience pilote.

I.3. Le peuplier

Le peuplier appartient avec le genre *Salix* à la famille des Salicacées. Les différentes espèces de peuplier se répartissent en six sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques (Eckenwalder, 1996 ; Figure 19). Les sections *Aigeros*, *Tacahama* et *Populus* sont les plus importantes. La section *Aigeros* comprend notamment *Populus deltoides* et *Populus nigra*, la section *Tacahama*, *Populus trichocarpa* et la section *Populus*, *Populus alba*. Les espèces de peuplier issues de la section *Aigeros* poussent principalement dans l'Est de l'Amérique du Nord (*P. deltoides*) et autour de la Méditerranée (*P. nigra*).

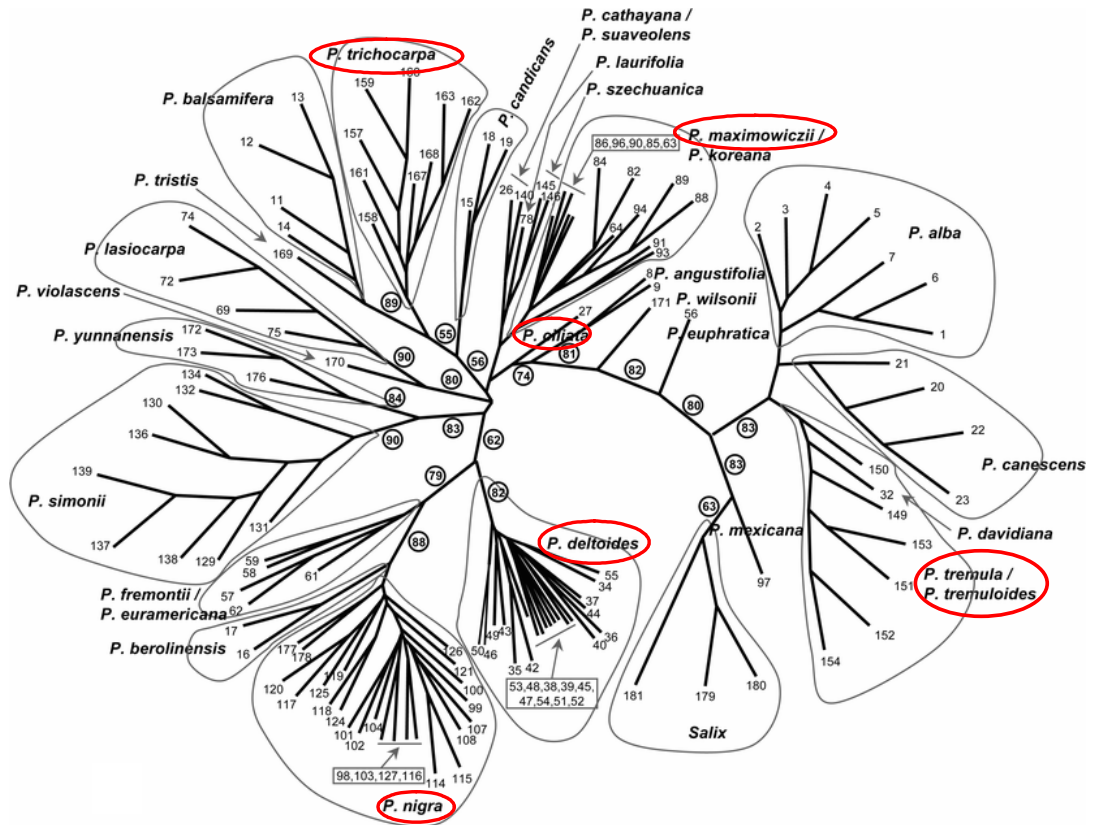


Figure 20: Arbre phylogénétique des espèces de peupliers existantes. Sont entourées en rouge les espèces que nous avons étudiées (d'après Cervera et al., 2005).

Le peuplier est une espèce plantée dans les vallées, souvent à proximité d'un cours d'eau. En France, le peuplier noir (d'origine iranienne) s'est répandu à partir de 1749 sur les bords du canal de Briare *via* l'Italie. Des boutures de *P. deltoides* provenant de l'Est de l'Amérique du Nord ont été introduites en Angleterre et en France aux 17^{ème} et 18^{ème} siècles. Les variétés les plus importantes de *P. deltoides* sont le peuplier de Caroline (variété 'Angulata' = 'Carolin') et le peuplier de Virginie (variété 'Monilifera' = *P. canadensis*). Des hybridations naturelles entre des femelles de *P. deltoides* et des mâles de *P. nigra* ont généré de nombreux clones *P. canadensis* (anciennement *P. euramericana*), comme 'Serotina', 'Robusta' ou encore 'I-214'. L'hybridation entre *P. deltoides* et *P. nigra* ne se fait que dans un sens. De même, certaines hybridations entre espèces ne sont pas possibles, comme par exemple l'hybridation entre *P. trichocarpa* et *P. grandidentata* (Eckenwalder, 1996 ; Rinaldi et al., 2007). L'arbre phylogénétique montre la plupart des espèces de peuplier (Figure 20).

Ces dernières années, le peuplier est devenu un arbre commercialisé à grande échelle. Les croisements génétiques ont pour objectif d'obtenir de meilleurs individus aptes à être domestiqués et exploités abondamment dans l'industrie. Afin de mieux sélectionner les individus destinés à l'industrie forestière, il est nécessaire de connaître les processus impliqués dans la formation du bois, les mécanismes d'adaptation à l'environnement et les mécanismes de résistance mis en place par le peuplier face aux stress biotiques et abiotiques. Ainsi, le peuplier est devenu le modèle d'étude de nombreux laboratoires nationaux et internationaux (Bradshaw et al., 2000 ; Taylor, 2002 ; Brunner et al., 2004).

Le peuplier est un arbre à croissance rapide, avec une floraison au bout de 4 à 5 ans. Cette caractéristique permet d'effectuer des croisements génétiques avec des résultats à court terme. Ainsi plusieurs cartes génétiques ont été établies pour plusieurs espèces de peuplier à la fois pour des individus mâles et femelles géniteurs de populations d'intérêt pour la sélection génétique. De nombreux Quantitative Trait Loci (QTL) de croissance et de résistance à divers agents pathogènes sont identifiés et disponibles (Taylor, 2002). L'aire de croissance naturelle du peuplier s'étend sur tout l'hémisphère Nord. La variabilité génétique naturelle qui en découle, facilite l'étude de l'adaptation physiologique de l'arbre à son environnement (Brunner et al., 2004).

Le peuplier est également facilement manipulable par génie génétique. Le peuplier transformé par agrotransformation est micro-propagé *in vitro* en deux mois (Noiël et al., 2002) et l'expression du transgène est stable dans le temps au sein des populations cultivées *in vitro*, en serre et en plein champ (Hawkins et al., 2003).

Tableau 21: Principales études menées sur le potentiel accumulateur de métaux du peuplier et du saule (en noir) sur sites contaminés avant (en rouge) et après (en bleu) le début de notre étude. (T : *trichocarpa* ; M : *maximowiczii* ; D : *deltoides* ; N : *nigra*).

espèce/ cultivar	Métal	Teneur en métal dans le sol	Teneur dans les feuilles	Teneur dans les tiges	Teneur dans les racines	Références
PEUPLIERS						
cv. Beaupré (TxD)	Cd	100	209	-	-	Robinson et al. (2000)
Treize cultivars	Cd	0,05-1,6	1,5-10	-	-	Laureysens et al. (2004)
	Zn	60-486	100-800	-	-	
	Cr	31-71	0,5-1,5	-	-	
	Cu	7-43	8-18	-	-	
<i>P. alba</i>	Pb	11-171	0,2- 4	-	-	Mertens et al. (2004)
	Cd	5,7	8	-	-	
cv. Eridano (DxM) + cv. I-214 (DxN)	Zn	10300	260-300	55 – 80	55 - 100	Sebastiani et al. (2004)
	Cu	102	20	10	50 - 60	
	Cr	14800	5	15 – 20	15 - 20	
<i>P. davidiana</i>	Cd	3,7	6,0 - 7,1	-	-	Chang et al. (2005)
	Cu	14	5,9 - 6,6	-	-	
	Pb	913	4,4 - 4,9	-	-	
	Zn	229	99 - 499	-	-	
<i>P. nigra</i>	Cd	1,32 - 4,86	5 - 20	-	-	Unterbrunner et al. (2007)
<i>P. tremula</i>	Zn	246 - 1180	800-1200	-	-	
<i>P. alba</i>	Cd	1,44	3,13- 4,90	-	-	Dominguez et al. (2008)
	Zn	457	412-605	-	-	
Robusta (<i>P. x euramericana</i>)	Cd	10,3 - 12,5	7,9- 26,7	-	-	Vandecasteele et al. (2008)
	Zn	1145 - 1429	574- 1520	-	-	
<i>P. alba</i>	Zn	950	2500	700	1150	Castiglione et al. (2009)
	Cu	1300	400	110	570	
SAULES						
<i>S. phyllicifolia</i> <i>S. borealis</i>	Cd	52,4	12,5	7,3	6,2	Stolz & Greger (2002)
	Zn	14500	1130	852	566	
	Cu	1420	7,8	10,9	88,2	
<i>S. sp.</i> (5 cv.) <i>P. sp.</i> (2 cv.)	Pb	2040	3,4	15,4	348	French et al. (2006)
	Cd	0,3-6,1	5-10	2-8	-	
	Zn	128-373	100-750	50-300	-	
<i>S. caprea</i> , <i>S. fragilis</i> , <i>S. purpurea</i> , <i>P. tremula</i> , <i>P. nigra</i>	Cu	5,9-307	10	10-55	-	Unterbrunner et al. (2007)
	Cd	1,3 -678	5-55	-	-	
	Zn	15-61600	650-3800	-	-	

Le peuplier possède un génome diploïde de petite taille 485 ± 10 Mb, qui se répartit sur 19 chromosomes (Tuskan et al., 2006). Son génome a ainsi une taille semblable à celle du génome du riz, mais 4 fois plus importante que la taille du génome *d'Arabidopsis thaliana*. Par comparaison, sa taille est 6,5 fois inférieure à celle du génome humain et 40 fois plus petite que celle du génome du pin. De plus le genre *Populus* regroupe une collection de plus de 376500 Expressed Sequence Tag (ESTs) disponibles dans les bases de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), correspondant à plus de 10 000 unigènes (Nanjo et al., 2004 ; Tuskan et al., 2006). En 2001, le Joint Genome Institute (Department of Energy, USA, <http://genome.jgi-psf.org/>) avec le concours de l'International Poplar Genome Consortium (IPGC, <http://www.ornl.gov/sci/ipgc>) a entrepris le séquençage du génome du peuplier. Le peuplier est ainsi devenu le premier arbre et le seul à cette date dont le génome est entièrement séquencé et accessible à la communauté scientifique (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>; Tuskan et al., 2006).

Nous venons de décrire dans ce chapitre les raisons qui nous ont conduites à nous intéresser au peuplier. En effet, le peuplier est une espèce ligneuse intéressante en phytoremédiation de par son importante biomasse qui compense son accumulation moindre par rapport aux espèces hyperaccumulatrices décrites précédemment. Le Tableau 21 résume les principales études menées sur le potentiel accumulateur du peuplier. Nous pouvons constater que ces études étaient limitées quant au nombre de cultivars étudiés lorsque ce travail de thèse a débuté (2005), même si elles mettaient déjà en évidence des potentiels variables entre clones mais également entre sites. Les données du peuplier sont comparables à celles mesurées pour les saules (Tableau 21). En effet, ces études révèlent un potentiel accumulateur de Cd et de Zn non négligeable de la part du peuplier. Enfin, le peuplier étant une espèce ligneuse d'importance économique considérable en France, l'idée de pouvoir utiliser sa biomasse pour produire de l'énergie tout en accumulant les métaux ajoute un intérêt supplémentaire au peuplier face au saule.

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

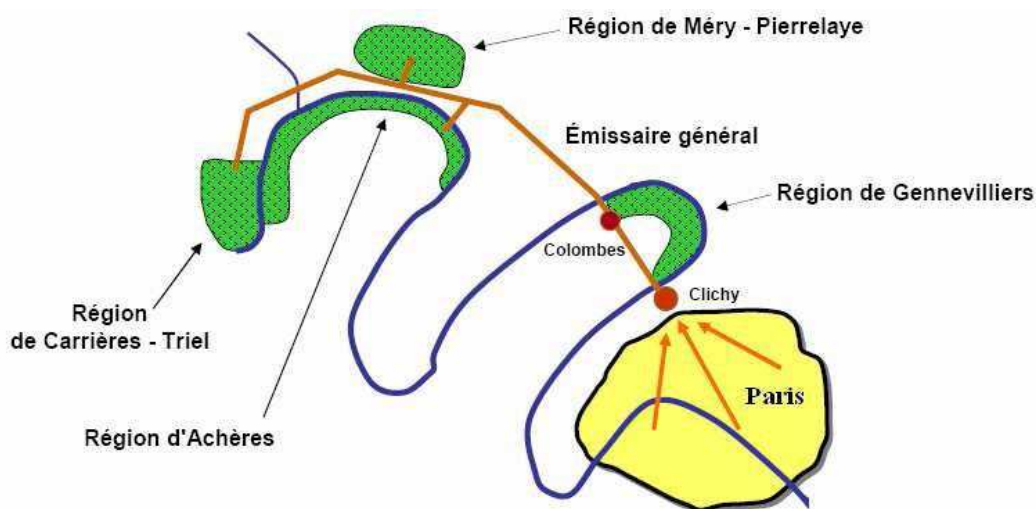


Figure 21: Représentation des épanchages des eaux brutes de Paris à la fin du XIX^{ème} siècle (d'après Arambourou et al., 2008).

Tableau 22: Historique de la pollution de Pierrelaye (d'après rapport du SIAAP pour HPC-Envirotec, 2008)

Dates	Principaux faits marquants
Avant 1896	Pratique du maraîchage sur la zone étudiée.
1896	Décret autorisant la Ville de Paris à épandre des eaux d'égouts sur la plaine de Méry-sur-Oise et Pierrelaye.
1899	Mise en service de l'usine de relevage de Colombes pour assurer les épanchages sur la plaine de Méry-sur-Oise et Pierrelaye. Inauguration des 2150 hectares de champs d'épandage de Méry-sur-Oise et Pierrelaye.
1940	Mise en service de la station d'épuration d'Achères (épuration par boues activées) ce qui entraîne une diminution du traitement des eaux par épandage.
1970	Création du syndicat Interdépartemental de l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP).
1997	Mise en évidence d'une pollution des sols par les métaux lourds sur la plaine de Méry-sur-Oise et Pierrelaye. Interdiction de mise sur le marché du thym cultivé dans le secteur.
1999	Arrêté préfectoral interdisant temporairement la mise sur le marché des cultures légumières et des plantes aromatiques issues de parcelles irriguées par épandage des eaux usées. L'essentiel du maraîchage est transformé en monoculture de maïs pour l'alimentation animale.
2000	La production de toutes cultures légumières et aromatiques, destinées ou non à la commercialisation, localisée dans les zones concernées par les épanchages des eaux usées brutes est interdite par arrêté préfectoral.
2002	Début des irrigations par le biais d'eaux traitées issues de l'usine de Colombes
2007	Arrêt des irrigations avec des eaux traitées en provenance de l'usine de Colombes. Début des irrigations avec des eaux traitées à l'usine Seine-Aval d'Achères.

II. 1. Les sites d'étude

II.1.1. Le site de Pierrelaye-Bessancourt

II.1.1.1. Historique du site

L'actuelle plaine d'épandage des eaux usées à l'étude se trouve au centre du département du Val d'Oise (95), à environ 7 km au sud de Cergy (préfecture du département) et à environ 3 km du sud-est de Pontoise (chef-lieu du département). La plaine est située à 1 km au sud, à 1,7 km à l'est de l'Oise et à 1,7 km au nord de la Seine. La surface totale concernée est de 2150 hectares.

Le sol sablonneux et calcaire de la plaine était utilisé pour le maraîchage avant 1899 (Tableau 22). Ce site était favorisé par la récente construction de la voie de chemin de fer Paris-Pontoise permettant d'apporter de Paris des gadoues pour fertiliser les sols et d'exporter les produits cultivés sur la plaine vers la capitale (D'Arcimoles et al., 2000).

Un décret de 1899 autorisa la ville de Paris à mettre en place l'épandage de ses eaux usées sur ce territoire (Figure 21) ce qui améliora nettement le rendement des parcelles. A l'usine de Colombes, après une rapide opération de décantation, les eaux usées étaient relevées et refoulées à une hauteur de 40 m. L'écoulement se fait alors par gravité jusqu'à l'usine de relevage de Pierrelaye. Cette usine permet d'envoyer les eaux usées vers les zones d'irrigation situées à des altitudes supérieures. Les maraîchers de l'époque mirent à profit cette technique d'épuration pour fertiliser leurs parcelles et ainsi développer la culture maraîchère.

De 1906 à 1937, une station d'épuration des eaux usées sur lits bactériens traitait jusqu'à 1200 m³/j et régulaient les eaux d'irrigation. A partir de 1937 les eaux usées étaient traitées au niveau de la station d'épuration de la plaine d'Achères avant d'être rejetées dans la Seine (Figure 21, Tableau 22).

En 1997, suite à la mise en évidence de métaux dans les sols superficiels de la plaine, des arrêtés préfectoraux interdirent la commercialisation et la consommation du thym produit sur les parcelles ayant reçu les épandages.

Les eaux brutes sont remplacées par des eaux clarifloculées (ou décantation physico-chimique, permet de débarrasser l'eau du phosphore présent sous forme dissoute) entre 1999 et 2002 (Vedry et al., 2001). A cette époque les terrains irrigables représentaient environ 1300 ha dont seulement 541 étaient réellement irrigués.

Tableau 23: Valeurs de référence en situations non polluées Epandagri et ANADEME (D'après Mench & Baize, 2004).

Teneur en métaux en mg kg MS ⁻¹	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Fond Pédo-Géochimique Naturel (Epandagri)		0,02	17,45	4,15	0,02	6,20	6,00	14,00
Teneur Agricole Habituelle Locale (Epandagri)		0,31	22	13,50	0,12	13,00	30,50	48,50
Médiane sur 11000 valeurs sur sol exempt d'apport de boues (Mench & Baize, 2004)		0,30	37,60	13,80	0,05	20,40	25,60	59,00

Tableau 24: Valeurs de référence dans la zone irriguée par les eaux usées d'Epandagri et SIAAP-ANTEA (Rapport SIAAP, 2008).

Teneur en métaux en mg kg MS ⁻¹	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Moyenne Epandagri		3,10	187,30	119,00	2,33	33,75	274,40	466,50
Moyenne SIAAP-ANTEA	18,30	5,06	82,57	148,32	2,18	21,33	219,10	502,38

En 1999, un arrêté préfectoral interdit la commercialisation de cultures légumières et de plantes aromatiques issues des parcelles irriguées par épandage des eaux usées (Tableau 22). A partir de cette date la monoculture de maïs à destination animale pris la place des cultures maraîchères (Baize, 2002).

Entre 2003 et 2006 l'irrigation des 900 ha de terres agricoles se faisait par les eaux traitées par procédés physico-chimiques de l'usine de Colombes (Figure 21, Tableau 22).

A partir de 2007, les eaux d'irrigation de la plaine de Méry-sur-Oise et Pierrelaye viennent de la station de traitement Seine-Aval du SIAAP par le biais de l'unité de pompage « Pétunia » (station souterraine de pompage prélevant l'eau épurée dans le canal de rejet de l'usine Seine-Aval d'Achères).

II.1.1.2. Etat des lieux actuel

La mise en œuvre des plans de surveillance des cultures et des récoltes issues des périmètres pollués de Pierrelaye-Achères a été initiée en 2005. Cette action s'inscrit aujourd'hui dans l'orientation "promouvoir des modes de production respectueux de la santé et de l'environnement" du projet stratégique mis en place par la Direction Régionale et Interdépartementale de l'Agriculture et de la Forêt (DRIAF) pour la période 2007-2012. La DRIAF pilote, sous l'autorité des Préfets du Val d'Oise et des Yvelines, la reconversion durable des sols pollués par les métaux lourds vers des productions non alimentaires. Le maintien de l'agriculture sur cette zone est stratégique puisque l'activité agricole est jugée indispensable par les scientifiques pour l'équilibre des sols et éviter le relargage des métaux lourds dans la nappe phréatique sous-jacente (Rapport de la DRIAF, 2008).

Différentes études ont été mises en œuvre pour appréhender cette problématique de pollution suite à l'épandage des eaux usées brutes de la ville de Paris. L'étude nommée "Epandagri" reste la seule expertise scientifique de diagnostic disponible à ce jour. Elle fournit un socle d'informations et de connaissances pour ancrer de nouvelles démarches d'investigation dont les plans de surveillance (Rapport de la DRIAF, 2008).

Epandagri a d'abord permis de définir un référentiel de "normalité" de présence des métaux lourds sur la base de sols déclarés comme n'ayant pas reçu d'apports d'eaux usées brutes (Tableau 23). Des valeurs de Fond Pédo-Géochimique Naturel (FPGN) et de Teneur Agricole Habituelle Locale (TAHL) peuvent ainsi être définies (Lamy et al., 2003). La TAHL

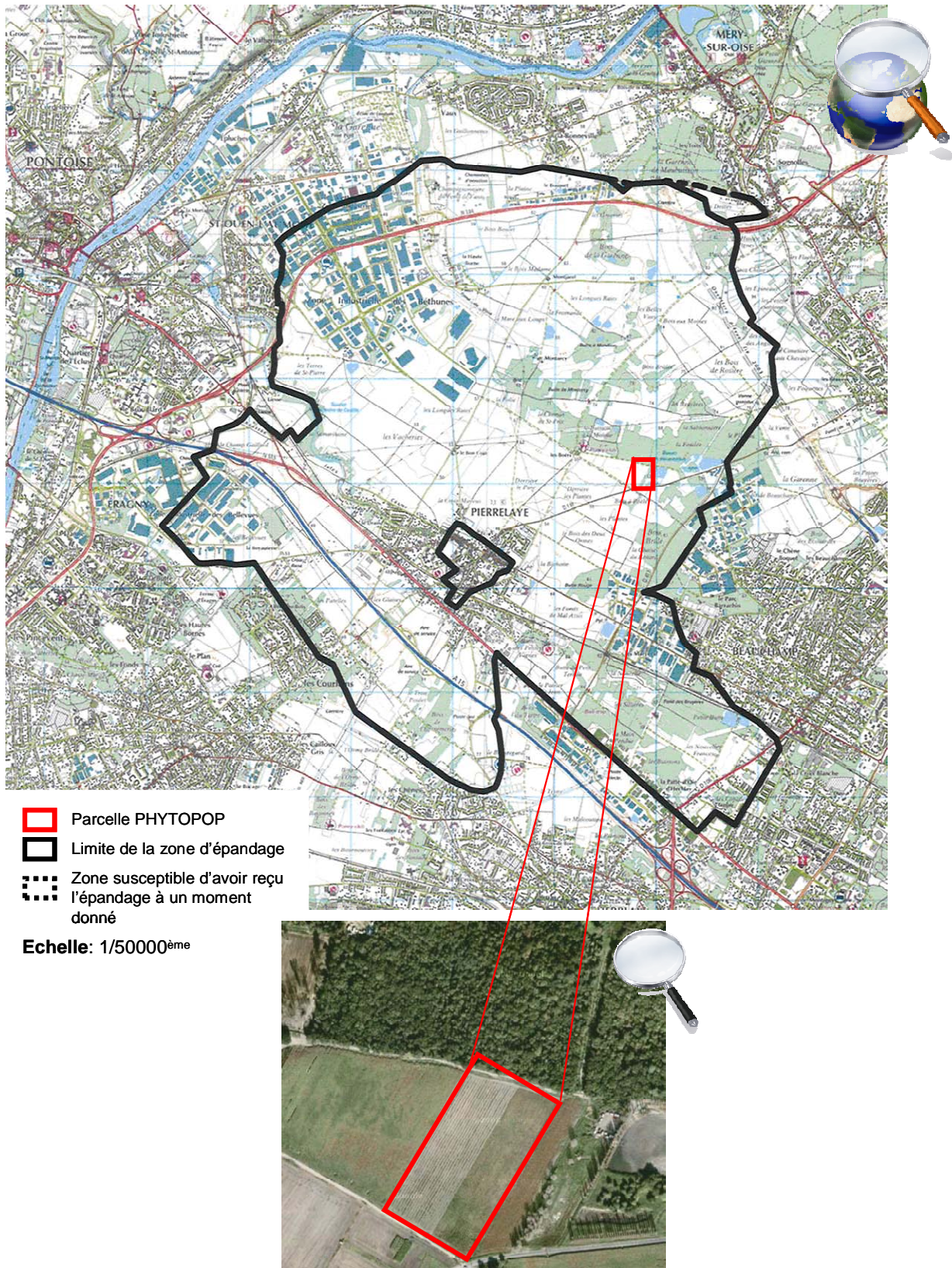


Figure 22: Délimitation de la zone d'épandage des eaux usées aux alentours de Pierrelaye (en noir, source SIAAP) et localisation de la parcelle utilisée dans le cadre du projet PHYTOPOP (en rouge).

est tout à fait cohérente avec des références nationales et confirme que ces sols dits "non pollués" contiennent des métaux à hauteur de la concentration originelle (Fond Pédogéochimique) auxquels se sont ajoutés les apports standards liés aux retombées de la pollution.

L'étude confirme la forte contamination pluri-métallique des sols. L'INRA a évalué que la quantité de métaux présents dans le sol variait entre 0,75 kg m² à 1,25 kg m² ce qui représente 10 000 tonnes de métaux sur les 890 ha de la plaine de Pierrelaye. Les résultats de l'étude SIAAP-ANTEA sont très convergents avec ceux de l'étude Epandagri. Mis à part le Ni, les teneurs des métaux étudiés sont nettement supérieures aux valeurs agricoles habituelles locales (TAHL) respectives.

Les polluants métalliques apportés au cours d'un siècle d'irrigation par les eaux usées par la Ville de Paris sur des sols agricoles, ou par tout autre source dans un tel contexte péri-urbain, ont été progressivement incorporés dans l'horizon superficiel, soit directement avec l'infiltration de l'eau soit mécaniquement suite aux labours annuels et retournement des croûtes de particules solides séchées en surface. Cette incorporation progressive a abouti à un horizon de labour fortement anthropisé (Bourennane et al., 2006 ; Dère et al., 2007).

Une parcelle de 3 ha située entre Pierrelaye et Bessancourt au niveau de la zone ayant reçu l'épandage des eaux usées de Paris (Figure 22) est étudiée dans le cadre du projet PHYTOPOP « Stratégies culturelles, valorisation de la biomasse, et sélection de géotypes plus performants appliquées à l'utilisation du peuplier pour la remédiation de sols pollués » (ANR PRECODD).

II.1.2. Le site de Métaleurop

Dans le nord de la France, dans la région de Douai (62) se trouvaient deux des plus importants sites de production de Pb et de Zn. L'usine produisant 220000 t de Zn par an est toujours en activité, il s'agit d'Umicore située à Aubry. L'usine de Noyelles-Godault nommée Métaleurop Nord, créée en 1894 produisait environ 170000 tonnes de Pb et 105000 tonnes de Zn par an.



Figure 23: Photographie de Métaeurop Nord en cours de démantèlement.

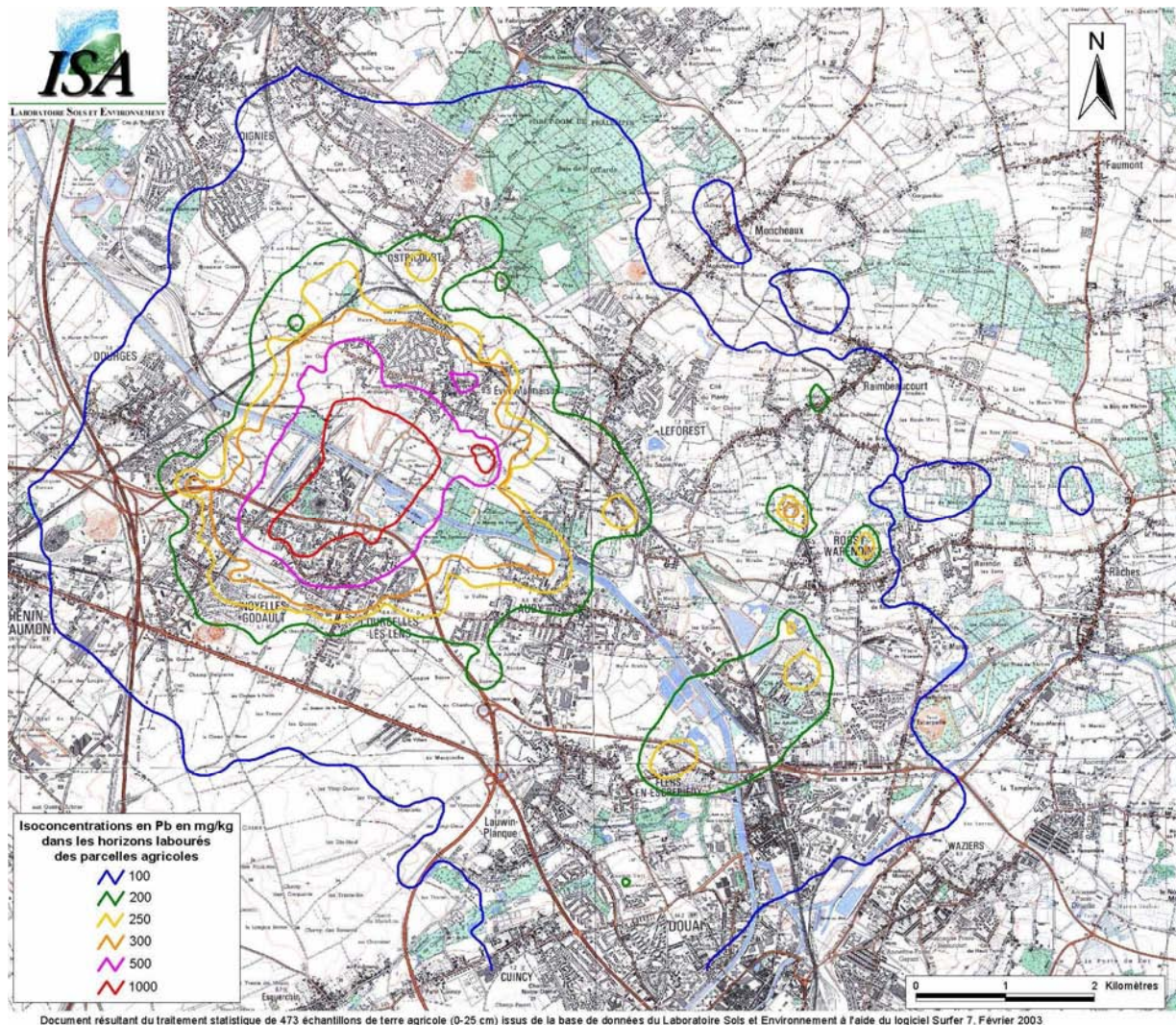


Figure 24: Lignes d'isoconcentrations en Pb reflétant la pollution en Pb autour des usines de Métaeurop Nord et Umicore situées respectivement à Noyelles-Godault et Auby en mg Pb kg MS^{-1} (Issu de la base de données du Laboratoire Sols et Environnement de l'ISA de Lille par B. Girondelot de l'ADEME).

II.1.2.1. Historique du site

L'usine de Métaleurop Nord était une filiale de Métaleurop SA qui exploitait une fonderie située sur les communes de Noyelles-Godault et de Courcelles-lès-Lens. Cette usine a été construite en 1893 par la Société anonyme des Mines de Malfidano. Cette usine fut revendue en 1920 à la Société minière et métallurgique de Penarroya, suite aux dommages engendrés par la guerre. En 1936 l'usine moderne de production de Pb est reconstruite sur un procédé original mais elle subira à nouveau des dégâts au cours de la seconde guerre mondiale. En 1961-1962 une nouvelle usine est construite et les fours de l'ancienne usine sont arrêtés au profit du procédé thermique Imperial Smelting Process (ISB). Dès 1980, la Société minière et métallurgique de Penarroya est en difficulté suite à l'apparition de normes de pollution qui l'obligent à reconsidérer leurs installations. En 1988, l'usine porte le nom de Métaleurop et fait partie du groupe Glencore. Sous l'action de l'Inspection des installations classées, les rejets atmosphériques ont été réduits de manière drastique de 350 tonnes de Pb canalisées en 1970 à une quinzaine de tonnes en 2002 (DRIRE, 2003). À sa fermeture, Métaleurop Nord raffinait le Zn et d'autres métaux (dont Pb, Cu, Sb, In, Ge, Au, Ag, Cd...). L'usine ne prendra pas en charge la dépollution du site.

Depuis son arrêt d'activité au début de l'année 2003 et sa liquidation judiciaire, le site a été cédé à la société SITA par ordonnance du tribunal de grande instance de Béthune du 12 novembre 2003 pour en assurer la réhabilitation.

Les conditions de remise en état du site ont été imposées au repreneur, SITA par arrêté préfectoral du 18 août 2004 : les travaux de dépollution, désamiantage et démantèlement (Figure 23), mesures de prévention des risques sur l'environnement et sur la santé des travailleurs. Sur le plan de la ré-industrialisation, l'arrêté d'autorisation signé le 18 août 2006 a permis à SITA Agora la mise en place d'une écopole de traitement des déchets après consultation des neuf communes environnantes concernées. Conformément à l'arrêté préfectoral du 31 décembre 2008, la mission qui incombe à l'ADEME consiste en la gestion des risques environnementaux et sanitaires autour de l'ancien site industriel Métaleurop. Depuis juin 2003, l'ADEME avait, par arrêtés préfectoraux successifs, mission de stocker les terres polluées dans un centre d'enfouissement technique de classe 2 et en contrepartie d'apporter des terres propres dès que quelqu'un voulait bâtir dans la zone du Projet d'Intérêt Général (PIG) Metaleurop. Cette mission s'est arrêtée le 31 décembre 2007 mais a été reconduite en 2008. De plus, l'ADEME assure la gestion de plusieurs parcelles situées autour

Tableau 25: Moyennes, minimums et maximums des teneurs totales en divers éléments dans des sols agricoles sur le site de Noyelles-Godault et sur un site témoin (en mg kg MS⁻¹) (D'après Sterckeman et al., 2002).

Elément	Sol loessique de référence			Sols autour de Noyelles-Godault		
	Moyenne	Minimum	Maximum	Moyenne	Minimum	Maximum
Ag	0,13	0,09	0,16	0,83	0,12	2,38
As	8,90	7,50	10,7	16,2	8,60	29,0
Bi	0,16	0,14	0,17	0,48	0,17	1,00
Cd	0,42	0,38	0,46	9,79	1,86	21,25
Co	9,30	8,30	10,3	9,7	6,2	12,7
Cr	48,8	46,9	53,4	47	34,8	60,1
Cu	16,7	14,0	18,8	27,6	15,5	46,2
Hg	0,08	0,07	0,08	0,34	0,13	0,65
In	0,035	0,030	0,041	0,240	0,060	0,550
Ni	24,7	18,1	33,2	20,2	9,60	34,8
Pb	38,4	32,7	45,7	522,7	101,0	1131,8
Sb	1,37	0,81	2,08	6,76	1,47	14,5
Se	0,18	0,18	0,19	0,55	0,37	1,44
Sn	2,75	2,43	3,20	3,35	2,09	5,81
Th	9,8	9,4	10,3	8,6	5,4	10,9
Tl	0,25	0,23	0,30	0,48	0,29	0,89
U	2,38	2,33	2,45	2,22	1,68	2,69
Zn	73,7	66,9	80,2	644,6	149,8	1377,9

de l'usine sur environ 40 km² et ce entre les lignes d'isoconcentration en Pb de 200 et 1000 mg kg MS⁻¹ (Figure 24). Le Conseil Régional a mis en place avec tous les partenaires concernés un Pôle de Compétences sur les sites et sols pollués. Il a lancé le Programme de Recherche Concerté (PRC). Dès 1994, différentes équipes se sont associées pour mener des investigations sur la nature des contaminants, leurs mécanismes de transfert et leur impacts sur les organismes vivants, y compris sur l'homme (Baize, 2002). Le Conseil Régional a ensuite aidé à fédérer les acteurs concernés autour d'un projet de développement local. Parallèlement, l'État a créé à Douai le Centre National de Recherche sur les Sites et Sols Pollués, le CNRSSP.

De plus, deux PIG ont vu le jour : un premier arrêté préfectoral, en juin 1989, définit un PIG de prévention des risques des activités polluantes de l'usine Asturienne (CRAM) à Auby, fin 1997 (prorogé par les arrêtés des 20 janvier 1999 et 16 janvier 2002), un autre PIG est défini autour de Métaleurop pour réglementer les activités et les occupations du sol. Le périmètre du PIG de Métaleurop Nord englobe les communes de Noyelles-Godault, Courcelles-les-Lens et Evin-Malmaison. Quatre zones sont délimitées en fonction du risque encouru. Un PIG permet d'imposer aux municipalités concernées des restrictions d'urbanisme liées aux risques technologiques ou aux sols pollués.

II.1.2.2. Etat des lieux actuel

Malgré la fermeture Métaleurop Nord, les sols autour de l'usine sont encore fortement pollués par le Cd, le Pb et le Zn et on retrouve également l'Ag, l'As, le Bi, le Cr, le Cu, le Co, le Hg, le Sn, l'In, le Ni, le Se et le Tl dans des proportions moindres (Sterckeman et al., 2002). Le sol est contaminé sur une surface de 120 km² sur lesquels vivent 55000 habitants. Cette pollution concerne à la fois les parcelles agricoles et les jardins des particuliers.

La pollution des sols agricoles a bien été étudiée depuis les travaux de Luttringer et de Cormis en 1979 et des lignes d'isoconcentration pour les principaux polluants ont été définies (Figure 24). Le Tableau 25 montre les teneurs en métaux mesurées à Noyelles-Godault et sur un site témoin. Les moyennes de teneurs en Cd sont 23 fois plus importantes à Noyelles-Godault, celles de Pb 13 fois plus importantes et celles de Zn 9 fois plus importantes que sur le site loessique de référence (Sterckeman et al., 2002). La distribution verticale des éléments

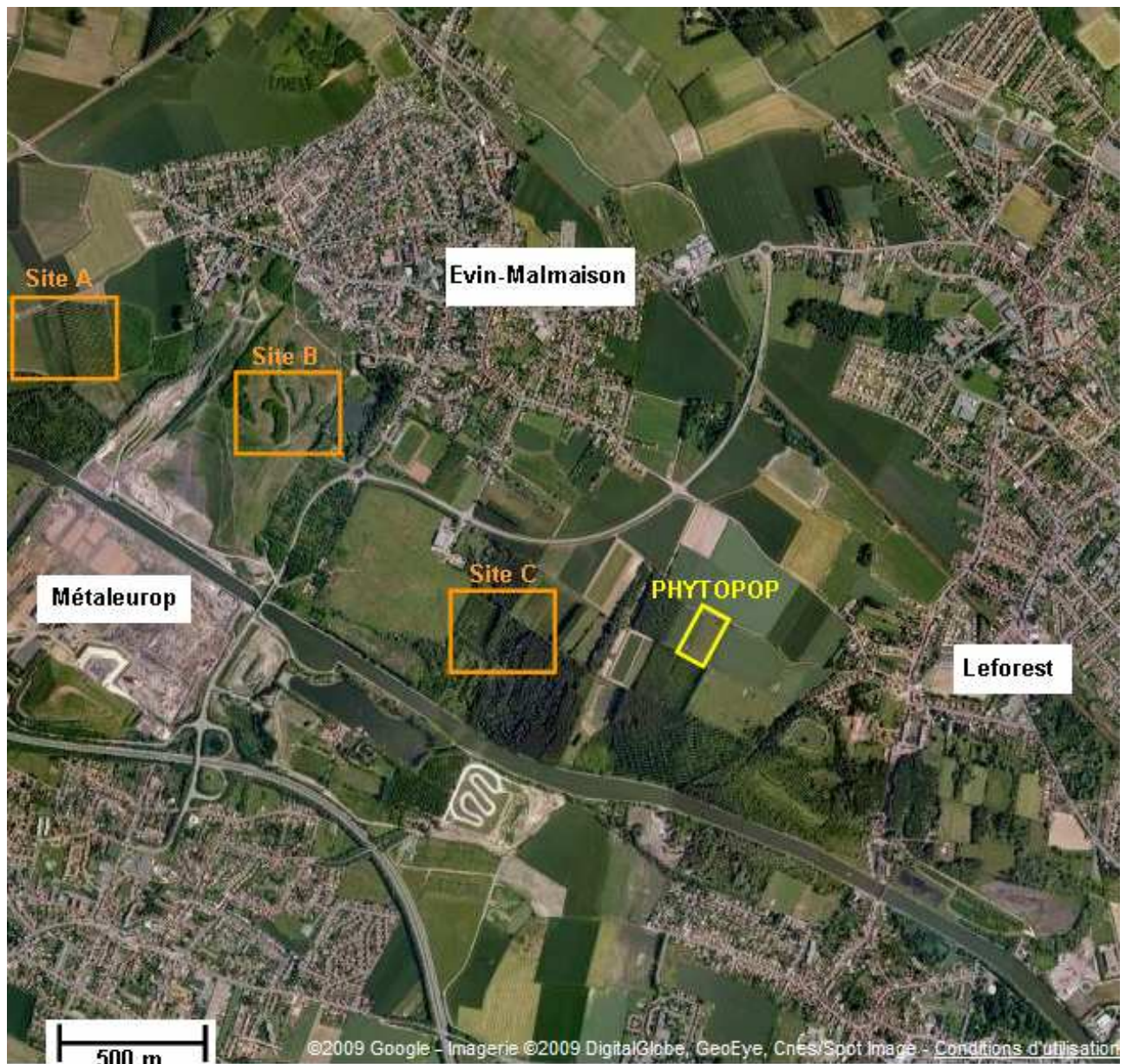


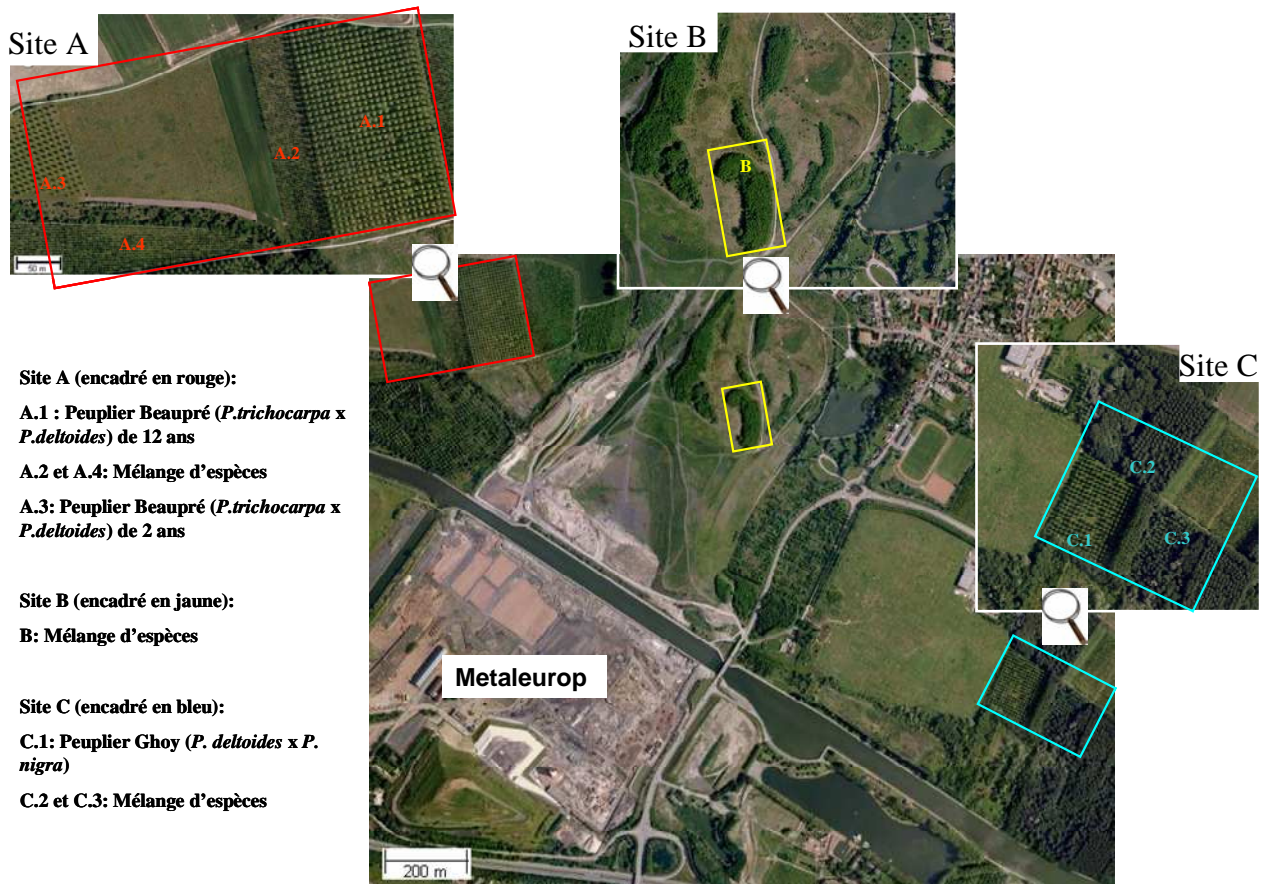
Figure 25: Site de Métaleurop Nord. En orange sont indiqués les 3 sites (A, B et C) sur lesquels nous avons réalisé des prélèvements d'espèces ligneuses. En jaune, la parcelle du projet PHYTOPOP sur laquelle différents cultivars de peupliers ont été plantés.

métalliques a également été étudiée. Il a été montré que la contamination des sols agricoles était limitée aux 30 premiers centimètres de sol et qu'elle décroît ensuite très vite en profondeur (Sterckeman et al., 2000). Cela est conforme aux propriétés de ces éléments qui présentent de fortes affinités avec la phase solide des sols. Le Zn et le Cd peuvent cependant être retrouvés à des profondeurs de l'ordre de 2 m dans les cas de sols très contaminés en surface (Baize, 2002).

Les contaminations en surface des sols urbains sont souvent plus élevées que celles des sols agricoles voisines, et des concentrations de $33,5 \text{ mg Cd kg MS}^{-1}$, $5280 \text{ mg Pb kg MS}^{-1}$ et $7570 \text{ mg Zn kg MS}^{-1}$ ont été mesurées sur ces sites (Douay et al., 2008b; Pruvot et al., 2006). Les polluants majeurs des sols urbains sont Cd, In, Pb, Sb et Zn alors que les polluants majeurs des parcelles destinées à l'agriculture était uniquement Cd, Pb et Zn (Douay et al., 2008b). Cette contamination des sols urbains est très préoccupante pour la population locale (Pruvot et al., 2006).

Les teneurs dans les jardins des particuliers étaient moins étudiées alors que les habitants du site continuent à faire des jardins potagers. Les pratiques de culture (ajout de fertilisants, de matières organiques, arrosage avec de l'eau de pluie) tendent à aggraver la situation de pollution des jardins potagers. Les concentrations mesurées sont 39 et 71 fois plus élevées pour le Pb et le Cd respectivement que celles d'un sol agricole de référence (Douay et al., 2008a). Ces teneurs sont bien sûr beaucoup trop élevées par rapport aux normes.

Nous avons réalisé des prélèvements de sol et de végétaux (feuilles et tiges) sur les sites nommés A, B et C du site de Métaeurop Nord (Figure 25). Une parcelle de 1 ha située à Leforest est également utilisée dans le cadre du projet PHYTOPOP (Figure 25).



Site A (encadré en rouge):

A.1 : Peuplier Beaupré (*P.trichocarpa* x *P.deltoides*) de 12 ans

A.2 et A.4: Mélange d'espèces

A.3: Peuplier Beaupré (*P.trichocarpa* x *P.deltoides*) de 2 ans

Site B (encadré en jaune):

B: Mélange d'espèces

Site C (encadré en bleu):

C.1: Peuplier Ghoy (*P. deltoides* x *P. nigra*)

C.2 et C.3: Mélange d'espèces

Figure 26: Site de Métaeurop et localisation des sites A, B et C où ont été réalisés des prélèvements de sol, de feuilles, de tiges des différentes espèces rencontrées.

II.2. Matériel biologique et sols

II.2.1. Matériel végétal et sol issus de sites expérimentaux

Le matériel végétal utilisé au cours de cette thèse est issu à la fois de différentes campagnes d'échantillonnage (sur le site de Métaleurop, sur nos sites d'étude où ont été plantés plusieurs cultivars de peuplier) et de différents cultivars de peupliers cultivés en culture hydroponique et en pots en laboratoire.

II.2.1.1. Espèces ligneuses du site de Métaleurop (hors PHYTOPOP)

Le premier de cette thèse étant de comparer les capacités d'accumulation de métaux dans différentes espèces ligneuses, des prélèvements ont été effectués sur le site de Métaleurop (Noyelles Godault, 62), pollué par des métaux lourds. Ce site a été décrit § II.1.2.

Des échantillons de feuilles et de tiges des espèces ligneuses rencontrées sur le site ont été prélevés à trois reprises (en juin 2005, en juin 2006 et en octobre 2006) afin de comparer les valeurs des concentrations en métaux d'une année sur l'autre et entre saisons. Des échantillons de sol du site ont également été prélevés en juin et octobre 2006 et nous disposons de données de pollution du sol du site (Sterckeman et al., 2002) ce qui nous permet de comparer nos résultats à ceux de la littérature.

Nous avons réalisé des prélèvements sur 3 sites autour de l'ancienne usine de Metaleurop. Ces sites ont été nommés arbitrairement A, B et C (Figure 26).

Les espèces collectées sur le site A sont *Acer campestre* L. (Erable champêtre), *Acer pseudoplatanus* L. (Erable sycomore), *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (Aulne glutineux), *Betula pendula* Roth (Bouleau verruqueux), *Crataegus monogyna* Jacq. (Aubépine monogyne), *Fraxinus excelsior* L. (Frêne commun), *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* (Peuplier cultivar Beaupré), *Prunus avium* L. (Merisier), *Quercus robur* L. (Chêne pédonculé), *Quercus rubra* L. (Chêne rouge), *Robinia pseudoacacia* L. (Robinier faux acacia), *Salix alba* L. (Saule blanc), *Salix caprea* L. (Saule marsault), *Ulmus minor* Mill. (Orme champêtre).

Les espèces collectées sur le site B sont *Acer campestre* L. (Erable champêtre), *Betula pendula* Roth (Bouleau verruqueux), *Corylus avellana* L. (Coudrier), *Cornus sanguinea* L. (Cornouiller sanguin), *Genista tinctoria* L. (Genêt des teinturiers), *Ligustrum vulgare* L. (Troène), *Malus sylvestris* Mill. (Pommier sauvage), *Prunus avium* L. (Merisier), *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (Tremble), *Robinia pseudoacacia* L. (Robinier faux acacia), *Salix alba* L. (Saule blanc), *Salix caprea* L. (Saule marsault), *Salix purpurea* L. (Saule pourpre).

Les espèces collectées sur le site C sont *Acer pseudoplatanus* L. (Erable sycomore), *Cornus sanguinea* L. (Cornouiller sanguin), *Fraxinus excelsior* L. (Frêne commun), *P. deltoides* x *Populus nigra* (cultivar Ghoy), *P. nigra*, *P. tremula* x *Populus alba*, *Salix alba* L. (Saule blanc), *Sambucus nigra* L. (Sureau noir), *Ulmus minor* Mill. (Orme champêtre).

Cinq échantillons de feuilles et cinq échantillons de tiges sont prélevés pour chaque espèce (et ce sur des arbres différents) pour tester la variation intraspécifique en plus de la variation interspécifique. Nous avons pris soin de prendre les échantillons de manière homogène à savoir que les feuilles et les tiges ont été récoltés à 2 m de hauteur, de plus ce sont des feuilles de même maturité et des tiges de même âge (tiges d'un an). Une dizaine d'échantillons du sol présent sur cette même parcelle sont prélevés entre 0 et 20 centimètres de profondeur à l'aide d'une tarière. Après prélèvement ces échantillons sont stockés à 4°C. Les échantillons végétaux ont été lavés à l'eau distillé afin d'éliminer les poussières présentes à la surface des tissus et contenant potentiellement des métaux. Ces échantillons sont ensuite séchés à 60°C avant d'être broyés. Les feuilles sont broyées avec un pilon et un mortier et les tiges sont coupées finement avec un sécateur avant d'être broyées dans le mortier. Les échantillons de sol sont tamisés (2mm).

II.2.1.2. Peupliers du site de Micheville

Le site de Micheville est situé à Villerupt (54) entre Thionville et Longwy. Il a été le lieu d'une exploitation d'une mine à ciel ouvert avec la création de plates-formes sidérurgiques et de crassiers. Depuis l'arrêt des activités minières et la destruction des bâtiments, il est devenu une friche industrielle d'environ 370 ha gérée par l'Etablissement Public de la Métropole Lorraine qui a pour mission le réaménagement des sites industriels à l'abandon. En 2005, nous avons prélevé des échantillons de feuilles de

Tableau 26: Liste et principales caractéristiques des cultivars utilisés pour les essais de terrain dans le cadre du projet PHYTOPOP.

Nom du clone	Espèce	Pays	Section	Nom botanique	Sexe
Bakan	TM	B	Tacamahaca	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i>	mâle
Fritzi Pauley	T	B	Tacamahaca	<i>P. trichocarpa</i>	femelle
Muur	DN	B	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	mâle
Skado	TM	B	Tacamahaca	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i>	femelle
Trichobel	T	B	Tacamahaca	<i>P. trichocarpa</i>	mâle
Vesten	DN	B	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	femelle
Dvina	D	I	Aigeiros	<i>P. deltoides</i>	mâle
I-214	DN	I	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	femelle
Lena	D	I	Aigeiros	<i>P. deltoides</i>	mâle
Soligo	DN	I	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	mâle
Triplo	DN	I	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	mâle
Dorskamp	DN	NL	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	mâle
Flevo	DN	NL	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	mâle
Koster	DN	NL	Aigeiros	<i>P. x euramericana</i>	mâle

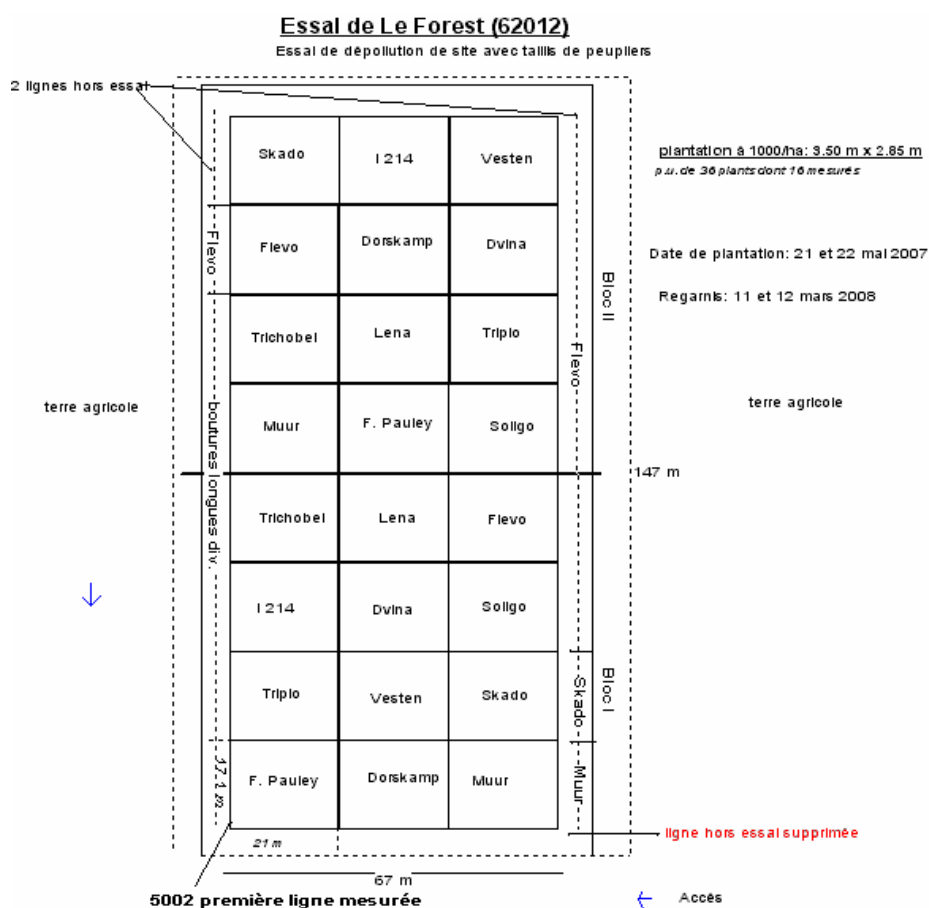


Figure 27: Répartition des différents cultivars sur le site de Leforest en mode TCR (1000 t/ha) sur une surface de 1 ha composée de 2 répétitions (blocs 1 & 2) avec 12 clones par bloc.

P. tremula x *P.tremuloides* (Tremble) sur ce site pollué par du Zn, du Pb et du Cd afin de comparer les teneurs obtenues à celles de Métaleurop.

II.2.1.3. Espèces ligneuses et sols de sites témoins

Nous avons prélevé en juin 2006 des échantillons de feuilles, tiges et de sol sur un site témoin situé en Lorraine et plus exactement à Champenoux (54). Sur ce site se trouvaient des espèces ligneuses d'une dizaine d'années. Nous avons prélevé des échantillons de *Acer pseudoplatanus*, *Betula pendula*, *P.trichocarpa* x *P.deltoïdes* (Beaupré), *P.tremula* x *P.tremuloïdes*, *Quercus robur* et de *Salix alba*.

Nous avons également prélevé en juin 2005 des échantillons de feuilles de *P. trichocarpa* x *P. deltoïdes* (Beaupré), de *P. deltoïdes* x *P. nigra* (Ghoy), de *P. tremula* x *P. tremuloïdes* (Tremble) et de *P. nigra* à Rumilly en Cambresis et Masnières qui sont des villages situés à une cinquantaine de kilomètres de Metaleurop.

II.2.1.4. Peupliers de la parcelle expérimentale de Leforest (62) (PHYTOPOP)

La première parcelle expérimentale du projet PHYTOPOP est localisée sur la commune de Leforest à quelques kilomètres de l'ancienne usine de Métaleurop Nord (Figure 26), a une surface de 1 ha et une texture de sol argilo-limoneuse. Le sol est bien alimenté en eau. Douze clones ont été plantés sur cette parcelle au mois de mai 2007 à une densité de 1000 tiges par hectare: Fritzi Pauley, Muur, Skado, Trichobel, Vesten, Dvina, I-214, Lena, Soligo, Triplo, Dorskamp et Flevo (Tableau 26). Deux répétitions ont été mises en place par le FCBA, la répartition des cultivars a été faite au hasard dans ces 2 blocs (Figure 27). Nous disposons donc de 24 parcelles unitaires de 359 m². Il y a 36 plants par parcelle unitaire (Tableau 27).

Pour les deux sites expérimentaux, les plants d'origine sont des boutures de 30 cm environ, enfoncées manuellement sur toute leur longueur, dont seul le bourgeon dépassant du sol donnera naissance à la future tige. La pose de clôture autour des dispositifs a été rendue nécessaire par la présence de lapins en grand nombre sur le site. La maîtrise de la végétation d'accompagnement (espèces adventices) est assurée en début de saison par un traitement herbicide de pré-émergence (matière active : oxyfluorène + propyzamide) et par un ou plusieurs sarclages mécaniques en cours de saison de végétation. La plantation et l'entretien

Tableau 27: Description des dispositifs expérimentaux de Pierrelaye-Bessancourt et Leforest.

Site	Répétitions	Densité /ha	Nombre de clones	Distance de plantation	Nombre de plants par parcelle unitaire
Pierrelaye (95)	2	1000	14	3,5 x 2,85 m	49
	2	10000	14	2 lignes de 0,75 x 0,80 m espacées de 1,75 m	384
Leforest (62)	2	1000	12	3,5 x 2,85 m	36

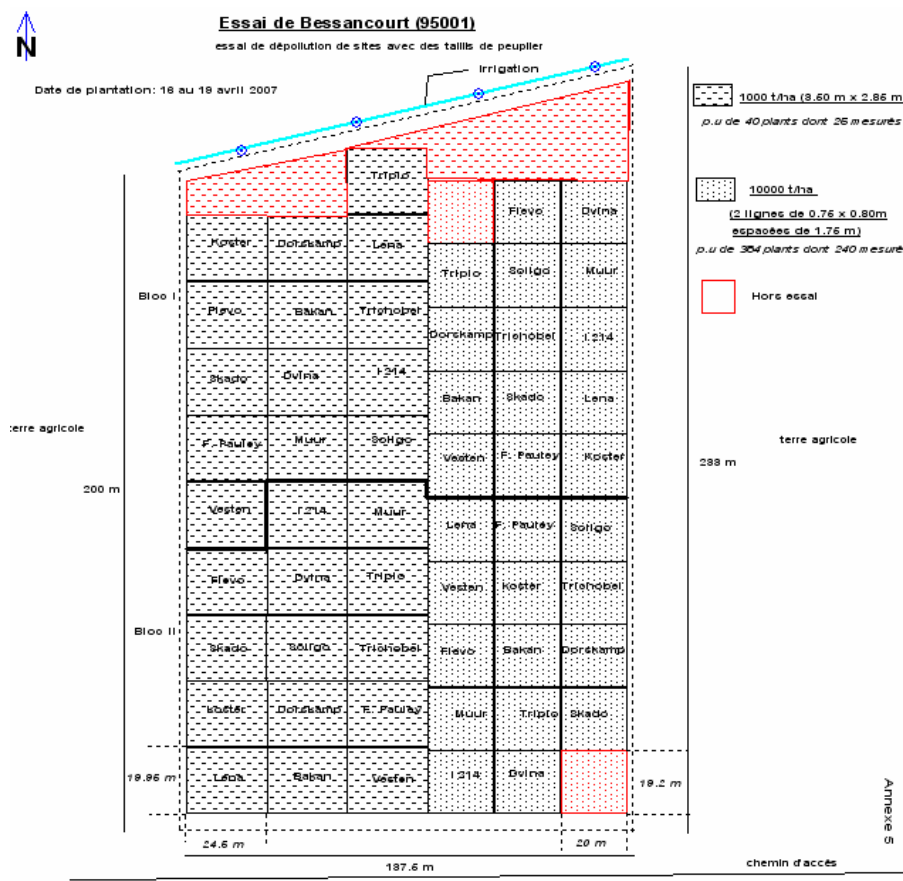


Figure 28: Répartition des différents cultivars sur le site de Pierrelaye en mode TCR (1000 t/ha) et TTCR (10000 t/ha) sur une surface de 3 ha composée de 2 répétitions (blocs I & II) pour chaque mode de culture avec 14 clones par bloc.

des parcelles sont gérées par le FCBA (Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement), partenaire du projet PHYTOPOP.

Nous avons prélevé 5 échantillons de feuilles de chacun de ces 12 cultivars dans les 2 blocs en octobre 2007 et juillet 2008. Les techniques de prélèvement, de stockage et de traitement des échantillons sont identiques à celles décrites en §II.1.1.1.

Parallèlement à ces analyses dans les tissus foliaires, des prélèvements de sols ont été réalisés par D. Baize (INRA Orléans) sur cette même parcelle en août 2008. Il s'agit d'échantillons composites, résultant du mélange de 16 prélèvements au sein d'une même placette. Les teneurs totales et extractibles (DTPA et NH_4NO_3) en métaux lourds ont ainsi été déterminées sur toute la parcelle expérimentale.

Des mesures portant sur la survie et la croissance en hauteur des plants ont été réalisées en février 2008 par le FCBA à raison de 16 plants par parcelle unitaire. Les données sont saisies suivant un système de coordonnées géographiques permettant d'opérer sur les mêmes plants à chaque mesure. Suite à d'importants dégâts causés par des lapins, le site a été regarni en mars 2008 avec des boutures de 2 m de hauteur qui sont enfoncées de moitié dans le sol.

II.2.1.5. Peupliers de la parcelle expérimentale de Pierrelaye (95) (PHYTOPOP)

La seconde parcelle expérimentale du projet PHYTOPOP localisée sur la commune de Pierrelaye est polluée par les eaux usées de la Ville de Paris. Cette parcelle de 3 ha présente 2 modes de culture : taillis à courte rotation (TCR) et taillis à très courte rotation (TTCR) (respectivement à 1000 et 10000 tiges ha^{-1}) et pour chaque mode de culture il y a 2 répétitions (Figure 28). La surface totale est de 3 ha. La texture du sol est sableuse avec une couche organique plus ou moins profonde. Il y a deux cultivars supplémentaires par rapport à la parcelle de Leforest : Koester et Bakan (Tableau 26). Il y a 2 modes de culture et 2 blocs par mode de culture soit 4 blocs au total ce qui équivaut à 54 parcelles unitaires de 489 m^2 pour les TCR et 389 m^2 pour les TTCR. Cela représente 49 plants par parcelle unitaire en TCR et 384 plants en TTCR (Tableau 27). Les peupliers ont été plantés en avril 2007.

Nous avons prélevé 5 échantillons de feuilles de chacun de ces 14 cultivars dans les 4 blocs en octobre 2007 et juillet 2008. En juillet 2008 nous avons également prélevé des feuilles jaunes dans les blocs TTCR afin d'analyser la variation des teneurs entre feuilles matures et feuilles sénescentes.

Tableau 28: Récapitulatif des espèces et cultivars testés en laboratoire (en culture hydroponique ou en pots) et sur sites contaminés (Métaleurop, Pierrelaye et Leforest). X : présent. E : essai sur une petite parcelle unitaire de Pierrelaye.

D : *P. deltoides* ; DC : *P. deltoides* x *P. ciliata* ; DM : *P. deltoides* x *P. maximowiczii* ; DN : *P. deltoides* x *P. nigra* ; MN : *P. maximowiczii* x *P. nigra* ; N : *P. nigra* ; T : *P. trichocarpa* ; TD : *P. trichocarpa* x *P. deltoides* ; TM : *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* ; tt : *P. tremula* x *P. tremuloides*.

Nom du cultivar (ou espèce)	Espèce	Culture hydroponique	Culture en pots	Métaleurop	Pierrelaye	Leforest
L 155 A 56	D	X				
Dvina	D	X			X	X
Lena	D	X	X		X	X
Sile	DC	X				
Eridano	DM	X				
Flevo	DN	X			X	X
Dorskamp	DN	X			X	X
I-214	DN	X			X	X
Koster	DN	X			X	
Triplo	DN	X			X	X
A4A	DN	X				
Soligo	DN	X			X	X
Muur	DN	X			X	X
Vesten	DN	X			X	X
Rochester	MN	X				
Blanc de Garonne	N	X				
AFO-662	N	X				
AFO-678	N	X				
Trichobel	T	X			X	X
Fritzi Pauley	T	X			X	X
Nisqually	T	X				
Rap	TD	X				
Raspalje	TD	X			E	
Bakan	TM	X			X	
Skado	TM	X	X		X	X
Ghoy	DN	X		X		
Beaupré	TD	X		X		
Nigra	N	X		X		
Tremble	tt			X		

Les techniques de prélèvement, de stockage et de traitement des échantillons sont identiques à celles décrites § II.2.1.1.

Parallèlement à ces analyses dans les tissus foliaires, des prélèvements de sol ont été réalisés par D. Baize sur cette même parcelle en juillet 2007. Il s'agit d'échantillons composites, résultant du mélange de 16 prélèvements au sein d'une même placette tant en TCR qu'en TTCR. Les teneurs totales et extractibles en métaux lourds ont ainsi été déterminées sur toute la parcelle.

Des mesures portant sur la survie et la croissance en hauteur des plants ont été réalisées en février 2008 à raison de 26 plants par parcelle unitaire pour la densité à 1000 tiges ha⁻¹ et 120 plants pour la densité à 10000 tiges ha⁻¹. Les données sont saisies suivant un système de coordonnées géographiques permettant d'opérer sur les mêmes plants à chaque mesure. Les blocs en TCR ont aussi été regarnis en mars 2008, tout comme sur la parcelle de Leforest.

De plus, une première estimation de la biomasse a été faite en fin de 2^{ème} année (début octobre 2008) sur une zone hors essai de taillis planté à 10000 tiges ha⁻¹. Des mesures de hauteur, de diamètre de tige ainsi que des pesées de biomasse (feuilles, branches, tiges) ont été faites sur 4 clones (2 clones produisant une biomasse importante, 2 clones à forte capacité phytoextractrice mais produisant une biomasse faible).

II.2.2. Peupliers cultivés en laboratoire

Les espèces et cultivars de peuplier utilisés au cours de cette thèse sont résumés dans le Tableau 28. Nous détaillerons dans le détail les cultivars étudiés sur les sites expérimentaux ainsi que ceux présents sur le site de Métaleurop en Annexe I.

II.2.3. Microorganismes utilisés

II.2.3.1. *Escherichia coli*

La souche utilisée est DH5αF' : F', *hsdR17* (r_K⁻m_K⁺), *supE44*, Δ(*lacIZYA-argF*)U169, *deoR*, (Φ80 *dlac*Δ (*lacZ*) M15), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

Tableau 29: Composition des milieux de culture liquide Luria Bertani (LB), SOB et SOC pour la culture de bactéries.

Composés	LB	SOB	SOC
Bactotryptone	10 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Extrait de levure	5 g l ⁻¹	5 g l ⁻¹	5 g l ⁻¹
NaCl	10 g l ⁻¹	0,5 g l ⁻¹	0,5 g l ⁻¹
KCl	-	0,2 g l ⁻¹	0,2 g l ⁻¹
MgSO ₄ 1M	-	-	10 ml
MgCl ₂ 1M	-	-	10 ml
Glucose 20%	-	-	10 ml

Tableau 30: Génotype des souches de levure (*S. cerevisiae*) utilisées pour la caractérisation fonctionnelle des transporteurs

Souches	Génotype
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<i>zrc1Δ</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ZRC1::kanMX4</i>
<i>cot1Δ</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 COT1::kanMX</i>
<i>ycf1Δ</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YCF1::kanMX4</i>
<i>pmr1Δ</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PMR1::kanMX4</i>
<i>smf1Δ</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SMF1::kanMX4</i>
<i>cup2Δ</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 CUP2::kanMX4</i>

Tableau 31: Composition du milieu de culture YPD pour levures.

Composés	Liquide	Solide
Bactotryptone	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Extrait de levure	10 g l ⁻¹	10 g l ⁻¹
Glucose	20 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Agar		20 g l ⁻¹

Le pH du milieu est ajusté à 5,5 avant stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Cette souche a été utilisée pour les transformations de routine. Elle permet la synthèse d'un grand nombre de copies de plasmides, son taux de transformation est élevé. Elle permet également le criblage blanc-bleu.

La souche d'*E. coli* a été cultivée à 37°C. La composition des différents milieux de culture utilisés est détaillée dans le Tableau 29.

II.2.3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Les souches de levures déficientes utilisées sont des mutants de *S. cerevisiae*. Elles sont conservées au laboratoire à -70°C. Leur génotype est présenté dans le Tableau 30. Les différentes souches de *S. cerevisiae* déficientes en transporteur sont réactivées sur milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) gélosé.

Toutes les expériences nécessitant une culture en milieu YPD liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance à 30°C. La composition du milieu YPD est présentée dans le Tableau 31. En fonction de la souche de levure déficiente utilisée, le milieu de culture dans les conditions de restriction n'est pas le même. Deux types de milieu sont utilisés, l'un dépourvu d'uracile pour la sélection des transformants, l'autre pour la recherche du phénotype.

Les cultures sont réalisées en aérobiose, à 30°C. Toutes les expériences nécessitant une culture liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance (Wiame et al., 1985).

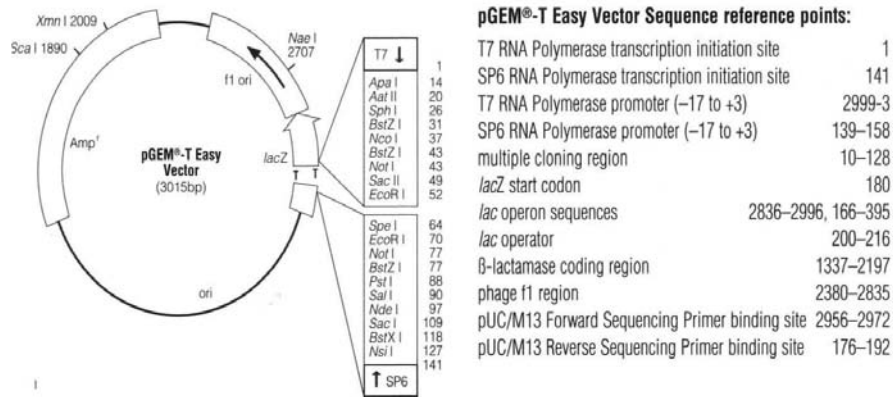


Figure 29: Carte de restriction de pGEM[®]Teasy

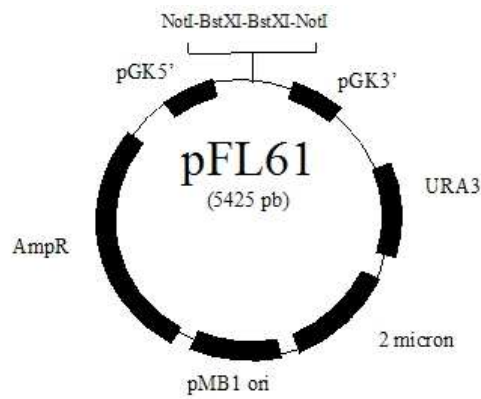


Figure 30: Représentation de la carte du plasmide pFL61.

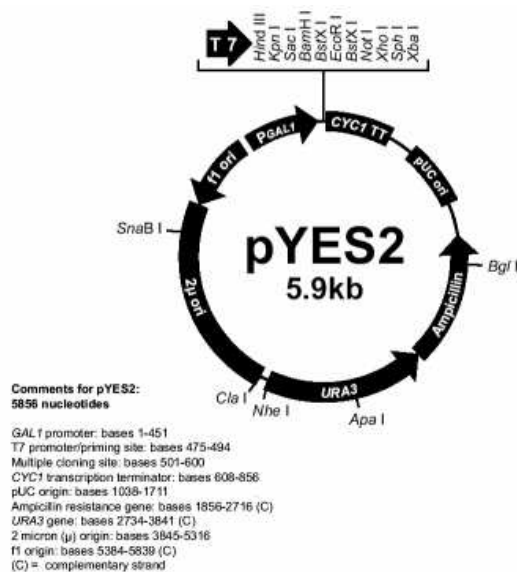


Figure 31: Représentation du plasmide pYES2 et de ses caractéristiques.

II.2.4. Plasmides utilisés

II.2.4.1. Plasmides de clonage

△ pGEM[®]-T easy (3 kb)

Le plasmide pGEM[®]-T easy (3015 pb) (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de répllication du phage f1 et un multisite de clonage localisé dans le gène *lacZα* (Figure 29). Il a été utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR obtenus avec l'ADN polymérase Advantage 2 (Clontech). Celle-ci rajoute en effet une molécule de dATP aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère. Les amorces SP6 et T7 encadrent la cassette de clonage et permettent d'amplifier le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour vérifier son insertion.

II.2.4.2. Plasmides navette *E. coli*-*S. cerevisiae*

Les plasmides utilisés sont de la famille YE_p, dits épisomiques. Ils contiennent l'origine de répllication du plasmide 2 μm. Ces plasmides sont présents à raison de 20 à 30 copies par levure.

△ pFL61 (5,4 kb)

Le plasmide pFL61 (Figure 30, Minet et al., 1992) possède le gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage *NotI* en aval du promoteur de la phosphoglycerokinase de *S. cerevisiae*. Les amorces L2 et R2 encadrent la cassette de clonage et permettent d'amplifier le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour vérifier son orientation. Il est pourvu du gène marqueur *URA3*. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer les gènes dans la levure.

△ pYES2 (5,9 kb) (Invitrogen)

Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur dont l'induction est galactose dépendante. Il est également pourvu du gène marqueur *URA3* (Figure 31). Il a été utilisé pour les tests de complémentation de levures déficientes.

△ pYES2GFP (6,5 kpb)

Ce plasmide est dérivé du plasmide pYES2 dans lequel a été inséré l'ADNc codant la GFP (S65T) grâce aux sites de restriction *XbaI* (Blaudez et al., 2003). Il a été utilisé pour localiser les transporteurs par fusion GFP.

II.2.4.3. Plasmides navette Plante-*E. coli*

△ pART7GFP (5,7 kb)

Ce plasmide est dérivé du plasmide pART7 (Gleave, 1992) dans lequel a été inséré l'ADNc codant la GFP (mGFP5) grâce aux sites de restriction *BamHI* (Peiter et al., 2005). Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un multisite de clonage sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Ce plasmide a été utilisé pour les études de localisation cellulaire des transporteurs.

II.3. Méthodes

II.3.1. Techniques de culture de peuplier en laboratoire

II.3.1.1. Culture hydroponique

Différents cultivars de peupliers sont cultivés sur milieu hydroponique (Tableau 28). L'utilisation de culture hydroponique a été revue par Jones en 1997. Dans les systèmes hydroponiques la solution nutritive peut être stationnaire ou circuler continuellement autour des racines. Une variante de ces systèmes est la culture NFT (Nutrient Film Technique) qui implique la circulation de solution nutritive depuis un réservoir autour des racines de peupliers déposés dans des pots. Les racines reposent sur un film de solution nutritive qui peut varier en composition et contenir des métaux lourds en solution. Un des avantages de la NFT est sa rapidité puisqu'un résultat est obtenu après 2 mois.

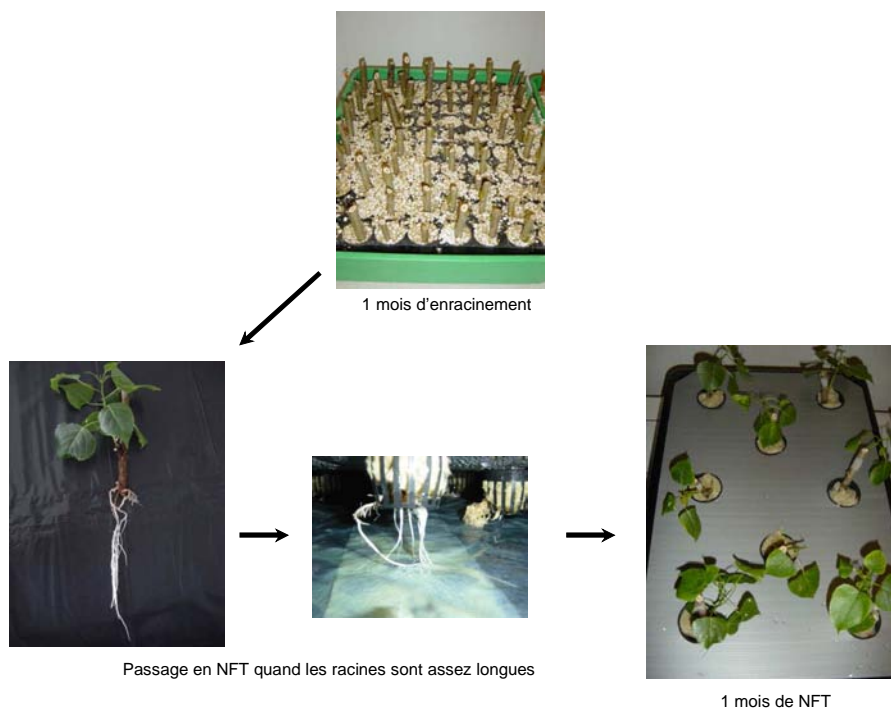


Figure 32: Bouturage des peupliers et passage en culture hydroponique (NFT)

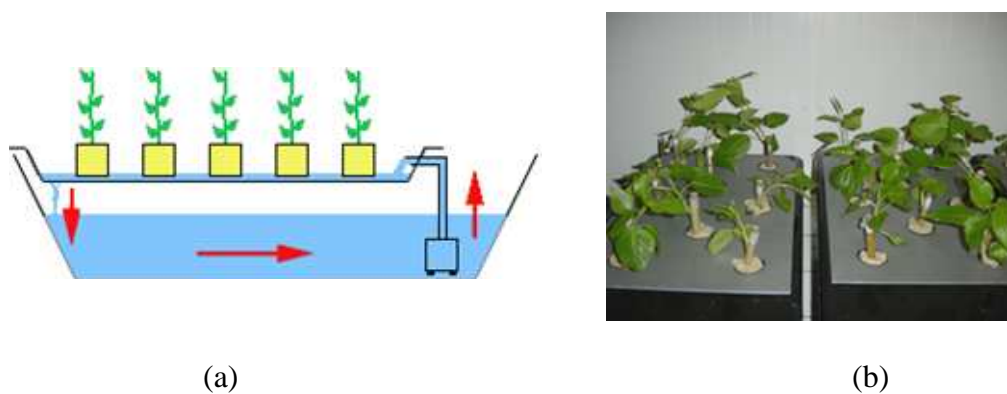


Figure 33: (a) : Système NFT (Nutrient Film Technique) et (b) : Culture du peuplier en bacs de NFT (à gauche un bac témoin, à droite un bac avec métaux).

Dans un premier temps, nous avons étudié des cultivars que nous trouvions à la fois sur des sites témoins et sur les sites A, B et C de Metaleurop à savoir *P. nigra*, *P. deltoïdes* x *P. nigra* (cultivar Ghoy), et *P. trichocarpa* x *P. deltoïdes* (cultivar Beaupré). Dans un deuxième temps, nous avons testé 25 cultivars fournis par le FCBA. Sur ces 25 cultivars, 14 ont été également plantés sur les sites expérimentaux de Pierrelaye et Leforest.

- **Préparation des boutures** (Figure 32)

Des tiges de 15 cm de 25 cultivars de peupliers fournis par le FCBA (Tableau 28) dans le cadre du projet PHYTOPOP sont mises à enraciner par séries de 4 cultivars. Il a tout d'abord fallu tester le substrat sur lequel faire enraciner ces tiges. Il en ressort qu'un mélange constitué de 2/3 de perlite et d'1/3 de vermiculite est bien adapté. Les tiges sont placées dans ce mélange pendant deux semaines en les faisant baigner dans de l'eau distillée. Les deux semaines suivantes nous ajoutons progressivement du milieu nutritif utilisé par la suite en NFT afin de bien acclimater les peupliers.

Nous avons dû également tester l'âge des tiges. Dans ce but nous avons coupé des tiges âgées respectivement de 1, 2, 3, 4 et 5 ans afin de voir quelles étaient les plus propices au bouturage. Les tiges de l'année précédente sont celles qui enracinent le mieux. Au bout d'un mois les racines sont suffisamment développées pour assurer un transfert des peupliers dans les bacs de culture hydroponique.

- **Préparation des bacs de culture hydroponique**

Les bacs de culture sont traités durant 24 heures avec une solution contenant 5% de HNO₃ puis 24 heures avec de l'eau distillée.

- **Système de culture sur film nutritif NFT**

Le système utilisé est le gro-tank GT205i (Figure 33). Ce système comprend un plateau de culture, un réservoir de 20 litres, une pompe microjet MC 320, un tube de distribution d'eau, une plaque de couverture argentée. Ses dimensions sont les suivantes : longueur : 70 cm, largeur : 38,5 cm, hauteur : 18,5 cm. Les boutures de peuplier sont déposées dans des paniers qui permettent de placer les racines au dessus d'un film sur lequel circule constamment la solution nutritive. Pour maintenir les peupliers dans les paniers, ceux-ci sont entourés de blocs de laine de roche. La capacité d'un bac est de 8 peupliers (Figure 33).

Tableau 32: Composition de la solution nutritive de culture hydroponique (pH ajusté à 5,8).

Composés	Concentration
CaCl ₂	0,75 mM
KNO ₃	4,7 mM
NH ₄ NO ₃	5,15 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,375 mM
KH ₂ PO ₄	0,3 mM
MnSO ₄ H ₂ O	100 µM
ZnSO ₄ H ₂ O	30 µM
Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O	1 µM
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,1 µM
CoCl ₂	0,1 µM
FeSO ₄ 7 H ₂ O	100 µM
KI	5 µM
H ₃ BO ₃	100 µM

L'expérience est réalisée dans une chambre de culture d'intensité lumineuse de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et un régime de température jour-nuit de 16 heures à 24°C à 80% d'humidité relative et 8 heures à 18°C et 60% d'humidité relative.

La concentration en minéraux d'une solution nutritive (Tableau 32) est généralement très supérieure à celle rencontrée habituellement dans les sols (Downs & Hellmers, 1975). Un excédent est nécessaire afin de maintenir un apport continu de nutriments au fur et à mesure de leur absorption par les racines.

Le pH est régulièrement contrôlé et ajusté pour éviter un éventuel biais lié au pH et donc à la biodisponibilité des métaux.

De plus, pour les traitements avec métaux sont ajoutés 10 μM de Cd, Cu, Ni et Pb, et 200 μM de Zn. Les solutions stock utilisées sont ZnCl_2 , CdCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 à 1M et $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à 0,05M. Par conséquent nous avons un bac témoin et un bac avec métaux pour chaque cultivar. Le choix de ces concentrations est basé sur les expérimentations de Watson et al. (2003) qui ont été réalisées sur du saule.

Les bacs sont vidés une fois par semaine afin de renouveler les solutions nutritives et métalliques dans le but d'éviter un épuisement des éléments. Nous avons pris soin de noter tout changement morphologique durant l'expérience.

Les peupliers restent ainsi un mois en culture hydroponique avant d'être mesurés, séchés, pesés, broyés et analysés en ICP-AES. Dans chaque cas, nous avons analysé les teneurs en métaux dans les feuilles en prenant soin à chaque fois de ne prendre que des feuilles matures. Tant que faire se peut, nous avons analysé à chaque fois au moins 5 échantillons. Nous avons également conservé les tiges et les racines rincées 15 minutes à l'EDTA 10 mM pour les analyser éventuellement par la suite.

La durée à adopter a également été testée lors d'expériences préliminaires. En effet, les peupliers atteignent une taille satisfaisante au bout de 4 semaines de culture hydroponique. Les boutures seront donc cultivées pendant 2 mois au total.

II.3.1.2. Culture en pots

Des boutures des cultivars Lena et Skado obtenues du FCBA ont été plantées en pots de 2 litres, contenant du sol de Pierrelaye ou Leforest. Préalablement, des échantillons des 2 sols ont été prélevés et analysés afin de mesurer leur teneur initiale en métaux.



Figure 34: Photographie des cultivars Lena et Skado après deux mois de culture en pots.

Après 80 jours de culture, nous avons récolté les feuilles à 3 étages foliaires différents, les tiges, les racines et le sol afin d'analyser leurs teneurs respectives en métaux. Concernant les racines, un traitement de 15 min à l'EDTA 10 mM a été réalisé afin d'éliminer les métaux présents à la surface des racines. De plus, des mesures de croissance (longueur et diamètre des tiges, nombre de feuilles) ont été réalisées ainsi que des mesures de matière fraîche et de matière sèche. Les échantillons ont été séchés à 60°C durant 48 heures.

De ces cultures, des échantillons de cv. Lena ayant poussé sur le sol de Leforest ont été prélevés pour analyser la localisation des métaux en spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS).

De plus, nous avons également planté *Arabidopsis halleri* sur ces 2 sols afin de comparer les teneurs foliaires en métaux d'une plante hyperaccumulatrice à celles du peuplier.

Les cultivars Lena et Skado ont été choisis pour mener une étude sur sol contaminé en laboratoire (Figure 34). Le but était de comparer ces données aux résultats obtenus sur site et en culture hydroponique.

Plusieurs paramètres ont été testés :

- effet cultivar : Lena et Skado
- effet sol : Pierrelaye et Leforest
- conditions hydriques : 750 ml (arrosage non limitant) et 250 ml (arrosage limitant) d'eau par semaine.

Au total cette manipulation a permis de tester 80 peupliers (10 par condition).

• Préparation des peupliers

Le sol pollué provient des sites ateliers de Pierrelaye et Leforest. Le sol a été tamisé (5 mm) afin d'éliminer les nombreux déchets présents notamment dans le sol de Pierrelaye. Le sol a ensuite été longuement mélangé afin de l'homogénéiser. Deux kg de sol ont été pesés avec précision puis mis dans des pots de 2 l avant d'y planter les boutures de peuplier. Nous avons également analysé plusieurs échantillons de sol afin d'en mesurer les teneurs en métaux.

Nous avons utilisé des boutures de Skado et Lena fournies par le FCBA (conservées en chambre froide à leur réception). Celles-ci mesuraient 40-50 cm, nous les avons alors coupées en 2. Les boutures ont été mises à enraciner directement en terre et au bout d'une

semaine les premières feuilles apparaissaient. Nous avons pris soin de ne conserver qu'un bourgeon par tige afin d'avoir des peupliers à une seule branche et surtout homogènes.

Arabidopsis halleri a également mis en culture afin de comparer les teneurs en métaux de l'arabette qui est une plante hyperaccumulatrice aux teneurs du peuplier.

L'expérience est réalisée dans une chambre de culture d'intensité lumineuse de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et un régime de température jour-nuit respectivement de 16 heures à 24°C à 80% d'humidité relative et 8 heures à 18°C et 60% d'humidité relative.

- **Déroulement de l'expérience**

Durant 8 semaines les peupliers sont arrosés soit 1 fois par semaine avec 250 ml d'eau (« arrosage limitant ») soit 3 fois par semaine avec 250 ml d'eau (« arrosage non limitant ») afin de tester deux conditions hydriques. A la fin de l'expérience, les peupliers sont déterrés, leurs racines sont rincées durant 15 minutes dans une solution contenant 10 mM d'EDTA. Les longueurs des tiges et des racines sont mesurées. Nous avons également compté le nombre de feuilles pour chaque plant. Ensuite les masses fraîches des feuilles, des tiges et des racines sont mesurées. Les peupliers sont séchés durant 48 h à 60°C avant d'en mesurer les masses sèches. Par la suite, les feuilles, tiges et racines sont broyées dans le but d'utiliser 100 à 200 mg pour la quantification des métaux par ICP-AES. En ce qui concerne le sol, il est tamisé (2 mm) après avoir été séché.

II.2.2. Techniques d'analyse des sols

Nous avons analysé les caractéristiques physico-chimiques des sols des sites A, B et C de Métaleurop. Les analyses des sols de Pierrelaye et Leforest ont été effectuées par D. Baize (un partenaire du projet PHYTOPOP) et par le Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras pour les autres échantillons récoltés à Métaleurop, à Micheville et sur les sites témoins.

II.3.2.1. Granulométrie

L'analyse granulométrique a été réalisée selon la norme française X 31-107 par la dispersion des particules minérales après destruction de la matière organique par le peroxyde

d'hydrogène et la séparation des particules en différentes classes par sédimentation pour les particules $<50 \mu\text{m}$ et tamisage pour les particules $>50 \mu\text{m}$ (Gee & Bauder, 1986).

La méthode permet de distinguer cinq fractions :

- argile ($<2 \mu\text{m}$)
- limons fins ($2-20 \mu\text{m}$)
- limons grossiers ($20-50 \mu\text{m}$)
- sables fins ($50-200 \mu\text{m}$)
- sables grossiers ($200-2000 \mu\text{m}$)

II.3.2.2. Carbone organique et azote total

Les analyses du carbone organique et de l'azote total ont été réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras selon la norme française ISO 10694 et ISO 13878. Les échantillons sont incubés à 1000°C en présence d'oxygène. Après séparation chromatographique, la quantité de gaz carbonique (CO_2) et d'azote moléculaire (N_2) formées sont quantifiées au moyen d'un catharomètre.

II.3.2.3. Capacité d'échange cationique (CEC) méthode Metson

L'analyse de la CEC a été réalisée selon la norme française X 31-130 après percolation d'une solution d'acétate d'ammonium à 1M et à pH 7 (Lefèvre, 1961).

II.3.2.4. Détermination du pH

Les échantillons de sol (environ 50 g) fraîchement récoltés sont séchés puis mis à agiter à 150 trs min^{-1} pendant 20 heures en présence de 50 ml d'eau distillée. Les solutions sont récoltées et centrifugées à 10000 g pendant 15 minutes puis le pH est déterminé.

II.3.2.5. Détermination de la fraction des éléments échangeables du sol

La fraction des éléments échangeables d'échantillons de sol a été recueillie après extraction au chlorure de calcium (Menziès et al., 2007). Dix grammes de sol sec (séché à

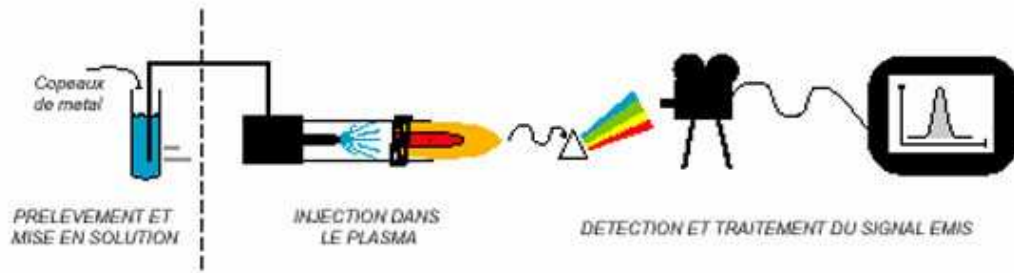


Figure 35: Schéma de principe de l'ICP-AES.

35°C) sont mis à agiter (150 trs min⁻¹) pendant 2 heures à 20°C en présence de 100 ml d'une solution de chlorure de calcium à 0,01M (Houba et al., 2000). Le mélange est alors filtré sur filtre sans cendres (Rotilabo®-Rundfilter, qualitativ, Roth, Allemagne) et le filtrat est dilué, puis acidifié en ajoutant 1 ml d'acide nitrique pour 50 ml de filtrat. Les témoins constitués d'eau ultrapure et du même volume d'acide nitrique ont également été réalisés.

II.3.3. Analyse des teneurs en métaux dans les tissus végétaux et le sol par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)

Cette méthode est basée sur le principe que le plasma d'argon échange son énergie avec les atomes présents dans la solution. En retournant à un état moins énergétique ces atomes émettent des radiations de longueur d'onde caractéristique de l'élément dosé (Figure 35). La spectrométrie d'émission plasma permet de doser en routine la plupart des éléments à des concentrations de l'ordre de 1 µg l⁻¹, soit de l'ordre de la partie par milliard en masse (ou ppb, part per billion). Les analyses en ICP-AES ont été réalisées par P. Richaud au CEA de Cadarache.

Une analyse nécessite 100 à 200 mg de matière sèche, que ce soit pour des échantillons de feuilles, de tiges, de racines ou encore de sol.

Les échantillons de 100 à 200 mg de matière sèche sont minéralisés avec 5 ml de HNO₃ à 70% dans un micro-ondes. Après dilution à une concentration finale de 3,5 % de HNO₃, la teneur en éléments métalliques est déterminée par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (Vista MPX, Varian).

Le contrôle de la qualité est basé sur l'utilisation de contrôles internes et de solutions étalons certifiées (Astasol-Mix, Analytica Ltd, Prague, République Tchèque) qui permettent d'établir des courbes étalons sur la gamme entière pour chaque élément.



Figure 36: Microscope électronique à balayage à pression variable (INRA, Champenoux).



Figure 37: Spectromètre de masse à ionisation secondaire, IMS-LAM (CRPGL, Belvaux, Luxembourg).

II.3.4. Techniques d'analyse de la localisation tissulaire des éléments métalliques

II.3.4.1. Microscope électronique à Balayage (MEB)

Nous avons utilisé le microscope électronique à balayage de l'INRA de Champenoux (Figure 36) pour tenter de localiser les métaux dans les feuilles et tiges de peuplier cv. Beaupré prélevé sur le site de Métaleurop. En effet, le MEB à pression variable permet d'observer l'anatomie de tout type d'échantillon sans aucune préparation préalable c'est-à-dire sans y déposer une couche conductrice (qui est une étape essentielle de préparation des échantillons dans le cas des MEB classiques à vide très poussé) ce qui permet d'examiner une vaste gamme d'échantillons. Ce MEB à pression variable est équipé d'un système de cryo-transfert (-180°C), d'une platine à effet Peltier (-50°C) et d'un système de microanalyse X des éléments minéraux à dispersion d'énergie.

Les échantillons prélevés sur le site de Métaleurop sont congelés instantanément à l'azote liquide et conservés à -80°C avant d'être analysés.

II.3.4.2. Spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS)

Nous avons également analysé des feuilles de peuplier de cv. Lena cultivés en pots durant 2 mois sur du sol de Leforest (traitement avec métaux) et sur sol non contaminé (témoin) en spectrométrie de masse à ionisation secondaire au CRP-GL (Centre de Recherche Public- Gabriel Lippmann) situé à Belvaux, Luxembourg (IMS-LAM).

- **Préparation des échantillons à l'aide d'un automate de cryo-substitution (Leica AFS)**

Les échantillons de feuilles de peuplier de cv. Lena ont tout d'abord subi une étape de congélation ultra-rapide (refroidissement de 30000 °C par seconde) à l'azote liquide ce qui permet de les observer dans leur état quasi natif. L'application d'une pression élevée à l'instant précis de la congélation favorise la congélation de l'eau sous une forme non destructrice (glace amorphe), jusqu'à une profondeur relativement élevée (150 µm). L'eau congelée est ensuite substituée par de l'éthanol au cours d'une étape de cryosubstitution débutant à -90°C. Ensuite, il y a une remontée progressive en température pour passer ainsi de la température de l'azote liquide à la température ambiante permettant ainsi à l'éthanol de s'évaporer.

Les méats laissés par l'évaporation de l'alcool sont comblés par de la résine époxy. Des coupes de 1 micron d'épaisseur sont ensuite réalisées avec un ultra-microtome.

- **Analyse des échantillons de feuilles avec l'IMS-LAM**

Les analyses ont été réalisées en mode de détection des ions secondaires positifs en utilisant un bombardement focalisé d'ions gallium. Un film d'or de 10 nm a été déposé sur tous les échantillons.

Les éléments ont été analysés sous forme d'ions M^+ . Les éléments étudiés sont ^{23}Na , ^{39}K , ^{40}Ca , ^{64}Zn et ^{114}Cd . Les images obtenues en Ca, Na et K permettent de visualiser les cellules. Les images du Zn et du Cd ont été obtenues par accumulation de plusieurs plans. Ceci permet de détecter des traces plus facilement. Par contre cela dégrade sensiblement la qualité des images qui apparaissent alors un peu floues.

II.3.5. Techniques d'extraction et d'analyse des acides nucléiques

II.3.5.1. Extraction des acides nucléiques

- **Extraction de l'ADN plasmidique d'*E.coli***

La préparation de l'ADN plasmidique est réalisée à partir du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Biorad) à partir de 5 ml de culture bactérienne en milieu LB en fin de phase exponentielle de croissance. Le volume final d'ADN est de 100 μl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 600 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8 % où il doit apparaître sous forme de trois bandes correspondant aux trois formes d'enroulement du plasmide.

- **Extraction de l'ADN génomique de Peuplier**

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit « DNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen) à partir de 100 mg de tissu congelé selon les recommandations du fournisseur. Le volume final est de 200 μl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 200 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. La qualité est contrôlée sur gel d'agarose à 0,8% où il doit apparaître sous forme d'une bande large, de taille comprise entre 20 et 25 kb.

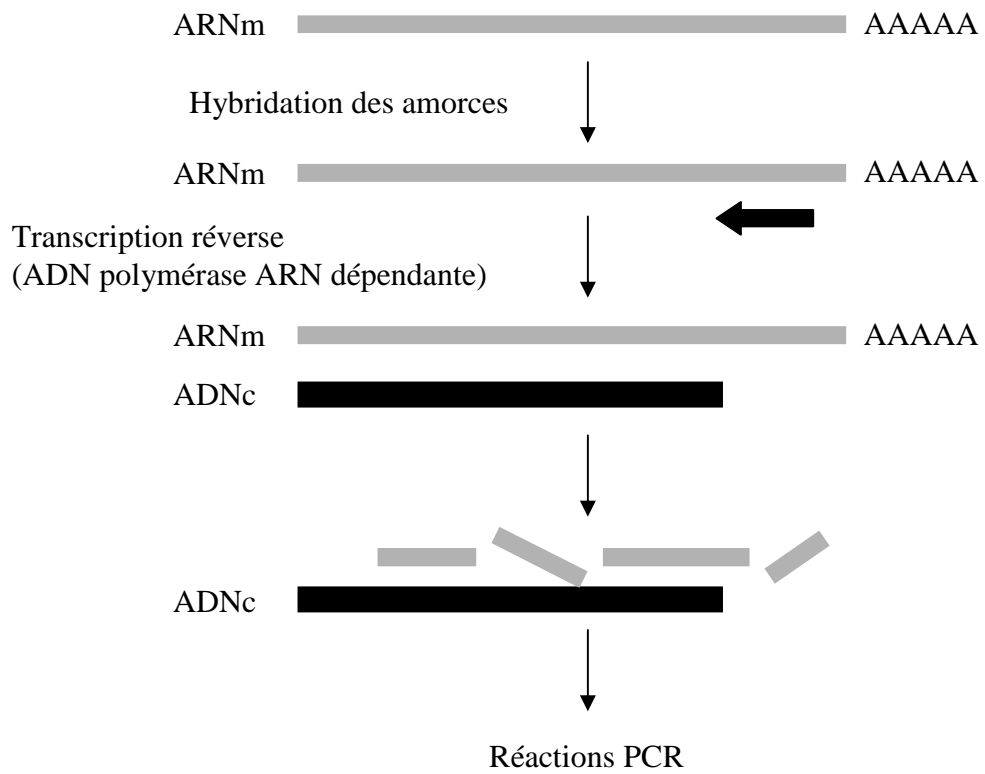


Figure 38: Synthèse du premier brin d'ADNc par l'enzyme Reverse Transcriptase.

- **Extraction des ARN totaux**

L'extraction est réalisée avec le RNeasy plant minikit (Qiagen) sur environ 100 mg de feuilles, tiges ou racines congelées à l'azote liquide dès leur récolte puis conservées à -80°C . Le matériel végétal est broyé dans un broyeur (modèle MM 300 Retsch, Qiagen) à l'aide de billes de tungstène et repris dans 450 μl d'un tampon contenant de l'isothiocyanate de guanidine ou de l'hypochlorure de guanidine, du β -mercaptoéthanol (10 $\mu\text{l ml}^{-1}$) et additionné de polyéthylène glycol (PEG 6000 à 20 mg ml^{-1}) pour les tissus à teneur élevée en métabolites secondaires. Une première centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires. Une deuxième centrifugation permet de fixer les ARNs sur la matrice d'une colonne. De plus afin d'éliminer les éventuelles traces d'ADN génomique, qui parasiteraient les réactions PCR, les échantillons sont soumis à un traitement à la DNase I (Rnase free) (Qiagen) en accord avec le protocole. Lors de la dernière étape les ARNs sont élués avec 50 μl d'eau ultrapure stérile traitée au Diéthyl Pyrocarbonate (DEPC).

L'étape suivante est la mesure de la concentration des ARN. La quantité des ARN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Bio Photometer (Eppendorf) à 260 nm. Le blanc est réalisé avec de l'eau DEPC (50 μL). Une dilution au 50^{ème} permet de mesurer l'absorbance et de déterminer la concentration en ARN (1 unité de DO à 260 nm correspond à 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ d'ARN). Cette mesure de concentration sera déterminante pour la Reverse Transcriptase (RT) réalisée par la suite.

La qualité des ARNs totaux est contrôlée sur gel d'agarose à 1% où les ARNr 25S et 18S apparaissent comme deux bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 25S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 18S. Les échantillons sont ensuite conservés dans le congélateur à -80°C .

II.3.5.2. Transcription Reverse (RT)

Pour les analyses par RT-PCR 0,6 à 1 μg d'ARN sont convertis en ADNc en utilisant le kit cMaster™ RT_{plus} PCR System et cMaster™Rt Kit (Eppendorf) grâce à l'action d'une enzyme multifonctionnelle, la reverse transcriptase, qui possède trois activités distinctes : ADN polymérase ARN dépendante, exoribonucléase hybride dépendante et ADN polymérase ADN dépendante et qui agit à 42°C pendant 90 minutes (Figure 38).

Tableau 33: Exemple de programme PCR.

Étapes	Température	Durée
	PCR de n cycles	
Dénaturation	94°C	30s
Hybridation	58°C	45s
Elongation	72°C	1min 50s

Tableau 34: Conditions optimales d'utilisation des gènes transporteurs de métaux en PCR. Nous pouvons constater que les quantités d'ADNc, les Tm ainsi que le nombre de cycles varient entre les différents transporteurs étudiés.

N° transporteur	quantité (µl)	Tm	Nombre de cycles
PtMTP 1	1	58	35
PtMTP 2	2	58	35
PtMTP 3.1	1	58	35
PtMTP 3.2	1	58	35
PtMTP 4	2	57	35
PtMTP 5	1	58	35
PtMTP 8.1	1	57	37
PtMTP 8.2	1	53	38
PtMTP 8.3	2	58	35
PtMTP 9	1	58	35
PtMTP 11.1	2	58	35
PtMTP 11.2	2	58	35
PtMTP 12	1	58	30
UBQ	0,5	53-58	28

Tableau 35: Exemple de composition d'un mélange pour la PCR

Composition	Volume en µl	
Tampon 10X (Sigma)	2,5	
dNTP 10mM	0,5	
5x primer mix	5	<u>5x primer mix :</u>
ADNc	1	0,75µl de F (Forward) 10µM
Taq polymérase 5U/µl (Sigma)	0,1	0,75µl de R (Reverse) 10µM
Eau stérile	15,9	3,50µl d'eau stérile
Volume total	25	

Pour la rétrotranscription *in vitro*, les deux premières activités de l'enzyme sont utilisées pour générer un ADNc simple brin. Pour un volume réactionnel de 20 µl, sont ajoutés 2 µl d'oligodT15 (10 µM), 2 µl de dNTP (5 mM), 2 µl de tampon 10X et 1 µl de reverse transcriptase (4U µl⁻¹).

II.3.5.3 Mesure de taux de transcrits par Reverse Transcriptase et Réaction en Chaîne par Polymérase (RT-PCR)

La technique PCR utilisée est celle décrite par Saiki et al., (1985). Elle repose sur la capacité de synthèse d'un fragment d'ADN déterminé *in vitro* à l'aide d'une polymérase thermostable : la Taq polymérase. Pour catalyser cette synthèse, cette enzyme a besoin d'une amorce : un fragment oligonucléotidique complémentaire à une région de l'ADN à amplifier. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : une dénaturation thermique des brins d'ADN matriciel, une hybridation des amorces à leur séquence cible et une élongation à partir des amorces par l'action de la Taq polymérase (Tableau 33).

- **Les amorces nucléotidiques**

La spécificité de la réaction PCR repose sur la spécificité d'hybridation entre les amorces oligonucléotidiques et leur séquence cible sur l'ADN matriciel. Pour cela différents critères ont été définis dans le choix des amorces : une longueur minimale en dessous de laquelle l'hybridation n'est plus fiable (20 nucléotides) ; une absence de complémentarité entre les amorces ; un T_m théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les 2 amorces. Le T_m est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle les deux brins d'ADN sont associés par 50% de leurs séquences complémentaires. La formule permettant de calculer la valeur du T_m est la suivante : $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. Chaque couple d'amorces utilisé pour l'amplification de chaque gène est testé préalablement sur l'ensemble des gènes appartenant à la même famille afin de s'assurer de la bonne spécificité des amorces utilisées (Tableau 34).

- **Composition d'un mélange amplifié par PCR**

La composition de l'essai pour un volume réactionnel de 25 µl est la suivante (Tableau 35): 5 à 25 ng d'ADN cible sont mis au contact de 0,2 µM de chaque amorce nucléotidique et de 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dNTPs). La composition du tampon de réaction est : Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 ; KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM ; gélatine 0,01%

lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) fournie par Sigma et est additionnée à raison de 1 U. La composition du tampon de réaction est : Tris-HCl 20 mM, pH 8,8 ; KCl 10 mM, MgSO₄ 2 mM ; 10 mM (NH₄)₂SO₄ ; TritonX-100 0,1% lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* fournie par New England BioLabs et est additionnée à raison de 1 U.

Dans les cas où les produits de PCR serviront de matrice aux réactions de séquençage, ou bien seront clonés dans des vecteurs d'expression, l'«Advantage 2 Polymerase Mix », l'Herculase II ou la *Pfu* polymérase seront préférées à l'ADN polymérase fournie par Sigma.

L'«Advantage 2 Polymerase Mix » est un mélange de deux ADN polymérases commercialisées par Clontech qui permet d'amplifier de longs fragments d'ADN avec une grande fidélité. Elle est fournie en solution concentrée 50 fois et fonctionne dans son tampon de réaction dont la composition est la suivante : Tricine-KOH 40 mM, pH 8,7 ; KOAc 15 mM ; Mg(OAc)₂ 3,5 mM ; BSA 3,75 µg/ml ; Tween-20 0,005% ; Nonidet-P40 0,005%.

La *Pfu* ADN polymérase (Promega) est une enzyme thermostable avec une grande fidélité de synthèse, isolée à partir de *Pyrococcus furiosus* DSM3638 (Lundberg et al., 1991). La composition de son tampon de réaction est la suivante : Tris-HCl 20 mM, pH 8,8 ; KCl 10 mM ; (NH₄)₂SO₄ 10 mM ; MgSO₄ 2 mM ; BSA nuclease-free 0,1 mg/ml ; Triton®X-100 0,1%.

L'Herculase® II Fusion Enzyme (Stratagene) est une enzyme thermostable avec une grande fidélité de synthèse (comme la *Pfu*) isolée de *Pyrococcus furiosus*.

- **Conditions d'amplification**

L'amplification est réalisée dans un appareil automatisé (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Les conditions de dénaturation sont de 3 min à 94°C pour le premier cycle et de 30 sec pour les cycles suivants. Les conditions d'hybridation sont de 45 sec à des températures comprises entre 54 et 60°C, cette valeur étant fonction des T_m de chaque amorce. Les conditions d'élongation sont de 1 à 2 min 30 sec à 72°C, cette valeur étant fonction de la longueur du fragment d'ADN à amplifier. Le mélange est soumis à un nombre de cycles d'amplification variant de 28 à 38 dans les conditions décrites puis un dernier cycle d'élongation de 6 à 10 min (Tableau 33). En effet en PCR il est important de ne pas entrer dans le domaine de saturation et donc il faut un nombre de cycles d'amplification qui varie selon les gènes. Il est nécessaire d'utiliser un contrôle, c'est pourquoi un fragment d'ADNc d'un gène codant une ubiquitine est simultanément amplifié, ce gène étant supposé avoir une expression constante.

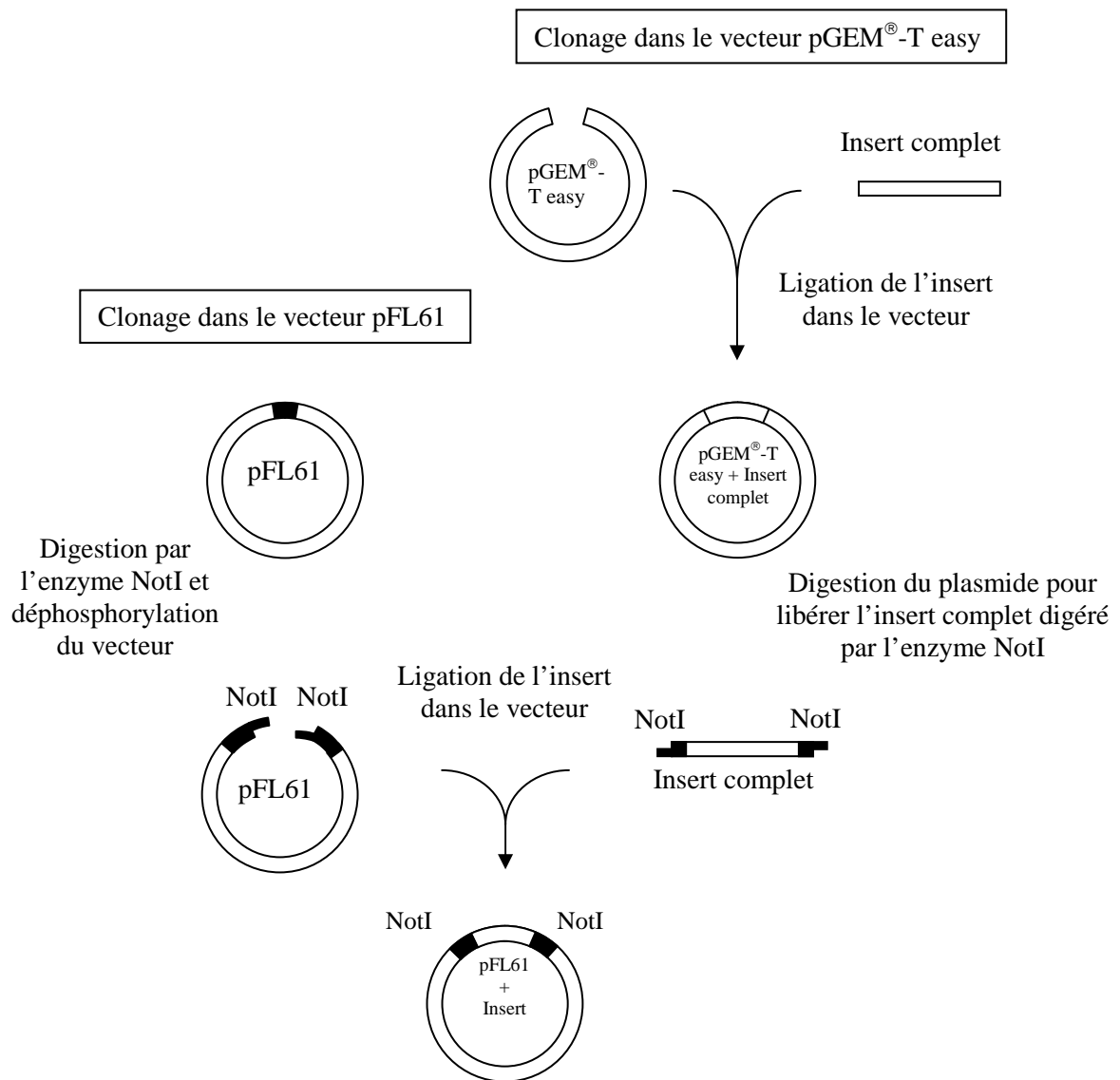


Figure 39: Clonage dans les vecteurs pGEM[®]-T easy et pFL61.

- **Séquençage de l'ADN**

Pour l'obtention de séquences d'ADN de grande taille (>1kb), les échantillons ont été séquencés par le programme « Eco Read Fast » de la société Genome Express (France).

II.3.5.4 Techniques de clonage

II.3.5.4.1. Préparation du vecteur

Le plasmide pGEM[®]-T easy utilisé pour le clonage des fragments PCR est fourni dans le kit « pGEM[®]-T easy Vector Systems » (Promega) prêt à l'emploi. Concernant les autres vecteurs pFL61, pYES2, pYES2GFP, pART7GFP, pART27, ceux-ci sont linéarisés par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) puis déphosphorylés afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même.

Clonage dans les vecteurs pFL61

Trois à quatre µg de plasmide pGEM[®]-T easy portant les fragments d'ADNc d'intérêt sont digérés par l'enzyme de restriction NotI afin de libérer des fragments d'ADNc bordés de chaque côté par le site NotI (Figure 39). Ces fragments sont purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit « GFX[™] PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech), seront ensuite ligués dans le vecteur pFL61 digéré par la même enzyme de restriction NotI.

Le vecteur digéré est ensuite déphosphorylé par hydrolyse des groupements phosphate situés à ses extrémités 5' protubérantes à l'aide d'une phosphatase alcaline (Calf Intestine alkaline Phosphatase (Promega)). Cette étape est nécessaire afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même. Le plasmide ainsi traité est isolé par électrophorèse en gel d'agarose et purifié à l'aide du kit « GFX[™] PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech).

Les ADNc pleine longueur digérés sont clonés dans le vecteur pFL61 ouvert et déphosphorylé selon un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. Le mélange de ligation ainsi obtenu est utilisé pour transformer des bactéries compétentes d'*E. coli* souche DH5αF'. Les transformants positifs, vérifiés par PCR, sont alors sélectionnés et les plasmides bactériens sont extraits à l'aide du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Bio-Rad), selon le protocole proposé par le fournisseur.

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysé(s) par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s). L'étape de ligation s'effectue selon un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. Le mélange de ligation ainsi obtenu est utilisé pour transformer des bactéries compétentes d'*E. coli* souche DH5 α F'. Les transformants positifs, vérifiés par PCR, sont alors sélectionnés et les plasmides bactériens sont extraits à l'aide du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Bio-Rad), selon le protocole proposé par le fournisseur.

II.3.5.4.2. Préparation du fragment à cloner

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans le vecteur pGEM[®]-T easy, sont purifiés après séparation sur gel d'agarose, à l'aide du kit « GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech).

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs autres que pGEM[®]-T easy sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysés par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s).

II.3.5.4.3. Ligation

Les ligations sont généralement effectuées avec un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. La quantité d'insert requis est alors calculée à partir de la formule suivante :

$$\frac{(\text{ng de vecteur}) \times (\text{taille de l'insert})}{\text{taille du vecteur}} \times \frac{\text{mole d'insert}}{\text{mole de vecteur}} = \text{ng d'insert}$$

Cette étape de ligation se déroule pendant une nuit à 4°C dans un volume final de 10 μ l contenant 10 à 50 ng de vecteur, 20 à 100 ng de fragment à cloner, 1 unité de T₄ ADN ligase dans le tampon de réaction préconisé par le fournisseur (Fermentas).

II.3.5.4.4. Transformation des bactéries

- **Préparation de bactéries chimio-compétentes**

Les bactéries sont cultivées dans 5 ml de milieu LB à 37°C pendant 24 h. Une partie de cette préculture (50 μ l) est utilisée pour ensemercer 100 ml de milieu SOB (Tableau 29).

Tableau 36: Composition du tampon TB (500 ml) pour la transformation chimique des bactéries.

Composés	Quantité
HEPES	1,19 g
CaCl ₂	1,1 g
KCl	9,32 g
Ajuster le pH à 6,7 avec KOH	
MnCl ₂	5,44 g

La solution est stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore) pré-rincé à l'eau distillée.

Les bactéries sont cultivées sous forte agitation à une température comprise entre 18 et 20°C jusqu'à une DO à 600 nm de 0,6 (phase exponentielle de croissance). La culture est alors refroidie dans la glace et centrifugée à 3000 rpm à 4°C pendant 10 min. Les cellules sont lavées dans du tampon TB froid (Tableau 36), refroidies, puis centrifugées à 3000 rpm à 4°C pendant 10 min avant d'être remises en suspension dans 8 ml de tampon TB auquel on ajoute du DMSO pour une concentration finale de 7%. Après refroidissement, cette suspension bactérienne est répartie par fractions de 50 µl qui sont ensuite congelées immédiatement par immersion dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

- **Transformation des cellules compétentes**

5 µl de mélange de ligation sont ajoutés à 50 µl de bactéries compétentes, le tout étant placé dans la glace pendant 30 min. Ensuite les tubes sont placés dans un bain-marie à 42°C pendant 30 à 45 secondes. Immédiatement après ce choc thermique, 400 µl de milieu LB ou SOC (Tableau 29) sont ajoutés dans les tubes et l'ensemble est placé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Le mélange de transformation est ensuite étalé sur boîtes de LB agar en présence de l'antibiotique adéquate pour sélectionner les bactéries ayant intégré des plasmides. Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes.

II.3.6. Expression hétérologue dans *S.cerevisiae*

II.3.6.1. Transformation de *S. cerevisiae*

La transformation des cellules de levure par des plasmides d'expression est réalisée d'après la technique de Gietz et al. (1992) après traitement des cellules à l'acétate de lithium (AcLi) (Ito et al., 1983).

- **Préparation des cellules**

Une culture de levures (50 ml) en milieu riche YPD (Tableau 31) à DO 0,6 est centrifugée 5 min à 4000 rpm afin de récolter les cellules. Elles sont ensuite lavées deux fois dans 1 ml d'eau stérile. Les cellules sont ensuite lavées dans 1 ml d'un tampon TE (0,01 M Tris-base ; EDTA 0,001 M ; pH 7,5) / AcLi (0,1 M ; pH 7,5) puis reprises dans 0,5 ml du même tampon. Les cellules sont alors compétentes.

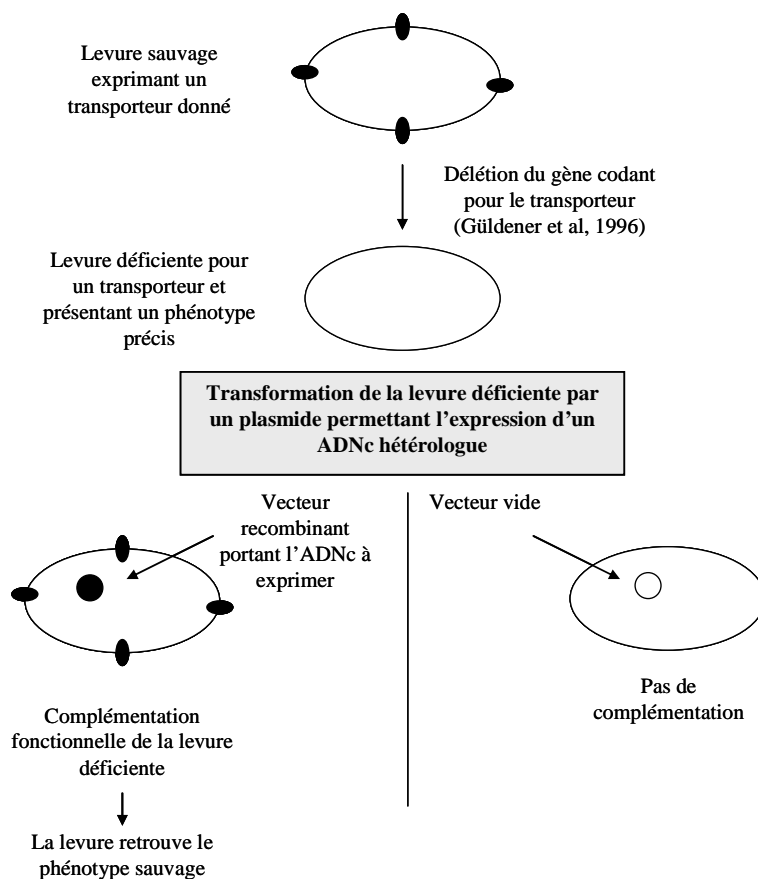


Figure 40: Principe de la complémentation fonctionnelle de levures déficientes.

Tableau 37:Composition du milieu de culture SD-URA de sélection des transformants des souches de levure

Composés	Concentration
YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma)	1,7 g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g l ⁻¹
Yeast synthetic drop-out Supplement without uracil (Sigma)	1,92 g l ⁻¹
Glucose	20,0 g l ⁻¹
Ajuster pH à 5,8	
Agar	20,0 g l ⁻¹

Souches	Sensibilité aux métaux testée sur boîtes SD
BY4741	Souche contrôle sauvage
<i>zrc1Δ</i>	15 mM Zn
<i>cot1Δ</i>	15 mM Zn et 2 mM Co
<i>ycf1Δ</i>	0,075 mM Cd
<i>pmr1Δ</i>	2 mM Mn
<i>smf1Δ</i>	1,5 mM Ni
<i>cup2Δ</i>	0,15 mM Cu

- **Transformation**

A 50 µl de cellules sont ajoutés, 5 µl d'ADN 'carrier' de sperme de saumon soniqué (10 mg/ml), 1 µg d'ADN à transformer (vecteur contenant l'insert correspondant à un transporteur ou vecteur vide) et 300 µl d'une solution PEG 4000 40% / TE / AcLi. Le mélange est incubé 30 min à 30°C sous agitation puis un choc thermique est réalisé pendant 15 min à 42°C. Les cellules sont rapidement lavées dans 1 ml d'eau stérile et étalées sur milieu de sélection gélosé -URA de la souche utilisée. Les clones positifs apparaissent après quelques jours à 30°C. Un témoin (sans ADN) est réalisé et nous permet de nous assurer de la spécificité de la transformation.

II.3.6.2. Tests de complémentation

Le principe de la complémentation fonctionnelle de levure déficiente par un plasmide permettant l'expression d'un ADNc hétérologue est décrit sur la Figure 40.

Les levures ainsi transformées par nos différents gènes d'intérêts ont été cultivées pendant 3 à 5 jours sur des milieux contenant différents métaux (Tableau 37). Sur chaque boîte, la souche sauvage BY4741 transformée par le vecteur vide est utilisée comme témoin positif alors que la souche délétée transformée également par le vecteur vide sert de témoin négatif. Les sources proviennent de chez EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>). Nous avons testé pour chaque transformation de *S. cerevisiae* des souches sensibles au Zn (*zrc1Δ* et *cot1Δ*), au Cd (*ycf1Δ*), au Mn (*pmr1Δ* et *smf1Δ*), au Cu (*cup2Δ*) et au Co (*cot1Δ*).

Nous ne donnons ici que les détails les plus importants pour chaque transporteur de métal. Les protéines ZRC1 et COT1 chez *S. cerevisiae* sont localisées sur la membrane de la vacuole et participent au stockage des ions Zn et Co respectivement (Li & Kaplan, 1998 ; MacDiarmid et al., 2000, 2002 ; Miyabe et al., 2001). YCF1 est localisée sur la membrane vacuolaire et participe à la détoxification du Cd (Li et al., 1997) et du Hg (Gueldry et al., 2003). PMR1 est située sur la membrane de l'appareil de Golgi (Culotta et al., 2005) ; SMF1 est localisé sur la membrane plasmique (Portnoy et al., 2002), ils sont tous deux responsables du transport du Mn. CUP2 est localisé au niveau du noyau et participe à l'homéostasie du Cu (Buchman et al., 1989).

Tableau 38: Composition du tampon de plasmolyse.

Composés	Concentration
Mannitol	500 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM
MES-KOH pH 5,6	10 mM

Tableau 39: Composition de la solution enzymatique.

Composés	Concentration
Cellulysine	1%
Macerase	0,3%
Mannitol	400 mM
KCl	20 mM
MES-KOH pH 5,6	20 mM
Incuber 10 min à 55°C pour inactiver les protéases et augmenter la solubilité des enzymes. Refroidir la solution à température ambiante.	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM
BSA	0,1%
Filtrer (0,45 µm) dans une boîte de Pétri	

Tableau 40: Composition de la solution W5

Composés	Concentration
CaCl ₂ , 2H ₂ O	125 mM
NaCl	154 mM
MES-KOH pH 5,6	2 mM
Glucose	5 mM
KCl	5 mM

II.3.7. Localisation de transporteurs par fusion GFP par expression dans un système hétérologue

Pour obtenir des informations concernant la localisation intra-cellulaire du transporteur PtMTP9 nous avons cloné le transporteur dans le vecteur pYES2 en fusion avec le GFP. Des cellules isolées de levure (souche *pmr1Δ*) poussant sur milieu liquide SD-Galactose sont déposées (lorsque leur DO à 600 nm est de 0,6 à 1) sur une lame de microscopie. Elles sont ensuite observées sur un microscope droit Nikon Optiphot-2 (Nikon). La Green Fluorescence Protein (GFP) est excitée à l'aide d'un filtre transmettant de 450 à 490 nm et l'émission de la fluorescence GFP est recueillie après passage à travers un filtre laissant passer toutes les longueurs d'ondes supérieures à 510 nm. Les images sont acquises et numérisées avec un appareil photo numérique (Nikon) fixé sur le microscope et piloté par le logiciel Nikon Capture Version 3.0.

II.3.8. Expression transitoire des fusions protéines-GFP chez *A. thaliana*

II.3.8.1. Préparation des protoplastes

Les protoplastes utilisés pour l'expression transitoire de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP sont préparés à partir de feuilles bien développées de plants d'*A. thaliana* âgés de 3 à 4 semaines.

Six à huit feuilles sont coupées en morceaux très fins de 0,5 à 1 mm, en présence de tampon de plasmolyse (Tableau 38). Les tissus ainsi obtenus sont ensuite transférés dans la solution enzymatique (Tableau 39) contenant les différentes enzymes qui vont dégrader les parois cellulaires. Le tout est placé sous vide pendant 5 min afin que la solution enzymatique pénètre bien dans l'ensemble des tissus. Les tissus ainsi infiltrés sont placés à l'obscurité à 23°C pendant 3 heures.

La solution obtenue est ensuite filtrée à travers une maille de nylon afin d'éliminer les débris cellulaires et de ne garder que les protoplastes.

4,5 ml de CaCl₂ à 200 mM sont ajoutés à la suspension de protoplastes. Les protoplastes sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 700 rpm puis repris à froid dans 10 ml de solution W5 (Tableau 40).

Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une chambre de Neubauer. L'intégrité des cellules est également vérifiée. Les protoplastes sont à nouveau centrifugés pendant 1 min

Tableau 41:Composition de la solution MaMg.

Composés	Concentration
Mannitol	400 mM
MgCl ₂ , 7H ₂ O	15 mM
MES-KOH pH 5,6	5 mM

Tableau 42:Composition de la solution PEG-CMS.

Composés	Quantité
PEG 4000	1 g
Mannitol 1 M	500 µl
Ca(NO ₃) ₂	250 µl
H ₂ O	875 µl

Tableau 43:Composition du milieu de culture des protoplastes.

Composés	Concentration
MS salts + vitamins (Sigma M0404)	4,4g l ⁻¹
Mannitol	350 mM
Glucose	50 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	3 mM
Ajuster le pH à 5,8 avec 30 µl KOH 1M	
Chloramphenicol	1 mg l ⁻¹
Filtrer (0,22 µm)	

à 700 rpm et repris à froid avec la solution W5 de façon à obtenir une concentration de l'ordre de $1,5 \cdot 10^5$ cellules ml^{-1} . La suspension cellulaire est alors refroidie pendant 30 min à l'obscurité avant d'être centrifugée pendant 1 min à 700 rpm. Les protoplastes sont alors resuspendus dans une solution MaMg (Tableau 41) de manière à obtenir une concentration de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ cellules ml^{-1} .

II.3.8.2. Transformation des protoplastes

100 μl de la suspension de protoplastes, c'est-à-dire environ $5 \cdot 10^4$ cellules ml^{-1} sont mis en présence de 10 μl d'ADN (vecteur pART7GFP portant l'ADNc sans codon STOP du gène d'intérêt fusionné au gène codant pour la GFP), correspondant environ à une quantité totale d'ADN de 10 à 15 μg . 110 μl de solution PEG-CMS (Tableau 42) sont ensuite ajoutés, l'ensemble est placé à l'obscurité, à 23°C pendant 30 min.

Des volumes croissants (0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml et 2 ml) de solution W5 sont progressivement ajoutés sur une période de 20 min. Les protoplastes sont de nouveau centrifugés pendant 2 min à 700 rpm, lavés avec 3 ml de milieu de culture avant d'être resuspendus au final dans 0,5 ml de milieu de culture de protoplastes (Tableau 43). Les protoplastes sont déposés dans des plaques de culture cellulaire dont les puits ont été préalablement traités au sérum afin d'éviter toute agrégation des protoplastes. Le tout est incubé toute une nuit, à l'obscurité et à 23°C. La fluorescence produite par la GFP est visualisée après 16 à 24 h d'incubation.

II.3.9. Analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques réalisées tout au long du travail présenté dans ce manuscrit ont principalement portées sur l'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques des gènes d'intérêt. Pour ce travail, différents programmes informatiques ont été utilisés et la plupart de ces programmes est hébergée sur les serveurs (<http://www.infobiogen.fr> et <http://www.expasy.org/tools>). Les comparaisons de séquences protéiques et nucléotidiques ont été réalisées à l'aide de l'algorithme BLAST (Basic Alignment Search Tool) version 2.0 (Altschul et al., 1994 ; Altschul et al., 1997). Le programme utilisé (blastx) compare les produits de la traduction de la séquence étudiée dans les six phases de lecture possible avec les séquences présentes dans les bases de données. Les banques de données consultées sont

des banques non redondantes de séquences nucléotidiques et protéiques du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La caractérisation des protéines résultantes de la traduction de la séquence nucléotidique est réalisée à l'aide d'outils répertoriés dans les serveurs (<http://www.infobiogen.fr> et <http://molbiols-tools.ca/>).

Les bases de données biologiques ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>), regroupant les motifs, les signatures et les profils caractéristiques de protéines connues ont été utilisées pour obtenir des compléments d'informations. La base de données ARAMEMNON regroupe tout particulièrement les données disponibles concernant les protéines possédant des domaines transmembranaires chez les plantes. Ces outils permettent de formuler des hypothèses quant à la fonction et la localisation d'une protéine issue de la traduction d'une séquence nucléotidique nouvellement séquencée.

En ce qui concerne l'analyse phylogénétique des transporteurs de métaux, nous avons tout d'abord cherché la signature Pfam correspondant à la famille de transporteurs recherchée. Pour ce faire il a suffi de rechercher ce numéro de Pfam à partir d'une séquence de peuplier sur le JGI. Celui-ci est disponible quand on clique sur le lien avec le numéro Interpro ID qui mène au site <http://pfam.sanger.ac.uk/>. Il est alors possible de télécharger le fichier de séquences protéiques correspondant à cette signature Pfam. Ces séquences seront blastées (BlastP) contre le génome d'un organisme d'intérêt. Les sites permettant de blaster les séquences sont les suivants :

http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html (*P. trichocarpa*)

<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html> (*C. reinhardtii*)

http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html (*P. patens*)

<http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html> (*S. bicolor*)

<http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html> (*S. mollendorffii*)

<http://rice.plantbiology.msu.edu/> (*O. sativa*)

<http://www.arabidopsis.org/> (*A. thaliana*)

<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/> (*V. vinifera*)

Nous retenons donc les gènes modèles qui correspondent à notre famille d'intérêt avant de regrouper les gènes modèles de tous ces organismes sur un arbre phylogénétique. Les alignements multiples ont été réalisés en utilisant la méthode ClustalW (Thompson et al., 1994). Les analyses phylogénétiques et d'évolution moléculaire ont été conduites à l'aide du logiciel MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004). Les analyses phylogénétiques ont été réalisées selon la méthode Neighbor-Joining (NJ) du logiciel MEGA version 3.1 en utilisant

les options suivantes : pairwise deletion et Poisson correction. Les tests de « bootstrap » concernant les arbres phylogénétiques ont également été réalisés afin de renforcer ces analyses.

Les séquences de ces organismes sont également présentes sur le lien : <http://www.phytozome.net/>. Rappelons que le peuplier est le premier arbre dont le génome est entièrement séquencé et accessible à la communauté scientifique.

Nous avons également analysé les ESTs (Expressed Sequence Tags) sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) qui représentent les gènes exprimés. Ceci nous a permis de déterminer les spécificités tissulaires de nos transporteurs de métaux d'intérêt.

II.3.10. Analyses statistiques

Le coefficient de Pearson est utilisé pour évaluer la corrélation linéaire entre deux teneurs en métaux dans les feuilles et dans les tiges des différentes espèces analysées. En effet, ce type de coefficient permet d'établir l'existence d'un lien entre 2 variables X et Y afin de mesurer la force ou l'intensité de ce lien. Un signe positif indique que la relation est proportionnelle, un signe négatif qu'elle est inversement proportionnelle. Par convention on dit que la relation entre X et Y est parfaite si $r=1$; très forte si $r>0.8$; forte si r est compris entre 0,5 et 0,8 ; moyenne si r se situe entre 0,2 et 0,5 ; faible si r se situe entre 0 et 0,2 et nulle si $r=0$. Celui-ci a été calculé en utilisant le logiciel statistique SYSTAT (SYSTAT In., Evanston, IL, USA).

Les variations de concentrations en métaux entre espèces, entre cultivars ou en fonction de l'âge des tissus sont testées avec une analyse de variance à deux facteurs (Two Way ANOVA) avec ce même logiciel SYSTAT qui permet de conclure si la différence est significative ou non et avec quel degré de certitude.

CHAPITRE III

*Mise en évidence du potentiel accumulateur de métaux
chez le peuplier*

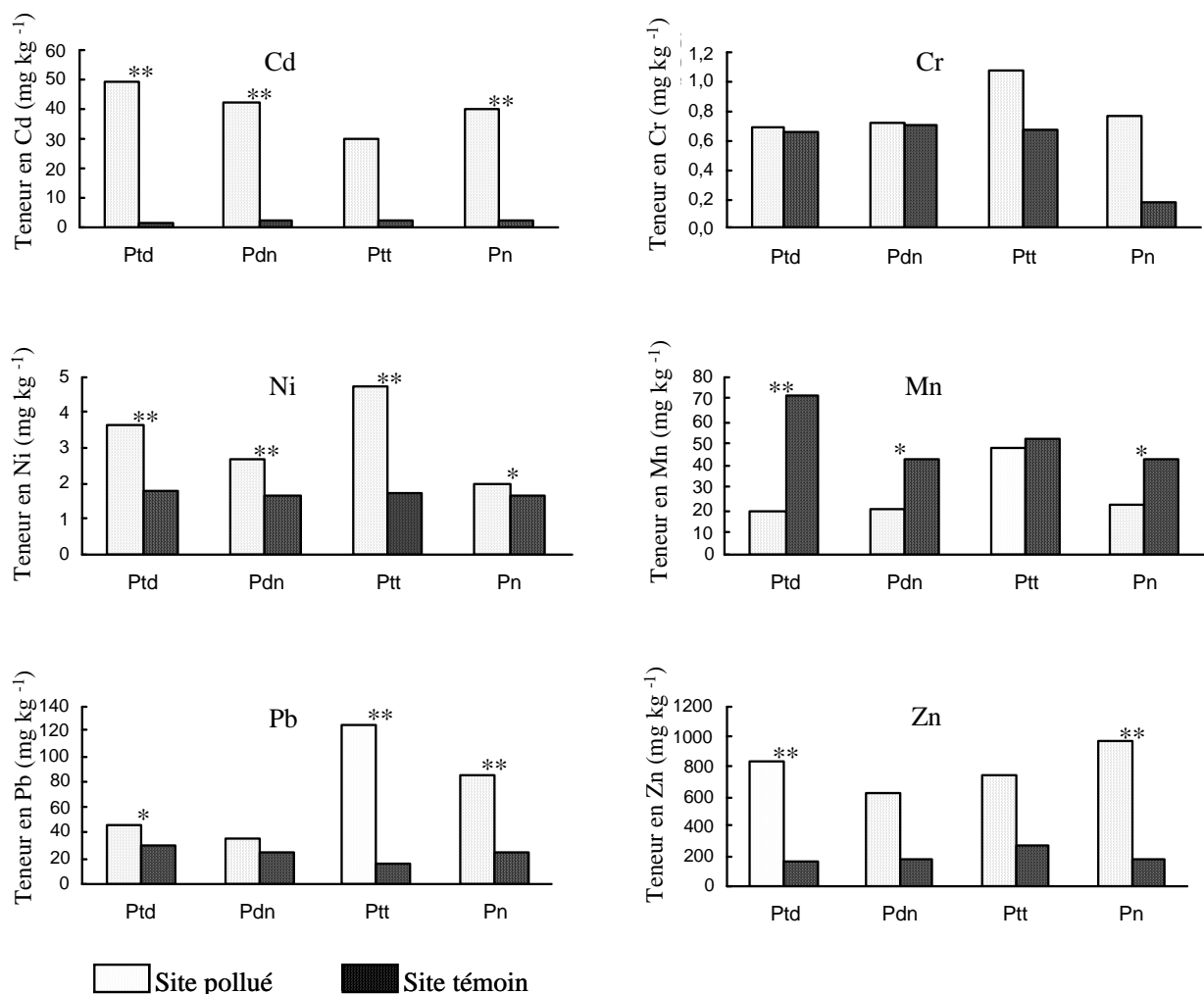


Figure 41: Evolution de la concentration en métaux dans les feuilles de différents cultivars de peuplier entre un site pollué et son site témoin. Les concentrations sont mesurées en ICP-AES et sont exprimées par les moyennes pour chaque espèce/cultivar et pour chaque condition (pollué ou témoin) \pm les écart-types de 5 réplicats.

Les différences statistiques de concentrations en métaux entre le site pollué et son site témoin sont montrées par de simples astérisques ($P < 0,05$) ou doubles astérisques ($P < 0,01$) et ont été déterminées par un test t de student sur des données normalisées.

Ptd: *P. trichocarpa* x *P. deltoides*; Pdn: *P. deltoides* x *P. nigra*; Ptt: *P. tremula* x *P. tremuloides*; Pn : *P. nigra*.

Le premier objectif de mon travail était la mise en évidence du potentiel accumulateur de métaux chez le peuplier. Pour cela, il était nécessaire de comparer plusieurs espèces ligneuses soumises à un même stress métallique afin de déterminer la place du peuplier en tant qu'accumulateur par rapport aux autres espèces. Une estimation des teneurs basales en métaux dans les végétaux présents sur des sites témoins a tout d'abord été réalisée. Ensuite, des prélèvements sur un nombre important (25) d'espèces ligneuses plantées sur le site de Métaleurop (pollué majoritairement au Zn, Cd et Pb) ont permis de comparer les potentiels accumulateurs de métaux de ces espèces. Dans le but de confirmer ces résultats obtenus sur le site de Métaleurop, la capacité d'accumulation de métaux par le peuplier a également été analysée à partir d'échantillons prélevés sur un autre site (Micheville, fortement pollué au Zn et au Pb).

III.1. Teneurs en métaux de végétaux prélevés sur sites témoins

III.1.1. Prélèvements réalisés en juin 2005 sur le site témoin de Métaleurop

Dans le cadre d'une étude préliminaire nous avons réalisé des prélèvements de feuilles sur le site de Métaleurop (Figure 25) et sur un site considéré comme son témoin situé dans la zone non polluée à une cinquantaine de kilomètres de l'usine (§ II.2.1.3). De manière générale, les teneurs en métaux (Cd, Ni, Mn, Pb et Zn) dans les feuilles sont significativement différentes entre le site pollué et le site témoin (Figure 41). En effet, *P.trichocarpa* x *P. deltoides* a une teneur en Cd 30 fois plus importante sur le site pollué. Concernant le Pb, on observe une concentration 8 fois plus importante pour *P. tremula* x *P.tremuloides* sur le site de Métaleurop. De fortes différences sont également observées pour le Zn et le Ni.

En résumé, les teneurs normales en Cd pour le peuplier sont comprises entre 1,6 et 2,6 mg kg MS⁻¹, celles de Cr entre 0,2 et 0,6 mg kg MS⁻¹ ; 1,7 mg kg MS⁻¹ de Ni ; 40 à 70 mg kg MS⁻¹ de Mn ; 20 mg kg MS⁻¹ de Pb et 150 à 250 mg kg MS⁻¹ de Zn. Ces valeurs sont valables pour le sol de cette région, nous avons voulu réaliser d'autres prélèvements sur un autre site témoin pour vérifier l'exactitude de ces données.

Tableau 44: Teneurs en métaux dans les feuilles et les tiges de plusieurs espèces prélevées sur un site non pollué (en mg kg MS⁻¹). Les concentrations sont mesurées en ICP-AES et sont exprimées par les moyennes de 5 réplicats pour chaque espèce.

FEUILLES	Cd	Cr	Cu	Mn	Zn
<i>A. pseudoplatanus</i>	1,13	3,74	6,45	34,9	178,1
<i>B. pendula</i>	0,51	3,33	3,85	483,5	106,4
<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoïdes</i>	1,22	3,36	4,35	63,3	160,0
<i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloïdes</i>	1,78	5,04	6,02	132,3	118,2
<i>Q. robur</i>	0,34	3,42	3,41	291,7	44,3
<i>S. alba</i>	1,69	4,81	5,43	202,3	331,7

TIGES	Cd	Cr	Cu	Mn	Zn
<i>A. pseudoplatanus</i>	1,10	2,72	4,76	44,8	78,4
<i>B. pendula</i>	0,44	2,72	3,65	130,2	116,2
<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoïdes</i>	0,43	2,51	2,62	17,9	50,6
<i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloïdes</i>	1,14	2,46	7,23	36,2	73,3
<i>Q. robur</i>	0,42	3,10	3,03	92,7	42,6
<i>S. alba</i>	1,36	2,95	8,86	3,55	157,8

Tableau 45: Caractéristiques des sols contaminés étudiés (Sites A, B et C situés à Métaleurop ; Figure 26). Les teneurs en métaux sont mesurées par ICP-AES et expriment la moyenne \pm les écart-types de 10 réplicats. Les autres paramètres sont mesurés sur un échantillon composite (réalisé par mélange des 10 réplicats) de chaque site.

	Unité	Site A	Site B	Site C
pH (H ₂ O)	-	7,58 \pm 0,22	7,80 \pm 0,12	7,86 \pm 0,10
Sables grossiers (0,2-2 mm)	G kg ⁻¹	41	634	20
Sables fins (50-200 μ m)	G kg ⁻¹	246	132	74
Limons grossiers (20-50 μ m)	G kg ⁻¹	340	62	366
Limons fins (2-20 μ m)	G kg ⁻¹	196	92	253
Argiles (< 2 μ m)	G kg ⁻¹	177	80	287
C organique	G kg ⁻¹	28	145	24,3
N organique	G kg ⁻¹	1,68	4,12	1,8
Matière Organique	G kg ⁻¹	48,4	251	42,1
CEC	cmol+ kg ⁻¹	11,6	8,46	15,8
Cd échangeable	mg kg ⁻¹	0,23 \pm 0,10	0,25 \pm 0,20	0,03 \pm 0,02
Cd Total	mg kg ⁻¹	10,0 \pm 2,11	8,14 \pm 3,02	9,06 \pm 1,07
Cu échangeable	mg kg ⁻¹	0,22 \pm 0,11	0,16 \pm 0,04	0,15 \pm 0,06
Cu Total	mg kg ⁻¹	27,5 \pm 7,02	50,8 \pm 5,64	16,4 \pm 2,23
Cr échangeable	mg kg ⁻¹	0,002 \pm 0,001	0,001 \pm 0,001	0,001 \pm 0,001
Cr Total	mg kg ⁻¹	23,0 \pm 1,32	21,4 \pm 1,57	24,4 \pm 0,75
Mn échangeable	mg kg ⁻¹	0,17 \pm 0,16	0,17 \pm 0,13	0,03 \pm 0,02
Mn Total	mg kg ⁻¹	143 \pm 27,8	292 \pm 63,6	140 \pm 27,5
Pb échangeable	mg kg ⁻¹	0,11 \pm 0,03	0,20 \pm 0,12	0,02 \pm 0,01
Pb Total	mg kg ⁻¹	492 \pm 102	433 \pm 102	403 \pm 26,7
Zn échangeable	mg kg ⁻¹	4,89 \pm 3,47	6,37 \pm 6,30	0,31 \pm 0,14
Zn Total	mg kg ⁻¹	742 \pm 174	415 \pm 115	490 \pm 43,0

III.1.2. Prélèvements réalisés en juin 2005 sur un site témoin situé en Lorraine (Champenoux)

Des prélèvements ont également été réalisés sur un site non pollué en région Lorraine (Tableau 44). Nous avons prélevé à la fois des feuilles et des tiges de peuplier, de bouleau, de chêne, de saule et d'érable. Les valeurs mesurées pour le peuplier sont du même ordre de grandeur que celles mesurées à plusieurs kilomètres du site de Métaleurop ce qui est réconfortant. Nous avons des valeurs plus importantes en Cr qui peuvent être liées à une concentration plus importante dans le sol. Aussi, pour le même cultivar de peuplier (Beaupré) nous avons 1,22 mg Cd kg MS⁻¹ ; 3,36 mg Cr kg MS⁻¹ ; 63,3 mg Mn kg MS⁻¹ et 160 mg Zn kg MS⁻¹ dans les feuilles. Les teneurs en métaux dans le sol témoin de Champenoux sont de 1,47 mg Cd kg MS⁻¹ ; 41 mg Cr kg MS⁻¹ ; 1310 mg Mn kg MS⁻¹ et 82 mg Zn kg MS⁻¹.

III.2. Teneurs en métaux de végétaux prélevés sur le site de Métaleurop

Pour vérifier le caractère d'accumulation de métaux du peuplier, un dosage des métaux présents dans les feuilles d'un nombre important d'espèces ligneuses s'avérait nécessaire. Ce dosage a précédemment été réalisé sur des échantillons prélevés en juin 2005, puis en juin et octobre 2006. Ces données permettront par conséquent des comparaisons interannuelles et intersaisonniers.

III.2.1. Niveau de contamination des sols

Les principales caractéristiques des différents sols récoltés sont données dans le Tableau 45. Les sites A et C sont d'anciens sols agricoles d'origine loessique alors que le site B est situé sur un ancien terril (Sterckeman et al., 2002). Le site B est celui qui a la plus faible capacité d'échanges cationiques (CEC) et la plus faible teneur en argiles mais présente une forte teneur en matière organique. Au contraire, les sites A et C ont une faible teneur en matière organique et une forte teneur en argiles.

Les teneurs normales en métaux lourds dans les sols loessiques de référence des alentours ont été préalablement déterminées (Sterckeman et al., 2002) et sont de l'ordre (mg kg MS⁻¹) de 0,38 à 0,46 pour le Cd, 47 à 53 pour le Cr, 14 à 19 pour le Cu, 33 à 46 pour le Pb et 67 à 80 pour le Zn. Les sols à proximité de l'ancienne usine de Métaleurop Nord sont

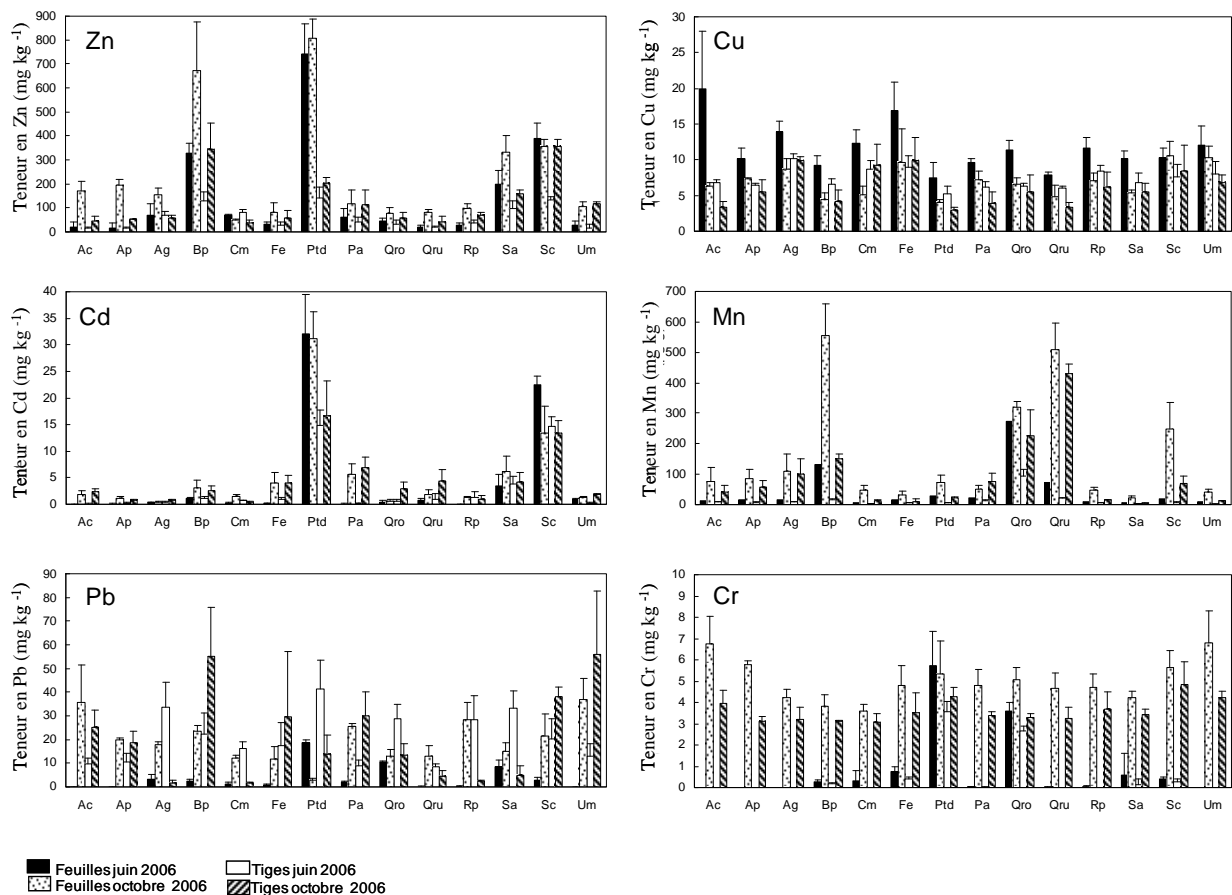


Figure 42: Concentrations en Cd, Cu, Cr, Mn, Pb et Zn dans les tissus d'espèces ligneuses récoltées sur le site A de Métaeurop (en mg kg^{-1}). Les concentrations dans les feuilles et les tiges sont mesurées en ICP-AES et sont exprimées par les moyennes pour chaque espèce, pour chaque tissu et pour chaque saison \pm les écart-types de 5 réplicats.

Ac: *Acer campestre*, Ap: *Acer pseudoplatanus*, Ag: *Alnus glutinosa*, Bp: *Betula pendula*, Cm: *Crataegus monogyna*, Fe: *Fraxinus excelsior*, Ptd: *Populus trichocarpa* x *P. deltoides*, Pa: *Prunus avium*, Qro: *Quercus robur*, Qru: *Quercus rubra*, Rp: *Robinia pseudoacacia*, Sa: *Salix alba*, Sc: *Salix caprea*, Um: *Ulmus minor*.

fortement contaminés au Zn, au Cd et au Pb (Tableau 45 ; Douay et al., 2008b; Sterckeman et al., 2002).

Les teneurs en Cd total dans les sols vont de 8 à 10 mg kg MS⁻¹, celles de Pb de 400 à 500 mg kg MS⁻¹ et celles de Zn de 400 à 750 mg kg MS⁻¹ (Tableau 45). Ces valeurs sont supérieures au sol loessique de référence de la région. Une assez forte contamination au Cu a aussi été observée mais les teneurs en Cr et en Mn sont quant à elles similaires à celles du sol de référence (Sterckeman et al., 2006).

Bien que nous ne retrouvions pas de différence significative entre les concentrations en Cd et Pb totales entre sites, le site A est plus contaminé en Zn (742 mg kg MS⁻¹) que les sites B et C (415 et 490 mg kg MS⁻¹, respectivement). Les mêmes conclusions ne sont pas valables pour les fractions en métaux extractibles au CaCl₂. En effet, même si les valeurs de pH sont assez similaires entre sols, les concentrations en Cd, Pb, Mn et Zn extractibles sont de 5,5 à 14 fois plus élevées dans les sites A et B par rapport au site C. La proportion de Cd extractible au CaCl₂ est de 0,3 (site C) à 3,1 % (site B). Les fractions extractibles du Cr et du Pb sont très faibles. Par exemple, la proportion en Pb extractible par rapport au Pb total est de 0,004 (site C) à 0,009 % (site A). Les autres métaux montrent des proportions en métaux extractibles intermédiaires. Les métaux lourds de ces sols sont donc faiblement extractibles au CaCl₂.

III.2.2. Teneurs en métaux dans les tissus des espèces ligneuses

III.2.2.1. Zinc

L'accumulation de Zn dans les feuilles et dans les tiges dépend des espèces (Figures 42 & 43). Les teneurs en Zn dans les feuilles sont de 30 à 150 mg kg MS⁻¹ pour la plupart des espèces ligneuses. Cependant, le bouleau, le peuplier et le saule accumulent de 2 à 6 fois plus de Zn que les autres espèces. Ces espèces ont un facteur de bioconcentration (BCF: rapport entre les teneurs en métaux dans les feuilles et dans le sol) de 0,6 à 1,2 ce qui laisse supposer que ces espèces sont accumulatrices de Zn (Tableau 46). La seule exception est *Salix purpurea* qui a une teneur plus faible en Zn que les autres Salicacées (100 mg kg MS⁻¹). L'accumulateur le plus performant présent sur ces sites est le peuplier (*P. trichocarpa* x *P. deltoides* sur le site A, *P. tremula* x *P. tremuloides* sur le site B et *P. deltoides* x *P. nigra* sur le

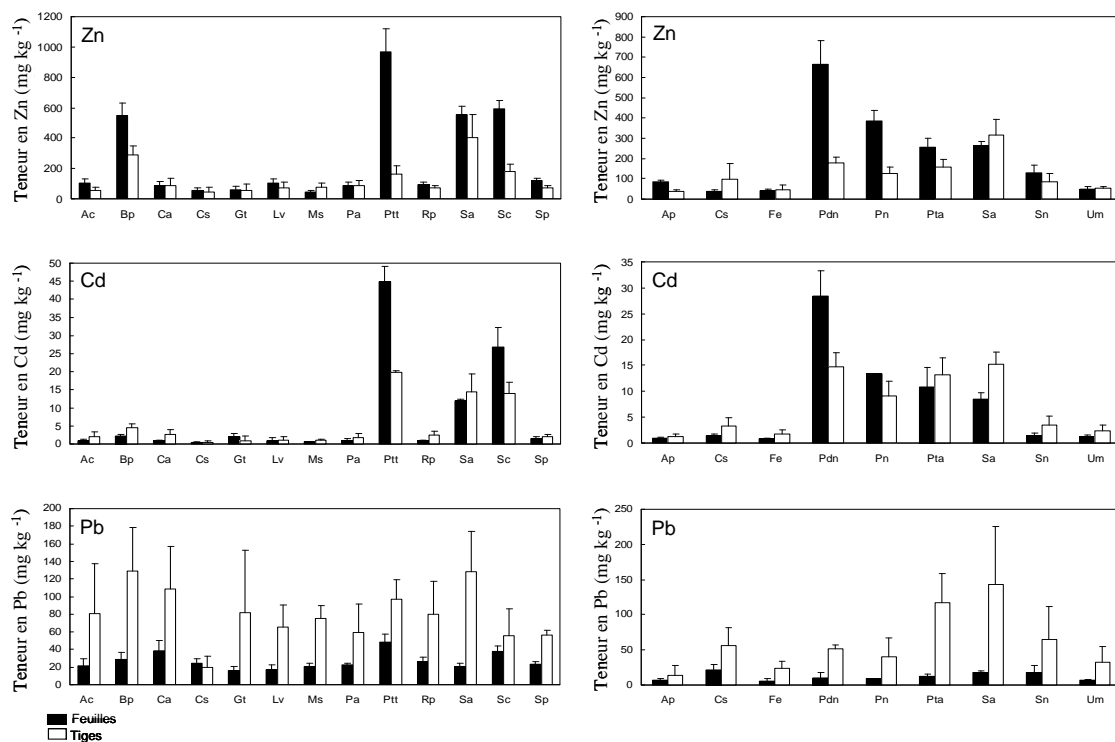


Figure 43: Concentrations en Cd, Pb et Zn dans les feuilles et les tiges d'espèces ligneuses récolées sur les sites B et C (mg kg^{-1}).

Ac: *Acer campestre*, Ap: *Acer pseudoplatanus*, Bp: *Betula pendula*, Ca: *Corylus avellana*, Cs: *Cornus sanguinea*, Fe: *Fraxinus excelsior*, Gt: *Genista tinctoria*, Lv: *Ligustrum vulgare*, Ms: *Malus sylvestris*, Pa: *Prunus avium*, Pdn: *Populus deltoides x P. nigra*, Pn: *Populus nigra*, Pta: *Populus tremula x P. alba*, Ptt: *Populus tremula x P. tremuloides*, Rp: *Robinia pseudoacacia*, Sa: *Salix alba*, Sc: *Salix caprea*, Sn: *Sambucus nigra*, Sp: *Salix purpurea*, Um: *Ulmus minor*.

site C) avec une teneur moyenne en Zn de 850 mg kg MS⁻¹ (Figures 42 & 43). Les teneurs moyennes en Zn sont semblables dans les feuilles et dans les tiges sauf pour le bouleau, le peuplier et le saule qui présentent des concentrations 1,5 à 4 fois plus élevées dans les feuilles que dans les tiges. Rappelons que sur nos sites témoins nous avons mesuré également une plus forte concentration dans les feuilles que dans les tiges.

III.2.2.2. Cadmium

Comme décrit précédemment pour le Zn, les teneurs en Cd les plus élevées dans les feuilles sont retrouvées pour le peuplier et le saule, allant de 13 à 44 mg kg MS⁻¹ (Figures 42 & 43). Les facteurs de bioconcentration sont plus importants que pour le Zn car ils sont d'environ 2 (Tableau 46). Les teneurs en Cd dans les feuilles des autres espèces vont de 1 à 5 mg kg MS⁻¹. Les facteurs de bioconcentration des autres espèces sont donc bien plus faibles. De plus, ces valeurs sont nettement supérieures à celles mesurées sur des arbres ayant poussé sur des sites non contaminés (Tableau 44).

Les concentrations dans les feuilles et dans les tiges sont similaires à part pour les plus forts accumulateurs que sont le peuplier et le saule où la teneur en Cd est supérieure dans les feuilles. De plus, les teneurs en Cd dans les feuilles de peupliers sont supérieures à celles des saules, mais cette constatation n'est pas valable pour les tiges.

III.2.2.3. Plomb

Les teneurs en Pb dans les feuilles et dans les tiges ne montrent pas de différence significative entre espèces. Les facteurs de bioconcentration sont très faibles (de 0,005 à 0,11 ; Tableau 46). Cependant, les teneurs en Pb sont 2 à 4 fois plus élevées dans les tiges que dans les feuilles. Les concentrations en Pb dans les tiges sont ainsi de 50 à 100 mg kg MS⁻¹.

III.2.2.4. Cuivre, manganèse et chrome

Les teneurs en Cu, Mn et Cr ont été aussi analysées dans les feuilles et dans les tiges d'espèces ligneuses présentes sur le site A (Figure 42) et sur les sites B et C (données non montrées ici). Le Cu est un contaminant des sites (Tableau 45 ; Sterckeman et al., 2002).

Tableau 46: Facteurs de bioconcentration des espèces ligneuses collectées sur 3 sites différents de Métaleurop (BCF: concentration dans les feuilles/ concentration dans le sol).

Espèces ligneuses	Cd			Zn			Pb		
	Site A	Site B	Site C	Site A	Site B	Site C	Site A	Site B	Site C
<i>Acer campestre</i>	<0,01	0,04	-	0,02	0,13	-	<0,01	0,05	-
<i>Acer pseudoplatanus</i>	<0,01	-	0,07	0,01	-	0,14	<0,01	-	0,02
<i>Alnus glutinosa</i>	0,01	-	-	0,07	-	-	0,01	-	-
<i>Betula pendula</i>	0,07	0,12	-	0,32	0,69	-	0,01	0,07	-
<i>Cornus sanguinea</i>	-	0,03	0,10	-	0,07	0,06	-	0,06	0,05
<i>Corylus avellana</i>	-	0,04	-	-	0,11	-	-	0,09	-
<i>Crataegus monogyna</i>	0,01	-	-	0,07	-	-	<0,01	-	-
<i>Fraxinus excelsior</i>	0,01	-	0,08	0,03	-	0,08	<0,01	-	0,01
<i>Genista tinctoria</i>	-	0,11	-	-	0,08	-	-	0,04	-
<i>Lingustrum vulgare</i>	-	0,05	-	-	0,13	-	-	0,04	-
<i>Malus sylvestris</i>	-	0,03	-	-	0,06	-	-	0,05	-
<i>Populus deltoides x Populus nigra</i>	-	-	1,39	-	-	0,78	-	-	0,02
<i>Populus nigra</i>	-	-	0,97	-	-	0,62	-	-	0,02
<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	-	2,26	-	-	1,22	-	-	0,11	-
<i>Populus tremula x Populus alba</i>	-	-	0,79	-	-	0,41	-	-	0,03
<i>Populus trichocarpa x Populus deltoides</i>	1,98	-	-	0,72	-	-	0,04	-	-
<i>Prunus avium</i>	<0,01	0,05	-	0,06	0,11	-	<0,01	0,05	-
<i>Quercus robur</i>	0,03	-	-	0,04	-	-	0,02	-	-
<i>Quercus rubra</i>	0,04	-	-	0,02	-	-	<0,01	-	-
<i>Robinia pseudoacacia</i>	<0,01	0,04	-	0,03	0,11	-	<0,01	0,06	-
<i>Salix alba</i>	0,21	0,63	0,61	0,20	0,70	0,42	0,02	0,05	0,04
<i>Salix caprea</i>	1,38	1,42	-	0,38	0,80	-	0,01	0,09	-
<i>Salix purpurea</i>	-	0,09	-	-	0,15	-	-	0,05	-
<i>Sambucus nigra</i>	-	-	0,10	-	-	0,21	-	-	0,04
<i>Ulmus minor</i>	0,01	-	0,09	0,03	-	0,08	<0,01	-	0,02

Tableau 47 : Corrélations de Pearson entre teneurs en métaux dans les feuilles et dans les tiges d'espèces ligneuses récoltées sur le site de Métaleurop (valeurs de corrélation r avec différences significatives marquées par une étoile).

Zn	Pb	Mn	Al	Cu	Co	Cr	Fe	Mg	Ca	K	Ni	Feuilles
0,957**	0,472*	-0,007	0,004	0,001	0,060	0,004	0,000	0,000	0,111	0,000	-0,004	Cd
	0,443	-0,004	0,003	0,001	0,074	0,000	0,000	-0,001	0,052	-0,001	-0,008	Zn
		0,001	0,408	-0,001	0,034	0,044	0,296	0,217	0,275	0,018	0,011	Pb
			0,000	-0,006	-0,010	0,004	0,004	0,034	-0,031	-0,013	0,009	Mn
				-0,002	0,049	0,094	0,722**	0,443	0,139	0,156	0,044	Al
					-0,064	-0,071	-0,070	-0,044	-0,042	-0,018	-0,003	Cu
						0,025	0,214	0,140	0,010	0,237	-0,004	Co
							0,221	0,204	0,308	0,254	0,444	Cr
								0,690**	0,283	0,388	0,039	Fe
									0,308	0,464*	0,045	Mg
										0,273	0,074	Ca
											0,028	K

Zn	Pb	Mn	Al	Cu	Co	Cr	Fe	Mg	Ca	K	Ni	Tiges
0,797**	0,145	-0,023	0,027	0,000	0,229	0,005	0,026	0,056	0,140	0,121	-0,014	Cd
	0,099	-0,009	0,007	0,000	0,276	-0,004	0,002	0,019	0,014	0,099	-0,012	Zn
		-0,004	0,574*	0,021	0,004	0,307	0,603**	0,181	0,074	0,019	0,094	Pb
			-0,007	-0,057	-0,054	0,003	-0,002	0,010	-0,014	-0,005	0,070	Mn
				0,016	-0,054	0,343	0,811**	0,324	0,048	0,077	0,089	Al
					-0,003	-0,003	0,002	0,000	-0,089	0,000	-0,039	Cu
					0,009	0,020	0,025	0,064	0,028	0,313	-0,009	Co
							0,502*	0,559**	0,126	0,301	0,132	Cr
								0,326	0,126	0,104	0,140	Fe
									0,106	0,504**	0,102	Mg
										0,065	0,006	Ca
											0,019	K

* La corrélation est significative à P < 0,05

** La corrélation est significative à P < 0,01.

cependant quelles que soient les espèces analysées il n'y a pas de différence de concentration en Cu entre les feuilles et les tiges. Des résultats similaires sont trouvés pour le Ni, l'Al et le Co.

Les teneurs en Mn varient entre espèces. Alors que la plupart des espèces ligneuses ont des concentrations allant de 10 à 100 mg kg MS⁻¹, les feuilles de *B. pendula*, *S. capreae*, de *Q. robur* et *Q. rubra* collectées en octobre ont des concentrations en Mn bien plus élevées (de 250 à 550 mg kg MS⁻¹). Une accumulation importante de Mn est aussi trouvée dans les tiges des chênes (Figure 42).

Les concentrations en Cr sont plus importantes en octobre qu'en juin mais ne varient pas entre espèces. Il y a une accumulation préférentielle dans les feuilles par rapport aux tiges (Figure 42).

III.2.3. Variation saisonnière de la teneur en métaux des espèces ligneuses

Afin de vérifier si la concentration en métaux évolue en fonction de la saison, nous avons récolté et analysé des feuilles et des tiges d'espèces ligneuses aux mois de juin et d'octobre de la même année. En effet, les teneurs en métaux dans les feuilles et les tiges sont connues pour être dépendantes des saisons (Tomasevic et al., 2008).

Alors que des concentrations plus élevées en Zn et en Cd peuvent être trouvées en juin dans les tissus de *B. pendula* et de la plupart des espèces non accumulatrices, les teneurs en Pb, Mn et Cr sont plus élevées en octobre qu'en juin pour toutes les espèces (sauf pour *P. trichocarpa* x *P. deltoides* et *Q. robur*). Ceci est particulièrement vrai pour le Cr qui est difficilement détectable en juin. Quelles que soient les espèces, il n'y a pas d'effet saisonnier sur la concentration en Cu (Figure 42).

L'analyse statistique par ANOVA met en évidence une interaction significative entre espèces et saison pour le Cr, Mn, Pb et Zn dans les feuilles et dans les tiges (Tableau 48).

III.2.4. Variation annuelle de la teneur en métaux des espèces ligneuses

Quels que soient le métal et les espèces, il n'y a pas de différence significative entre les teneurs mesurées en 2005 (Figure 41) et 2006 (Figures 42 & 43) ce qui montre une bonne reproductibilité des résultats obtenus.

Tableau 48 : Résultats de l'ANOVA concernant les effets espèces et saison sur les concentrations en métaux dans les feuilles et dans les tiges des espèces collectées à Métaleurop (feuilles et tiges récoltées en juin, feuilles et tiges récoltées en octobre).

Effet (feuilles)	Cd	Cr	Cu	Mn	Pb	Zn
Espèces	***	***	**	***	***	***
Saison	Ns	***	***	***	***	***
Espèces x saison	Ns	***	ns	***	***	**

Effet (tiges)	Cd	Cr	Cu	Mn	Pb	Zn
Espèces	***	***	**	***	***	***
Saison	**	***	***	**	***	***
Espèces x saison	Ns	***	*	*	***	***

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,005$, *** = $P < 0,001$, ns = non significatif.

III.2.5. Corrélations entre les teneurs en métaux dans les différents tissus

Des coefficients de corrélation (corrélation de Pearson) ont été calculés pour chaque combinaison de métaux dans les feuilles et les tiges (Tableau 47).

Dans les feuilles, le coefficient de corrélation pour le couple Cd-Zn est très fort ($r > 0,8$), ceux pour les couples Fe-Al et Fe-Mg sont forts ($0,5 < r < 0,8$). Les autres coefficients de corrélation entre métaux sont moyens ou faibles.

Dans les tiges, le coefficient de corrélation pour le couple Fe-Al est très fort. Ceux pour les couples Cd-Zn, Al-Pb, Fe-Pb, Fe-Al, Fe-Cr, Mg-Cr et K-Mg sont forts. Les autres coefficients de corrélation entre métaux sont moyens ou faibles.

Nous avons trouvé des corrélations différences significatives entre coefficients de corrélation ($p < 0,01$) dans les feuilles et dans les tiges pour le couple Cd-Zn et aussi pour le couple Fe-Al et également pour K-Mg ($p < 0,05$). Dans les feuilles, les concentrations de Pb-Cd ($p < 0,05$), Mg-Fe ($p < 0,01$) sont significativement corrélées. Dans les tiges, les concentrations en Fe sont aussi corrélées avec le Pb et le Cr. Des différences de corrélations significatives sont aussi trouvées pour Al-Pb ($p < 0,05$) et Mg-Cr ($p < 0,05$).

III.3. Teneurs en métaux dans les feuilles de peuplier d'un autre site pollué : Micheville (54)

En 2005, nous avons également prélevé des feuilles sur une ancienne mine à ciel ouvert située dans le Nord de la Lorraine. Ce site est connu pour être pollué notamment en Zn et en Pb. En effet, nous avons retrouvé des teneurs très importantes en Zn dans les feuilles de tremble (*P. tremula* x *P. tremuloides*): $1240 \text{ mg kg MS}^{-1}$, mais également $4,1 \text{ mg kg MS}^{-1}$ de Cd. Les teneurs en autres métaux observées dans les feuilles étaient dans les normes. Les teneurs en Zn mesurées sur le site de Métaeurop ne sont donc pas les teneurs les plus importantes qu'on peut retrouver dans le peuplier et notamment pour le tremble.

III.4. Discussion sur les résultats obtenus sur les sites témoins et pollués

Les deux campagnes de prélèvements sur deux sites témoins de compositions différentes ont permis de mettre en évidence le fait que les concentrations de base en métaux étaient équivalentes sur des sites pourtant complètement différents. Ces teneurs sont surtout comparables pour le Cd et le Zn, les métaux qui nous préoccupent le plus car ce sont les polluants majeurs du site de Métaleurop. Ces valeurs sont également comparables à celles présentes dans la littérature (Benton, 1998 ; Larcher, 2003 ; Kabata-Pendias, 1992).

Cependant, même pour un sol aux teneurs en métaux considérées comme « normales » des différences sont observées entre espèces (Tableau 44). Ainsi, les Salicacées présentent de manière générale des teneurs en métaux dans leurs feuilles comme dans leurs tiges plus élevées que les autres espèces. Ceci est surtout valable pour le Cd et le Zn. Par contre, le cas du Mn est tout autre car les teneurs sont plus élevées pour le bouleau et le chêne. Les teneurs en Cu et Cr varient peu entre espèces mais varient légèrement entre sites. De manière générale, les teneurs en métaux dans les feuilles sont supérieures à celles des tiges.

Par conséquent, sur un site considéré comme non pollué (car présentant des teneurs en métaux qui entrent dans les normes) le peuplier et le saule montrent une accumulation supérieure aux autres espèces et donc un potentiel d'absorption et de séquestration de ces métaux supérieur et de fait un potentiel non négligeable en phytoremédiation.

Les différentes espèces ligneuses étudiées ne se comportent pas de la même façon face à une pollution métallique. En effet, les Salicacées accumulent des quantités significativement différentes des autres espèces au niveau de leurs parties aériennes (Tableau 48). Les hybrides de peuplier *P. trichocarpa* x *P. deltoides*, *P. tremula* x *P. tremuloïdes* et *P. deltoides* x *P. nigra* ont été prélevés sur 3 sites différents mais montrent cependant des teneurs en Cd et en Zn significativement différentes des autres espèces. En effet, ces teneurs dans les tissus foliaires sont d'environ 650 à 950 mg Zn kg MS⁻¹ et 28 à 43 mg Cd kg MS⁻¹ (Figure 42). Sur le site témoin nous avons mesuré des teneurs de 150 à 250 mg Zn kg MS⁻¹ et 1,6 à 2,6 mg Cd kg MS⁻¹ soit 4 fois moins de Zn et 17 fois moins de Cd que sur site pollué (Figure 41).

Il avait été précédemment démontré que *P. trichocarpa* x *P. deltoides* pouvait accumuler de fortes concentrations de Cd (209 mg kg MS⁻¹) dans ses tissus foliaires sur un sol contenant jusqu'à 300 mg Cd kg MS⁻¹ (Robinson et al., 2000). Les plus fortes teneurs en Zn mesurées sur site pollué étaient de 2700 mg kg MS⁻¹ pour *S. viminalis* clone 78198 sur un sol qui contenait 1160 mg Zn kg MS⁻¹ (Hammer et al., 2003). Etant donné que les pollutions

étaient moins importantes sur le site de Métaeurop il n'est pas étonnant d'avoir mesuré de plus faibles teneurs dans les feuilles et dans les tiges des peupliers sur les sites A, B et C.

Si on considère les facteurs de bioconcentration, les hybrides de peuplier peuvent être considérés comme des accumulateurs de Zn et surtout de Cd (Tableau 46). Une espèce est dite accumulatrice si son facteur de bioconcentration est supérieur à 1 ce qui signifie que les concentrations mesurées dans le végétal sont supérieures à celles du sol. Les plus forts facteurs que nous ayons mesurés sont pour *P. tremula* x *P. tremuloides* et sont respectivement de 2,26 et 1,22 pour le Cd et le Zn. Les saules ont également été bien étudiés. Le plus fort facteur de bioconcentration de Cd (27,9) a été mesuré sur *S. viminalis* clone 78183 sur un sol contenant 0,45 mg Cd kg MS⁻¹ (Klang-Westin & Eriksson, 2003). Pour le Zn, le plus important facteur de bioconcentration (1,71) a été observé sur *S. viminalis* clone 78198 sur un sol contenant 1160 mg Zn kg MS⁻¹ (Hammer et al., 2003).

Une corrélation positive entre les concentrations en Zn et en Cd dans les feuilles et dans les tiges a été mise en évidence (Tableau 47) suggérant un transport commun des 2 métaux. Le Cd est capable d'utiliser les transporteurs de Zn, qui sont présents dans la plante pour absorber l'élément essentiel qu'est le Zn. Il est connu depuis de nombreuses années que le Zn est un ion compétiteur du Cd (Hawf & Schmid, 1967) et qu'il diminue l'absorption de Cd (Mengel & Kirkby, 2001). L'absorption de Cd dépend de la quantité de Zn dans le sol et les plantes absorbent généralement plus de Cd si la teneur en Zn du sol est faible (Kirkham, 2006).

Une exception est cependant notable : le bouleau accumule le Zn mais pas le Cd (Figures 42 & 43 ; Tableau 46). Il avait déjà été démontré que le peuplier, le saule et le peuplier avaient des facteurs de bioconcentration de Zn similaires alors que les facteurs de bioconcentration du Cd sont inférieurs pour le bouleau par rapport aux Salicacées (Unterbrunner et al., 2007). Cette différence observée pour le bouleau pourrait être due à une sécrétion de composés qui complexent le Cd et l'empêchent ainsi de pénétrer dans la plante. Les ectomycorhizes présentes au niveau du système racinaire du bouleau pourraient également avoir de plus fortes capacités tampon que celles présentes chez le peuplier. En effet, certaines espèces de champignons ectomycorhiziens sont plus efficaces pour piéger les métaux et donc limitent le transfert des métaux vers les tissus de la plante.

En général la pollution au Zn est associée à la pollution au Cd et la plupart des espèces accumulant le Zn accumulent également le Cd, c'est le cas notamment des Salicacées. Le but est de rechercher des cultivars qui seraient utilisables sur la majorité des sites pollués que la pollution soit monométallique ou polymétallique. Les Salicacées accumulent surtout le Cd et le Zn au niveau de leurs parties aériennes. Ces métaux peuvent être remobilisés dans le sol après la chute des feuilles à plus ou moins longue distance et donc entrer dans la chaîne alimentaire. Il est par conséquent indispensable de ramasser les feuilles de peuplier si celui-ci est utilisé dans un but de phytoremédiation. Reste à déterminer la technique la plus adaptée pour cette récolte fastidieuse de feuilles.

Les sites de Métaeurop étaient principalement pollués au Zn, Cd et Pb. Cependant, ceux-ci présentent des caractéristiques différentes qui engendrent une extractibilité (au CaCl_2) variable des métaux, celle-ci étant plus importante sur les sites A et B (Tableau 45). Malgré cette variation dans la biodisponibilité des métaux, les teneurs en métaux dans les feuilles et dans les tiges des différents hybrides de peuplier restent importantes (Figures 42 & 43) ce qui suggère que les proportions de métaux biodisponibles ne sont pas un facteur limitant l'absorption des métaux et leur translocation vers les parties aériennes. Nous avons également mesuré les teneurs en métaux chez *Arabidopsis halleri* récoltée sur le site A, une plante herbacée connue pour hyperaccumuler le Cd et le Zn (Zhao et al., 2000). *A. halleri* avait des teneurs foliaires de $300 \text{ mg Cd kg MS}^{-1}$ et $20800 \text{ mg Zn kg MS}^{-1}$, valeurs tout à fait conformes aux références bibliographiques disponibles pour cette espèce (Zhao et al., 2000).

Les teneurs en Pb, Cr et Mn sont plus élevées dans les feuilles et dans les tiges collectées au mois d'octobre qu'au mois de juin. Notons également que le chêne présente de plus fortes teneurs en Mn que les autres espèces. Ces teneurs sont conformes à celles reportées par Vandecasteele et al. (2008). Une augmentation des teneurs de Cd et de Zn a également été observée pour *Acer sp.*, *B. pendula*, *F. excelsior* et *P. avium* alors qu'aucune variation n'était notable pour le Cu. Des résultats similaires ont été observés pour le bouleau, l'érable, le tilleul, le saule (Piczak et al., 2003) et le peuplier (Laureysens et al., 2004). Chez le peuplier et le saule, Lombini et al. (2003) attribuent ces variations à la modification de la croissance au cours d'une année de végétation. Les concentrations en métaux sont généralement plus fortes en début de saison végétative à cause d'un apport accru en nutriments et d'un fort taux de croissance. Durant la période de sénescence des feuilles il y a donc une augmentation des teneurs en métaux liée à une diminution d'apport de nutriments

(dont les composés métalliques). Il en résulte une plus forte teneur en métaux dans les feuilles sénescents des espèces accumulatrices.

Le site de Micheville est intéressant car il a permis de confirmer le potentiel accumulateur du peuplier sur un site de composition totalement différente car pollué uniquement au Zn et au Cd. Nous observons des teneurs en Zn supérieures à celles du site de Métaleurop ce qui est dû à une teneur plus élevée dans le sol.

Chapitre IV

Exploitation en phytoremédiation de la variabilité génétique du peuplier in situ

Tableau 49: Concentrations en métaux totaux et pH du sol prélevé sur le site de Leforest par D. Baize en août 2008 (valeurs moyennes sur toute la parcelle en mg kg MS⁻¹).

	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Mn	Pb	Zn	pH
Minimum	4,6	8,4	54,2	18,2	20,6	249	228	324	6,0
Maximum	5,1	10,0	62,1	25,5	26,5	338	264	372	6,8
Moyenne	4,9	9,1	57,7	20,9	22,8	275,9	247,9	350,6	6,4
Médiane	4,9	9,0	56,9	19,9	22,4	271	248	352	6,4

Tableau 50: Concentrations en métaux extractibles (par le DTPA et le NH₄NO₃) du sol prélevé sur le site de Leforest (valeurs moyennes sur toute la parcelle).

	Extraits par DTPA (mg kg MS⁻¹)					Extraits par NH₄NO₃ (µg kg MS⁻¹)			
	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn
Minimum	3,2	3,7	2,2	108	44,4	272	<15	289	4490
Maximum	3,7	4,9	2,8	133	74,2	1180	30,8	2240	32900
Moyenne	3,4	4,1	2,4	121,3	56,4	640,5		1037	15091
Médiane	3,4	4,1	2,4	122,0	54	534,5	<15	768	11450

Nous venons de démontrer que le peuplier était une espèce accumulant fortement les métaux comme le Cd et le Zn. Nous avons également mis en évidence une variabilité d'accumulation entre espèces et/ou cultivars de peuplier. L'étape logique suivante était de tester plusieurs cultivars commerciaux dans le but de discriminer les plus adaptés en vue d'une utilisation en phytoextraction. Le deuxième objectif de mon travail de thèse était ainsi d'analyser les teneurs en métaux de différents cultivars de peuplier en situation de polycontamination métallique réelle. Cette étude se place dans le cadre du projet PHYTOPOP. Deux sites dont l'origine et la nature de la pollution diffèrent ont servi à cette étude où une douzaine de cultivars de peuplier sont ainsi testés.

IV.1. Teneurs en métaux de feuilles de peupliers prélevés sur la parcelle expérimentale de Leforest (62)

IV.1.1. Teneurs en métaux dans le sol

La parcelle de Leforest est relativement proche des sites A, B et C sur lesquels nous avons fait des prélèvements en 2005 et 2006, même si elle est un peu plus éloignée de la source de pollution. Des prélèvements du sol de la parcelle de Leforest ont été réalisés et analysés en août 2008 par D. Baize (INRA d'Orléans) (Tableaux 49 & 50). Les résultats trouvés sont en accord avec les données obtenues en 2005 et 2006 sur les 3 sites d'étude (§ III.2.1.) ainsi qu'avec les cartes de pollution donnant les lignes d'isoconcentration réalisées par l'ISA de Lille (Figure 24).

Par rapport aux concentrations totales mesurées dans les horizons de surface de la plaine environnante, celles mesurées sur la parcelle expérimentale de Leforest sont plutôt basses pour le Cu, toute à fait normales pour Mn et Mo et un peu élevées pour Cr, Cu, Co. La pollution est modérée pour le Zn et le Pb et forte pour le Cd avec des valeurs moins élevées pour ces 3 métaux par rapport au site d'Evin Malmaison qui était plus proche de la source de pollution. La pollution est assez uniforme sur toute la parcelle quand on considère les métaux totaux à part pour le Ni qui est un peu moins abondant dans la moitié nord-ouest de la parcelle.

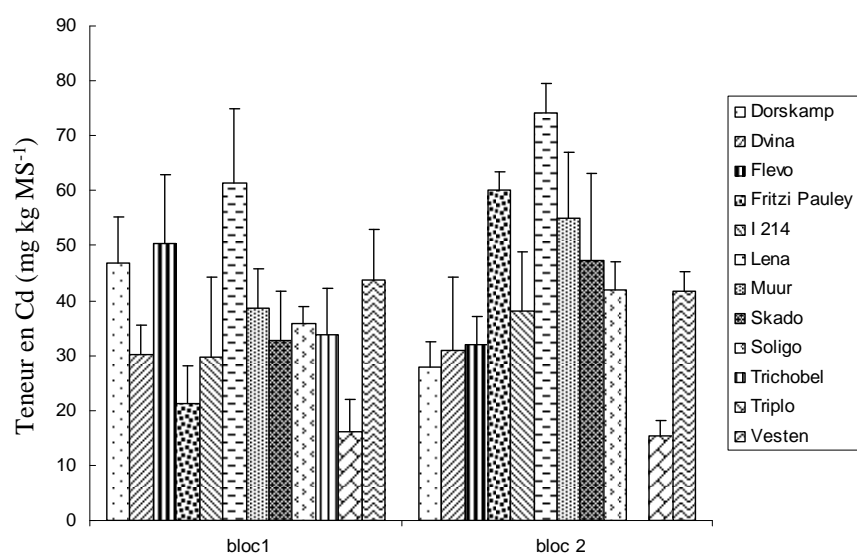


Figure 44 : Teneurs en Cd dans les feuilles des 12 cultivars et dans les 2 blocs de la parcelle de Leforest (en mg kg MS⁻¹). Sont représentées les moyennes ± les écart-types (n=5).

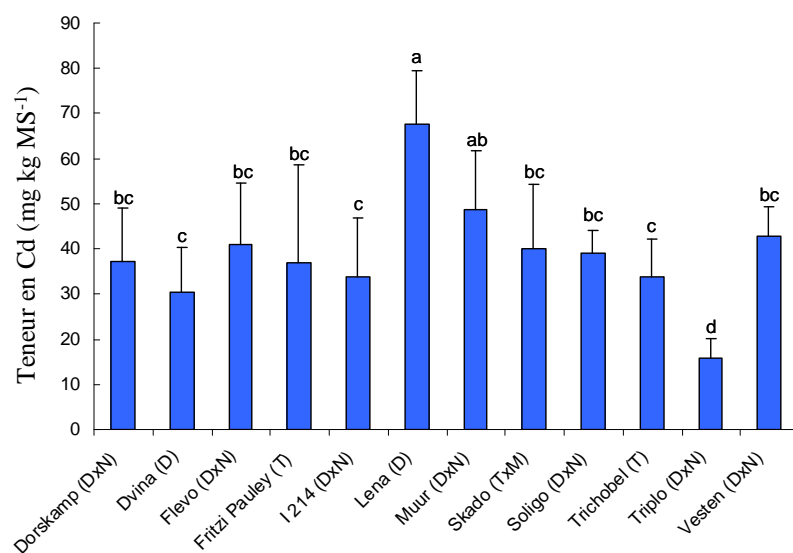


Figure 45: Teneurs en Cd dans les feuilles des 12 cultivars de la parcelle de Leforest (en mg kg MS⁻¹). Sont représentées les moyennes des 2 blocs (n=10) ± les écart-types.

Une analyse statistique (ANOVA) permet de déterminer les différences significatives entre 2 cultivars ($P < 0,005$).

L'espèce est précisée entre parenthèses après le nom du cultivar.

D : *P. deltoides* ; N : *P. nigra* ; T : *P. trichocarpa* ; DxN : *P. deltoides* x *P. nigra* ;

TxM : *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*.

Concernant la fraction de métaux biodisponibles, deux techniques ont été utilisées (Tableau 50) :

- L'extraction par un réactif contenant du DTPA permet d'extraire les formes des métaux liées aux matières organiques et aux oxydes de fer et de manganèse. Ces formes sont mobilisables assez facilement et pourraient devenir biodisponibles. Les valeurs obtenues sont tout à fait similaires à celles des sols agricoles non pollués pour le Cu et le Ni alors qu'elles sont élevées pour le Cd, le Pb et le Zn.

- L'extraction par le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) extrait les formes les plus réactives des métaux, celles facilement échangeables et celles présentes dans la solution du sol sous forme ionique. Une très faible proportion du Pb total est directement biodisponible (<1%). Il en va de même pour le Zn pour lequel la proportion varie de 1 à 10%. En revanche, une proportion non négligeable du Cd total est sous forme échangeable ou soluble (5 à 24%). Ce sont justement ces formes facilement disponibles du Cd, du Pb et du Zn qu'il va être possible de faire diminuer dans les horizons de surface par phytoextraction.

IV.1.2. Teneurs en métaux et facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars prélevés octobre 2007)

IV.1.2.1. Teneurs en métaux dans les feuilles des différents cultivars

Nous avons prélevé au mois d'octobre 2007 des feuilles des différents cultivars de peuplier plantés (en avril 2007) sur le site de Leforest. Ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus sur les 3 autres sites de Métaleurop.

IV.1.2.1.1. Cadmium

Les concentrations en Cd du sol de la parcelle de Leforest sont de l'ordre de 5 mg kg MS^{-1} (Tableau 49). Les concentrations retrouvées dans les feuilles (Figure 44 & Figure 45) sont alors nettement supérieures à celles rencontrées dans le sol puisqu'elles vont jusqu'à 75 mg kg MS^{-1} . Un facteur de bioconcentration sera calculé par la suite.

Nous regrouperons par la suite les mêmes cultivars issus des 2 blocs afin de comparer les cultivars entre eux et ce pour tous les métaux étudiés.

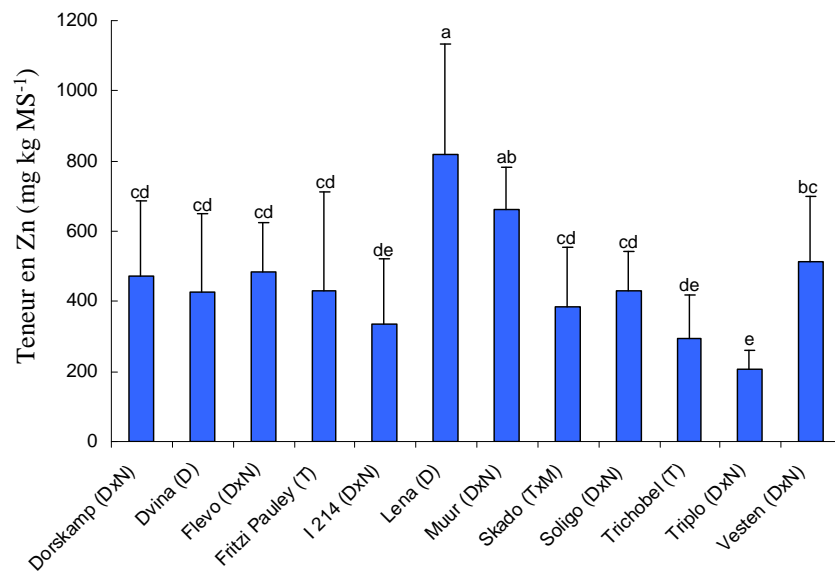


Figure 46: Teneurs en Zn dans les feuilles des 12 cultivars de la parcelle de Leforest (en mg kg MS⁻¹). Sont représentées les moyennes des 2 blocs (n=10) ± les écart-types.

Une analyse statistique (ANOVA) permet de déterminer les différences significatives entre 2 cultivars (P < 0,005)

D : *P. deltoides* ; N : *P. nigra* ; T : *P. trichocarpa* ; DxN : *P. deltoides* x *P. nigra* ;
TxM : *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*.

Une nette différence entre cultivars peut-être mise en évidence, ceci est corroboré par l'analyse statistique qui montre des différences significatives entre cultivars (Figure 45). Une différence d'un facteur supérieur à 4 est observée entre le cultivar qui accumule le moins et celui qui accumule le plus. En effet, le cv. Lena présente une concentration d'environ 70 mg kg MS⁻¹ de Cd dans les tissus foliaires contre 15 mg kg MS⁻¹ pour le cv. Triplo. Dans l'ordre les cultivars qui accumulent le plus sont donc Lena > Muur > Vesten > Flevo > Skado > Soligo > Dorskamp > Fritzi Pauley > I214 > Trichobel > Dvina > Triplo.

IV.1.2.1.2. Zinc

Les différences entre cultivars suivent la même tendance que pour le Cd même si le facteur de variation entre cultivars est un peu inférieur à 4 dans le cas du Zn (Figure 46). Les teneurs en Zn sont de 820 mg kg MS⁻¹ pour le cv. Lena contre 210 mg kg MS⁻¹ pour Triplo.

IV.1.2.1.3. Nickel

Les teneurs en Ni ne sont pas assez importantes pour parler d'accumulation. Cependant, si on classe les cultivars par ordre décroissant quant à leur teneur en Ni, nous obtenons un résultat complètement différent de celui du Cd et du Zn. En effet le classement est le suivant : Lena > Soligo > Dvina > Muur > Triplo > Dorskamp > Flevo > I214 > Skado > Fritzi Pauley > Vesten > Trichobel.

Nous avons mesuré 11,3 mg kg MS⁻¹ de Ni pour le cv. Lena contre 6,35 mg kg MS⁻¹ pour le cv. Trichobel soit une différence de l'ordre d'un facteur 2 seulement.

IV.1.2.1.4. Chrome

Tout comme pour le Ni, de faibles variations sont observées entre cultivars. Lena reste le cultivar qui accumule le plus et les cultivars appartenant à l'espèce ou à un hybride *trichocarpa* accumulent moins de ce métal (Skado, Trichobel, Fritzi Pauley).

Tableau 51: Facteurs de bioconcentration (teneur dans les feuilles / teneur dans le sol) en Cd total dans les feuilles des différents cultivars de la parcelle de Leforest.

Cultivar	FB
Lena (D)	14,3
Muur (DxN)	9,4
Vesten (DxN)	8,6
Skado (TxM)	8,1
Fritzi Pauley (T)	8,0
Soligo (DxN)	7,9
Flevo (DxN)	7,9
Dorskamp (DxN)	7,1
I-214 (DxN)	7,0
Trichobel (T)	6,8
Dvina (D)	6,3
Triplo (DxN)	3,2

Tableau 52: Facteur de bioconcentration en Zn total dans les feuilles des différents cultivars de la parcelle de Leforest.

Cultivar	FB
Lena (D)	2,4
Muur (DxN)	1,9
Vesten (DxN)	1,5
Fritzi Pauley (T)	1,4
Flevo (DxN)	1,3
Dorskamp (DxN)	1,3
Dvina (D)	1,2
Soligo (DxN)	1,2
Skado (TxM)	1,1
I-214 (DxN)	1,0
Trichobel (T)	0,8
Triplo (DxN)	0,6

IV.1.2.1.5. Cuivre

Contrairement au Ni et au Cr ce sont plutôt les cultivars appartenant à l'espèce ou à un hybride *trichocarpa* qui accumulent davantage le Cu. En effet, Skado est le cultivar le plus accumulateur avec $10,2 \text{ mg kg MS}^{-1}$ contre $5,26 \text{ mg kg MS}^{-1}$ pour Dvina. De plus, Lena qui était le cultivar qui accumulait le plus tous les autres métaux semble accumuler nettement moins bien le Cu ($5,68 \text{ mg kg MS}^{-1}$).

IV.1.2.2. Facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars

IV.1.2.2.1. Cadmium

Les facteurs de bioconcentration en Cd obtenus sont importants (Tableau 51). En effet, au delà de 1 on considère qu'il y a accumulation, ce qui est le cas pour tous les cultivars. Le cv. Lena semble être bien plus performant que les autres cultivars puisqu'on a un facteur de bioconcentration de 14,2 contre 3,2 pour le Triplo. Le classement entre cultivars reste quasiment identique à celui obtenu pour les concentrations en Cd dans les feuilles. La plupart des cultivars ont un facteur de bioconcentration compris entre 6 et 9.

Nous observons un écart-type en général assez faible entre blocs à part pour le cv. Fritzi Pauley qui montre une assez forte hétérogénéité entre les 2 blocs.

IV.1.2.2.2. Zinc

Les facteurs de bioconcentration du Zn sont nettement inférieurs à ceux du Cd (Tableau 52). Cependant, nous observons encore des variations entre cultivars. Le Lena reste le cultivar le plus accumulateur et le Triplo le moins accumulateur. Les cv. Triplo et Trichobel ont des facteurs de bioconcentration inférieurs à 1 et n'accumulent donc pas le Zn.

Les cv. Muur et Vesten sont les plus accumulateurs après le Lena et accumulent donc bien à la fois le Cd et le Zn.



Figure 47: Peuplier en mode TCR sur le site de Leforest. A gauche : cultivés depuis 1 an, à droite : regarnis de l'année. Nous voyons dans ce cas une assez forte hétérogénéité entre les peupliers ayant vécu une année sur le site et ceux qui viennent d'être replantés (hauteur de tige de 2 m à la plantation).

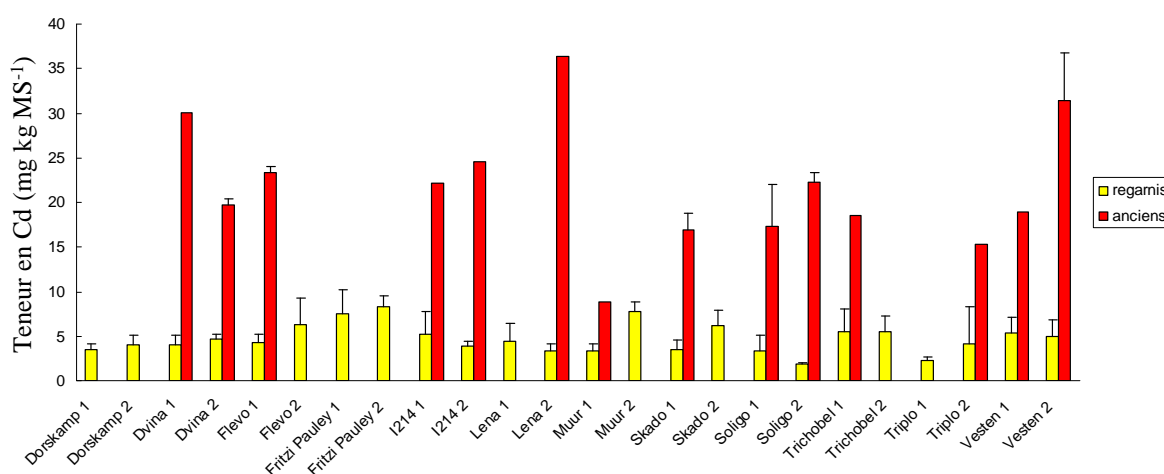


Figure 48: Teneurs en Cd dans les feuilles des peupliers regarnis et des peupliers plantés depuis 1 an (en mg Cd kg MS⁻¹). Sont représentées les moyennes des 2 blocs ± les écart-types (n= 5).

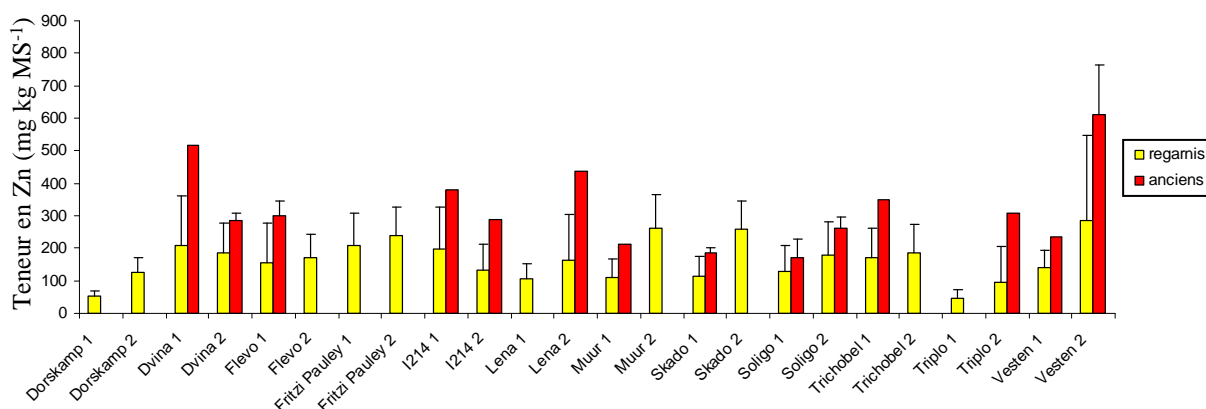


Figure 49: Teneurs en Zn dans les feuilles des peupliers regarnis et des peupliers plantés depuis 1 an en mg Zn kg MS⁻¹). Sont représentées les moyennes des 2 blocs ± les écart-types (n=5).

IV.1.2.2.3. Chrome, cuivre et nickel

Ces métaux ne sont pas accumulés par le peuplier sur ce site, nous n'avons pas trouvé de facteur de bioconcentration supérieur à 1.

IV.1.3. Teneurs en métaux et facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars prélevés en juillet 2008

Le taux de survie, exprimé en pourcentage, représente la proportion de plants vivants au moment des mesures par rapport à l'effectif planté. Les taux de survie ont été mesurés par le FCBA et varient entre cultivars. Ces taux de survie sont parfois faibles suite à des dégâts importants causés par des lapins. En moyenne, le taux de survie enregistré sur la parcelle de Leforest est de 38%. C'est pourquoi ce site a été regarni en avril 2008.

Au moment où nous avons fait les prélèvements il y avait donc sur le site des peupliers âgés de 1 an et de 3 mois (Figure 47). Des prélèvements ont été réalisés à la fois sur les peupliers présents sur le site depuis un an et sur ceux qui venaient d'être plantés.

IV.1.3.1. Cadmium

Les teneurs en Cd des feuilles prélevées au mois de juillet 2008 sont d'une part nettement inférieures pour les peupliers regarnis 3 mois plus tôt par rapport aux peupliers âgés de un an mais également plus faibles en juillet qu'en octobre pour ces derniers (Figure 48). Ainsi les teneurs en Cd dans les feuilles du cv. Lena en juillet 2008 pour les peupliers âgés de un an ne sont que de $36,4 \text{ mg kg MS}^{-1}$ d'où un facteur de bioconcentration 2 fois moins élevé qu'en octobre 2007. De manière générale, les teneurs sont de 5 à 10 mg kg MS^{-1} pour les regarnis et 15 à 35 mg kg MS^{-1} pour les peupliers âgés de un an.

IV.1.3.2. Zinc

De même que pour le Cd, les concentrations mesurées en juillet 2008 sont inférieures à celles d'octobre 2007 (Figure 49). Cependant ces différences sont un peu moins importantes

Tableau 53 : Concentrations moyennes en métaux dans le sol de Pierrelaye (en mg kg MS⁻¹).

	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Mn	Pb	Zn
Minimum	1,94	4,01	36,7	69,3	14,1	129	74,7	314
Maximum	4,44	13,5	89	230	41,7	304	484	761
Moyenne	2,60	6,22	52,9	119	20,6	182	263	449
Médiane	2,76	6,65	56,7	136,4	22,1	194	276	482

Tableau 54 : Concentrations en métaux biodisponibles du sol prélevé sur le site de Pierrelaye par D. Baize (valeurs moyennes sur toute la parcelle en mg kg MS⁻¹).

	Extraits par DTPA (mg kg MS ⁻¹)					Extraits par NH ₄ NO ₃ (µg kg MS ⁻¹)			
	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn
Minimum	0,701	17,5	1,28	14,0	68,9	17,9	414	13,9	1200
Maximum	1,830	66,3	3,53	53,8	180	39,1	1000	33,8	2300
Moyenne	0,992	27,2	1,74	22,7	96,1	23,7	605	18,7	1520
Médiane	1,059	32,2	2,0	26,5	105,6	24,2	616	19,5	1611

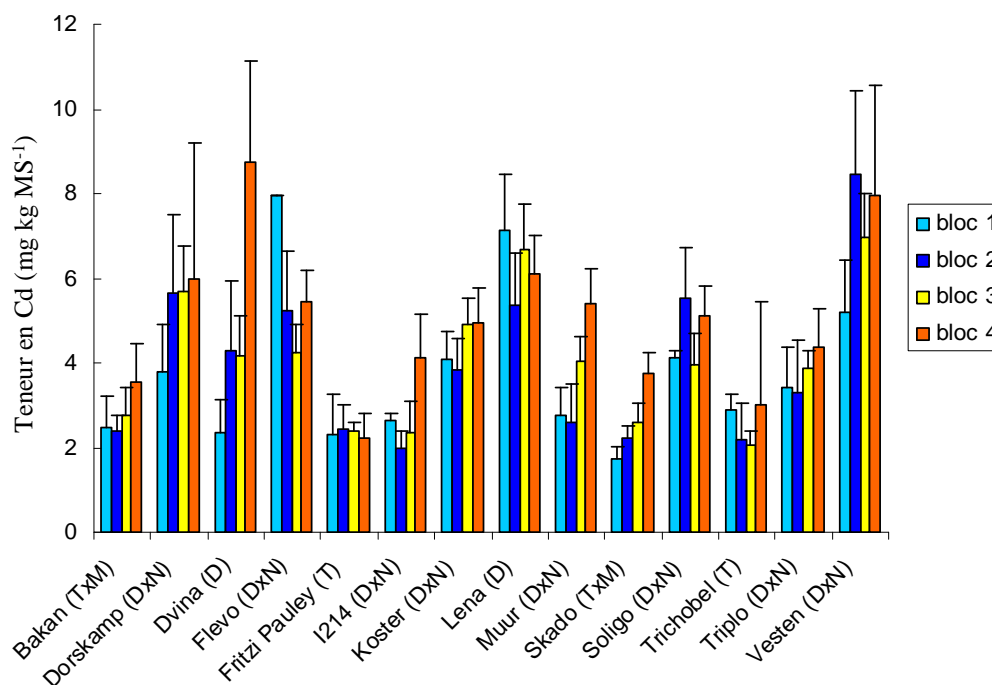


Figure 50: Teneurs en Cd dans les feuilles des différents cultivars plantés selon 2 modes culturaux. Mode TCR (en bleu, bloc 1 et 2) et mode TTCR (en jaune, bloc 3 et 4) sur le site de Pierrelaye (en mg kg MS⁻¹). Sont représentées les moyennes ± les écart-types (n=5).

(les teneurs sont 2 ou 3 fois moins élevées en juillet). Pour les regarnis, les teneurs sont de 50 à 250 mg kg MS⁻¹ et pour les peupliers âgés d'un an de 150 à 600 mg kg MS⁻¹.

IV.2. Teneurs en métaux de feuilles de peupliers prélevés sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye-Bessancourt (95)

IV.2.1. Teneurs en métaux dans le sol

Des analyses du sol ont été réalisées (D. Baize, INRA d'Orléans) sur chaque placette donc nous disposons des concentrations précises en métaux dans le sol pour chaque cultivar.

Les échantillons de sol sont des échantillons composites (mélange de 25 échantillons sur la profondeur 0-20 cm sur une même parcelle) prélevés au centre des 56 placettes. Les sols sont très sableux (du moins en surface) et contiennent de très nombreux fragments. Les teneurs en métaux totaux dans le sol sont de 2,76 mg Cd kg MS⁻¹, 482 mg Zn kg MS⁻¹ et 276 mg Pb kg MS⁻¹.

Etant donné que nous disposons des concentrations en métaux pour chaque placette, nous pouvons calculer le coefficient de bioconcentration et nous nous limiterons à ce coefficient car il est plus représentatif que la teneur en métaux dans les feuilles pour comparer les potentiels d'accumulation des cultivars.

Le sol de Pierrelaye (Tableau 53) est donc moins pollué en Cd et à peu près autant pollué en Pb et en Zn que le site de Leforest. Il est par contre nettement plus pollué en Cu. Si on considère les fonds pédo-géochimiques naturels locaux, nous constatons une pollution au Cd, Zn, Cu et Pb. De plus, nous possédons les données de biodisponibilité (extraction au nitrate d'ammonium) ce qui nous permet de déduire quelles sont réellement les performances de ces cultivars (Tableau 54).

IV.2.2. Teneurs en métaux et facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars en octobre 2007

IV.2.2.1. Teneurs en métaux

Le sol est pollué en Cd puisque en moyenne on observe une concentration de 2,76 mg kg MS⁻¹. Les teneurs observées dans les feuilles (2 à 8 mg kg MS⁻¹ environ ; Figure 50) sont supérieures à celles du sol, le Cd est donc bien accumulé dans les feuilles de peuplier.

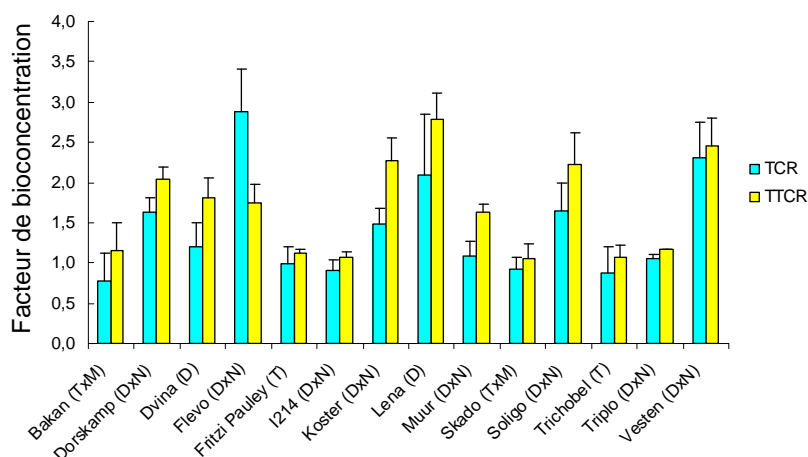


Figure 51: Facteurs de bioconcentration en Cd pour différents cultivars plantés en modes TCR (bleu) et TTCR (jaune). Les facteurs de bioconcentration sont représentés par des moyennes pour chaque traitement (TCR ou TTCR) \pm leurs écart-types (n=10).

Tableau 55 : Facteurs de bioconcentration (FB) en Cd (par rapport à la quantité de métaux totaux).

Cultivar	FB
Vesten (DxN)	2,45
Lena (D)	2,44
Flevo (DxN)	2,31
Soligo (DxN)	1,93
Koster (DxN)	1,88
Dorskamp (DxN)	1,84
Dvina (D)	1,50
Muur (DxN)	1,36
Triplo (DxN)	1,11
Fritzi Pauley (T)	1,05
I-214 (DxN)	0,99
Skado (TxM)	0,99
Trichobel (T)	0,97
Bakan (TxM)	0,96

Tableau 56: Facteurs de bioconcentration dans les feuilles en Cd (par rapport au Cd extractible au nitrate d'ammonium dans le sol, moyenne des 4 blocs).

Cultivar	FB
Flevo (DxN)	275
Vesten (DxN)	268
Lena (D)	236
Soligo (DxN)	199
Dorskamp (DxN)	170
Koster (DxN)	141
Dvina (D)	133
Triplo (DxN)	128
Muur (DxN)	125
I-214 (DxN)	107
Fritzi Pauley (T)	107
Trichobel (T)	106
Skado (TxM)	90
Bakan (TxM)	83

Nous observons une assez grande différence de concentrations entre blocs donc nous ne présenterons par la suite que les facteurs de bioconcentration, qui permettent de mieux estimer le potentiel accumulateur de chaque cultivar. Nous regrouperons également les 2 blocs de TCR entre eux et ferons de même pour les 2 blocs de TTCR.

IV.2.2.2. Facteurs de bioconcentration

IV.2.2.1.1. Cadmium

L'accumulation varie nettement selon les cultivars (Figure 51). De manière générale il y a peu de différences entre blocs TCR et TTCR mais cette différence devrait être plus marquée au cours du temps, quand la biomasse des peupliers aura augmenté.

Nous pouvons constater que, de manière générale les *deltoides* et les hybrides *deltoides x nigra* accumulent beaucoup mieux le Cd que les *trichocarpa* et les hybrides *trichocarpa x maximowiczii* (Tableau 57). Les cultivars Vesten, Lena et Flevo ont des facteurs de bioconcentration supérieurs à 2, ce sont donc les cultivars qui accumulent davantage de Cd.

Si nous calculons le facteur de bioconcentration (FB) en tenant compte de l'extractibilité du Cd nous retrouvons plus ou moins le même classement quant au potentiel d'accumulation des différents cultivars (Tableau 56). De plus, étant donné que nous ne disposons pas des données de biodisponibilité pour tous les métaux nous nous contenterons de calculer un facteur de bioconcentration par rapport à la concentration en métaux totaux dans le sol.

IV.2.2.1.2. Zinc

De même que pour le Cd, les facteurs de bioconcentration ont été calculés (Figure 52). Ceux-ci sont moins élevés que pour le Cd ce qui confirme les résultats obtenus précédemment. Les cultivars qui accumulent davantage le Zn sont Lena, Vesten et Soligo.

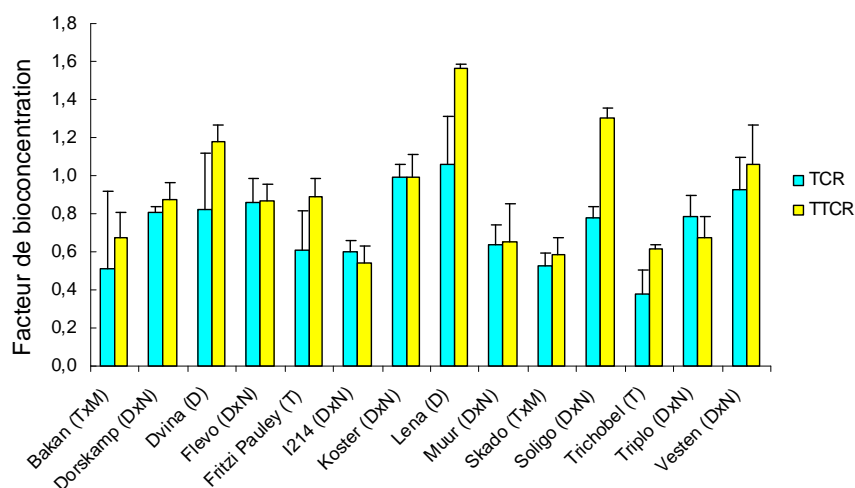


Figure 52: Facteurs de bioconcentration en Zn (par rapport à la biodisponibilité dans le sol). Les facteurs de bioconcentration sont représentés par des moyennes pour chaque traitement (TCR ou TTCR) \pm leurs écart-types (n=10).

Tableau 57: Facteurs de bioconcentration en Ni, Cu et Cr

Cultivar	Ni	Cultivar	Cu	Cultivar	Cr
Dvina (D)	2,26	Flevo (DxN)	0,21	Dvina (D)	0,19
Lena (D)	1,80	Koster (DxN)	0,19	Lena (D)	0,15
Dorskamp (DxN)	1,32	I-214 (DxN)	0,17	Dorskamp (DxN)	0,10
Bakan (TxM)	1,19	Dorskamp (DxN)	0,16	Flevo (DxN)	0,09
Flevo (DxN)	1,15	Lena (D)	0,16	Soligo (DxN)	0,08
Skado (TxM)	0,98	Dvina (D)	0,11	Trichobel (T)	0,07
Trichobel (T)	0,95	Muur (DxN)	0,10	Skado (TxM)	0,07
Fritzi Pauley (T)	0,84	Fritzi Pauley (T)	0,07	Bakan (TxM)	0,07
Triplo (DxN)	0,71	Skado (TxM)	0,07	Fritzi Pauley (T)	0,07
Soligo (DxN)	0,70	Bakan (TxM)	0,06	Vesten (DxN)	0,06
Vesten (DxN)	0,68	Soligo (DxN)	0,06	Triplo (DxN)	0,05
I-214 (DxN)	0,33	Trichobel (T)	0,06	Koster (DxN)	0,03
Koster (DxN)	0,32	Vesten (DxN)	0,05	I-214 (DxN)	0,02
Muur (DxN)	0,23	Triplo (DxN)	0,04	Muur (DxN)	0,01

IV.2.2.1.3. Nickel

Le peuplier et plus particulièrement les cv. Dvina, Lena, Dorskamp, Bakan et Flevo accumulent assez fortement le Ni. Les facteurs de bioconcentration en Ni (Tableau 57) sont assez hétérogènes car ils varient de 2,26 (Dvina) à 0,23 (Muur). Nous n'avons jamais relevé de facteurs de bioconcentrations en Ni si importants sur le site de Métaleurop alors que les teneurs totales en Ni sont du même ordre de grandeur.

IV.2.2.1.4. Chrome et cuivre

Les facteurs de bioconcentration (Tableau 57) sont trop faibles pour parler d'accumulation de Cu et de Cr par le peuplier. Cependant, nous pouvons constater une hétérogénéité importante entre cultivars, d'où une possibilité d'accumulation de ces métaux si ceux-ci étaient plus biodisponibles.

IV.2.3. Facteurs de bioconcentration dans les feuilles des différents cultivars prélevés en juillet 2008

Suite à la mortalité assez importante en 2007, les différents cultivars des blocs TCR ont été regarnis par le FCBA. Nous ne considérerons ici que le bloc 4 où il n'y a pas eu de regarnis et où la croissance était la plus importante (zone la mieux irriguée).

IV.2.3.1. Cadmium

Les concentrations mesurées dans les feuilles en juillet 2008 sont en général inférieures à celles d'octobre 2008. En avril 2008, un cultivar supplémentaire a été ajouté au niveau du bloc 4, tout en bas de la parcelle, il s'agit du cv. Raspalje (TxD).

Les facteurs de bioconcentration ne sont pas très différents entre juillet et octobre pour la plupart des cultivars (Figure 53). Par contre une différence assez importante est observée pour les cv. Lena, Dorskamp et Soligo.

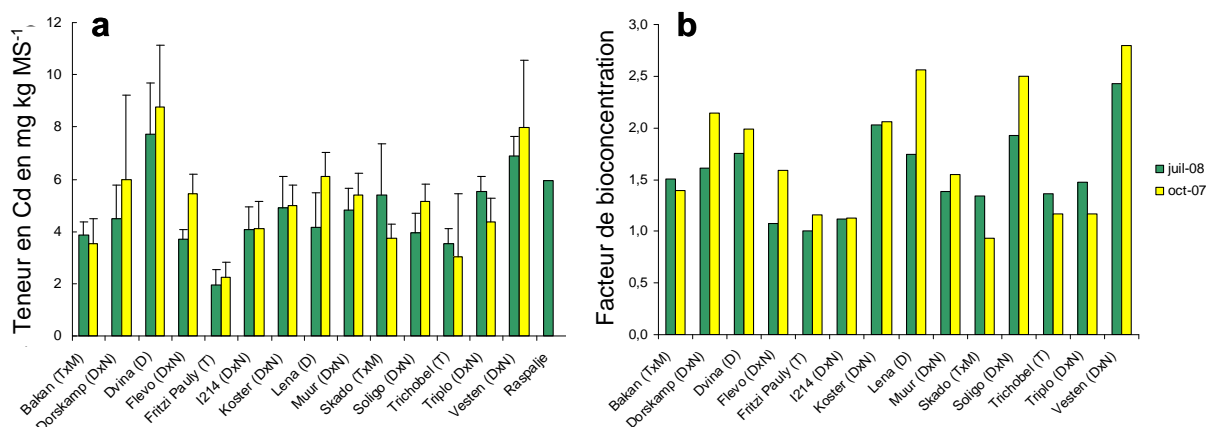


Figure 53: Comparaisons entre saisons des teneurs et facteurs de bioconcentration en Cd. Les teneurs en Cd (a) et les facteurs de bioconcentration (b) sont mesurés dans les feuilles de peupliers du bloc 4 (TTCR) en octobre 2007 (en jaune) et juillet 2008 (en vert) et réalisés sur 5 réplicats \pm leurs écart-types pour chaque date.

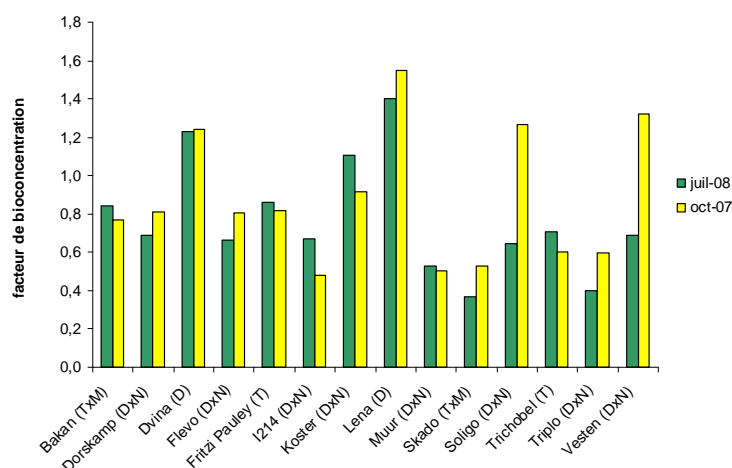


Figure 54: Facteurs de bioconcentration en Zn dans les feuilles de peupliers du bloc 4 (TTCR) en octobre 2007 et juillet 2008 (n=5).



Figure 55: Comparaison des teneurs en Cd et Zn selon la maturité des feuilles. Concentrations en Cd (a) et en Zn (b) dans les feuilles matures (en vert) et les feuilles sénéscentes (en jaune) de 3 cultivars de peuplier du bloc 4 (sur 5 réplicats \pm leurs écart-types pour chaque type de feuilles).

IV.2.3.2. Zinc

De même que pour le Cd, les facteurs de bioconcentration sont en général plus élevés en octobre qu'en juillet (Figure 54). Nous ne retrouvons pas exactement le même profil que pour le Cd. En effet, pour le cv. Soligo et le Vesten le facteur de bioconcentration était 2 fois plus important à l'automne alors que la différence entre les 2 saisons était moindre pour le Cd. Il pourrait donc y avoir un effet clonal dans les variations entre saisons.

IV.2.4. Teneurs en Cd et en Zn dans les feuilles matures et sénescents

Dans le bloc 4, en juillet 2008 nous avons trouvé 3 cultivars qui avaient déjà des feuilles sénescents en plus des feuilles matures. Nous avons prélevé sur un même arbre les 2 stades foliaires et analysé leurs concentrations en métaux.

IV.2.4.1. Cadmium

Il apparaît assez nettement que les teneurs en Cd (Figure 55) sont supérieures dans les feuilles sénescents ce qui permet d'expliquer les différences que nous avons observées à la fois sur le site de Leforest et sur celui de Pierrelaye entre les 2 saisons. Ceci est surtout valable pour le cv. Lena dont la teneur en juillet est équivalente aux autres cultivars mais plus élevée en octobre.

IV.2.4.2. Zinc

De même que pour le Cd, les teneurs en Zn (Figure 55) sont supérieures dans les feuilles sénescents. La différence de concentration entre cultivars est plus visible au mois de juillet, en effet le cv. Lena montre une teneur en Zn plus élevée que les 2 autres cultivars alors que la teneur d'octobre est du même ordre que celle observée pour le cv. Bakan.

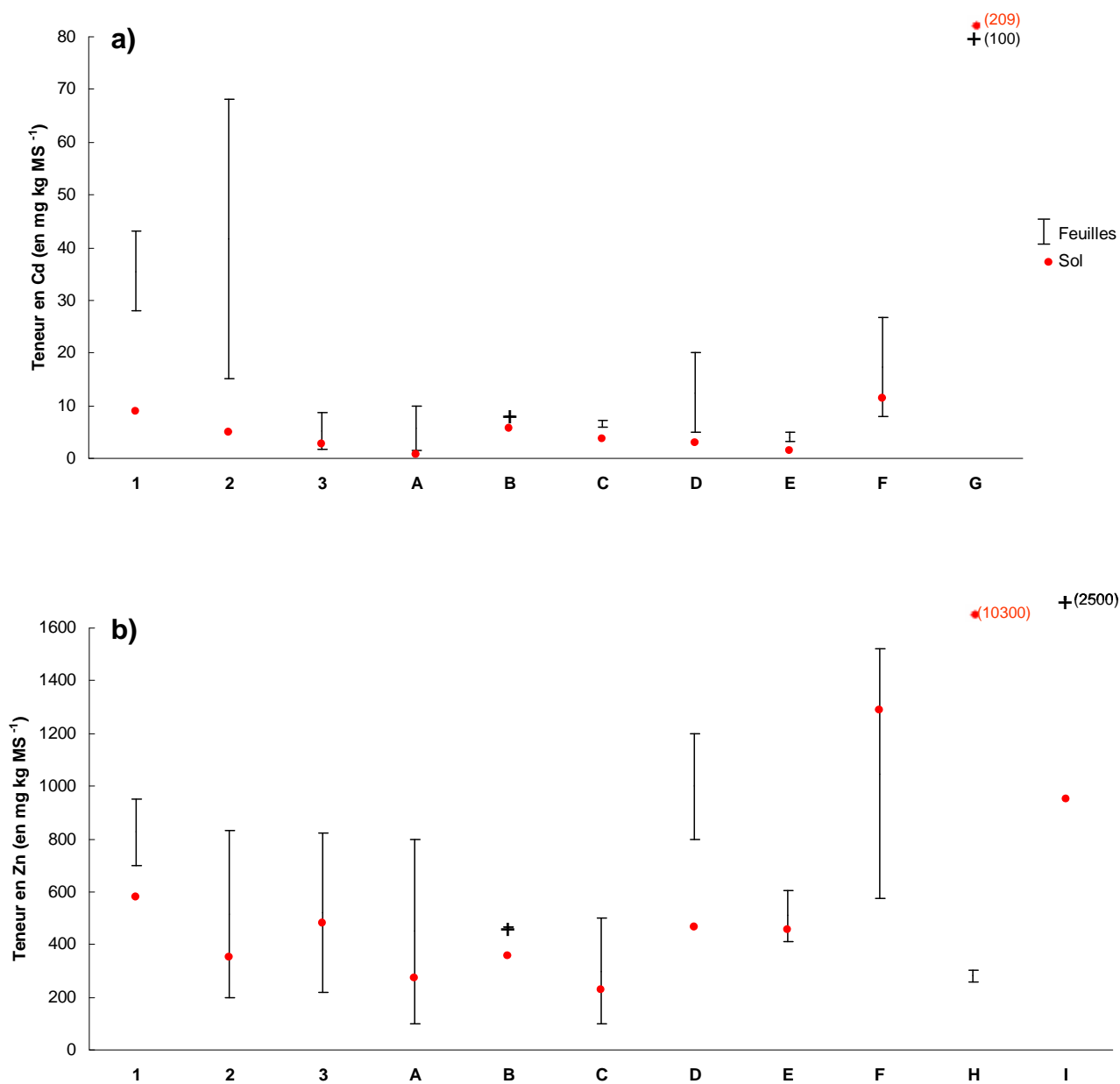


Figure 56: Comparaison des teneurs en Cd (a) et en Zn (b) mesurées sur les sites de Métaeurop, Pierrelaye et Leforest dans le sol et dans les feuilles de peuplier avec les données disponibles dans la bibliographie.

1 : Métaeurop ; 2 : Leforest ; 3 : Pierrelaye ; A : Laureysens et al. (2004) ; B : Mertens et al. (2004) ; C : Chang et al. (2005) ; D : Unterbrunner et al. (2007) ; E : Dominguez et al. (2008) ; F : Vandecasteele et al. (2008) ; G : Robinson et al. (2000) ; H : Sebastiani et al. (2004) ; I : Castiglione et al. (2009).

IV.3. Discussion sur les résultats obtenus sur les parcelles expérimentales de Leforest et et Pierrelaye

Les teneurs en métaux mesurées dans le sol du site de Leforest sont inférieures à celles mesurées sur le site de Métaeurop. En effet, le site de Leforest est contaminé par 248 mg Pb kg MS⁻¹, 350 mg Zn kg MS⁻¹ et 4,9 mg Cd kg MS⁻¹ mais n'est pas contaminé par le Cu (20 mg kg MS⁻¹) ni le Ni (22 mg kg MS⁻¹). Cependant, les métaux contaminants présentent une forte biodisponibilité (mis à part le Pb : moins de 1% biodisponible) puisque 1 à 10% du Zn est biodisponible et 5 à 24% pour le Cd. Les plus faibles concentrations en métaux totaux dans le sol par rapport au site de Métaeurop sont alors compensées par une importante biodisponibilité de ceux-ci. En effet, les accumulations de Cd et Zn sont semblables dans les tissus foliaires des peupliers issus du site de Métaeurop et du site expérimental de Leforest. Les teneurs en métaux mesurées dans le sol du site de Pierrelaye sont moins importantes en Cd (2,76 mg Cd kg MS⁻¹) mais équivalentes en Zn et en Pb (respectivement 482 et 276 mg kg MS⁻¹). Les teneurs en Cu sont supérieures à celles du site de Leforest (136 mg Cu kg MS⁻¹).

Les teneurs en Cd dans les feuilles varient entre cultivars (Figures 44 & 45). Aussi, à Leforest le cv. Lena accumule plus de 75 mg Cd kg MS⁻¹ alors que le Triplo n'accumule que 15 mg Cd kg MS⁻¹, soit un facteur de l'ordre de 5 entre le cultivar qui accumule le plus et celui qui accumule le moins. Les teneurs mesurées sur le site de Pierrelaye sont de 2 à 8 mg Cd kg MS⁻¹ donc plus faibles ce qui s'explique notamment par une pollution moindre en Cd dans le sol. Les plus fortes teneurs en Cd recensées dans la bibliographie sont de 209 mg Cd kg MS⁻¹ pour le *P. trichocarpa* x *P. deltoides* (Robinson et al., 2000 ; Figure 56). Cela signifie que le peuplier a la capacité d'accumuler davantage que les résultats trouvés dans la présente étude. Ainsi, s'il est planté sur un site plus pollué ou si le Cd de ce site est plus disponible qu'à Leforest, un peuplier devrait accumuler davantage de Cd.

Les teneurs en Zn varient également entre cultivars puisque, pour le site de Leforest, on mesure 820 mg Zn kg MS⁻¹ chez le cv. Lena contre 210 mg Zn kg MS⁻¹ chez le Triplo soit une variation d'un facteur 4 entre le cultivar qui accumule le plus et celui qui accumule le moins (Figure 46). Les teneurs en Zn sur le site de Pierrelaye sont du même ordre et sont de 150 à 830 mg Zn kg MS⁻¹.

Tableau 58: facteurs de bioconcentration moyens en Cd pour les sites de Pierrelaye et Leforest.

	Leforest		Pierrelaye
Lena (D)	14,26	Vesten (DxN)	2,45
Muur (DxN)	9,39	Lena (D)	2,44
Vesten (DxN)	8,59	Flevo (DxN)	2,31
Skado (TxM)	8,05	Soligo (DxN)	1,93
Fritzi Pauley (T)	8,02	Koster (DxN)	1,88
Soligo (DxN)	7,93	Dorskamp (DxN)	1,84
Flevo (DxN)	7,91	Dvina (D)	1,50
Dorskamp (DxN)	7,09	Muur (DxN)	1,36
I-214 (DxN)	7,02	Triplo (DxN)	1,11
Trichobel (T)	6,82	Fritzi Pauley (T)	1,05
Dvina (D)	6,33	I-214 (DxN)	0,99
Triplo (DxN)	3,17	Skado (TxM)	0,99
		Trichobel (T)	0,97
		Bakan (TxM)	0,96

Les teneurs en Ni sur le site de Leforest sont moins variables bien qu'un facteur de l'ordre de 2 soit tout de même présent entre le cv. Lena (11,3 mg kg MS⁻¹) et le Trichobel (6,3 mg kg MS⁻¹). Les teneurs observées sur le site de Pierrelaye sont plus importantes puisqu'elles atteignent 46 mg Ni kg MS⁻¹ chez le cv. Dvina. Les teneurs en Cr sont encore moins variables que le Ni.

Concernant le Cu, nous sommes bien en deçà des teneurs mesurées par Castiglione et al. (2009) où 400 mg Cu kg MS⁻¹ étaient mesurées dans les feuilles sur un site contenant environ 1200 mg Cu kg MS⁻¹ mais ceci reste facilement explicable par une teneur en Cu soixante fois moins importante sur le site expérimental de Leforest que dans cette étude. Sur le site de Pierrelaye, la teneur la plus élevée est de 30 mg Cu kg MS⁻¹ (cv. Flevo) pour une teneur totale dans le sol 9 fois moins importante. Cependant, les facteurs de bioconcentration correspondants sont faibles et ne permettent pas de conclure à une accumulation du Cu par le peuplier.

L'utilisation des FB est préférable aux teneurs car cela permet de s'affranchir du biais causé par la variabilité des teneurs en métaux dans le sol. Les FB en Cd sur le site de Leforest sont supérieurs à ceux de Pierrelaye car l'extractibilité du Cd par le nitrate d'ammonium est dix fois plus importante sur ce site (Tableau 58). Le plus important FB mesuré est deux fois moins important que sur *S. viminalis* (27,9) mesuré par Klang-Westin & Eriksson (2003) en sachant que la pollution au Cd de nos sites expérimentaux n'est pas extrêmement élevée. Cependant, le FB mesuré est assez élevé pour conclure que le peuplier est un bon accumulateur de Cd.

Les FB mesurés pour le Zn sont inférieurs à ceux mesurés pour le Cd allant de 2,4 pour le cv. Lena à 0,6 pour Triplo sur le site de Leforest (Tableau 52). Sur le site de Pierrelaye, ils sont de 1,6 (cv. Lena) à 0,35 (cv. Trichobel). Les FB doivent être supérieurs à 1 pour parler d'espèce accumulatrice. Cependant, ces valeurs sont du même ordre que celles décrites dans la littérature (1,71 chez *S. viminalis*, Hammer, 2003 ; et 4,5 pour *P. nigra*, Unterbrunner et al., 2007).

Les FB du Ni mesurés sur le site de Pierrelaye sont de 2,26 (cv. Dvina) à 0,23 (cv. Muur). Nous n'avons pas trouvé de référence bibliographique portant sur une accumulation de Ni par le peuplier, ce résultat est donc particulièrement intéressant.

Les FB des autres métaux sont inférieurs à 1 donc ce ne sont pas des espèces accumulatrices de ces métaux, ce qui n'est pas étonnant car le sol étudié n'est que peu pollué par les autres métaux hormis le Pb qui est connu pour ne pas être accumulé dans les parties aériennes.

Enfin, nous avons étudié également l'effet saisonnier sur la teneur en métaux dans les feuilles. Il en ressort que les teneurs en Cd sont deux fois moins importantes en juillet qu'au mois d'octobre. Les différences observées entre les teneurs en Zn à ces deux périodes sont moins importantes.

De plus, nous avons étudié les concentrations en métaux sur les peupliers plantés un an auparavant mais également sur les peupliers regarnis deux mois auparavant. Sur le site de Leforest, nous avons ainsi mesuré entre 5 et 10 mg Cd kg MS⁻¹ pour les peupliers regarnis contre 15 à 35 mg Cd kg MS⁻¹ pour les peupliers âgés de 1 an. De même, nous obtenons 50 à 250 mg Zn kg MS⁻¹ pour les regarnis contre 150 à 600 mg Zn kg MS⁻¹ pour les peupliers âgés de 1 an. Les métaux sont donc moins accumulés sur des peupliers récemment plantés, les teneurs en Cd et en Zn étant bien moins importantes que pour les peupliers en place depuis plus d'un an.

Les premiers résultats sont très encourageants puisqu'il y a bien accumulation de métaux et notamment de Cd et de Zn dans tous les cultivars et sur les 2 sites. De plus, dans le cas de Leforest situé à proximité du site de Métaeurop, les résultats obtenus sur des arbres âgés de 6 mois sont déjà comparables à ceux obtenus sur des arbres de 10 ans plantés sur des sites voisins (sites A, B et C ; Figure 56). Le peuplier semble donc capable d'accumuler rapidement les métaux présents dans le sol. Ces données sont comparables à celles de la littérature même si l'étendue est plus élevée pour nos valeurs surtout dans le cadre de Leforest, ce qui est dû à l'important panel de cultivars testés (Figure 56). Le potentiel accumulateur de Cd est par conséquent très dépendant du cultivar.

De plus, les cultivars performants sur un site le sont également sur l'autre (Figure 56) ce qui est très encourageant également car ce sont 2 sites complètement différents tant par leur composition en métaux que par leur ressource en eau (l'un est irrigué, l'autre pas). Aussi, cette première étude nous permet de conclure que les cv. Lena, Vesten et Flevo sont d'excellents candidats pour la phytoremédiation de sols pollués au Zn et au Cd. Les *trichocarpa* et hybrides de *trichocarpa* sont de moins bons candidats et ce surtout sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye qui est moins humide que celle de Leforest.

De plus, certains cultivars accumulent assez bien le Ni: Dvina, Lena, Dorskamp, Bakan et Flevo sur le site de Pierrelaye uniquement. Or la teneur totale en Ni est identique à celle mesurée sur le site de Leforest donc il semblerait que le Ni soit bien plus disponible sur le site de Pierrelaye.

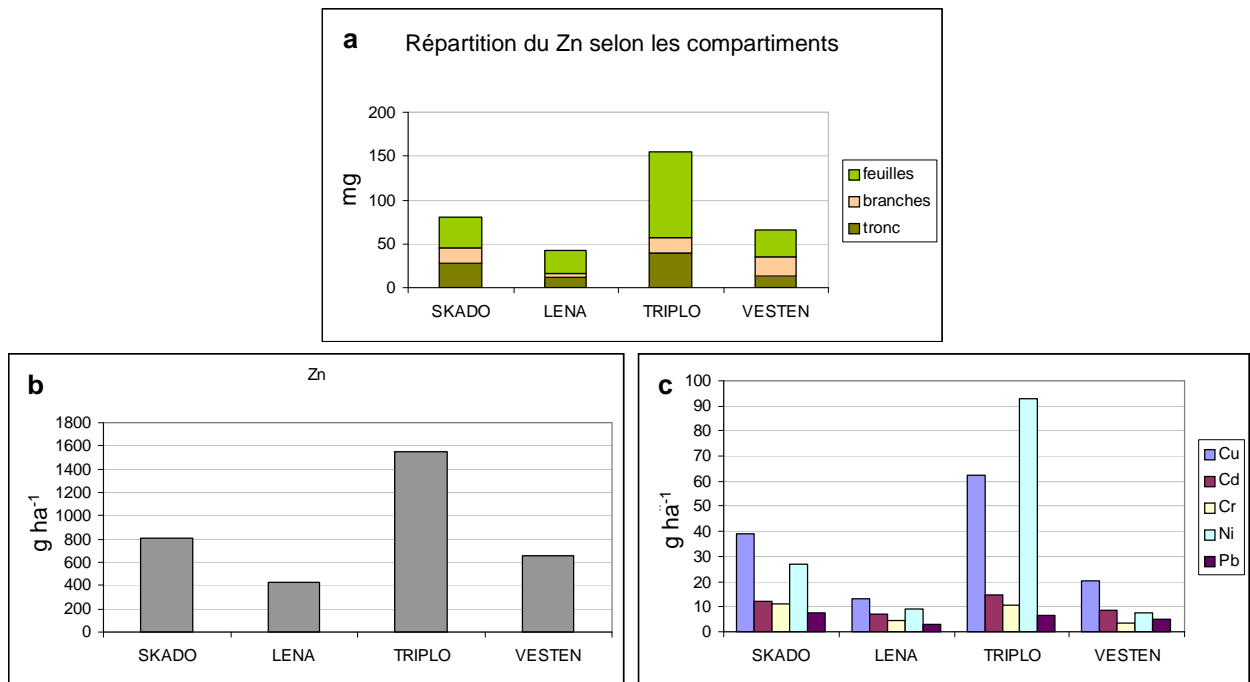


Figure 57: Estimation des biomasses produites par 4 cultivars plantés en mode TTCR sur le site de Pierrelaye. Les cultivars analysés sont Skado, Lena, Triplo et Vesten plantés dans le bloc 4 du site de Pierrelaye (d'après J.Y Gautry, communication personnelle).

- (a) Répartition du Zn selon les compartiments de l'arbre.
- (b) Estimation de la quantité totale de Zn extraite par unité de surface (g ha^{-1})
- (c) Estimation de la quantité totale de Cu, Cd, Cr, Ni et Pb extraite par unité de surface (g ha^{-1})

Nous avons testé 12 à 14 cultivars de peuplier sur 2 sites expérimentaux dont l'historique de pollution diffère. Ce ne sont pas des sites extrêmement pollués mais ils reflètent les pollutions recensées sur de nombreux sites en France. Le point le plus positif de cette étude est que ce sont les mêmes cultivars qui accumulent davantage le Cd et le Zn sur ces 2 sites donc nous pouvons penser qu'ils ont un réel potentiel de phytoextraction du Cd et du Zn.

Concernant le site de Pierrelaye, nous avons séparé les modes TCR et TTCR afin de tester une éventuelle différence d'accumulation entre eux. Pour l'instant il n'y a pas de différence significative entre les 2 modes de traitement. Concernant les données d'octobre 2007, l'absence de différence semblait logique étant donné que les peupliers n'étaient âgés que de 6 mois. Concernant les données de juillet 2008, nous préférons ne pas comparer les modes TCR et TTCR étant donné que les TCR avaient été regarnis cette année, d'où un biais possible sur les résultats. D'autres prélèvements pourront être réalisés l'année prochaine pour comparer les accumulations entre traitements.

Pour compléter ces données, il sera essentiel de connaître les biomasses produites par ces cultivars et cela sur les 2 sites. Les biomasses ont été estimées sur 4 cultivars plantés en TTCR sur le site de Pierrelaye (Figure 57). Il en ressort que le cv. Triplo qui accumulait moins de Zn et de Cd que les autres cultivars possède une biomasse plus importante et donc une quantité de métaux extraite par unité de surface plus importante que les autres cultivars. Le cv. Triplo accumule ainsi $1,5 \text{ kg Zn ha}^{-1}$ alors que le cv. Lena accumule $0,4 \text{ kg Zn ha}^{-1}$. De plus, cela confirme que les métaux sont préférentiellement accumulés dans les feuilles.

Il faudra donc estimer les biomasses de tous les cultivars et ce sur les deux sites avant de conclure totalement sur ce point mais cela confirme bien l'utilité de planter les peupliers en site expérimental et de prendre en compte à la fois les paramètres croissance et accumulation de métaux.

Chapitre V

Réponses du peuplier à une exposition métallique en conditions contrôlées

Le troisième objectif de ma thèse était de tester la réponse du peuplier à une exposition métallique en conditions contrôlées afin de comparer ces résultats à ceux obtenus sur sites expérimentaux. Une première étude a porté sur 25 cultivars commerciaux de peupliers comprenant également la douzaine de cultivars plantés sur les sites de Pierrelaye et Leforest. Ces cultivars ont été testés en culture hydroponique avec des milieux contenant des concentrations précises en métaux. Une seconde étude consistait à planter en pots des boutures de quelques cultivars sur sol contaminé provenant de nos deux sites expérimentaux. Ces études en chambre phytotronique permettent de contrôler notamment le régime hydrique (culture en pots), le pH et les concentrations en métaux (culture hydroponique). Elles permettent également de mesurer des paramètres physiologiques tels que les biomasses des feuilles, des tiges, des racines. Enfin, nous avons étudié la localisation des métaux dans les feuilles et les tiges de peupliers soumis à une exposition métallique.

V.1. Teneurs en métaux de plusieurs cultivars de peupliers cultivés en hydroponie

V.1.1. Essais préliminaires

Afin de mettre au point la technique de culture hydroponique il a tout d'abord fallu tester le substrat et l'âge optimal des boutures (voir § II.3.1) ainsi que la solution nutritive la plus adaptée.

Une fois ces conditions mises au point, nous avons pu mettre en culture des boutures de *P. nigra* (N), cv. Beaupré (TxD) et cv. Ghoy (DxN). Parallèlement à des mesures de croissance nous avons quantifié les métaux présents à la fois dans les feuilles, les tiges et les racines.

Pour chaque espèce ou cultivar testé, deux bacs sont utilisés en parallèle : un bac dit « témoin » (sans métaux) et un bac dit « avec métaux » (10 μM Cd, Cu, Ni et Pb et 200 μM de Zn). La solution nutritive de base (Tableau 32) ainsi que le pH sont identiques dans les deux conditions testées. La durée de l'expérience est de 1 mois.

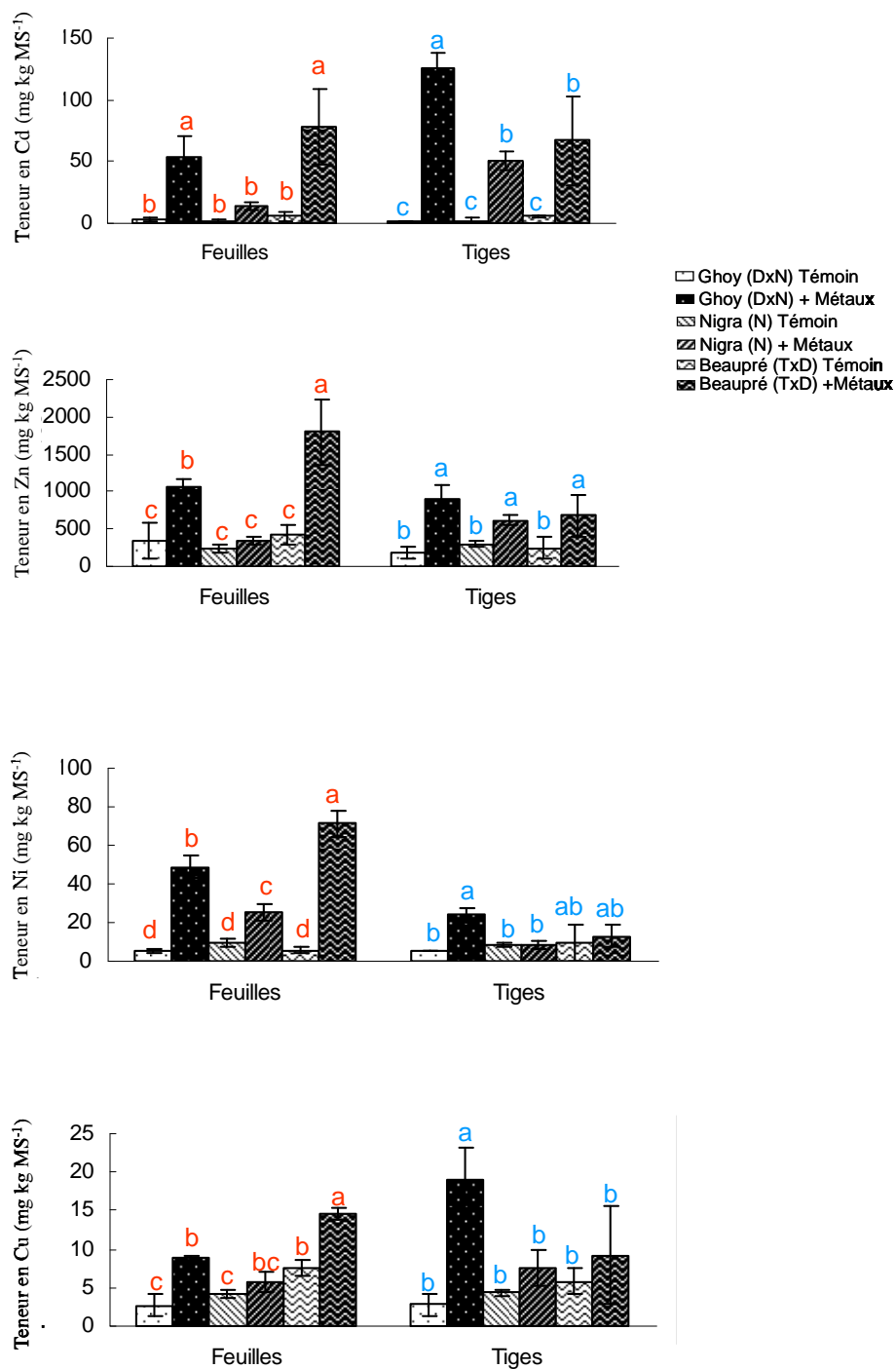


Figure 58: Teneurs en Cd, Zn, Ni et Cu dans les feuilles et les tiges de 3 espèces / cultivars de peupliers cultivés par hydroponie.

Les teneurs en métaux de *P. nigra* et des cv. Beaupré et Ghoy sont représentées à la fois pour le traitement « témoin » et le traitement « avec métaux ». Ce sont les moyennes pour chaque espèce / cultivar et pour chaque condition (« avec métaux » ou « témoin ») ± les écart-types (n=8).

Une analyse statistique (ANOVA) permet de déterminer les différences significatives entre cultivars / espèces (P< 0,005).

V.1.1.1. Cadmium

Les teneurs en Cd dans les feuilles et dans les tiges des bacs « témoins » sont inférieures à 10 mg kg MS^{-1} voire quasi nulles (Figure 58).

Concernant les bacs « avec métaux », les teneurs en Cd sont globalement plus élevées dans les tiges (sauf pour le cv. Ghoy), elles sont de 50 à $130 \text{ mg kg MS}^{-1}$ contre 20 à 80 mg kg MS^{-1} dans les feuilles (Figure 58). Dans le cas des feuilles comme dans celui des tiges, le *P. nigra* présente toujours des teneurs en Cd plus faibles que les autres cultivars. Si on considère les concentrations dans les feuilles, le Beaupré est le cultivar qui accumule le plus de Cd. A l'inverse c'est le cv. Ghoy qui accumule le plus de Cd dans les tiges. Le cv. Beaupré accumule environ 5 fois plus le Cd dans ses feuilles que le *P. nigra*. Les cv. Ghoy et Beaupré accumulent significativement plus de Cd que le *P. nigra*.

V.1.1.2. Zinc

Les teneurs en Zn pour les témoins varient de 300 à $400 \text{ mg kg MS}^{-1}$ (Figure 58). Il est logique de retrouver une accumulation en Zn de base étant donné qu'il y a du Zn dans la solution nutritive. Les concentrations en Zn sont plus élevées dans les feuilles que dans les tiges et ce pour tous les cultivars étudiés (de 500 à $1800 \text{ mg kg MS}^{-1}$). De même que pour le Cd, les concentrations en Zn du *P. nigra* sont inférieures aux autres cultivars. Le cv. Beaupré accumule presque 2 fois plus de Zn dans ses feuilles que le cv. Ghoy.

V.1.1.3. Nickel

Les teneurs pour le témoin sont de 5 à 10 mg kg MS^{-1} . Les concentrations dans les feuilles sont plus importantes que dans les tiges. Le cv. Beaupré est le peuplier qui accumule le plus de Ni dans ses feuilles (70 mg kg MS^{-1}) et le *P. nigra* celui qui accumule le moins (10 mg kg MS^{-1}). Dans les tiges, le cv. Ghoy accumule davantage (25 mg kg MS^{-1}) le Ni que les autres peupliers où il y a peu de différence entre le « témoin » et le traitement « avec métaux ».

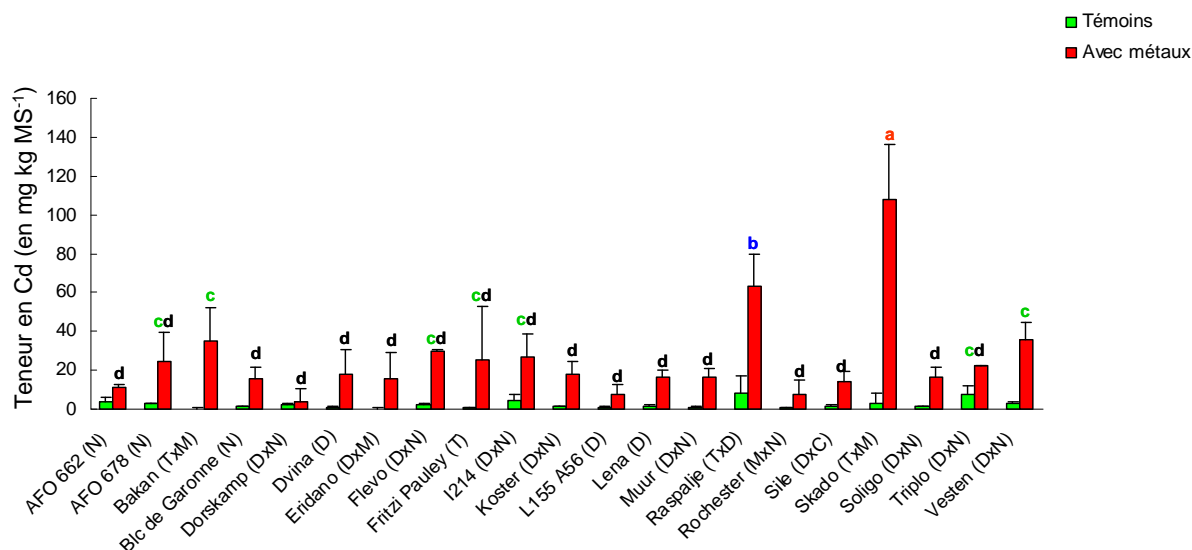


Figure 59: Teneurs en Cd dans les feuilles de 21 cultivars de peupliers cultivés en hydroponie. Les teneurs en Cd sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition (« avec métaux » ou « témoin ») ± les écart-types (n=8). L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre cultivars ($p < 0,005$).

Tableau 59: Concentrations foliaires en Cd des cultivars testés en culture hydroponique.

Cultivar	Teneur foliaire en Cd (mg kg MS ⁻¹)
Skado (TxM)	108,19
Raspalje (TxD)	63,13
Vesten (DxN)	35,49
Bakan (TxM)	34,91
Flevo (DxN)	29,71
I-214 (DxN)	26,48
Fritzi Pauley (T)	25,60
AFO 678 (N)	24,54
Triplo (DxN)	22,17
Dvina (D)	18,20
Koster (DxN)	18,10
Soligo (DxN)	16,58
Lena (D)	16,28
Muur (DxN)	16,26
Eridano (DxM)	15,96
Blanc de Garonne (N)	15,67
Sile (DxC)	13,86
AFO 662 (N)	11,52
Rochester (MxN)	7,47
L155 A56 (D)	7,19
Dorskamp (DxN)	3,89

V.1.1.4. Cuivre

La différence de teneur entre le témoin et le traitement avec métaux est moins importante que pour les autres métaux. En effet, ici la différence est d'un facteur 2 à 3. Encore une fois, le cv. Beaupré accumule davantage de Cu dans les feuilles que les autres espèces / cultivars. De plus, *P. nigra* présente une très faible différence entre le témoin et le traitement avec métaux. Tout comme pour les autres métaux, la teneur mesurée dans les tiges est plus élevée pour le cv. Ghoy et ici la différence est encore plus significative (Figure 58).

V.1.2. Etude des teneurs en métaux dans les feuilles de 25 cultivars de peuplier

Les essais préliminaires ont montré des différences d'accumulation entre espèces / cultivars. De plus, ces différences varient entre les feuilles et les tiges mais également entre métaux donc il semblerait qu'il y ait un effet tissulaire en plus d'un effet clonal. Cette étude a donc pu être utilisée à plus large échelle.

Nous avons reçu du FCBA 25 cultivars de peuplier sous forme de boutures. Certains cultivars sont également testés sur sites pollués dans le cadre du projet PHYTOPOP afin de comparer les résultats obtenus en champ et en conditions de laboratoire (Tableau 28). Ces différents cultivars de peuplier ont été cultivés en hydroponie et nous pouvons comparer les teneurs en métaux présentes dans les feuilles, les tiges et les racines des individus ayant poussé avec et sans métaux. En plus de ces mesures en ICP-AES, les croissances respectives de ces peupliers ont été mesurées.

Certains cultivars comme Trichobel et Nisqually n'ont pas survécu lors de leur passage en culture hydroponique. D'autres comme Rap et A4A ont difficilement survécu et il ne restait que 2 individus en fin de test ce qui a donné des résultats difficilement interprétables. Au final nous ne présentons donc les résultats que pour 21 cultivars.

Dans un premier temps, nous n'avons mesuré que les concentrations en métaux dans les feuilles car c'est dans le tissu foliaire que les métaux sont le plus accumulés sur le terrain (voir chapitre IV).

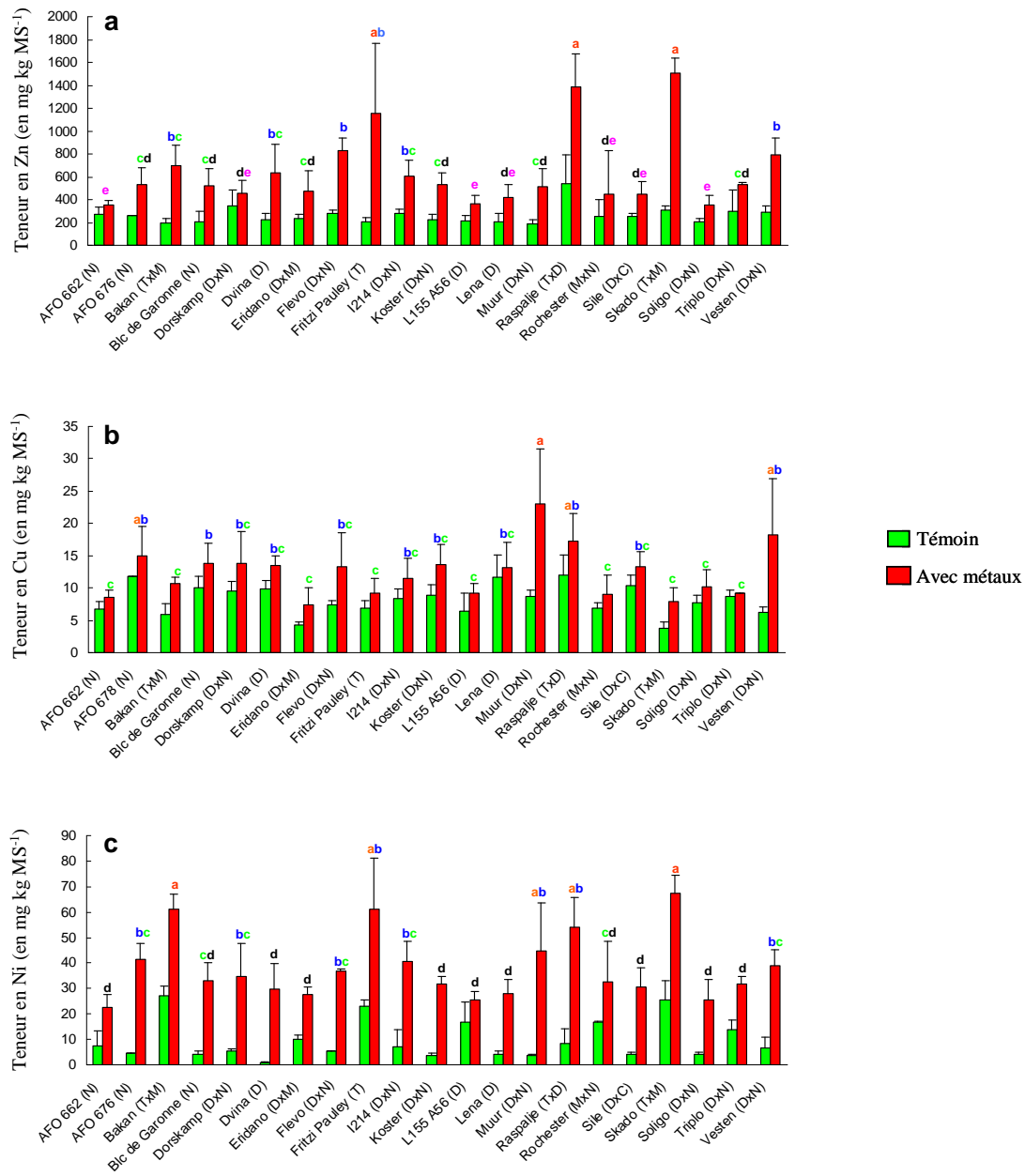


Figure 60: Teneurs en Zn (a), Cu (b) et Ni (c) dans les feuilles de 21 cultivars de peupliers cultivés en hydroponie (Test statistique : ANOVA, $p < 0,005$).

Les teneurs en métaux sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition (« avec métaux » ou « témoin ») \pm les écart-types ($n=8$). L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre cultivars ($p < 0,005$).

V.1.2.1. Cadmium

Les teneurs en Cd mesurées sur les peupliers témoins sont toutes inférieures à 5 mg kg MS⁻¹ (sauf le cv. Raspalje qui présente une teneur un peu supérieure mais également un écart-type élevé).

En culture hydroponique, les cultivars qui semblent accumuler le mieux le Cd appartiennent majoritairement à l'espèce *trichocarpa* (Figure 59 & Tableau 59) puisque 3 des 4 cultivars en tête de ce classement sont des hybrides de *P. trichocarpa* ou des *trichocarpa* purs. Un bon nombre de ces cultivars ont une teneur foliaire en Cd comprise entre 15 et 25 mg kg MS⁻¹. Un facteur de l'ordre de 15 est observé entre les cultivars qui accumulent le plus (Skado, Raspalje, Bakan et Fritzi Pauley) et celui qui accumule le moins (L155A56). Cela met donc bien en évidence une différence d'accumulation entre cultivars. Si on considère le test statistique, seuls les cv. Skado et Raspalje ont une teneur foliaire en Cd significativement différente des autres cultivars.

V.1.2.2. Zinc

Une concentration basale d'environ 200 mg Zn kg MS⁻¹ est mesurée pour tous les cultivars excepté le Raspalje (500 mg kg MS⁻¹ environ mais avec un écart-type élevé).

Les concentrations en Zn pour les différents cultivars des traitements avec métaux sont de 400 à 1400 mg kg MS⁻¹ (Figure 60). Les 3 cultivars qui accumulent le plus le Zn sont dans l'ordre Skado, Raspalje et Fritzi Pauley, soit des hybrides de *P. trichocarpa*. Un facteur de l'ordre de 4 est observé entre les cultivars qui accumulent le plus (Skado, Raspalje et Fritzi Pauley) et ceux qui accumulent le moins (L155A56, Soligo et AFO 662).

V.1.2.3. Cuivre et nickel

Peu de différences sont observées entre cultivars pour ces 2 métaux. En effet, les valeurs les plus élevées sont de 70 mg kg MS⁻¹ (Skado) et les plus faibles de 30 mg kg MS⁻¹ (L155A56) pour le Ni. Pour le Cu les valeurs fluctuent entre 23 mg kg MS⁻¹ (Muur) et 7 mg kg MS⁻¹ (Eridano).

Les teneurs en Cu (Figure 60) mesurées pour le « témoin » et pour le traitement « avec métaux » sont peu différentes. Cela peut être dû à une concentration en Cu trop faible même

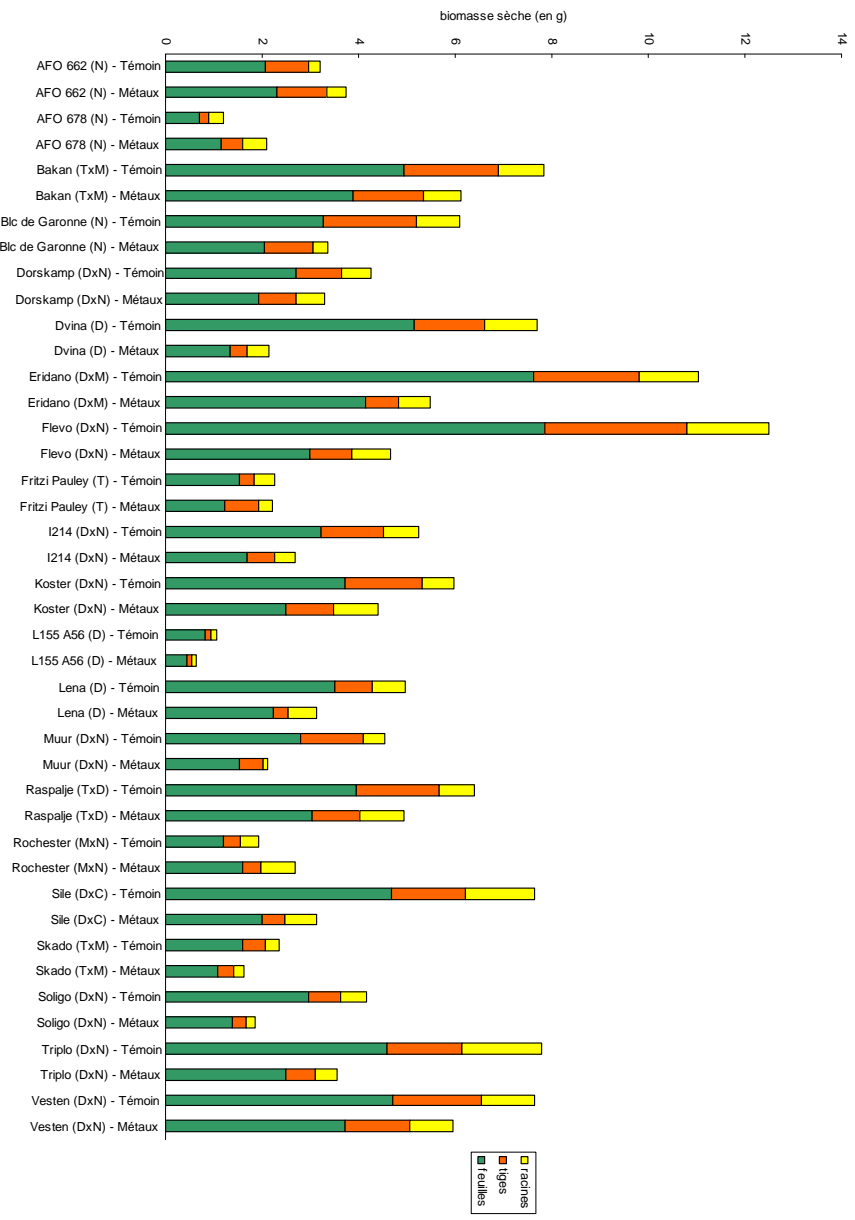


Figure 61: Biomasse foliaire, racinaire et des tiges des différents cultivars. Les biomasses sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition (« avec métaux » ou « témoin ») sur 8 réplicats.

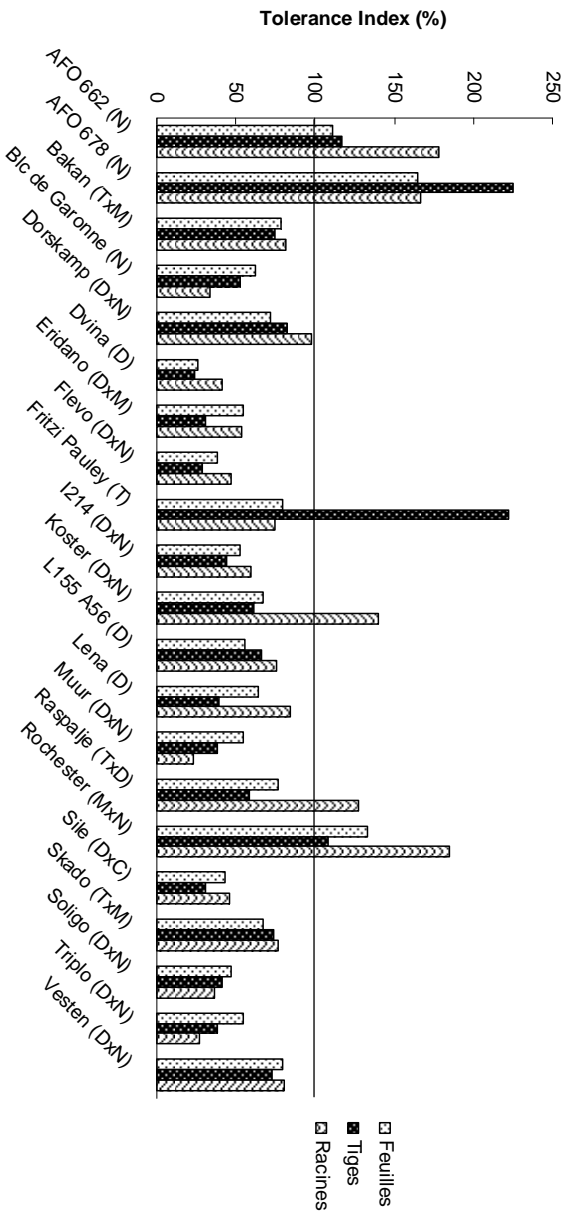


Figure 62: Index de tolérance des 21 cultivars. L'index de tolérance est calculé selon la formule suivante : (biomasse sèche avec métaux / biomasse sèche témoin)*100.

s'il n'est pas étonnant d'obtenir pour le peuplier de faibles teneurs en Cu étant donné les faibles facteurs de bioconcentration mesurés sur les sites expérimentaux.

V.1.2.4. Plomb

Les concentrations en Pb dans les feuilles n'ont pas été calculées car lors des analyses des métaux dans les tissus, nous nous situons la quasi-totalité du temps en dessous du seuil de détection.

V.1.2.5. Mesure de la biomasse

La teneur en un élément métallique dans un tissu donné est une donnée importante mais ce n'est pas la seule donnée essentielle. En effet, il est important de considérer également la biomasse produite (Figure 61). Un cultivar peut accumuler énormément, être sensible aux métaux et ne pas pousser ou au contraire un cultivar peut présenter une biomasse importante qui compense une plus faible concentration en métal par unité de biomasse.

Quand on considère la somme des biomasses des feuilles, des tiges et des racines, on constate tout d'abord que la biomasse foliaire est la plus importante (elle représente environ 2/3 de la biomasse totale). De manière générale, la biomasse totale est plus faible pour les traitements avec métaux que pour les témoins.

Une autre façon de représenter la biomasse est l'utilisation de l'index de tolérance (Figure 62). En effet, si la biomasse est plus importante (donc supérieure à 100 %) dans le cas du traitement avec métaux cela signifie que le cultivar tolère bien le traitement et qu'il croît mieux qu'en absence de contamination métallique. Il n'est pas étonnant de trouver peu d'index de tolérance supérieurs à 100 %. Ce n'est le cas que pour les cultivars AFO 662 et AFO 678 ainsi que Rochester. Or ce sont des cultivars qui, de manière générale n'accumulent pas de fortes quantités de métaux lourds. Par contre, il semblerait que d'autres cultivars comme Bakan, Dorskamp, Koster, Fritzi Pauley, Lena, Raspalje, Skado et Vesten soient intéressants car ils ont des index de tolérance intermédiaires.

Une fois les données de biomasse et de teneurs en métaux établies, il est nécessaire de calculer la masse de métaux accumulée par plant (Figure 63). Il en ressort que le Raspalje, le

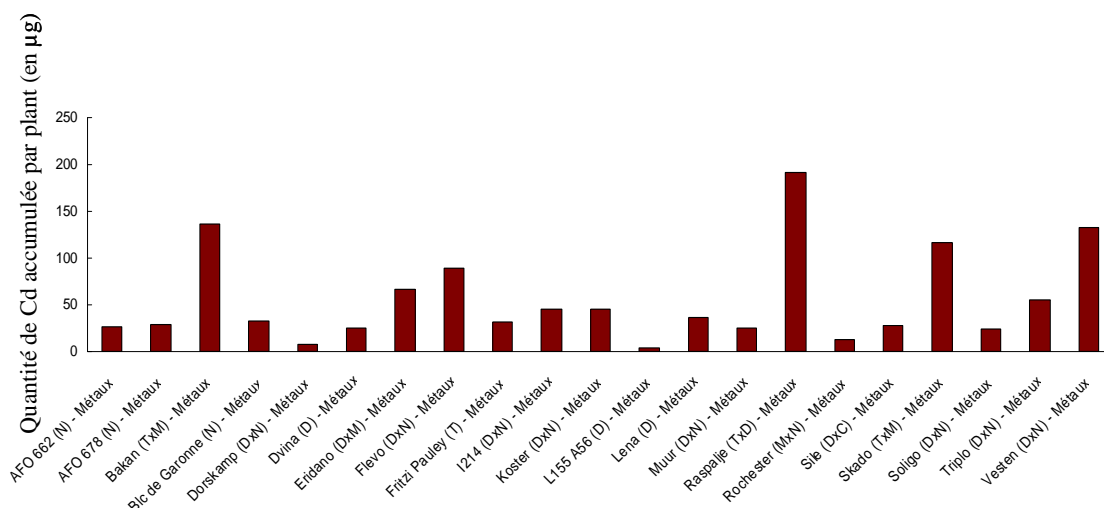


Figure 63: Quantité de Cd foliaire accumulée par plant et par cultivar (exprimée en µg de Cd). Les moyennes sont calculées sur 8 réplicats.

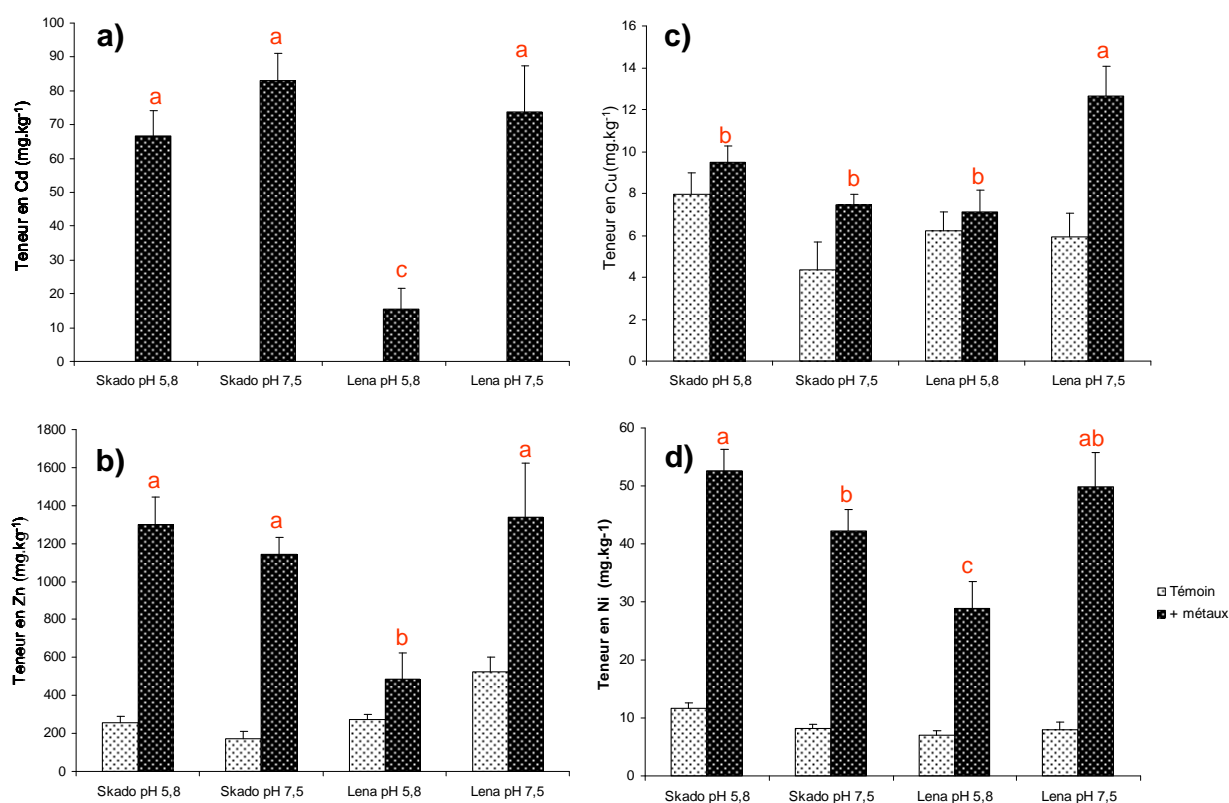


Figure 64: Teneurs en Cd (a), Zn (b), Cu (c) et Ni (d) dans les feuilles de cv. Skado et Lena cultivés en hydroponie à pH 5,8 et pH 7,5. Les teneurs en métaux sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition (+ métaux ou témoin / pH5,8 ou pH7,5) ± les écart-types de 8 réplicats. L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre les 2 pH pour les traitements « avec métaux » ($p < 0,005$).

Bakan et le Skado et le Vesten sont les cultivars les plus performants dans l'accumulation de Cd en conditions de culture hydroponique.

V.1.3. Influence du pH sur l'accumulation de métaux pour le Lena et le Skado

Nous avons voulu tester une hypothèse à savoir l'influence du pH. En effet, nous avons un pH de 5,8 en culture hydroponique contre environ 7 sur site. Le pH le plus adapté pour les peupliers étant de 7,5, nous avons testé l'influence du pH sur l'accumulation de métaux en culture hydroponique. Nous avons choisi ces deux cultivars car ce sont ceux qui présentaient une forte variation entre les résultats en culture hydroponique et ceux sur site.

En ce qui concerne le Cd, une faible variation est observée entre les 2 pH pour le cv. Skado (Figure 64). Par contre, les teneurs observées pour le cv. Lena varient beaucoup, de l'ordre d'un facteur 4. En effet, à pH 5,8, la concentration en Cd dans les feuilles du cv. Lena est nettement inférieure à celle du Skado. A pH 7,5, il n'y a pas de différence significative entre les teneurs mesurées chez le cv. Skado et chez le Lena.

Les mêmes conclusions peuvent être données pour le Zn, il y a peu de variation entre les 2 pH pour le cv. Skado et une variation importante pour le cv. Lena (Figure 64). De plus, une petite différence est également observée pour le cv. Lena témoin avec une teneur plus élevée à pH 7,5. Une tendance est observée pour le cv. Skado avec une plus faible accumulation à pH 7,5 et ce dans le cas du témoin et du traitement avec métaux. Concernant le Lena il ne s'agit plus d'une tendance mais bien d'une différence significative entre l'accumulation à pH 5,8 et celle à pH 7,5. Le Lena accumule davantage de Zn, tout comme pour le Cd à pH 7,5 alors que la capacité d'accumulation du cv. Skado n'est que faiblement altérée par cette différence de pH.

Les teneurs en Cu sont globalement plus faibles à pH 7,5 pour le cv. Skado et plus élevées à pH 7,5 pour le Lena par rapport au pH 5,8 que nous avons utilisé jusqu'à présent (Figure 64). De plus, nous avons constaté, par rapport à ce que nous avons observé pour le Cd et le Zn, que le cv. Lena accumulait significativement plus de Cu que le Skado à pH 7,5.

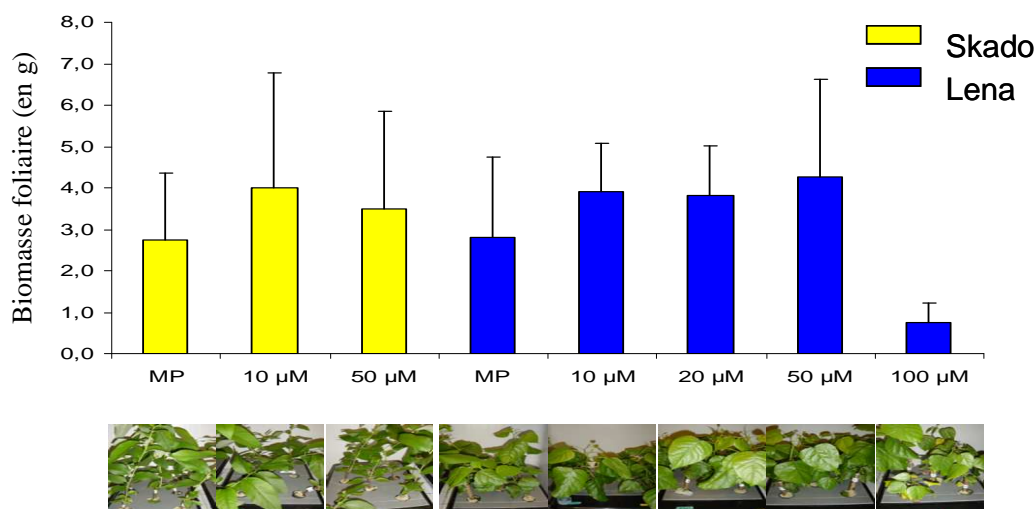


Figure 65: Biomasse foliaire des cultivars Skado et Lena cultivés en hydroponie avec des concentrations croissantes en Cd. MP : Multipollution (10μM Cd, Cu, Ni, Pb et 200 μM Zn) ; 10 à 100 μM de Cd dans les autres traitements. Les biomasses (en g) sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition ± les écart-types de 8 réplicats.

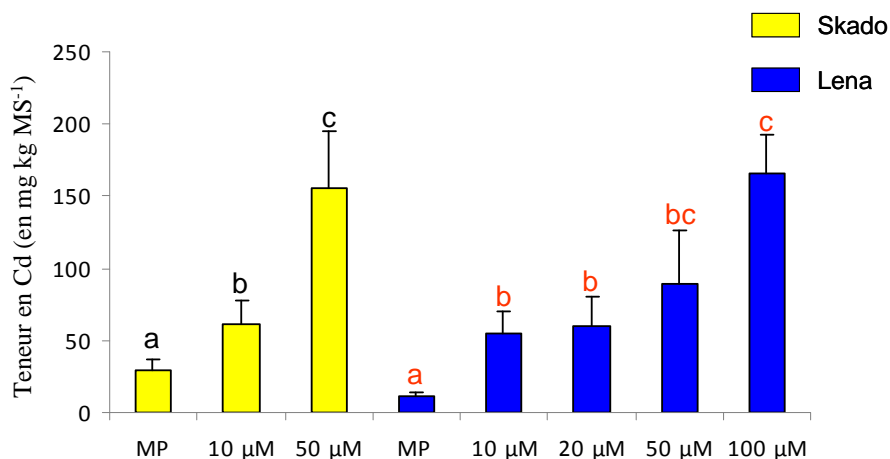


Figure 66: Teneurs en Cd dans les feuilles des cultivars Skado et Lena cultivés en hydroponie avec des concentrations croissantes en Cd. MP : Multipollution (10μM Cd, Cu, Ni, Pb et 200 μM Zn) ; 10 à 100 μM de Cd dans les autres traitements. Les biomasses (en g) sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition ± les écart-types de 8 réplicats. L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre les traitements (p<0,005).

Les concentrations en Ni pour le témoin sont plus ou moins identiques pour les deux cultivars et pour les deux pH (Figure 64). Les teneurs mesurées dans les feuilles sont supérieures à pH 7,5 pour le cv. Lena et inférieures pour le Skado. Cependant, la différence entre les 2 pH est bien plus évidente pour le cv. Lena.

De manière générale le cv. Skado est peu influencé par le pH alors que le Lena l'est énormément.

V.1.4. Effet d'une concentration croissante en Cd sur les cultivars Lena et Skado

Nous avons testé en parallèle les cv. Skado (TxM) et Lena (D) avec différentes concentrations en Cd (de 10 à 100 μM) mais également avec la même multi-pollution que celle utilisée pour tous les tests précédents (10 μM de Cd mais aussi 10 μM de Cu, de Pb et de Ni et 200 μM de Zn).

Nous voulions vérifier trois choses en effectuant cette expérience :

- S'il y avait une différence d'accumulation entre une multi-pollution et une pollution à un seul métal sachant que la concentration en Cd était la même
- Si la teneur en Cd augmentait dans les feuilles proportionnellement à la teneur dans le milieu ou si à partir d'une certaine concentration dans le milieu le peuplier était saturé et ne pouvait pas accumuler davantage.
- A partir de quelle concentration en Cd dans le milieu le peuplier était trop stressé pour se développer correctement.

V.1.4.1. Paramètres physiologiques

Nous avons mesuré la masse sèche foliaire, racinaire, et des tiges ainsi que la proportion en eau dans les feuilles pour les différents traitements et les deux cultivars (Figure 65). Il en ressort de manière générale que ces paramètres restent les mêmes pour des concentrations de 10 à 50 μM de Cd dans le milieu et que le peuplier semble moins stressé que lors d'une multi-pollution. Ces paramètres sont encore nettement plus altérés à 100 μM de Cd. Il semblerait donc que physiologiquement parlant, une concentration de 100 μM soit la

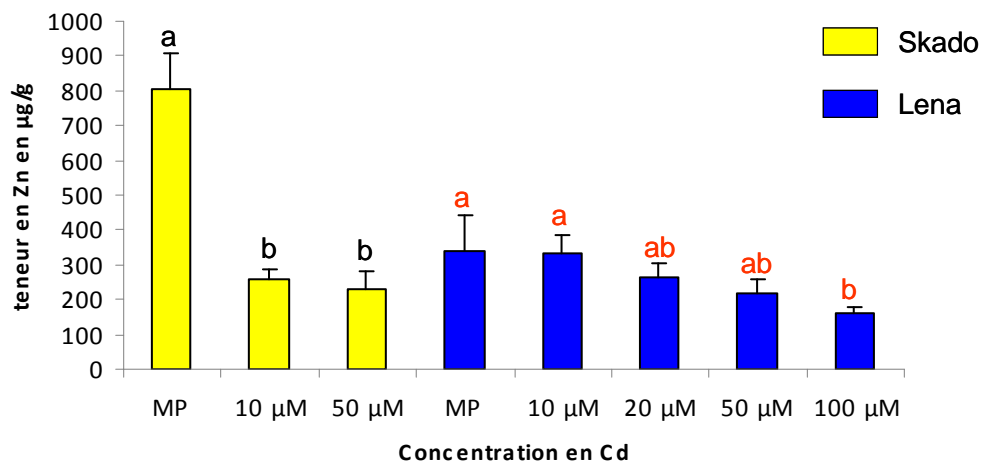


Figure 67: Teneurs en Zn dans les feuilles des cv. Skado et Lena cultivés en hydroponie avec des concentrations croissantes en Cd. MP : Multipollution (10µM Cd, Cu, Ni, Pb et 200 µM Zn) ; 10 à 100 µM de Cd dans les autres traitements. Les biomasses (en g) sont exprimées par les moyennes pour chaque cultivar et pour chaque condition ± les écart-types de 8 réplicats. L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre les traitements ($p < 0,005$).

concentration la plus élevée qu'un peuplier puisse supporter en culture hydroponique.

V.1.4.2. Teneurs en métaux dans les feuilles

La réponse à la dernière question vient d'être donnée en considérant les paramètres physiologiques. Nous allons répondre aux deux autres interrogations :

- Il y a une différence d'accumulation entre la multi-pollution et la pollution au Cd. Pour le cv. Skado cette différence est de l'ordre d'un facteur 2 et de 5 pour le Lena. Il y a donc une accumulation plus importante dans le cas d'une pollution à un seul métal, en tous cas pour le Cd. Cependant, il est rare de retrouver dans un sol une pollution à un seul métal.
- La concentration en Cd dans les feuilles ne cesse de croître lorsque la concentration croît dans le milieu (Figure 66).

Nous n'avons donc pas forcément atteint la concentration maximale, surtout pour le cv. Skado pour lequel il manquerait un point à 100 μM de Cd. Cependant, comme nous l'avons dit précédemment, le peuplier montre des signes de stress avec une concentration de 100 μM en Cd dans le milieu donc il semble difficilement envisageable d'observer une teneur supérieure à 160 mg Cd kg MS⁻¹ pour le cv. Lena.

Une teneur supérieure à 150 mg Cd kg MS⁻¹ est cependant envisageable pour le cv. Skado étant donné que nous n'avons pas mis plus de 50 μM de Cd dans le milieu. En effet, les teneurs en Cd dans les feuilles du cv. Skado et du cv. Lena sont comparables alors qu'il y a 50 μM de Cd dans le milieu nutritif du Skado contre 100 μM de Cd dans celui du Lena. A 10 μM en Cd dans le milieu il n'y avait pas de différence d'accumulation entre les deux cultivars. La différence commence à être évidente à partir de 20 μM dans le milieu nutritif du cv. Lena où la teneur est équivalente à celle mesurée pour 10 μM dans le milieu du cv. Skado. Par contre pour un milieu 5 fois plus concentré en Cd (entre 10 et 50 μM de Cd), nous n'observons pas une concentration 5 fois plus importante dans les feuilles. En effet, nous avons dans ce cas une concentration deux fois plus importante dans les feuilles du cv. Lena et trois fois plus importante dans les feuilles du cv. Skado. De plus, entre 50 et 100 μM de Cd dans le milieu, pour le cv. Lena ce rapport reste de 2.

Il n'est pas étonnant de voir une teneur en Zn constante dans le cadre d'une pollution au Cd (Figure 67). Ceci s'explique tout simplement par le fait qu'il y a du Zn dans le milieu nutritif de base. Cependant, on observe une petite diminution de concentration en Zn dans les feuilles de Lena à partir de 20 μM de Cd dans le milieu. Cette diminution pourrait s'expliquer par une compétition d'absorption entre le Cd et le Zn étant donné que ces 2 métaux utilisent

les mêmes transporteurs de métaux. De même, les teneurs en Fe, Ca, P, Mn diminuent également à partir de 20 μM dans le milieu.

V.1.5. Comparaison des résultats de culture hydroponique avec ceux obtenus sur sites expérimentaux

Rappelons que nous avons mesuré une teneur de 8 mg Cd kg MS^{-1} dans les feuilles du cv. Vesten sur le site de Pierrelaye et 67 mg Cd kg MS^{-1} dans les feuilles du cv. Lena sur la parcelle expérimentale de Leforest. En culture hydroponique, des teneurs intermédiaires entre ces 2 valeurs sont mesurées pour la plupart des cultivars mais le Skado cultivé en hydroponie présente une teneur plus importante (108 mg Cd kg MS^{-1}).

Nous avons quantifié des teneurs en Zn de l'ordre de 800 mg kg MS^{-1} à la fois sur la parcelle de Pierrelaye et sur celle de Leforest et ce pour le cv. Lena qui était le meilleur accumulateur dans les deux cas. Nous avons mesuré en culture hydroponique dans la plupart des cas des teneurs inférieures à celles observées sur les sites et pour les hybrides de *trichocarpa* des valeurs supérieures à celles-ci.

Concernant le Cu, les teneurs en hydroponie sont comparables à celles mesurées sur site car il y avait 25 mg Cu kg MS^{-1} dans les feuilles du cv. Vesten sur le site de Pierrelaye et 10 mg kg MS^{-1} dans les feuilles du cv. Skado sur le site de Leforest.

Les teneurs en Ni sont en général significativement différentes entre le « témoin » et le traitement « avec métal ». La teneur basale foliaire varie de 5 à 20 mg Ni kg MS^{-1} . Rappelons que nous avons mesuré 42 mg Ni kg MS^{-1} dans les feuilles du cv. Dvina sur le site de Pierrelaye et 12 mg kg MS^{-1} dans les feuilles du cv. Lena sur le site de Leforest. Les teneurs observées en culture hydroponique pour la plupart des cultivars varient entre 20 et 40 mg kg MS^{-1} et sont donc du même ordre que celles mesurées sur site. Les cultivars qui accumulent le plus de Ni sont le Skado et le Bakan (hybrides TxM) avec 60 mg Ni kg MS^{-1} dans leurs feuilles ce qui représente une quantité non négligeable. Ces 2 cultivars ont des teneurs en Ni significativement différentes des autres cultivars. Sur site, nous avons trouvé des facteurs de bioconcentration en Ni importants uniquement sur le site de Pierrelaye et allant de 0,84 (Fritzi Pauley) à 1,19 (Bakan) pour les *P. trichocarpa* et leurs hybrides, qui n'étaient pas les plus performants dans l'accumulation de Ni mais étaient tout de même parmi les premiers dans le classement.

En conclusion, si nous comparons les données que nous obtenons en culture hydroponique à celles obtenues sur site nous constatons que ce ne sont pas les mêmes cultivars qui accumulent dans les deux cas alors que les résultats étaient comparables entre sites. Il en ressort que les hybrides de *trichocarpa* semblent être les meilleurs candidats pour la phytoextraction de Cd et de Zn en culture hydroponique alors qu'ils faisaient partie des moins bons accumulateurs sur site.

Afin de tenter d'expliquer ces différences, nous avons testé l'influence du pH. En effet, le pH était ajusté à 5,8 lors des manipulations décrites précédemment or le pH du sol est est plus proche de 7 et il semblerait que le pH adapté au peuplier soit de 7,5 (Source: FCBA). De plus, la biodisponibilité étant plus importante lorsque le pH est acide donc nous aurions pu montrer de fortes variations d'accumulation entre les 2 pH testés à savoir 5,8 et 7,5. Nous avons pu démontrer une influence du pH sur l'accumulation de Cd et ce surtout pour le cv. Lena qui accumule davantage de Cd, Zn, Cu et Ni à pH 7,5. Les teneurs de base en Zn sont également supérieures à pH 7,5 pour le cv. Lena. Nous avons peut-être une piste qui permettrait d'expliquer les différences observées entre les mesures effectuées en culture hydroponique et celles effectuées sur les sites expérimentaux.

Nous avons comparé l'effet d'une pollution à un seul métal (Cd) à l'effet d'une multipollution. Une pollution à 10 μM de Cd engendre des teneurs foliaires en Cd plus importantes que dans le cas d'une multipollution (10 μM Cd + 10 μM Cu, Ni, Pb et 200 μM Zn). Cette différence est de l'ordre d'un facteur 2 pour le cv. Skado et 5 pour le cv. Lena. Nous avons également testé des concentrations croissantes en Cd afin d'estimer le potentiel maximal de ces cultivars. L'étude des biomasses met en évidence une nette diminution de la biomasse totale du cv. Lena entre 50 et 100 μM de Cd (Figure 65).

L'étude d'une pollution unique au Cd met en évidence une accumulation plus importante que dans le cadre d'une multipollution alors que la concentration en Cd est identique. De plus, nous pouvons conclure que les peupliers sont dans un état de stress notable lorsque ces concentrations en Cd deviennent trop importantes (à partir de 50 μM pour le cv. Lena). En effet, les nécroses deviennent plus nombreuses, la biomasse diminue et les teneurs en éléments tels que le Fe, Mg, P, Ca et Mn diminuent.

Nous pouvons conclure que les résultats obtenus en culture hydroponique ne sont pas corrélés avec ceux obtenus sur les sites expérimentaux, comme démontré par Stolz & Greger (2002). Ces différences peuvent s'expliquer par l'absence d'interactions entre les racines et les particules du sol, les bactéries, les champignons présents dans le sol et absents en culture hydroponiques ce qui affecte l'absorption et la translocation (Burd, 2000 ; Khan, 2000).

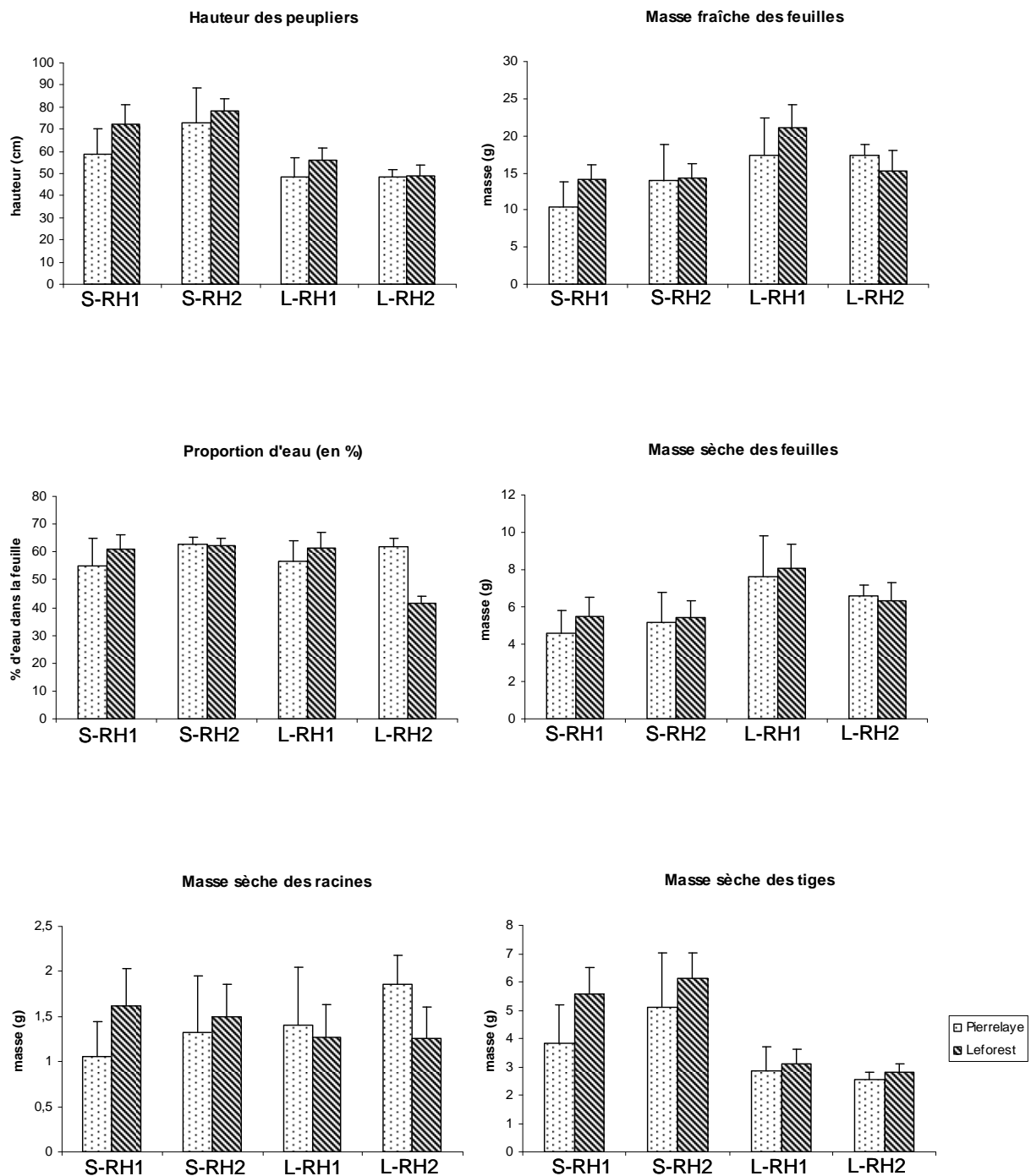


Figure 68 : Paramètres physiologiques des cv. Lena et Skado cultivés en pots durant 8 semaines sur du sol de Pierrelaye et de Leforest et dans 2 conditions hydriques différentes. RH1 : Régime hydrique 1 (arrosage non limitant) ; RH2 : Régime hydrique 2 (arrosage limitant). S : Skado; L : Lena. Les paramètres ont été mesurés sur 8 peupliers et représentent les moyennes pour chaque condition hydrique, chaque sol et chaque cultivar \pm leurs écart-types.

V.2. Etude des cultivars Skado et Lena cultivés en pots sur sol pollué (Pierrelaye et Leforest) et dans des conditions hydriques différentes

Dans le but d'expliquer les différences observées entre les résultats obtenus en culture hydroponique et ceux obtenus sur site, nous avons choisi d'adopter une technique intermédiaire à savoir l'étude de ces mêmes cultivars en chambre phytotronique mais en pots. Nous avons prélevé du sol sur nos deux sites expérimentaux (Pierrelaye et Leforest) et nous avons planté les cultivars Lena et Skado sur ces sols. Nous avons ajouté un paramètre supplémentaire en appliquant deux conditions hydriques différentes (750 ml d'eau par semaine pour le traitement dit RH1 et 250 ml d'eau par semaine pour le traitement dit RH2) afin de vérifier si les hybrides de *trichocarpa* accumulent mieux sur sol humide ce qui expliquerait pourquoi ils accumulent davantage en culture hydroponique. Et surtout, ceci devrait nous permettre de déterminer si cette technique est plus adaptée que la culture hydroponique pour le criblage de cultivars de peupliers et donc si les résultats sont comparables à ceux obtenus sur site.

V.2.1. Paramètres physiologiques

Nous avons comparé pour chaque sol, pour chaque cultivar et pour chaque condition hydrique la hauteur des peupliers, la masse fraîche et sèche des feuilles, la masse sèche des tiges, la masse sèche des racines (Figure 68) et la proportion en eau dans le sol mesurées en fin d'expérience (Figure 69).

Il en ressort que (Figure 68) :

- Le cv. Skado a une meilleure croissance en hauteur que le cv. Lena. Cependant, la masse foliaire est plus importante pour le Lena.
- Il y a peu de différence de croissance entre les plants cultivés sur les deux sols.
- La proportion en eau dans les feuilles est équivalente entre cultivars et entre sols sauf pour le traitement Lena « arrosage limitant » où la proportion en eau est bien plus faible pour le sol de Leforest.
- La masse sèche racinaire ne varie pas entre sols pour le cv. Skado « arrosage non limitant » et le cv. Lena « arrosage limitant ».
- La masse sèche des tiges est deux fois plus élevée chez le cv. Skado que chez le cv. Lena. Nous n'observons pas de différence significative entre les sols.

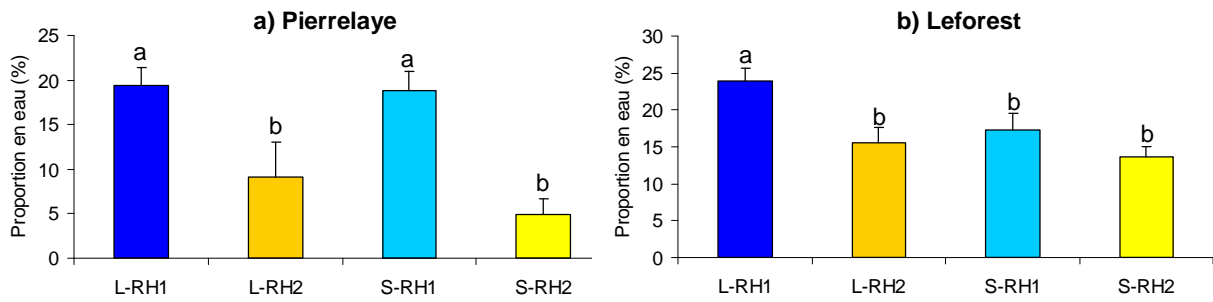


Figure 69: Proportion en eau dans les sols de Pierrelaye (a) et Leforest (b) dans deux conditions hydriques différentes. Les légendes de la figure 68 sont valables ici. Les proportions en eau dans le sol sont représentées par les moyennes \pm les écart-types de 8 réplicats. L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre les traitements hydriques ($p < 0,005$).

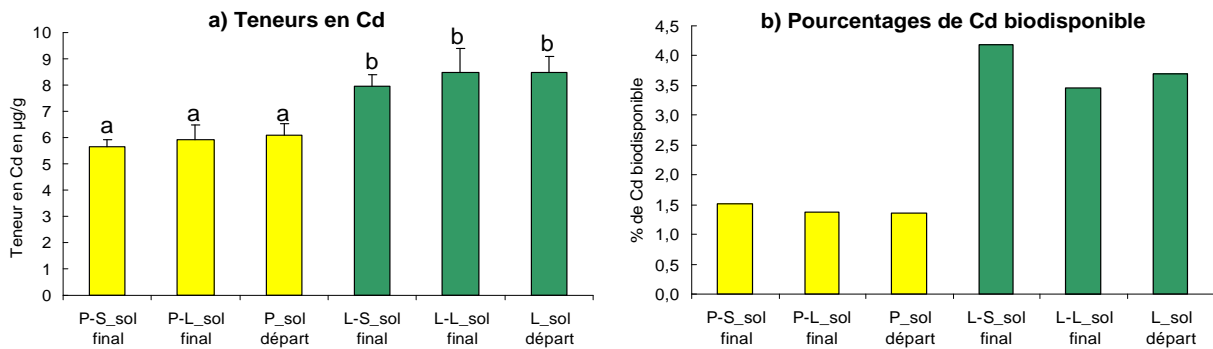


Figure 70: Teneurs en Cd totales (a) et proportions de Cd biodisponible (b) dans les sols de Pierrelaye (P) et Leforest (L) au départ (sol départ) et à la fin (sol final) de l'expérience. S : Skado ; L : Lena. Les teneurs en Zn sont représentées par les moyennes \pm les écart-types de 8 réplicats.

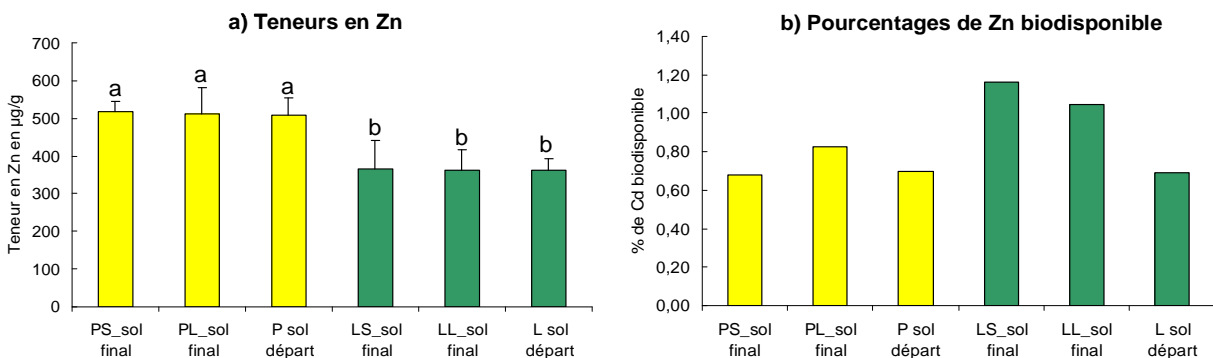


Figure 71: Teneurs en Zn totales (a) et proportions de Zn biodisponible (b) dans les sols de Pierrelaye (P) et Leforest (L) au départ (sol départ) et à la fin (sol final) de l'expérience. S : Skado ; L : Lena. Les teneurs en Zn sont représentées par les moyennes \pm les écart-types de 8 réplicats.

Une différence significative de proportion en eau est observée pour le sol de Pierrelaye, elle est moins nette pour le sol de Leforest et ce surtout pour le cv. Skado (Figure 69).

En effet, sur le sol de Pierrelaye dans les traitements « arrosage non limitant », le pourcentage en eau est de 20% pour les deux cultivars. Concernant le traitement « arrosage limitant », cette teneur en eau est de 10% pour le cv. Lena et 5% pour le cv. Skado. Il y a par conséquent une différence entre les deux traitements et le cv. Skado semble avoir utilisé davantage d'eau par apport au cv. Lena.

Sur le sol de Leforest, les teneurs sont moins variables : pour le cv. Lena, 24% d'eau pour le traitement « arrosage non limitant » contre 15% pour le traitement « arrosage limitant » et pour le cv. Skado, 18 % pour le traitement « arrosage non limitant » contre 13 % pour le traitement « arrosage limitant ».

En conclusion, le cv. Skado semble nécessiter de plus importantes ressources hydriques que le cv. Lena et cela sur les deux sols testés dans les mêmes conditions hydriques.

V.2.2. Teneurs en métaux dans les sols

Nous avons mesuré à la fois la teneur en métaux totaux et la teneur en métaux biodisponibles pour les deux sols étudiés.

Les teneurs en Cd totales sont d'environ 6 mg kg MS⁻¹ pour le sol de Pierrelaye et 8 mg kg MS⁻¹ pour le sol de Leforest. En plus d'avoir une teneur totale supérieure, le sol de Leforest est pollué par du Cd qui est 2 à 3 fois plus biodisponible (extractible au CaCl₂) que celui de Pierrelaye (Figure 70).

Les teneurs en Zn totales sont d'environ 500 mg kg MS⁻¹ pour le sol de Pierrelaye et 350 mg kg MS⁻¹ pour le sol de Leforest. Tout comme le Cd, le Zn est 2 fois plus biodisponible (extractible au CaCl₂) dans le sol provenant de Leforest que celui de Pierrelaye (Figure 71).

Les teneurs en autres métaux montrent que le sol de Pierrelaye est un peu plus pollué en Cr et beaucoup plus pollué en Cu que le sol de Leforest (Tableau 60). De plus, la biodisponibilité du Pb est 4 fois plus importante à Leforest qu'à Pierrelaye.

Les différences de biodisponibilité (extractible au CaCl₂) sont probablement dues aux paramètres intrinsèques des sols utilisés (pH, teneur en matières organiques,...).

Tableau 60: Teneurs totales en Cr, Cu, Ni et Pb des sols de Pierrelaye et Leforest (en mg kg MS⁻¹).

Métal	Pierrelaye	Leforest
Cu	154	22
Cr	72	55
Ni	22	23
Pb	240	230

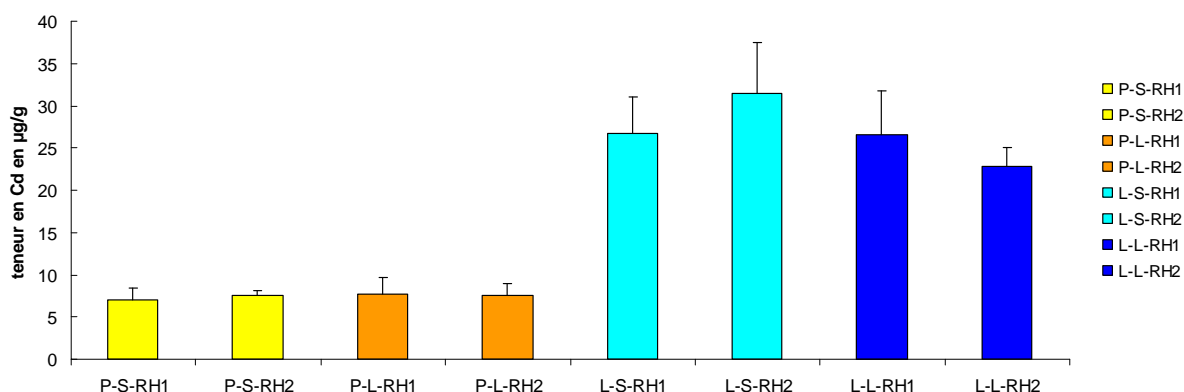


Figure 72 : Teneurs en Cd dans les feuilles de cv. Lena (L) et Skado (S) cultivés sur les sols de Pierrelaye (P) et Leforest (L) dans deux conditions hydriques différentes (RH1 : Régime hydrique 1 (arrosage non limitant) ; RH2 : Régime hydrique 2 (arrosage limitant)). Les teneurs en Cd dans les feuilles sont représentées par les moyennes ± les écart-types de 8 réplicats. Aucune différence significative entre les traitements hydriques pour chaque cultivar et pour chaque sol n'a été mise en évidence par ANOVA.

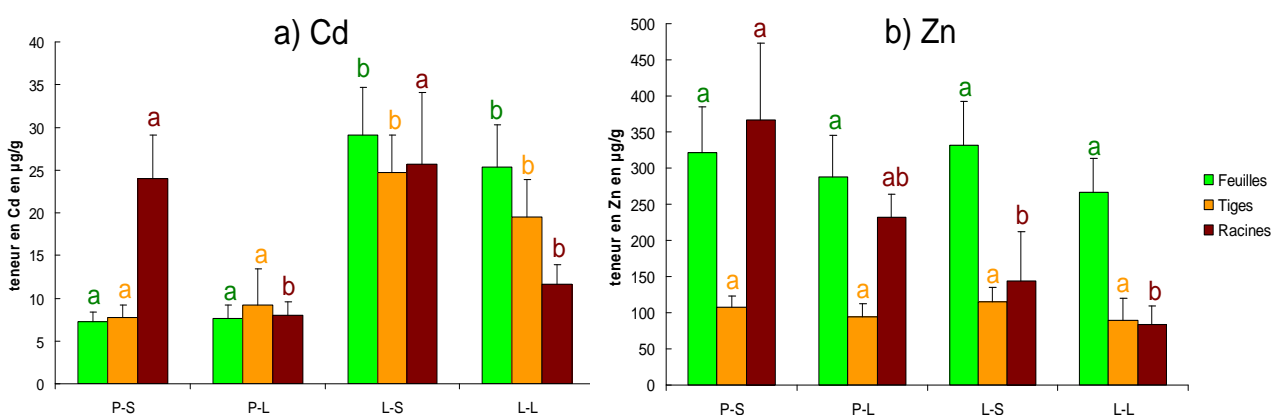


Figure 73 : Teneurs en Cd (a) et en Zn (b) dans les feuilles, les tiges et les racines de cv. Skado (S) et Lena (L) cultivés en pots sur sol de Pierrelaye (P) et de Leforest (L). Les teneurs en métaux représentés sont les moyennes ± les écart-types de 16 réplicats (les deux régimes hydriques sont regroupés). L'ANOVA permet de déterminer si la différence est significative entre les cultivars et entre les sols pour un même tissu ($p < 0,005$).

V.2.3. Teneurs en métaux dans les feuilles, les tiges et les racines de Lena et Skado

V.2.3.1. Cadmium

V.2.3.1.1. Sol de Pierrelaye

Nous pouvons comparer à la fois l'effet ressource hydrique (« arrosage limitant » ou « arrosage non limitant ») et l'effet cultivar sur le sol de Pierrelaye. Les teneurs en métaux dans les feuilles, dans les tiges, dans les racines ainsi que dans le sol ont été quantifiées.

La comparaison des deux traitements hydriques du cv. Lena ne met pas en évidence de différence significative, cependant nous observons une concentration plus élevée dans les tiges du traitement « arrosage limitant » (9,54 contre 8,89 mg Cd kg MS⁻¹) alors que l'inverse est observé pour les feuilles et pour les racines. Quant aux traitements du cv. Skado, aucune différence significative n'est mise en évidence alors que l'accumulation est un peu plus élevée dans les tiges et les racines du traitement « arrosage non limitant ». En résumé il y a peu de différence entre les traitements hydriques c'est pourquoi nous n'avons montré que les résultats concernant les teneurs dans les feuilles (Figure 72).

Une accumulation équivalente dans les feuilles et dans les tiges est observée pour les deux cultivars. L'accumulation au niveau des racines est par contre significativement plus élevée pour le cv. Skado (Figure 73). Concernant les teneurs en Cd dans les feuilles, peu de différences sont observées entre les deux traitements hydriques mais également entre les deux cultivars (Figure 72).

Etant donné que nous possédons les teneurs dans les feuilles, les tiges, les racines (Figure 73) et dans le sol (Tableau 60) il est possible de calculer des facteurs de bioconcentration. Les facteurs de bioconcentration dans les feuilles sont respectivement de 1,33 pour le cv. Lena et 1,30 pour le cv. Skado. Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux cultivars quant à l'accumulation de Cd dans les feuilles sur le sol de Pierrelaye.

V.2.3.1.2. Sol de Leforest

La comparaison des deux traitements hydriques du cv. Lena ne met pas en évidence de différence significative. Cependant, le cv. Lena accumule une quantité de Cd légèrement

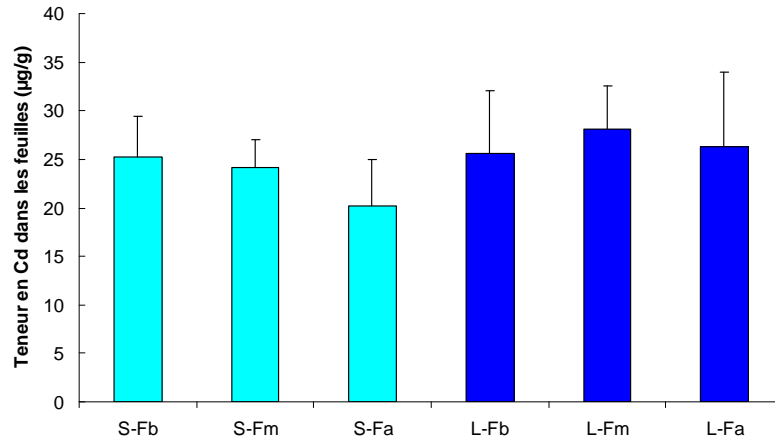


Figure 74: Teneurs foliaires en Cd des cv. Skado (S) et Lena (L) cultivés sur le sol de Leforest à trois étages foliaires différents : feuilles basales (Fb), médianes (Fm), apicales (Fa). Les teneurs en Cd représentés sont les moyennes \pm les écart-types de 6 réplicats (les deux régimes hydriques sont regroupés). Aucune différence significative entre étages foliaires n'a été mise en évidence par ANOVA.

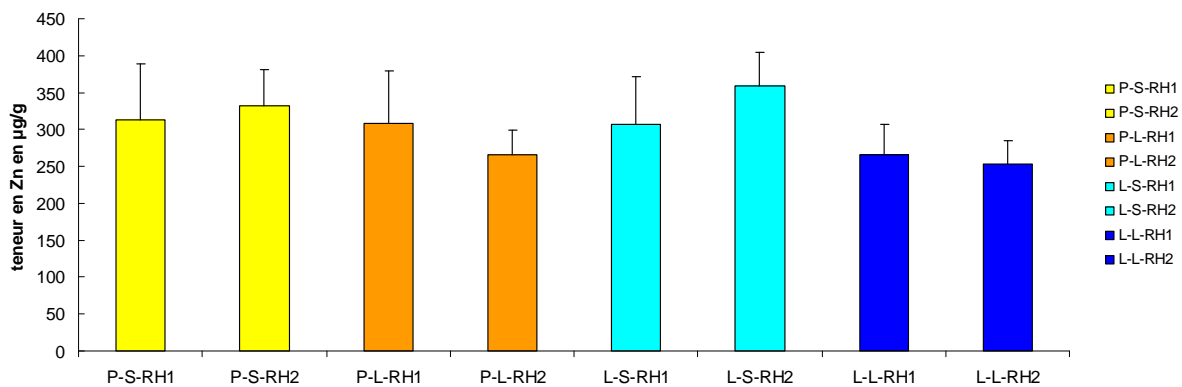


Figure 75: Teneurs en Zn dans les feuilles de cv. Lena (L) et Skado (S) cultivés sur les sols de Pierrelaye (P) et Leforest (L) dans deux conditions hydriques différentes (RH1 : Régime hydrique 1 « arrosage non limitant »; RH2 : Régime hydrique 2 « arrosage limitant »). Les teneurs en Zn dans les feuilles sont représentées par les moyennes \pm les écart-types de 8 réplicats. Aucune différence significative entre les traitements hydriques pour chaque cultivar et pour chaque sol n'a été mise en évidence par ANOVA.

Tableau 61: Teneurs foliaires en Cd et Zn (mg kg MS^{-1}) de l'arabette, des cv. Lena et Skado cultivés sur les sols de Pierrelaye et Leforest.

Sol	Teneur foliaire en Cd (mg kg MS^{-1})			Teneur foliaire en Zn (mg kg MS^{-1})		
	Arabette	Skado	Lena	Arabette	Skado	Lena
Pierrelaye	45	7.2	7.6	8396	321	287
Leforest	186	29.1	25.3	12761	332	267

supérieure dans le cas du traitement « arrosage non limitant » ce qui confirme la tendance observée avec les paramètres physiologiques (Figure 72).

Concernant les traitements du cv. Skado, le traitement « arrosage non limitant » montre une teneur foliaire en Cd un peu plus élevée que dans l'autre traitement hydrique.

Nous obtenons un facteur de bioconcentration de 2,89 pour le cv. Lena et 3,49 pour le cv. Skado. Le facteur de bioconcentration est légèrement plus élevé pour le cv. Skado, par conséquent, le Skado est le cultivar qui accumule le plus sur le sol de Leforest.

De plus, les teneurs foliaires en métaux ont été mesurées à 3 maturités différentes. Concernant le cv. Skado, les concentrations sont légèrement plus élevées dans les feuilles plus matures. Les teneurs sont plus importantes dans les feuilles basales, puis dans les feuilles médianes et enfin sont plus faibles dans les feuilles apicales. Concernant le cv. Lena, il est moins évident de conclure à une éventuelle différence étant donné l'importance relative des écart-types.

Nous avons également fait pousser de l'arabette (*Arabidopsis halleri*) sur ces deux mêmes sols (Tableau 61). Il en ressort une teneur de 45 mg Cd kg MS⁻¹ sur le sol de Pierrelaye soit une concentration 6,5 fois plus importante que le peuplier et de 186 mg Cd kg MS⁻¹ sur le sol de Leforest soit 6,6 fois plus que le peuplier.

V.2.3.2. Zinc

V.2.3.2.1. Sol de Pierrelaye

La comparaison des deux traitements hydriques du cv. Lena, ne met pas en évidence de différence significative même si une concentration foliaire en Zn plus élevée est observée pour le traitement « arrosage non limitant ». Quant aux traitements du cv. Skado, aucune différence significative n'est notée entre eux (Figure 75).

De plus, l'accumulation de Zn est équivalente dans les tiges des deux cultivars (Figure 73). L'accumulation au niveau des racines et des feuilles est quant à elle plus élevée pour le cv. Skado.

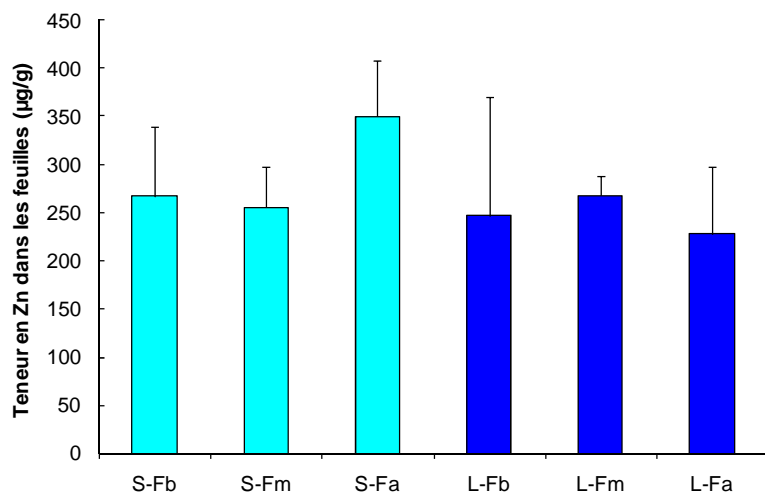


Figure 76: Teneurs foliaires en Zn de Skado (S) et de Lena (L) ayant poussé sur le sol de Leforest à trois étages foliaires différents : feuilles basales (Fb), médianes (Fm), apicales (Fa). Les teneurs en Zn représentés sont les moyennes ± les écart-types de 6 réplicats (les deux régimes hydriques sont regroupés). L'ANOVA ne révèle pas de différence significative entre étages foliaires.

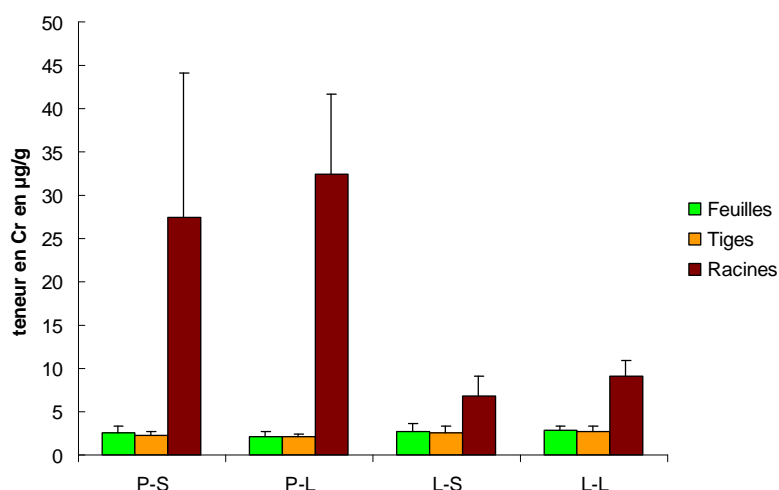


Figure 77: Teneurs en Cr dans les feuilles, les tiges, les racines des cv. Lena (L) et Skado (S) plantés sur sol de Pierrelaye (P) et de Leforest (L) durant 8 semaines. (n=16)

Tableau 62: Teneurs foliaires en Cr et Cu (mg kg^{-1} de MS⁻¹) de l'arabette, des cv. Lena et Skado cultivés sur les sols de Pierrelaye et Leforest.

Sol	Teneur foliaire en Cr (mg kg^{-1} de MS)			Teneur foliaire en Cu (mg kg^{-1} de MS)		
	Arabette	Skado	Lena	Arabette	Skado	Lena
Pierrelaye	3,7	2,6	2,1	12,1	5,6	4,0
Leforest	2,9	2,7	2,8	4,1	4,8	3,4

La concentration en Zn est 3 fois plus importante dans les feuilles que dans les tiges alors qu'elles étaient équivalentes dans le cas du Cd.

Nous obtenons un facteur de bioconcentration dans les feuilles de 0,58 pour le cv. Lena et 0,68 pour le cv. Skado donc il n'y a pas de différence significative entre les deux cultivars quant à l'accumulation de Zn dans leurs feuilles.

V.2.3.2.2. Sol de Leforest

Des facteurs de bioconcentration de 0,73 pour le cv. Lena et 0,89 pour le Skado sont mesurés, et mettent ainsi en évidence une accumulation de Zn plus importante du cv. Skado même si le FB est faible par rapport à celui du Cd.

La comparaison des 2 traitements du cv. Skado ne met pas en évidence de différence significative alors que l'accumulation de Zn est légèrement supérieure dans les feuilles du traitement « arrosage limitant ». Aucune différence entre les 2 traitements n'est observée pour le cv. Lena.

Concernant l'âge des feuilles, il semblerait que la teneur en Zn soit plus élevée pour les feuilles apicales soit les feuilles jeunes du cv. Skado, ce qui représente l'inverse de ce que nous avons observé pour le Cd (Figure 76).

La concentration mesurée dans l'arabette est de 8400 mg Zn kg MS⁻¹ sur le sol de Pierrelaye soit une teneur 26 fois plus importante que le peuplier et 12700 mg Zn kg MS⁻¹ sur le sol de Leforest soit une teneur 38 fois plus importante que le peuplier (Tableau 61). En comparaison avec le Cd, il y a une différence d'accumulation bien plus marquée entre l'arabette et le peuplier.

V.2.3.3. Chrome

Les teneurs en Cr sont similaires pour le peuplier et l'arabette (Tableau 62). De plus, il y a peu de différence d'accumulation entre les deux sols dans les feuilles et dans les tiges alors que les teneurs dans les racines sont plus élevées à Pierrelaye qu'à Leforest. La concentration en Cr dans le sol est plus importante à Pierrelaye mais la différence observée pour les teneurs dans les racines n'est pas du même ordre de grandeur et n'explique donc pas cette différence (Tableau 60).

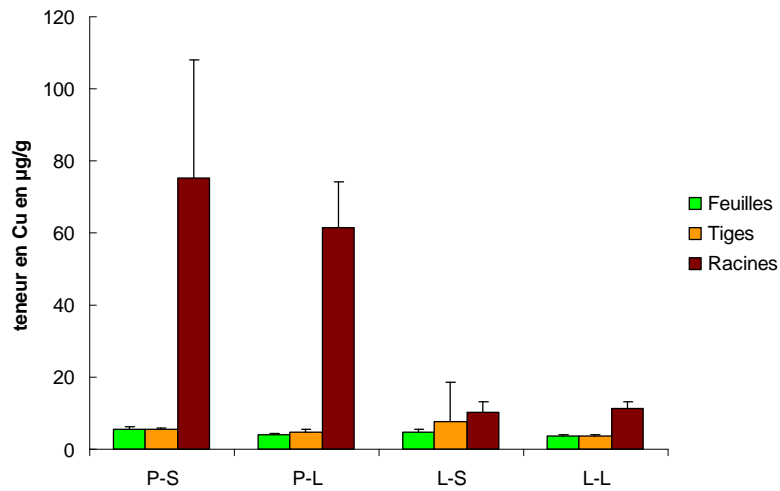


Figure 78: Teneurs en Cu dans les feuilles, les tiges, les racines des cv. Lena (L) et Skado (S) plantés sur sol de Pierreelaye (P) et de Leforest (L) durant 8 semaines. (n=16).

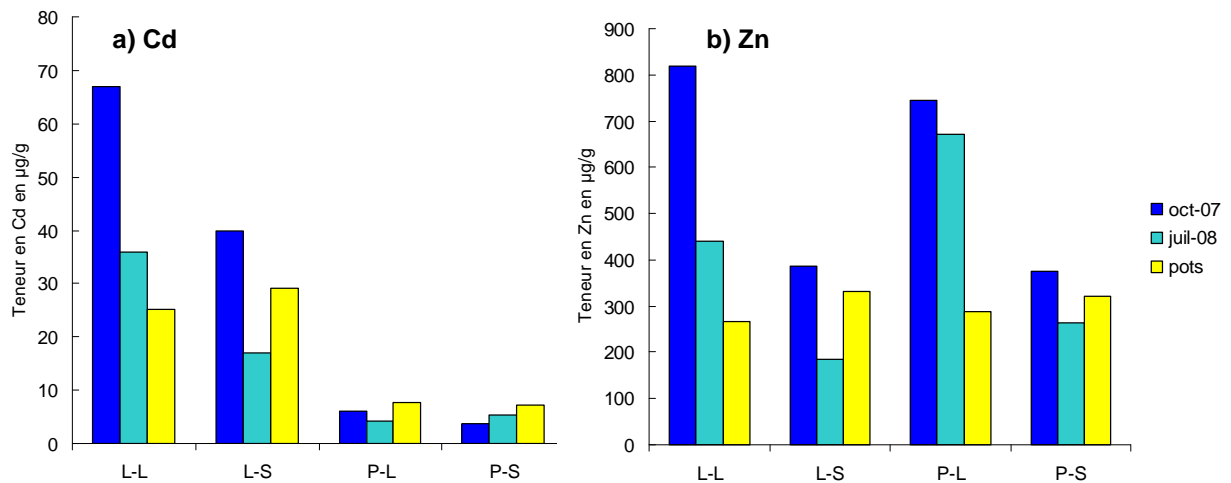


Figure 79: Comparaison des teneurs en Cd (a) et en Zn (b) dans les feuilles mesurées en pots après huit semaines de culture et sur sites expérimentaux des cultivars skado (S) et Lena (L) sur sol de Pierreelaye (P) et Leforest (L). Les valeurs représentent les moyennes obtenues pour chaque cultivar dans chaque condition de culture donnée (n= 20 sur site expérimental et n= 16 en pots).

V.2.3.4. Cuivre

La concentration est deux fois plus importante pour l'arabette que pour le peuplier sur le sol de Pierrelaye et est la même que celle du peuplier sur le sol de Leforest (Tableau 62). Pour les deux sols, les teneurs mesurées dans les feuilles du cv. Skado sont supérieures à celles du cv. Lena. De plus, les concentrations en Cu dans les racines des peupliers poussant sur le sol de Pierrelaye sont plus élevées que celles de Leforest.

V.2.3.5. Nickel

Les teneurs en Ni sont identiques pour les deux sols et aucune différence d'accumulation entre sols ni entre cultivars n'est observée.

V.2.4. Comparaison des données sur sites expérimentaux et en pots

Nous voulions vérifier si cette méthode de culture était adaptée pour un criblage de cultivars de peuplier, elle ne l'est pas. En effet, sur site nous trouvons une différence significative d'accumulation entre les cv. Skado et Lena (en faveur du Lena) et ici peu de différences entre cultivars sont observées et quand il y en a une, le résultat inverse à ce que l'on obtenait sur site est observé.

Il y a peu de différence entre les 2 traitements hydriques alors qu'un lot était arrosé en abondance et l'autre était 3 fois moins arrosé et donc possédait des ressources en eau limitées.

Nous observons une différence de teneur en Cd entre les 2 sites. Celle-ci est plus due à la biodisponibilité du Cd qu'à la teneur en métaux totaux car le Cd est bien plus extractible au CaCl_2 sur le sol de Leforest (Figure 70).

Le « témoin » Arabette était utile car on peut aisément le comparer au peuplier. Nous constatons que son potentiel accumulateur est supérieur au peuplier mais la biomasse du peuplier est très nettement supérieure. Or pour le Cd, la teneur mesurée dans l'arabette n'est que 6 fois supérieure à celle du peuplier et si on considère la biomasse il est évident que le peuplier accumulerait une quantité par plante de Cd supérieure à celle de l'Arabette.

Les teneurs en Cd et en Zn sont cependant du même ordre de grandeur que celles mesurées sur site ce qui est un point positif (Figure 79). Le point interrogatif étant la faible différence observée entre cultivars qui met en jeu d'autres paramètres que ceux mesurés ici.

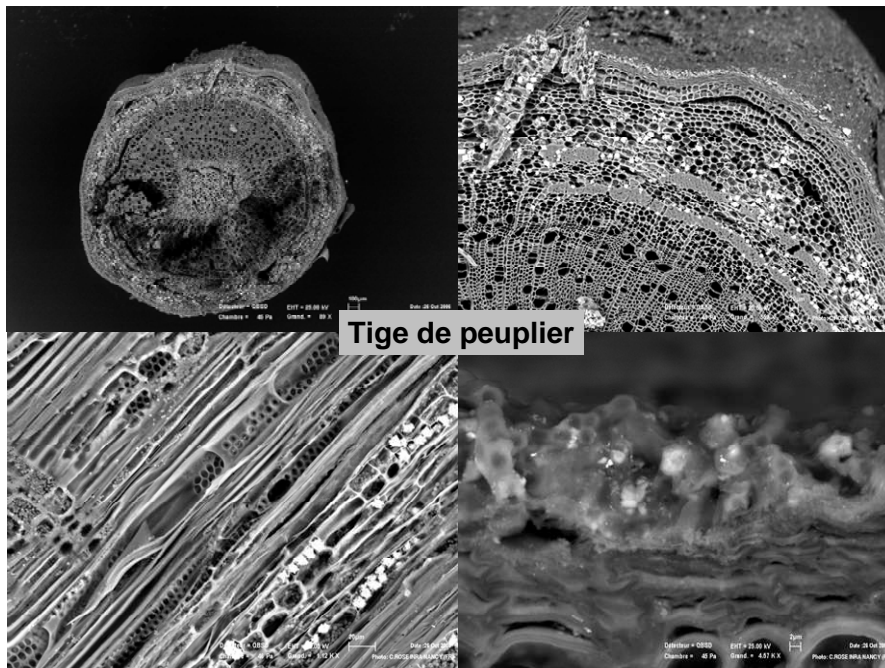


Figure 80: Image en MEB d'une tige du cv. Beaupré récoltée sur le site de Métaeurop.

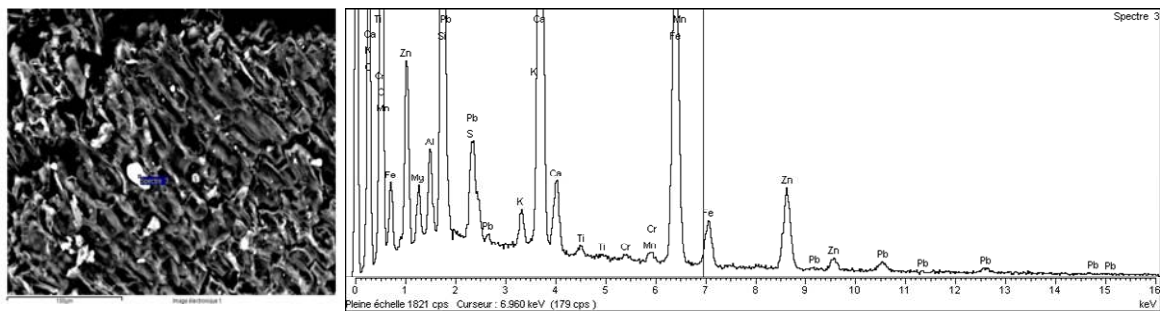


Figure 81: Photographie et spectre d'une particule présente sur une tige de peuplier provenant du site de Métaeurop.

Tableau 63: Teneurs en métaux (mesurées par ICP-AES) de l'écorce de peuplier analysée au MEB (en mg kg MS⁻¹).

Partie de l'écorce	Cd	Zn	Cu	Ni	Pb
Totale	8,4	183	2,5	5,2	11,1
Supérieure	8,0	169	3,1	6,3	0
Inférieure	10,6	236	8,0	6,3	227

V.3. Localisation des métaux dans les feuilles et les tiges de peuplier

Pour répondre au troisième objectif, nous avons analysé des feuilles et des tiges de peuplier ayant poussé sur du sol pollué notamment au Cd, Zn et Pb en microscopie électronique à balayage et en spectrométrie de masse à ionisation secondaire afin de localiser les métaux au niveau tissulaire.

V.3.1. Observations au microscope électronique à balayage

Une étude préliminaire en microscopie électronique à balayage (MEB) en vue de localiser les métaux sur des sections de tiges a été entreprise. Cet essai a été concluant car nous avons trouvé des particules riches en métaux (Zn, Pb et Cu). Sur l'échantillon de tige nous avons constaté que ces particules étaient principalement localisées à la surface de l'écorce. Pour vérifier cela nous avons analysé une écorce de peuplier parallèlement à une analyse en ICP-AES de cette même écorce (Tableau 63).

D'autres analyses ont été réalisées sur des échantillons de tiges de peupliers cv. Beaupré récoltés sur le site de Métaleurop en octobre 2007 (Figure 80 & Figure 81). Il apparaît que de nombreuses particules chargées en Ca, S, Fe, Zn, Ni, Mn et parfois Pb (traces) sont présentes sur les écorces des tiges.

Une analyse de la face interne de l'écorce a permis de mettre en évidence une zone localisée et très concentrée en cristaux (probablement d'oxalate) de Ca et accompagnée de Fe, Cr, Zn, Pb et As.

Dans le bois sont observés de nombreux cristaux dans la moëlle de la tige qui sont associés à de l'étain. On ne détecte pas de fortes concentrations en métaux lourds dans le bois mais on détecte notamment des traces de Zn lorsque l'on réalise un long balayage des surfaces par le faisceau.

Les teneurs en ICP-AES révèlent des teneurs en métaux lourds légèrement plus importantes dans la partie inférieure de l'écorce (face interne) que dans la partie supérieure (face externe) (Tableau 63). Les métaux sont donc moins concentrés à la surface de l'écorce.

La conclusion principale est que la présence de Pb et Zn dans les tiges devrait être confirmée par des analyses en WDS (spectromètre à dispersion de longueur d'onde) pour l'analyse des rayons X issus des éléments minéraux constitutifs d'échantillons placés dans un microscope électronique à balayage.

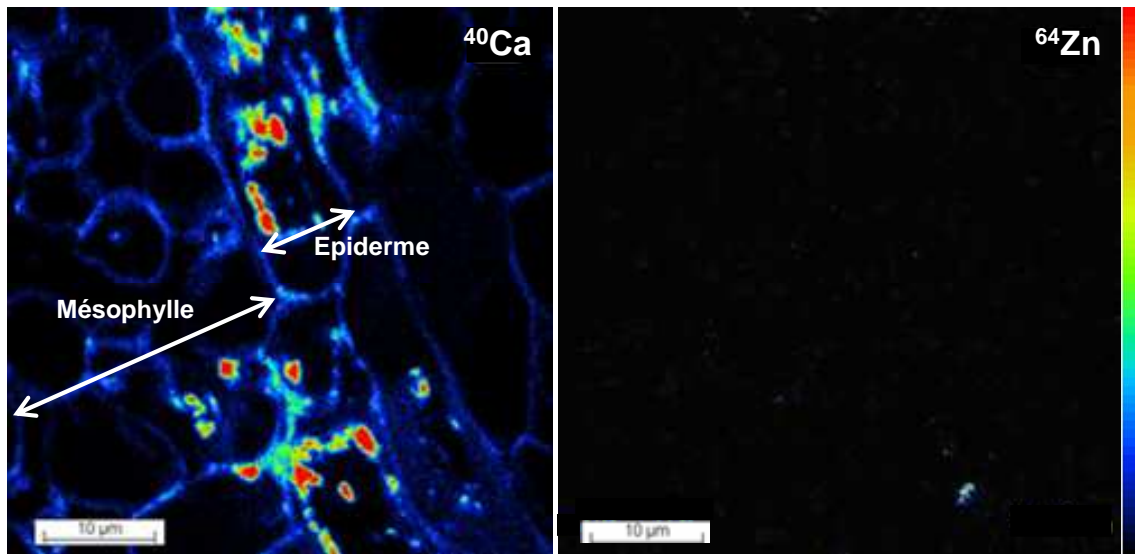


Figure 82: Cartographies en échelle linéaire ^{40}Ca et ^{64}Zn de l'échantillon contrôle (témoin sans métaux). Champ image de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

Tableau 64: Teneurs en Ca, K, Na, Cd et Zn dans les feuilles, les tiges et les racines du cv. Lena ayant poussé sur le sol de Leforest (en mg kg MS^{-1}).

Elément	Feuilles	Tiges	Racines
Ca	20000	11000	7000
K	22000	10000	15000
Na	3500	4000	8000
Cd	25	20	12
Zn	260	90	90

V.3.2. Observations de feuilles de cv. Lena avec un IMS6f modifié (IMS-LAM)

Dans le but de localiser plus précisément les métaux dans les feuilles, nous avons analysé des feuilles de cv. Lena de l'expérience en pots précédente avec un spectromètre de masse à ionisation secondaire. Les éléments étudiés sont ^{23}Na , ^{39}K et ^{40}Ca , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{112}Cd et ^{114}Cd . Nous ne présenterons que les images de ^{40}Ca et ^{64}Zn car ce sont les plus pertinentes.

Les images obtenues en Ca, Na, et K permettent de visualiser les contours des cellules. Les images du Zn et du Cd ont été obtenues par accumulation de plusieurs plans. Ceci permet de détecter des traces plus facilement mais cela a pour principal inconvénient de rendre les images floues.

Nous avons mis en culture parallèlement un peuplier (cv. Lena) sur sol non contaminé et sur sol de Leforest durant 8 semaines. Nous avons choisi le cultivar Lena car c'était celui qui semblait le plus performant sur les sites expérimentaux.

V.3.2.1. Observation de feuilles de Lena témoin (ayant poussé sur sol non pollué)

Comme nous l'espérons, les images avec les éléments ^{64}Zn et ^{114}Cd ne donnent pas de points chauds pour l'échantillon témoin ce qui signifie que ces métaux ne sont pas présents dans la feuille.

Le ^{40}Ca permet de bien délimiter les contours des cellules (Figure 82). Nous pouvons ainsi différencier l'épiderme du mésophylle.

V.3.2.2. Teneurs en métaux mesurés pour les peupliers ayant poussé sur le sol de Leforest

Parallèlement à l'analyse en microscopie, nous avons analysé les teneurs en métaux et autres éléments en ICP-AES afin de les quantifier.

Les teneurs des éléments comme le Na, le K et le Ca sont bien plus élevées que les teneurs en Zn et Cd (Tableau 64). Il est donc logique d'observer ces derniers éléments moins facilement.

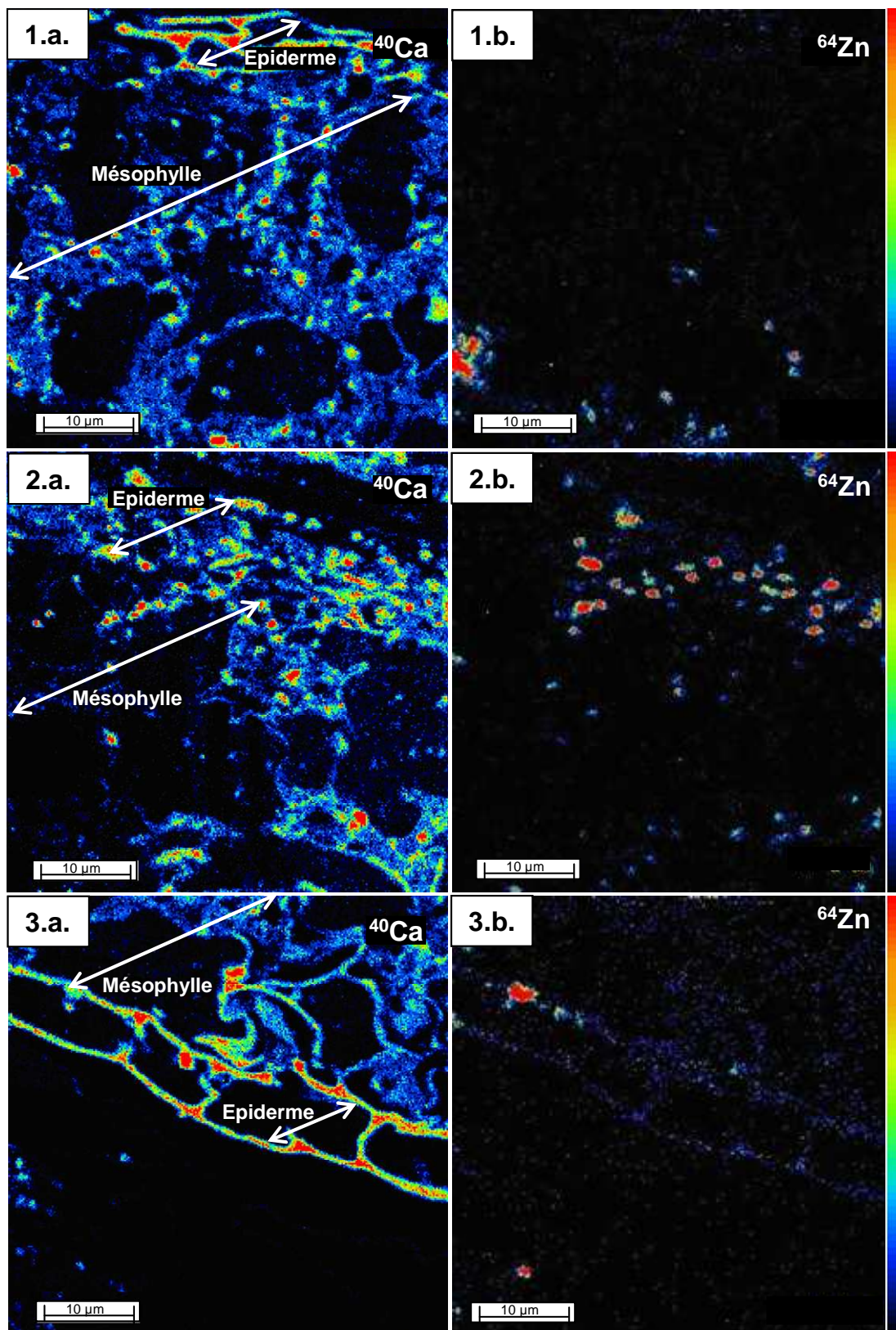


Figure 83 : Cartographies en échelle linéaire de ^{40}Ca (a) et de ^{64}Zn (b) sur les 3 échantillons de feuilles (numérotés 1 à 3) du cv. Lena planté sur sol pollué de Leforest durant 8 semaines. Champ image de 50 x 50 μm^2 .

V.3.2.3. Observations de coupes de feuilles de *Lena* ayant poussé sur le sol de Leforest

Les cartographies de Ca, Na et K permettent de définir les contours de l'image et sont utilisées pour l'annotation de la figure afin de localiser le Zn et le Cd par la suite (Figure 83 b).

Les profils du Na et du K sont très similaires. Les points chauds se concentrent aux mêmes endroits et surtout au niveau du mésophylle (données non montrées ici). Nous nous situons plutôt au niveau du parenchyme chlorophyllien lacuneux. Les teneurs en Na et en K dans les feuilles de ces peupliers sont de 3500 et 22000 mg kg MS⁻¹ respectivement (Tableau 64).

Le profil du Ca est différent de ceux du Na et du K. Rappelons que la teneur en Ca dans les feuilles du cv. *Lena* est de 20000 mg kg MS⁻¹ environ, soit plus ou moins autant que de K. Le Ca est bien plus concentré que les deux autres éléments au niveau de l'épiderme. De manière générale il est moins concentré que ceux-ci puisque les points de forte accumulation sont moins nombreux et moins étendus (données non montrées ici). Nous avons choisi cet élément pour illustrer ces analyses étant donné que sa localisation coïncidait bien avec celle du Zn.

Les profils du Zn (⁶⁴Zn et ⁶⁶Zn) se ressemblent mais les points de plus forte accumulation sont plus importants pour le ⁶⁴Zn c'est pourquoi nous ne présentons que les images de ⁶⁴Zn.

Sur le 1^{er} échantillon, le Zn semble être localisé préférentiellement aux endroits où le Ca était bien concentré. Aussi, on retrouve une accumulation de Zn majoritairement au niveau de l'épiderme mais également au niveau du mésophylle (Figure 83, 1b).

Les profils du Cd (¹¹²Cd et ¹¹⁴Cd) ne montrent aucune accumulation de Cd ce qui explique l'absence d'images ici. La teneur en Cd est trop faible et se situe par conséquent en dessous des limites de détection de l'appareil (Tableau 64).

Sur le 2^{ème} échantillon, nous voyons des contours de l'épiderme bien nets ainsi qu'une partie du mésophylle. Les cartographies du Zn (n'est présenté ici que le ⁶⁴Zn) montrent moins de points de forte accumulation mais plutôt une localisation plus diffuse bien que répartie sur le contour des cellules épidermiques. Les mêmes accumulations de Zn (couleur bleue) s'observent dans le mésophylle (Figure 83, 2b). Aucune accumulation de Cd n'est observée.

Sur le 3^{ème} échantillon, nous observons une partie du mésophylle. Les profils en Ca et Na sont différents. Tout comme dans le 1^{er} échantillon, le Ca est moins concentré que le Na au niveau du mésophylle (Figure 83, 3a).

Les cartographies en Zn montrent quelques points d'accumulation autour des cellules du mésophylle mais plutôt entre celles-ci et donc dans les méats. Contrairement au 2^{ème} échantillon, l'accumulation est moins diffuse que dans l'épiderme, ici elle est vraiment très localisée et limitée à quelques points chauds (Figure 83, 3b).

Dans la littérature, nous trouvons surtout des localisations foliaires *in situ* du Ni (Vazquez et al., 1992 ; Krämer et al., 1997, 2000 ; Ager et al., 2003, Robinson et al., 2003 ; Broaddhurst et al., 2004 ; Smart et al., 2007) et seulement quelques études sur la localisation du Cd et du Zn (Küpper et al., 1999, 2000) sur le Mn (Fernando et al., 2006, 2008) et encore moins sur l'As (Lombi et al., 2002) et le Co (Brooks, 1998). Ces études ont été menées *in vivo* par microscopie électronique (SEM-Scanning electron microscopy) / EDAX (Energy Dispersive X-ray analysis) et par microsonde nucléaire PIXE. Il a ainsi été démontré que le Ni, le Zn, le Cd et l'As étaient davantage concentrés dans les vacuoles des cellules épidermiques et dans les trichomes. Cependant, il a été démontré que le Zn et le Cd étaient présents à plus forte concentration dans le mésophylle (Küpper et al., 2000).

Les données récoltées dans la littérature sont donc totalement en accord avec celles que nous avons obtenues ici en SIMS. En effet, nous avons pu constater de plus fortes concentrations de Zn au niveau des cellules épidermiques ainsi qu'au niveau du mésophylle. Les teneurs en Cd étaient en dessous des limites de détection, c'est pourquoi nous n'avons pas pu observer cet élément. Rappelons que nous étudions une plante accumulatrice et non une plante hyperaccumulatrice comme dans toute la bibliographie précédemment citée et par conséquent il est logique de ne pas obtenir d'aussi belles images que pour les éléments Ca, Na et K qui étaient 100 fois plus importantes que les teneurs en Zn.

Après avoir démontré que le Zn était localisé au niveau de l'épiderme et au niveau du parenchyme, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de stockage du Zn dans ces tissus. C'est pourquoi nous avons étudié les transporteurs qui pouvaient y acheminer les métaux.

Chapitre VI

Etude phylogénétique et caractérisation fonctionnelle de transporteurs de métaux

Tableau 65: Récapitulatif du nombre de modèles de gènes appartenant aux familles CDF et ZIP chez les plantes et la levure.

Populus trichocarpa (Pt), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Sorghum bicolor* (Sb), *Physcomitrella patens* (Pp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Vitis vinifera* (Vv), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Selaginella mollendorffii* (Sm).

	Pt	At	Sb	Os	Vv	Sm	Pp	Cr	Sc
CDF	18	12	14	8	12	18	12	6	6
ZIP	21	17	16	15	19	9	9	10	5

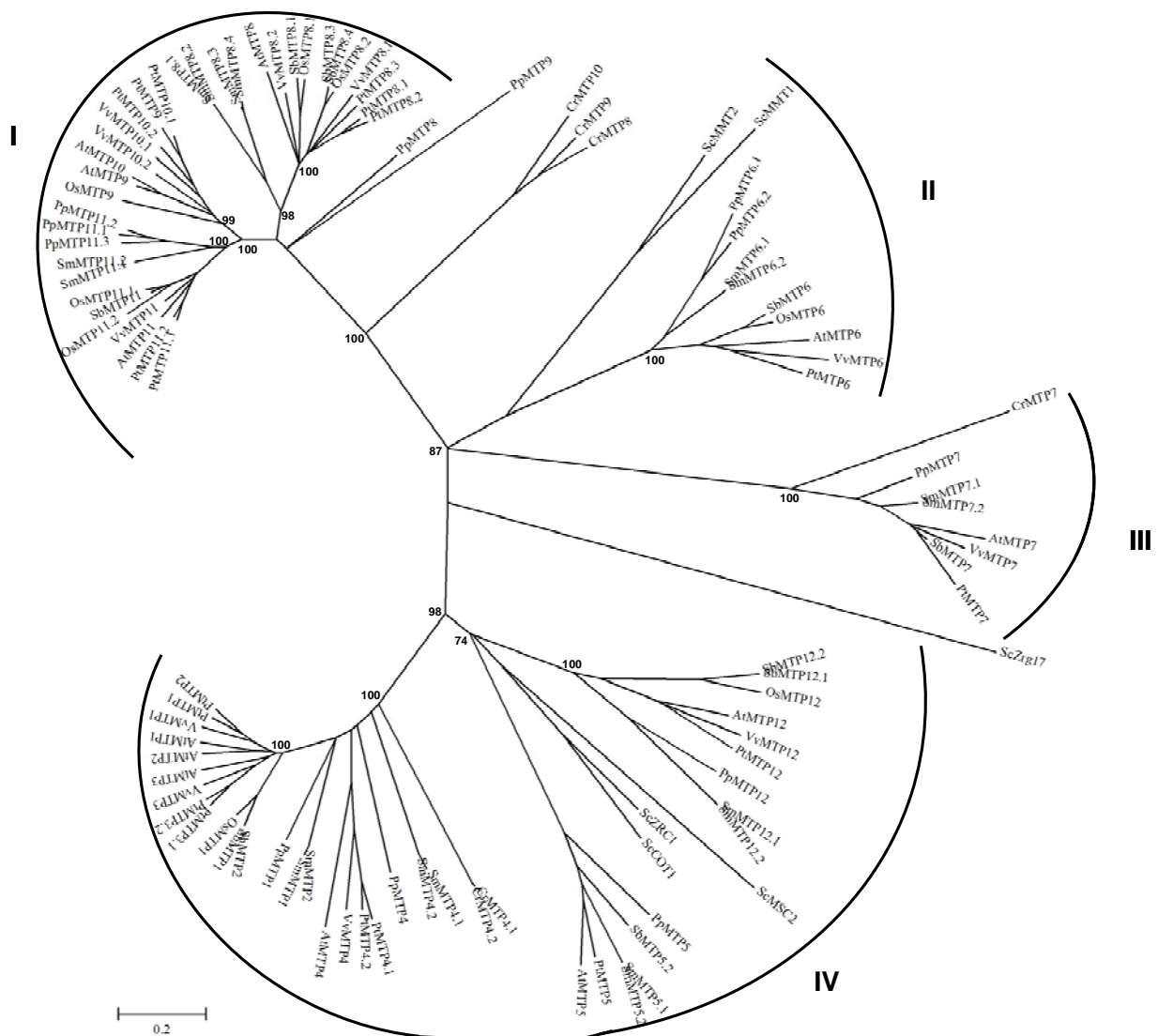


Figure 84: Arbre phylogénétique des séquences protéiques des transporteurs de la famille CDF de neuf organismes.

Le dernier objectif de ma thèse portait sur l'étude phylogénétique ainsi que la caractérisation des transporteurs de métaux. Aussi, nous avons procédé à une analyse phylogénétique de deux familles de transporteurs de métaux : les CDFs (Cation Diffusion Facilitator) et les ZIPs (Zrt-Irt like Proteins). Cette étude a porté sur huit organismes photosynthétiques: une algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*), une bryophyte (*Physcomitrella patens*), une lycophyte (*Selaginella mollendorffii*), deux monocotylédones (*Oryza sativa* et *Sorghum bicolor*), trois dicotylédones (*Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* et *Populus trichocarpa*), ainsi que sur la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Afin d'étudier, l'expression des transporteurs de peuplier, nous avons analysé *in silico* les ESTs (Expressed Sequence Tags) correspondantes à chacun des membres sur le site du NCBI.

Dans le but de compléter cette étude, nous nous sommes intéressés à l'expression, à la caractérisation fonctionnelle et à la localisation des transporteurs de la famille CDF.

VI.1. Analyse phylogénétique des transporteurs des familles CDF et ZIP

Le Tableau 65 récapitule le nombre de transporteurs des familles CDF et ZIP répertoriés pour chaque organisme. Nous pouvons constater que de manière générale ce nombre est plus important pour les dicotylédones, puis pour les monocotylédones et que les quatre organismes qui ne font pas partie des plantes supérieures possèdent un nombre moins important de transporteurs putatifs de métaux.

VI.1.1. Analyse phylogénétique des transporteurs de métaux de la famille CDF

L'arbre phylogénétique de la famille CDF fait apparaître 4 grands groupes numérotés I à IV. Comme décrit précédemment (§ I.1.4.2), ces transporteurs peuvent être classés selon leur affinité pour un ou plusieurs métaux (Montanini et al., 2007). Ainsi, le groupe I est constitué de transporteurs de Mn, le groupe II de transporteurs de Fe et de Zn, et le groupe IV de transporteurs ayant une affinité plus particulière pour le Zn. Le groupe III, est composé des homologues MTP7 qui ne sont pas encore caractérisés (Figure 84).

VI.1.1.1. Groupe I : transporteurs de Mn

Ce groupe peut être subdivisé en 2 sous-groupes : un contenant les homologues MTP9, MTP10 et MTP11 et un contenant les homologues MTP8 (Figure 84). Il n'y a aucun homologue de *S. cerevisiae* dans ce groupe.

De manière générale, les homologues de dicotylédones (*A. thaliana*, *P. trichocarpa* et *V. vinifera*) sont regroupés sur une même branche. Il en est de même pour les homologues de monocotylédones (*O. sativa* et *S. bicolor*) ainsi que pour *P. patens* et *S. mollendorffii*. Nous avons identifié 8 transporteurs putatifs de Mn chez le peuplier, 4 chez *A. thaliana*, 6 chez *S. mollendorffii* et 5 chez la plupart des autres organismes étudiés. Le peuplier possède donc un nombre supérieur de transporteurs de Mn, ceux-ci ayant pu être dupliqués au cours de l'évolution.

VI.1.1.2. Groupe II : transporteurs de Fe et Zn

Les plantes supérieures possèdent un seul homologue à MTP6 alors que la levure, la sélaginelle, et la mousse en possèdent deux (Figure 84). Les membres du groupe II sont des transporteurs de Fe et de Zn comme démontré lors des analyses de ScMMT1 et Sc MMT2, deux transporteurs mitochondriaux. A l'heure actuelle, aucune donnée de caractérisation fonctionnelle n'existe pour les homologues MTP6 d'organismes photosynthétiques.

VI.1.1.3. Groupe III : transporteurs MTP7

Les différents organismes ne possèdent qu'un homologue MTP7 excepté la sélaginelle qui en possède 2 et le riz qui n'en possède pas. A l'heure actuelle, aucune donnée de caractérisation fonctionnelle n'existe pour les homologues de MTP7 de plantes.

VI.1.1.4. Groupe IV : transporteurs de Zn

Le groupe IV constitue le plus important groupe de l'arbre et peut être divisé en 2 sous-groupes, le premier étant constitué des homologues MTP1 à MTP4 et le second regroupant les homologues MTP5 et MTP12 (Figure 84).

Dans le premier sous-groupe, il n'y a pas d'homologue recensé chez la levure. Le sorgho, le riz et la mousse possèdent un à deux membres alors que l'arabette, la vigne et la sélaginelle ont 3 ou 4 homologues et le peuplier possède 6 homologues. D'autre part, on peut

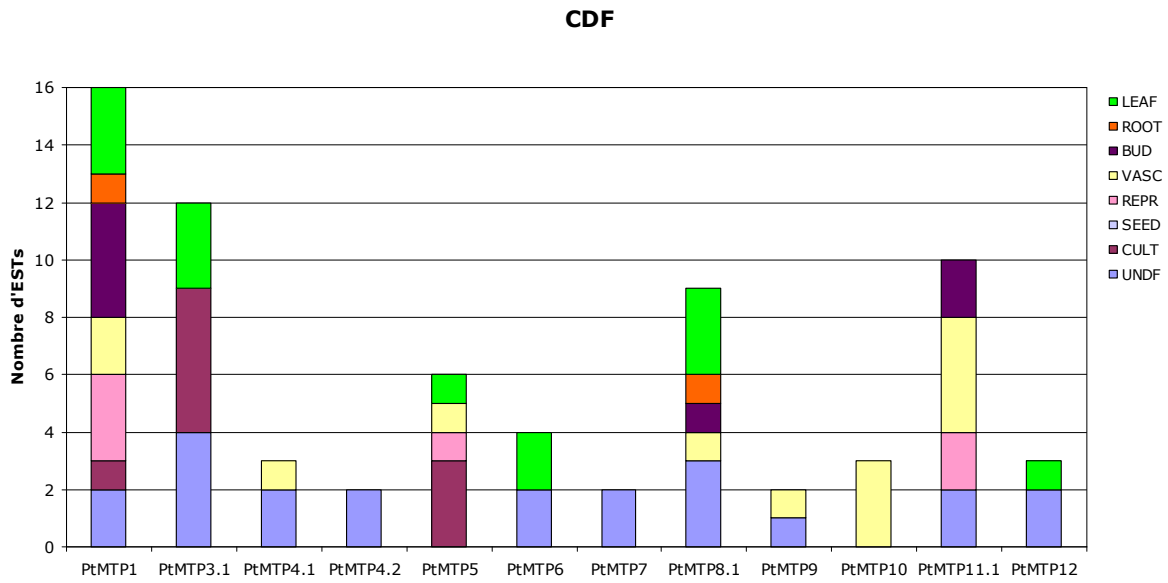


Figure 85: ESTs de peuplier correspondant aux gènes CDFs.

LEAF: feuilles (juvéniles, matures, sénescents). ROOT: racines (tous traitements). BUD: bourgeons (vegetatif). VASC: tissus vasculaires (cambium + phloème + xyleme + écorce). REPR: tissus reproducteurs (fleur + chatons + bourgeons floraux). SEED: graines (germée or imbibée). CULT: cultures cellulaires. UNDF: non défini (mix ou parties aériennes)

également noter que les homologues MTP1, MTP2 et MTP3 des plantes supérieures sont très proches les unes des autres (pourcentage d'homologie allant de 61 à 86%).

Dans le deuxième sous-groupe, chaque organisme étudié possède au moins deux homologues. Ce nombre peut monter jusqu'à 8 dans le cas de la sélaginelle et du peuplier.

VI.1.1.5. Analyse des ESTs de peuplier

Nous avons identifié des ESTs correspondant à 12 gènes différents de PtMTP ce qui signifie que les deux-tiers des gènes CDFs sont au minimum exprimés chez le peuplier (Figure 85). Le nombre d'ESTs par gène varie de 2 à 16. Si nous considérons l'ensemble des gènes de la famille, il s'avère qu'on les retrouve dans tous les tissus de la plante.

Une étude plus détaillée des homologues (hormis ceux qui sont exprimés dans la catégorie « non défini ») montre que certains CDFs sont exprimés dans tous les tissus alors que d'autres sont plus spécifiques. En effet, PtMTP1 est exprimé dans tous les tissus sans prédominance pour un tissu particulier.

Il ressort également de cette analyse que peu de CDFs sont exprimés dans les racines car seuls PtMTP1 et PtMTP8.1 sont exprimés dans les tissus racinaires. Nous retrouvons uniquement 3 CDFs exprimés dans les tissus reproducteurs (PtMTP1, PtMTP5 et PtMTP11.1) et dans les bourgeons végétatifs (PtMTP1, PtMTP8.1 et PtMTP11.1).

A l'opposé, la plupart des CDFs (PtMTP1, PtMTP4.1, PtMTP5, PtMTP8.1, PtMTP9, PtMTP10 et PtMTP11.1) sont exprimés dans les tissus vasculaires ce qui suggère un rôle de ces transporteurs dans l'échange d'ions métalliques entre les tissus. La plupart des CDFs sont également exprimés dans les feuilles (PtMTP1, PtMTP3.1, PtMTP5, PtMTP6, PtMTP8.1 et PtMTP12).

VI.1.2. Analyse phylogénétique des transporteurs de métaux de la famille ZIP

Les protéines de la famille ZIP d'eucaryotes ont été précédemment classées en sous-familles I et II (Guerinot, 2000). Une autre analyse avait permis d'ajouter 2 autres sous-familles : la sous-famille GufA et la sous-famille LIV-1 (Gaither & Eide, 2001). Notre analyse confirme l'existence de ces 4 groupes mais révèle également la présence de 3 groupes additionnels (Figure 86). Nos groupes I à V correspondent à la sous-famille I décrite par

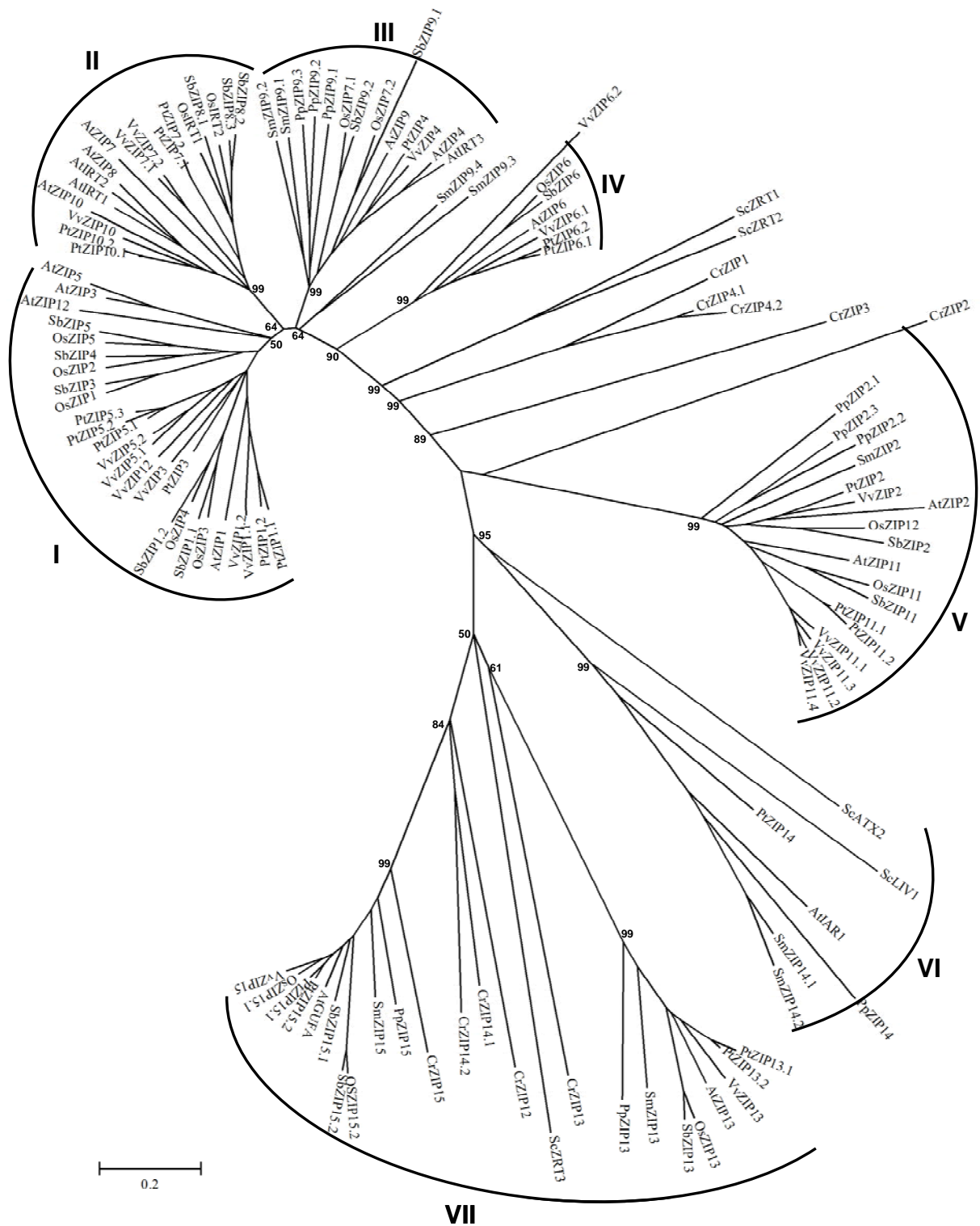


Figure 86: Arbre phylogénétique des séquences protéiques des transporteurs ZIP de *Populus trichocarpa* (Pt), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Sorghum bicolor* (Sb), *Physcomitrella patens* (Pp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Vitis vinifera* (Vv) et *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Selaginella mollendorffii* (Sm).

Guerinot (2000), le groupe VI correspond à la sous-famille LIV-1 et le groupe VII à la sous-famille GufA décrits par Gaither & Eide (2001).

Nous pouvons constater que les homologues de *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii* sont assez éloignés des homologues des autres organismes. En effet, ScZRT1 et ScZRT2 ne font partie d'aucun des 7 groupes, ce qui est également le cas de CrZIP1, CrZIP3, CrZIP4.1 et CrZIP4.2.

VI.1.2.1. Groupe I

Les groupes I, II et IV sont restreints aux plantes supérieures, ils ne contiennent aucune séquence de *P. patens*, *S. moellendorffii* et *C. reinhardtii* (Figure 86).

Le groupe I peut être subdivisé en 4 sous-groupes. Un des sous-groupes est composé uniquement d'homologues d'*A. thaliana*, un autre n'est composé que de séquences de monocotylédones, le troisième ne contient que des dicotylédones et le dernier contient à la fois des monocotylédones et des dicotylédones. Le nombre d'homologues présents dans ce groupe est assez conservé puisqu'il est compris entre 4 pour *A. thaliana* et 6 pour *P. trichocarpa*. Les identités de séquences peuvent être importantes puisqu'on retrouve une homologie comprise entre 81,4 et 88,8% entre PtZIP5.1, PtZIP5.2 et PtZIP5.3, ce qui fait penser que ces 3 homologues pourraient être issus d'une duplication récente. Rappelons que dans la littérature, nous avons trouvé des données sur AtZIP1 et AtZIP3 ainsi que sur OsZIP1, OsZIP3, OsZIP4 et OsZIP5 qui transportaient tous du Zn.

VI.1.2.2. Groupe II

Le groupe II ne contient également que des séquences de plantes supérieures qui peuvent être subdivisées en 2 sous-groupes, le premier ne contenant que des séquences de dicotylédones, le second contenant à la fois des monocotylédones et des dicotylédones (Figure 86). Les organismes présents dans ce groupe possèdent entre 2 (pour *O. sativa*) et 4 homologues (*P. trichocarpa*) sauf *A. thaliana* qui possède 5 homologues ce qui suggère l'intervention d'une duplication chez *A. thaliana*. Des données sont disponibles sur OsIRT1, AtIRT1 et AtIRT2 qui transportent tous du Fe et AtZIP7 transporte du Zn.

VI.1.2.3. Groupe III

Ce groupe est restreint aux plantes terrestres et ne contient pas de séquences de *C. reinhardtii* (Figure 86). Il peut donc être apparu après la division avec les algues vertes. La sélaginelle et la mousse contiennent respectivement 2 et 3 homologues alors que les monocotylédones n'en possèdent que 2 et les dicotylédones un seul excepté *A. thaliana* qui possède 3 homologues. Il semblerait donc que le nombre d'homologues de ce groupe ait diminué au cours de l'évolution et plus particulièrement chez les dicotylédones. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, ce groupe n'a pas été très étudié mis à part AtZIP4 et OsZIP7.1 et OsZIP7.2 qui transportent le Zn.

VI.1.2.4. Groupe IV

Ce groupe est restreint et ne contient que 1 à 2 homologues pour chaque organisme (Figure 86). Il semblerait qu'il y ait eu un processus de duplication pour *P. trichocarpa* et *V. vinifera*. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, ce groupe n'a pas encore été très étudié.

VI.1.2.5. Groupe V

Ce groupe contient des séquences pour chaque organisme photosynthétique étudié (Figure 86). Il peut être divisé en 2 sous-groupes, un contenant les homologues de ZIP2 et l'autre de ZIP11. Les homologues de la sélaginelle et la mousse sont plus proches du premier sous-groupe. Toutes les plantes supérieures hormis le peuplier et la vigne ont des représentants dans chaque sous-groupe. Des éléments de duplication se sont produits chez le peuplier et la vigne et plus particulièrement pour la vigne qui possède 4 homologues de ZIP11 avec des gènes en tandem sur la séquence génomique. Il n'y a pas de données bibliographiques disponibles pour ce groupe.

VI.1.2.6. Groupe VI

Ce groupe est composé des homologues de ZIP14 (Figure 86). Ce sont des homologues de ScLIV-1 (Kumanovics et al., 2006) qui est un transporteur de Zn et de ScATX2 (Lin & Culotta, 1996) qui joue un rôle dans l'homéostasie du Mn. Il n'y a pas

ZIP

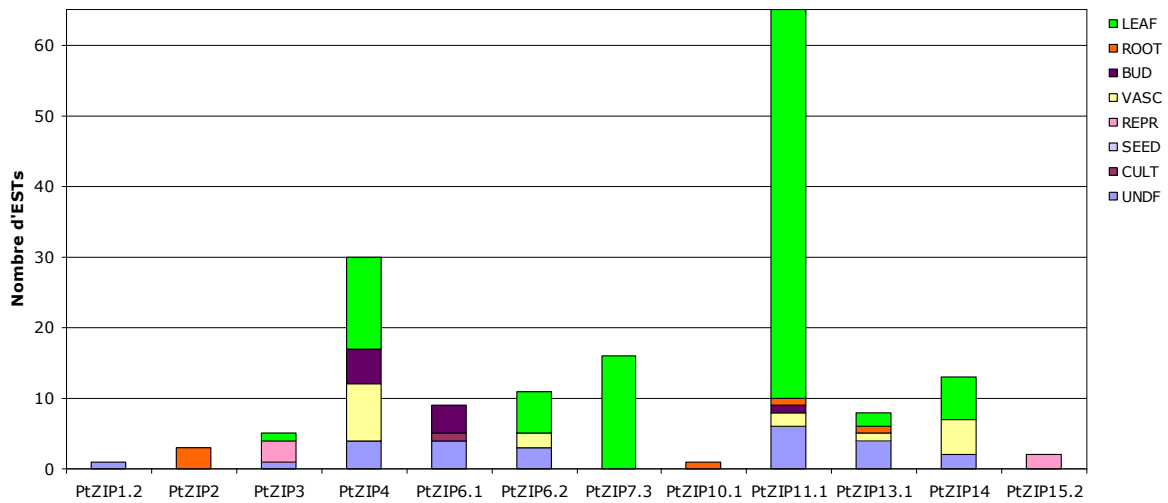


Figure 87: ESTs de peuplier correspondant aux gènes ZIPs.

LEAF: feuilles (juvéniles, mûres, sénescents). ROOT: racines (tous traitements). BUD: bourgeons (vegetatif). VASC: tissus vasculaires (cambium + phloème + xyleme + écorce). REPR: tissus reproducteurs (fleur + chatons + bourgeons floraux). SEED: graines (germée or imbibée). CULT: cultures cellulaires. UNDF: non défini (mix ou parties aériennes)

d'homologue de ZIP14 chez *C. reinhardtii* et chez les monocotylédones alors que *P. trichocarpa*, *P. patens* et *A. thaliana* ont tous un homologue. De plus, la sélaginelle possède 2 homologues de ZIP14 ce qui suggère l'existence d'une duplication chez les lycophytes durant l'évolution.

VI.1.2.7. Groupe VII

Tous les organismes photosynthétiques sont représentés dans ce groupe qui peut être divisé en 2 sous-groupes, un contenant les homologues de ZIP13 et l'autre ceux de ZIP15 (Figure 86). Tous les organismes possèdent un homologue de ZIP13 hormis le peuplier qui en possède 2. La conservation de ces gènes dans tous les organismes suggère une fonction physiologique importante de ceux-ci. Mis à part les monocotylédones, tous les organismes ont un homologue ZIP15. Ce groupe n'a pas été très étudié pour l'instant hormis ScZRT3 qui est un transporteur vacuolaire de Zn.

VI.1.2.8. Analyse des ESTs de peuplier

Nous avons identifié des ESTs correspondant à 12 PtZIPs ce qui suggère que la moitié des homologues de ZIPs sont exprimés chez le peuplier (Figure 87). Pris tous ensembles, les gènes exprimés couvrent tous les tissus de la plante. Une étude plus détaillée révèle que quelques homologues de ZIPs ont un profil d'expression spécifique à un tissu. PtZIP2 et PtZIP10.1 semblent uniquement exprimés dans les racines alors que les expressions de PtZIP7.3 et PtZIP15.2 sont limitées aux parties aériennes, dans les feuilles et dans les tissus reproductifs respectivement (Figure 87). A part PtZIP1.2 et PtZIP6.1, les autres ZIPs sont exprimés dans les feuilles. PtZIP3 est le second homologue à être exprimé dans les tissus reproductifs alors que PtZIP4, PtZIP6.1 et PtZIP11.1 sont exprimés dans les bourgeons végétatifs.

Il est intéressant de constater que cinq PtZIPs sont exprimés dans les tissus vasculaires ce qui suggère un rôle de ces homologues dans l'échange d'ions métalliques entre les tissus. Le nombre important d'ESTs détectées dans les feuilles pour PtZIP11.1 suggère que ce gène soit bien exprimé dans les tissus foliaires. Il serait intéressant de suivre l'expression de PtZIP11.1 durant le processus de maturation des feuilles qui pourrait démontrer un rôle de PtZIP11.1 dans la remobilisation des ions métalliques durant la sénescence.

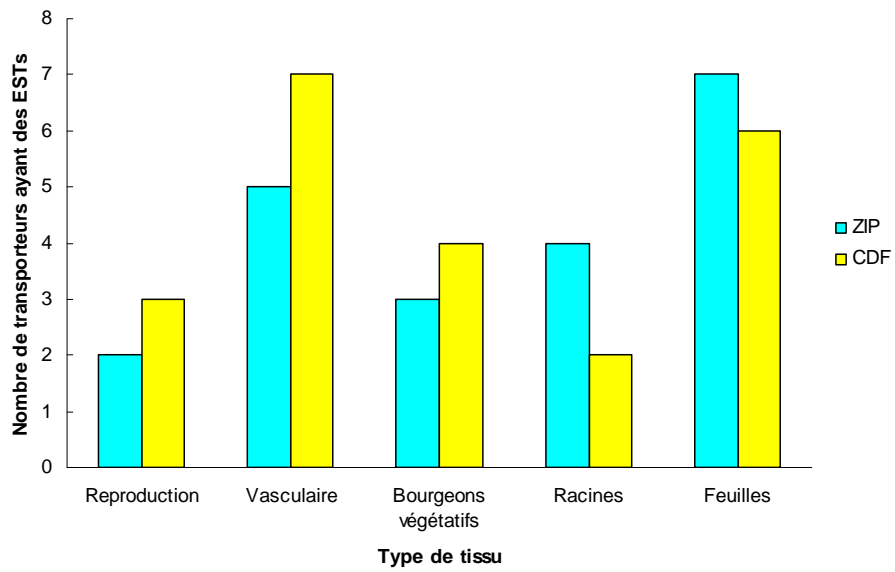


Figure 88: Nombre de transporteurs par tissu (de reproduction, vasculaire, bourgeons végétatifs, racines, feuilles) et par famille (ZIP et CDF) possédants des données d'ESTs.

VI.1.3. Discussion sur l'analyse phylogénétique des transporteurs des familles ZIP et CDF

L'étude phylogénétique des familles ZIP et CDF a permis de mettre en évidence de fortes analogies de séquences entre plantes terrestres qui permettent de former des groupes bien distincts. De manière générale, la levure et l'algue verte sont en dehors de ces groupes. Les arbres obtenus sont conformes aux données de la littérature et le fait d'avoir étudié plus d'espèces notamment dans le cas des ZIPs permet de distinguer davantage de groupes.

Nous avons identifié des ESTs correspondant à 12 PtZIPs et 12 PtMTPs. Ceux-ci se trouvent localisés dans toute la plante. Si on considère les tissus reproductifs, vasculaires, foliaires, racines et les bourgeons végétatifs, nous constatons une spécificité potentielle de ces transporteurs de métaux (Figure 88). Les ZIPs sont surtout exprimés dans les feuilles, les tissus vasculaires et les racines alors que les CDFs sont davantage exprimés dans les tissus vasculaires, les feuilles et les bourgeons végétatifs. Les deux familles possèdent peu de transporteurs exprimés dans les tissus reproductifs.

De manière générale, les ZIPs et les CDFs sont surtout exprimés dans les feuilles et dans les tissus vasculaires ce qui signifie que la translocation vers les parties aériennes est bien active pour ces transporteurs. Les ZIPs sont plus exprimés dans les racines que les CDFs ceci peut s'expliquer par le fait que les ZIPs sont souvent exprimés en cas de carence alors que les CDFs ont plutôt tendance à être surexprimés en cas d'excès.

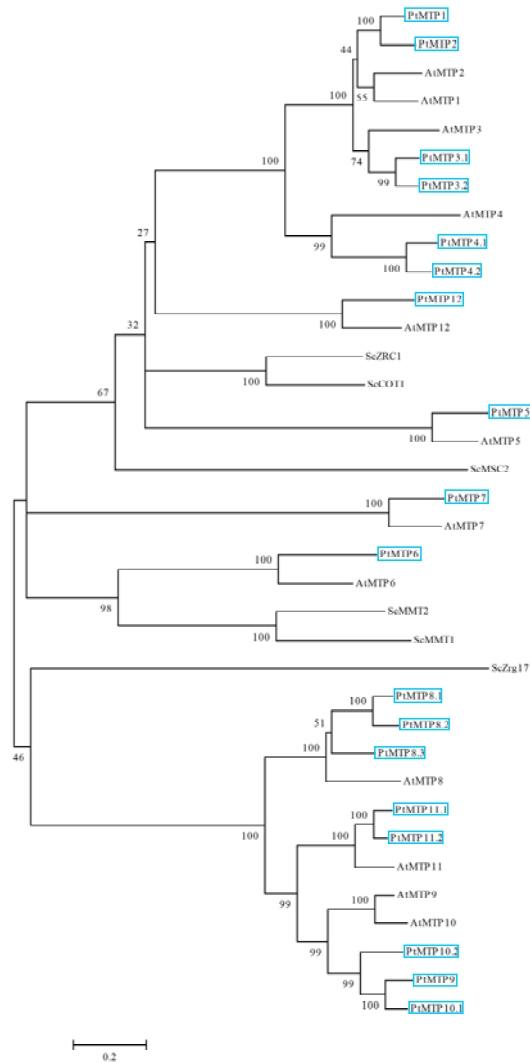


Figure 89: Arbre phylogénétique des séquences protéiques des transporteurs MTP de *P. trichocarpa* (Pt, encadrés), *A. thaliana* (At) et *S. cerevisiae* (Sc).

Tableau 66: Synthèse des expressions des MTPs dans les racines, les tiges, les feuilles jeunes et les feuilles matures de *P. tremula* x *P. alba* (clone 717-1B4) et *P. trichocarpa*.

+ : expression faible ; ++ : expression normale ; +++ : expression importante

Gène	Racines	Tiges	Feuilles jeunes	Feuilles matures
PtMTP1	++	+++	++	++
PtMTP2	+	++	++	+
PtMTP3.1	+	++	++	++
PtMTP3.2	+	++	++	++
PtMTP4.1	+	+	+	+
PtMTP4.2	+	+	+	+
PtMTP5	-	+	++	+
PtMTP6	+	+	+	+
PtMTP7	+	+	+	+
PtMTP8.1	+	+	+	+
PtMTP8.2	-	++	+	++
PtMTP8.3	++	++	++	++
PtMTP9	+	++	+	++
PtMTP10.1	+	+	+	+
PtMTP10.2	+++	++	+	+
PtMTP11.1	++	++	++	++
PtMTP11.2	++	++	++	++
PtMTP12	+	+	+	+

VI.2. Expression des gènes de la famille MTP

Pour répondre au quatrième objectif et vérifier la variabilité d'accumulation des métaux et l'expression des gènes de transporteurs de métaux de la famille CDF (Figure 89) nous avons tout d'abord testé l'expression dans différents tissus chez deux espèces de peuplier (*P. tremula* x *P. alba* (clone 717-1B4) et *P. trichocarpa*) puis l'expression de différents transporteurs dans les feuilles de peuplier issus de sites pollués mais également dans les tissus de peupliers cultivés en laboratoire (en pots et en culture hydroponique).

VI.2.1. Expression des MTPs chez *P. tremula* x *P. alba* (clone 717-1B4) et *P. trichocarpa* (clone Nisqually)

Nous avons synthétisé dans le Tableau 66 les résultats obtenus sur *P. tremula* x *P. alba* qui est un clone de référence très utilisé et sur *P. trichocarpa* (clone Nisqually) qui est le clone utilisé lors du séquençage du génome du peuplier.

Les résultats d'expression montrent que tous les transporteurs analysés sont exprimés et que leur expression peut varier entre les tissus considérés (même si la plupart sont exprimés de la même façon dans tous les tissus). Nous avons pu également constater que certains transporteurs montraient une différence d'expression selon la maturité du tissu foliaire. Ainsi, PtMTP2 et PtMTP5 sont plus exprimés dans les feuilles jeunes que dans les feuilles matures alors que l'inverse est trouvé pour PtMTP8.2 et PtMTP9.

Les MTPs semblent davantage exprimés dans les tissus aériens que dans les racines. En effet, pour certains nous n'avons détecté aucune expression racinaire (PtMTP8.2 et PtMTP5) et de manière générale l'expression est moins forte que dans les autres tissus. Cependant, le cas de PtMTP10.2 est tout autre étant donné que son expression est plus importante dans le tissu racinaire que dans les tissus aériens (Tableau 66).

Nous avons testé l'expression dans des fleurs mâles et femelles, nous avons ainsi pu mettre en évidence le fait que PtMTP11.1, PtMTP11.2, PtMTP7 et PtMTP9 étaient bien exprimés dans ces tissus.

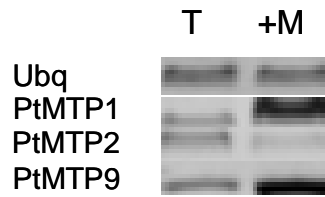


Figure 90: Expression des gènes codant les transporteurs de métaux PtMTP1, PtMTP2, PtMTP9 et l'ubiquitine dans des échantillons de feuilles de *P. trichocarpa* x *P. deltoides* provenant du site A de Métaleurop (+M) et de son site témoin (T).

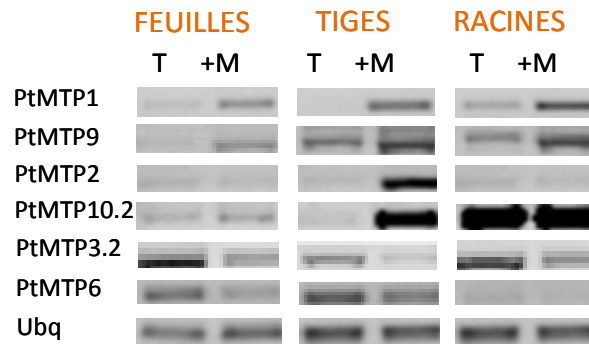


Figure 91: Expression de quelques gènes codant les transporteurs de métaux et l'ubiquitine dans des échantillons de feuilles, tiges et racines de *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* (cv. Skado) cultivés en culture hydroponique avec traitement métallique (+M) et son témoin (T).

VI.2.2. Expression des MTPs en condition de stress métallique

Nous avons également testé les expressions des MTPs en condition de stress métallique et cela dans 3 conditions différentes : sur site contaminé, en culture hydroponique et en pots sur du sol contaminé.

VI.2.2.1. Mesures d'expression sur des feuilles de peuplier provenant d'un site pollué et de son témoin

Tout d'abord, nous avons testé l'expression sur des échantillons de feuilles de *P. trichocarpa* x *P. deltoides* prélevés sur le site de Métaeurop (site A de notre étude) en juin 2005. Nous ne nous étions focalisés que sur 3 transporteurs à savoir PtMTP1, PtMTP2, et PtMTP9 (Figure 90). Les teneurs en Zn et Mn mesurées dans ces échantillons de feuilles par ICP-AES sont de 150 mg kg MS⁻¹ (T) et 740 mg kg MS⁻¹ (+M) pour le Zn et 75 mg kg MS⁻¹ (T) et 15 mg kg MS⁻¹ (+M) pour le Mn donc significativement différentes entre les 2 sites. Nous avons ainsi pu constater que PtMTP1 et PtMTP9 étaient plus exprimés sur site pollué que sur site témoin. Leur expression est donc accrue lors d'une exposition à des concentrations métalliques plus élevées dans le sol. Il y a donc une corrélation entre PtMTP1/PtMTP9 et la teneur foliaire en métaux (Zn et Mn respectivement). A l'opposé, PtMTP2 est plus exprimé sur les échantillons provenant du site témoin.

VI.2.2.2. Mesures d'expression sur des feuilles, des tiges et des racines de peupliers cultivés en hydroponique

Une analyse de notre panel de transporteurs de la famille CDF a été réalisée sur des échantillons de feuilles, de tiges et de racines de peupliers cultivés en culture hydroponique. Nous présentons ici les résultats les plus marqués sur le cv. Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* ; Figure 91) en sachant que les mêmes résultats ont été trouvés sur le cv. Lena. Les teneurs en métaux dans les feuilles ont été mesurées par ICP-AES soit 30 mg Cd kg MS⁻¹ (+M) ; 810 mg Zn kg MS⁻¹ (+M) et 310 mg Zn kg MS⁻¹ (T) ; 310 mg Mn kg MS⁻¹ (+M) et 430 mg Mn kg MS⁻¹ (T). Nous pouvons constater que l'expression de PtMTP1 et PtMTP9 est plus importante dans le cas du traitement métallique et ce pour les 3 tissus testés.

Tableau 67: Comparaison des taux d'expression de trois transporteurs de métaux en fonction du site sur des échantillons de feuilles, tiges et racines de *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* (cv. Skado) cultivés en pots sur sol pollué (Pierrelaye et Leforest) et sol témoin.
 + : expression faible ; ++ : expression normale ; +++ : expression importante.

Gène	Tissu	Témoin	Leforest	Pierrelaye
PtMTP8.2	Feuilles	+	++	+
	Tiges	+	+++	++
	Racines	+	++	+
PtMTP1	Feuilles	+	++	++
	Tiges	+	++	++
	Racines	+	++	++
PtMTP3.1	Feuilles	++	+	+
	Tiges	++	+	+
	Racines	++	+	+

Dans le cas de PtMTP2 et de PtMTP10.2, l'expression est variable entre les tissus (Figure 91). Leur expression est plus importante pour le traitement métallique uniquement dans les tiges. Remarquons que l'expression de PtMTP10.2 est très importante dans les racines et par conséquent trop saturée pour conclure sur une éventuelle différence d'expression entre les traitements. L'expression dans les feuilles de PtMTP2 et PtMTP10.2 ainsi que dans les racines de PtMTP2 est identique entre les deux traitements (Figure 91).

L'expression de PtMTP3.2 est plus importante dans les feuilles de peupliers témoins que pour les peupliers soumis au traitement métallique (Figure 91). Nous avons donc ici une expression qui diminue quand les teneurs en métaux augmentent dans le sol et dans les tissus. L'expression de PtMTP6 est moins tranchée entre les deux traitements mais il y a une tendance similaire à PtMTP3.2.

VI.2.2.3. Mesures d'expression sur des feuilles, des tiges et des racines de peupliers cultivés en pots sur sols pollués de Pierrelaye et Leforest ainsi que sur sol non pollué

Nous avons voulu tester l'expression des CDFs sur deux cultivars de peuplier (Lena et Skado) ayant poussé sur trois sols différents : un témoin, un sol de Pierrelaye et un sol de Leforest. Les résultats sont identiques entre cultivars. Nous ne présentons ici que trois transporteurs de métaux qui se comportent de façon complètement différente (Tableau 67). Les teneurs mesurées dans les tissus ainsi que dans le sol sont disponibles dans le paragraphe III.7 (Figure 70 ; Figure 71 ; Figure 73).

PtMTP8.2 est plus exprimé dans les feuilles, les tiges et les racines des peupliers ayant poussé sur sol de Leforest. Ceci est d'autant plus net pour les tiges qui montrent une expression de PtMTP8.2 nettement plus élevée que sur le sol non pollué. L'expression de PtMTP8.2 est identique entre le témoin et le sol de Pierrelaye mis à part dans les tiges où une expression plus importante sur le sol pollué est détectée (Tableau 67).

Les expressions de PtMTP1 sont plus élevées sur les sols pollués que sur le sol témoin. Néanmoins, aucune différence d'expression entre les deux sites pollués n'a pu être mise en évidence.

A l'opposé, les expressions de PtMTP3.1 sont plus importantes sur le sol témoin que sur les sols pollués et aucune différence entre les deux sols pollués n'est démontrée.

VI.2.3. Discussion sur les mesures d'expression des MTPs

Les variations d'expression de PtMTP1 et PtMTP9 au cours des expériences en condition de stress métallique vont dans le même sens à savoir une expression accrue lorsque le sol ou le milieu de culture sont pollués notamment au Cd, au Zn et au Pb.

PtMTP8.2 et PtMTP9 sont des transporteurs qui font partie du groupe phylogénétique des transporteurs de Mn (Figure 84) et sont davantage exprimés lors d'une carence en Mn (Figure 90, Figure 91 & Tableau 67). En effet, les teneurs en Mn sont 6 fois moins importantes sur les sols pollués que sur les sols témoins. Comme le Mn est un élément essentiel, les transporteurs de Mn semblent s'exprimer davantage lorsque la concentration en Mn dans le sol est plus faible. En effet, les plantes possèdent des mécanismes homéostatiques soit pour maintenir les concentrations internes des métaux essentiels entre les limites déficient et toxique soit pour maintenir à l'extérieur les métaux non essentiels (Di Baccio et al., 2003).

Une différence d'expression entre les sites de Pierrelaye et Leforest a été démontrée uniquement pour PtMTP8.2 (Tableau 67). Cependant il n'y a pas de différence significative entre les teneurs mesurées sur les sols de Pierrelaye et Leforest, PtMTP8.2 répondrait plus à un stress général ou à un autre métal qu'à la concentration en Mn dans le sol. En effet, nous sommes face au même cas de figure pour PtMTP9 qui est plus exprimé dans le traitement métallique en culture hydroponique alors que les teneurs en Mn sont identiques pour le traitement témoin (Figure 91). Les transporteurs de Mn seraient donc à la fois sensibles aux teneurs en Mn et sont exprimés en cas de carence mais également sensibles au stress général de la plante. Il a été démontré que l'absorption de Mn diminuait en présence de fortes concentrations en Cd et en Zn (Küpper, 2000).

PtMTP10.2 fait également partie de ce groupe phylogénétique mais il est plus exprimé en cas de stress métallique uniquement dans les tiges, son expression racinaire étant importante dans les deux traitements (Figure 91).

S'il s'avérait que PtMTP9 et PtMTP10.2 soient effectivement des transporteurs de Mn, ils auraient donc des fonctions bien distinctes dans l'homéostasie du Mn. L'aspect fonctionnel est abordé dans la partie suivante.

Les homologues de MTP1 ont été bien étudiés. Celui-ci est surexprimé chez *A. halleri* par rapport à *A. thaliana* et *A. lyrata*, le premier étant une espèce hyperaccumulatrice de Zn et Cd et les deux derniers n'étant pas des accumulateurs (Dräger et al., 2004). Une surexpression a été constatée lors de contamination du sol en Zn et ce dans les feuilles, les tiges et les

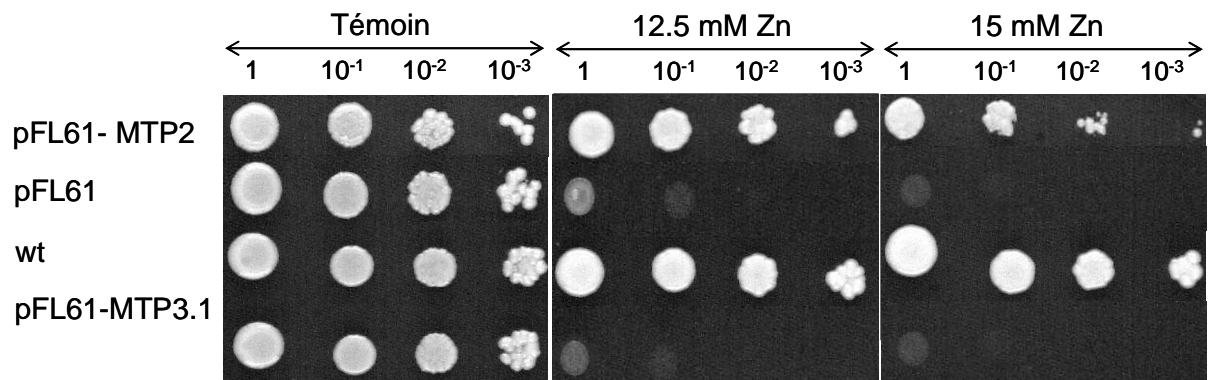


Figure 92: Caractérisation fonctionnelle de PtMTP2 et PtMTP3.1. La souche *zrc1Δ* est transformée avec soit le vecteur vide (pFL61), soit avec le vecteur portant les séquences codantes correspondantes à PtMTP2 et PtMTP3.1. Les transformants, dilués à 4 concentrations différentes, ont été étalés sur milieu SD témoin et contenant respectivement 12.5 et 15 mM de Zn. Les photos ont été prises après 5 jours de croissance.

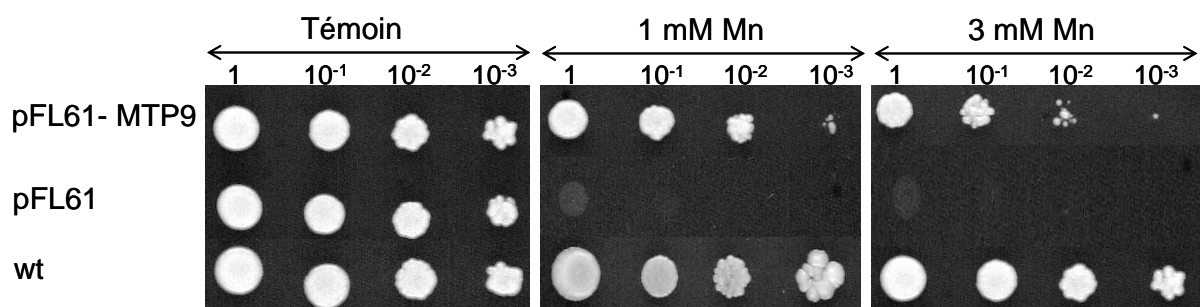


Figure 93: Caractérisation fonctionnelle de PtMTP9. La souche *pmr1Δ* est transformée avec soit le vecteur vide (pFL61), soit avec le vecteur portant la séquence codante correspondante à PtMTP9. Les transformants ont été étalés sur milieu SD témoin et contenant respectivement 1 et 3 mM de Mn. Les photos ont été prises après 5 jours de croissance.

racines. Une telle surexpression a déjà été démontrée pour MTP1 où une augmentation de la translocation des racines vers les parties aériennes et une augmentation de la tolérance au Zn étaient constatées (Assuncao et al., 2001 ; Kim et al., 2004). Une plus forte concentration en Zn a donc pour conséquence une plus forte expression de PtMTP1 qui a pour rôle de transporter le Zn vers le tonoplaste et ainsi séquestrer l'excès de Zn dans les vacuoles (Blaudez et al., 2003). Cependant, PtMTP2 est dans le groupe phylogénétique des transporteurs de Zn or il n'est pas surexprimé dans tous les tissus en cas de stress métallique, il n'est surexprimé que dans les tiges et pourrait donc avoir un rôle majeur (Figure 91).

PtMTP3.1 et PtMTP3.2 font également partie du groupe phylogénétique des transporteurs de Zn or ils sont moins exprimés lors de stress métallique et ce dans tous les tissus. Plusieurs hypothèses se posent alors, soit ils ne sont pas tolérants mais au contraire sensibles aux fortes concentrations de métaux, soit ils participent au fonctionnement cellulaire non perturbé, puisque le Zn est un élément essentiel. Leur fonctionnement serait altéré par la présence de fortes concentrations en Zn et le relais serait pris par d'autres transporteurs.

VI.3. Caractérisation fonctionnelle de quelques transporteurs de la famille CDF

Le quatrième objectif de cette thèse était également de caractériser quelques transporteurs de la famille CDF par complémentation fonctionnelle chez la levure *S. cerevisiae*.

Trois transporteurs de cette famille ont déjà été caractérisés chez le peuplier. Le premier est un transporteur de Zn, il s'agit de PtdMTP1 (Blaudez et al., 2003). Les deux autres, PtMTP11.1 et PtMTP11.2 sont des transporteurs de Mn (Peiter et al., 2007). L'analyse des autres transporteurs a été entreprise *via* le clonage dans le vecteur d'expression pFL61 et l'expression hétérologue de ces transporteurs dans des souches de levure sensibles au Zn (*zrc1Δ*) ou au Mn (*pmr1Δ*). Le témoin positif utilisé dans les deux cas est la souche sauvage transformée par le vecteur vide (pFL61) alors que le témoin négatif est constitué par la souche *zrc1Δ* ou *pmr1Δ* transformée avec le vecteur vide. Ainsi nous avons pu démontrer que PtMTP2 supprime la sensibilité au Zn de la souche *zrc1Δ* (Figure 92) et que PtMTP9 supprime la sensibilité au Mn de la souche *pmr1Δ* (Figure 93). PtMTP2 est donc un transporteur spécifique du Zn (Figure 92) alors que PtMTP9 est un transporteur spécifique du Mn (Figure 93). D'autre part, les deux transporteurs ne permettent pas de restaurer pas la tolérance au Cd.

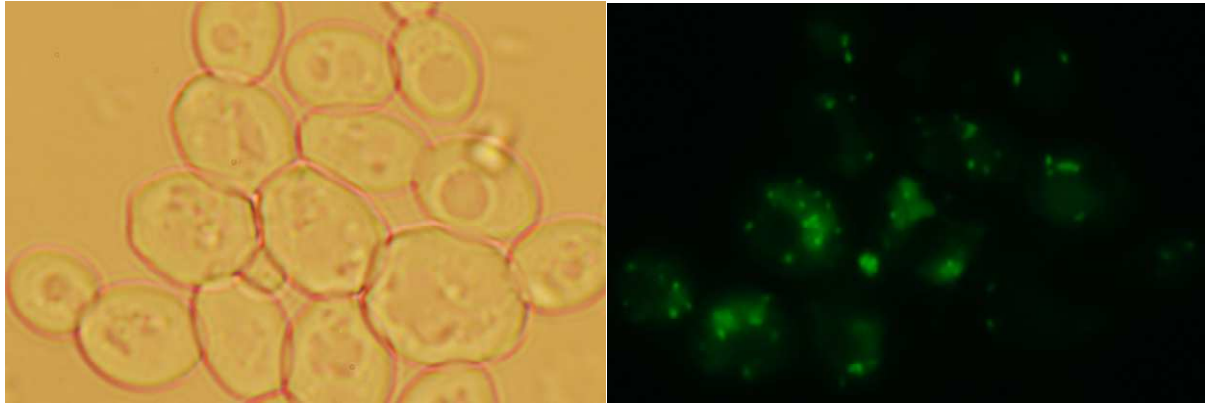


Figure 94: Observation des levures exprimant PtMTP9-GFP au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (x1000).

D'autres CDFs ont été testés mais ne montrent pas de caractérisation spécifique (c'est le cas notamment de PtMTP3.1 (Figure 92)) ou ont présenté des difficultés au moment du clonage. De plus, il ne faut pas négliger le fait qu'une co-résistance est possible entre métaux. En effet, il a été démontré une co-résistance entre le Ni et le Zn (Watmough & Dickinson, 1995) et entre le Fe et le Cd (Thomine et al., 2000) qui sont véhiculés par le même transporteur. Nous n'avons pas mis en évidence de co-résistance pour PtMTP2 et PtMTP9.

Maintenant la spécificité de ces transporteurs établie il serait intéressant de vérifier leur localisation et de savoir ainsi où ces métaux sont acheminés. Le transporteur de Mn PtMTP9 a été désigné pour cette étude plus poussée.

VI.4. Localisation d'un transporteur de Mn

Le transporteur de Mn PtMTP9 a été cloné dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP dans le but de mettre en évidence sa localisation cellulaire chez la levure. Les résultats obtenus semblent indiquer une localisation au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 94). Cette localisation rappelle en effet celle de PtMTP11.1 et PtMTP11.2 (Peiter et al., 2007).

L'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* est très utilisée mais les protéines des plantes ne sont pas forcément localisées au même niveau *in planta* que chez la levure même si le même phénotype final est obtenu (Delhaize et al., 2003 ; Kim et al., 2004). Par exemple, ShMTP8 (anciennement appelé ShMTP1, de *Stylosanthes hamata*, un légume tropical tolérant des sols acides avec de fortes concentrations de Mn) est localisé au niveau vacuolaire chez la plante et au niveau du réticulum endoplasmique chez la levure (Delhaize et al., 2003).

Nous avons donc tenté de localiser ce transporteur (ainsi que d'autres comme PtMTP2 et PtMTP3.2) chez la plante par expression transitoire des fusions protéines-GFP chez *A. thaliana* par transformation de protoplastes mais cette étude n'a pas donné de résultats convaincants. Ceci pouvant être dû à un problème au niveau de la fusion avec la GFP ce qui expliquerait l'absence de fluorescence ou à une instabilité de la protéine chimère. Quoiqu'il en soit une localisation *in planta* serait nécessaire pour confirmer la localisation chez *S. cerevisiae*.

Conclusions générales et perspectives

Le premier objectif des travaux présentés dans ce manuscrit était de mettre en évidence le potentiel accumulateur du peuplier par rapport aux autres espèces ligneuses

La démonstration du potentiel accumulateur du peuplier par rapport aux autres espèces ligneuses a été réalisée par la mesure des teneurs en métaux des feuilles et des tiges des arbres présents sur trois sites distincts entourant l'ancienne usine de Métaleurop (62) ainsi que sur le site de Micheville (54). Des mesures ont également été réalisées sur deux sites témoins dans le but de déterminer la teneur physiologique en métaux du peuplier.

Les teneurs normales en métaux lourds dans les sols loessiques de référence des alentours ont été préalablement déterminées et sont de l'ordre (en mg kg MS⁻¹) de 0,38 à 0,46 pour le Cd, 47 à 53 pour le Cr, 14 à 19 pour le Cu, 33 à 46 pour le Pb et 67 à 80 pour le Zn (Sterckeman et al., 2002).

Les teneurs foliaires normales pour les peupliers témoins sont comprises entre 1,6 et 2,6 mg Cd kg⁻¹, entre 0,2 et 0,6 mg kg MS⁻¹ pour le Cr, 1,7 mg Ni kg MS⁻¹, 40 à 70 mg kg MS⁻¹ de Mn, 20 mg Pb kg MS⁻¹ et 150 à 250 mg kg MS⁻¹ de Zn. Ces valeurs sont tout à fait comparables à celles présentes dans la littérature (Benton, 1998 ; Larcher, 2003 ; Kabata-Pendias, 1992).

Les teneurs en métaux totaux dans les sols des sites A, B et C de Métaleurop sont de 8 à 10 mg Cd kg MS⁻¹, de 400 à 500 mg Pb kg MS⁻¹ et celles de Zn de 400 à 750 mg kg MS⁻¹. Ces valeurs, supérieures aux normes, permettent de conclure que le sol est pollué par ces trois métaux. Si les valeurs de pH sont assez similaires entre sols, les concentrations en Cd, Pb, Mn et Zn extractibles au CaCl₂ sont de 5,5 à 14 fois plus élevées dans les sites A et B par rapport au site C.

Les teneurs en Zn mesurées dans les feuilles varient de 30 à 150 mg kg MS⁻¹ pour la plupart des espèces ligneuses. Cependant, le bouleau, le peuplier et le saule accumulent de 2 à 6 fois plus de Zn que les autres espèces, avec environ **850 mg Zn kg MS⁻¹ pour le peuplier** (moyenne réalisée sur les peupliers récoltés sur les 3 sites). Le facteur de bioconcentration le plus élevé est de 1,2 pour *P. tremula* x *P. tremuloides*. De plus, des teneurs plus importantes en Zn dans les feuilles de tremble (*P. tremula* x *P. tremuloides*) ont été mesurées sur le site de Micheville (1240 mg kg MS⁻¹). Des concentrations en Cd élevées sont recensées dans les feuilles de peuplier et de saule, allant de **13 à 44 mg Cd kg MS⁻¹** alors que celles des **autres espèces sont de 1 à 5 mg kg MS⁻¹**. Les facteurs de bioconcentration du Cd sont plus importants que pour le Zn car ils sont d'environ 2. De plus, les teneurs en Zn et Cd des

espèces accumulatrices sont plus élevées dans les feuilles que dans les tiges. Les valeurs obtenues pour les **autres métaux ne montrent pas de différence entre espèces** (mises à part de plus fortes teneurs en Mn dans les tissus aériens du chêne) ni d'accumulation de ceux-ci.

Il avait été précédemment démontré que *P. trichocarpa* x *P. deltoïdes* pouvait accumuler de fortes concentrations de Cd ($209 \text{ mg kg MS}^{-1}$) dans ses tissus foliaires sur un sol contenant jusqu'à $300 \text{ mg Cd kg MS}^{-1}$ (Robinson et al., 2000). Les plus fortes teneurs en Zn mesurées sur site pollué étaient de $2700 \text{ mg kg MS}^{-1}$ pour *S. viminalis* clone 78198 sur un sol qui contenait $1160 \text{ mg Zn kg MS}^{-1}$ (Hammer et al., 2003). Cependant, les pollutions recensées sur le sol de Métaeurop sont moins importantes que celles décrites ici, justifiant ainsi les plus faibles teneurs mesurées dans les tissus végétaux.

Nos données confirment l'hypothèse de départ à savoir que **le peuplier est une espèce intéressante pour la phytoextraction du Cd et du Zn** puisqu'il présente des concentrations en Cd et en Zn plus élevées que celles des autres ligneux présents sur les mêmes sites.

Pour compléter ces données, il serait utile de tester la capacité du peuplier à accumuler d'autres métaux, comme par exemple le Cu et Ni, sur d'autres sites présentant une pollution métallique plus importante et de comparer cette accumulation aux autres espèces ligneuses. Ces analyses permettraient de définir le spectre d'accumulation du peuplier en fonction de la pollution métallique du sol étudié et donc de préciser le cadre d'utilisation de cette espèce en phytoextraction.

Le deuxième objectif de mon travail visait à exploiter en phytoremédiation la variabilité génétique du peuplier in situ.

Dans le cadre du projet ANR PHYTOPOP, environ la moitié des cultivars testés en culture hydroponique ont également été plantés sur deux sites expérimentaux à savoir Pierrelaye (95) et Leforest (62). Ces deux sites sont pollués notamment par le Cd, le Pb et le Zn. De plus, deux itinéraires structuraux basés sur la densité de population ont été mis en place sur le site de Pierrelaye.

Sur le site de Leforest, les teneurs en métaux totaux sont d'environ $5 \text{ mg Cd kg MS}^{-1}$, $350 \text{ mg Zn kg MS}^{-1}$ et $250 \text{ mg Pb kg MS}^{-1}$. Une très faible proportion du Pb total est directement biodisponible (<1%). Il en est de même pour le Zn, pour lequel la proportion varie de 1 à 10%. En revanche, une proportion non négligeable du Cd total est sous forme échangeable ou soluble (5 à 24%).

Concernant, les teneurs mesurées dans les feuilles, elles sont d'environ **70 mg Cd kg MS⁻¹** pour le cv. **Lena** contre 15 mg Cd kg MS⁻¹ pour le cv. Triplo et **820 mg Zn kg MS⁻¹** contre 210 mg kg MS⁻¹ respectivement. Les variations observées entre cultivars pour les autres métaux sont moins importantes (de l'ordre d'un facteur 2).

La plupart des cultivars présentent un **facteur de bioconcentration du Cd compris entre 6 et 9**. Lena est le cultivar le plus performant quant à l'accumulation de Cd sur le site de Leforest puisque ce facteur est de 14 alors qu'il est de 3 pour Triplo. Les **facteurs de bioconcentration du Zn** sont bien moins importants et varient **de 2,4 pour Lena à 0,6** pour Triplo. Ceux des autres métaux sont tous inférieurs à 1.

D'autre part, nous avons étudié également l'effet saisonnier sur la teneur en métaux dans les feuilles. Il en ressort que les teneurs en Cd sont deux fois moins importantes en juillet qu'en octobre alors que les différences observées entre les teneurs en Zn à ces deux périodes sont moins variables. Il semble donc que la remobilisation automnale du Cd soit plus importante que celle du Zn. Des études plus approfondies seraient intéressantes pour élucider les mécanismes responsables de la remobilisation automnale des métaux chez le peuplier.

Sur le site de Pierrelaye, les teneurs en métaux totaux sont d'environ 3 mg Cd kg MS⁻¹, 480 mg Zn kg MS⁻¹, 280 mg Pb kg MS⁻¹ et 140 mg Cu kg MS⁻¹. Exceptée la pollution additionnelle en Cu, la pollution du site de Pierrelaye est donc du même ordre de grandeur que celle du site de Leforest. De plus, les facteurs de bioconcentration mesurés sont plus faibles sur le site de Leforest, notamment pour le Cd. De plus, certains cultivars accumulent assez bien le Ni puisque le facteur de bioconcentration le plus élevé est relevé pour le cv. Dvina (2,26). Les cultivars Lena, Dorskamp, Bakan et Flevo accumulent également le Ni.

Les premiers résultats obtenus sont très encourageants puisqu'il y a bien accumulation de métaux et notamment de Cd et de Zn dans tous les cultivars et sur les 2 sites. De plus, dans le cas de Leforest situé sur le site de Métaleurop, les résultats obtenus sur des arbres âgés de 6 mois sont déjà comparables à ceux obtenus sur des arbres de 10 ans plantés sur des sites voisins (sites A, B et C). **Le peuplier semble donc capable d'accumuler rapidement les métaux** présents dans le sol. De plus, les cultivars performants sur un site le sont aussi sur l'autre ce qui est très encourageant également compte tenu du fait que les 2 sites diffèrent tant par leur composition en métaux que, par leur ressource en eau et leur structure.

De plus, cette première étude nous permet de conclure que les **cultivars Lena, Vesten et Flevo sont d'excellents candidats pour la phytoextraction de sols pollués au Zn et au**

Cd alors que les *trichocarpa* et hybrides de *trichocarpa* sont de moins bons candidats, notamment pour la parcelle expérimentale de Pierrelaye.

Pour compléter ces données, il sera essentiel de connaître les biomasses produites par ces cultivars et cela sur les 2 sites. Les biomasses ont été estimées sur 4 cultivars plantés en TTCR sur le site de Pierrelaye. Il en ressort que le Triplo accumulait moins de Zn et de Cd que les autres cultivars mais possède une biomasse plus importante et présente donc une quantité de métaux extraite par unité de surface plus importante que les autres cultivars. Par la suite, il sera donc important d'estimer les biomasses de tous les cultivars et ce sur les deux sites avant de conclure totalement sur ce point.

Ainsi, en fin de projet PHYTOPOP, il sera possible de déterminer les cultivars les plus adaptés à la phytoextraction sur des sites contaminés aux métaux comme le Zn, le Cd et le Pb. Le fait d'analyser deux types d'itinéraires structuraux est également un plus quant à l'utilisation de la biomasse produite pour la production d'énergie.

Le troisième objectif de mon travail était d'étudier les réponses du peuplier à une exposition métallique en conditions contrôlées et de localiser les métaux au niveau tissulaire sur des peupliers cultivés sur sol contaminé.

Après avoir démontré que le peuplier était un bon accumulateur de métaux, notamment de Cd et de Zn, nous avons décidé de cribler plusieurs cultivars de peuplier par culture hydroponique dans le but de déterminer les cultivars les plus performants en phytoremédiation. Nous avons mesuré les teneurs foliaires en Cd et Zn de 21 cultivars différents, et nous nous sommes concentrés sur les teneurs foliaires car comme nous venons de le démontrer le Cd et le Zn se concentrent majoritairement dans les feuilles. Nous avons également testé l'effet du pH ainsi qu'une pollution à un seul métal.

Les cultivars semblant accumuler davantage le Cd sont des hybrides de *P. trichocarpa* ou des *trichocarpa* purs. Un facteur de l'ordre de 15 est observé entre les cultivars qui accumulent le plus (Skado, Rascalje, Bakan et Fritzi Pauley) et celui qui accumule le moins (L155A56) sachant que la teneur était d'environ 110 mg Cd kg MS⁻¹ pour le cv. Skado. Cela met donc bien en évidence une **différence d'accumulation entre cultivars.**

Les hybrides de *P. trichocarpa* sont également les plus forts accumulateurs de Zn, avec 1400 mg Zn kg MS⁻¹. Un facteur de l'ordre de 4 est observé entre les cultivars qui

accumulent le plus (Skado, Raspalje et Fritzi Pauley) et ceux qui accumulent le moins (L155A56, Soligo et AFO 662).

D'autre part, les teneurs en Cu et en Ni présentent des différences moins marquées entre espèces que les teneurs en Cd et en Zn. En effet, les valeurs les plus élevées sont de 70 mg kg MS⁻¹ (Skado) et les plus faibles de 30 mg kg MS⁻¹ (L155A56) pour le Ni. Concernant le Cu les valeurs fluctuent entre 23 mg kg MS⁻¹ (Muur) et 7 mg kg MS⁻¹ (Eridano). Les teneurs en Pb sont en dessous des limites de détection de l'ICP-AES.

Cependant, il ne faut pas oublier l'importance du facteur biomasse et il est donc nécessaire de considérer celui-ci en parallèle avec les teneurs en métaux accumulés. Ainsi, **Raspalje, Bakan, Skado et Vesten sont les cultivars les plus performants dans l'accumulation de Cd en conditions de culture hydroponique.**

D'autre part, nous avons voulu mesurer la part du pH dans les différences observées entre les résultats obtenus en culture hydroponique et sur site. Pour cela, nous avons testé l'influence du pH (pH 5,8 et pH 7,5) sur les cultivars Lena et Skado. De manière générale le cultivar Skado est peu influencé par le pH alors que Lena l'est énormément.

L'effet d'une pollution unique au Cd a été comparé à celui d'une multi-pollution sur les cultivars Lena et Skado. Les paramètres physiologiques tels que les biomasses tissulaires et les proportions foliaires en eau, sont de manière générale moins altérés lors d'une pollution unique au Cd. Le cv. Skado accumule davantage de Cd que le cv. Lena et cette accumulation est supérieure pour les deux cultivars dans le cadre d'une pollution unique au Cd. Ceci peut être expliqué par une compétition pour l'absorption entre ions métalliques et notamment entre le Cd et le Zn. De plus, il semblerait qu'une concentration de 100 µM de Cd, dans le cas d'une pollution unique, soit la concentration la plus élevée qu'un peuplier puisse supporter en culture hydroponique.

Dans le but d'expliquer les différences observées entre les résultats obtenus en culture hydroponique et ceux obtenus sur site, nous avons choisi d'adopter une technique intermédiaire à savoir l'étude de ces mêmes cultivars en chambre phytotronique dans des pots. Les cultivars Lena et Skado ont été plantés sur du sol provenant des 2 sites expérimentaux et cultivés selon 2 conditions hydriques différentes. En considérant les paramètres physiologiques, nous constatons que le cv. Skado a une croissance en hauteur supérieure au Lena alors que la biomasse foliaire est plus importante pour ce dernier. Quels que soient le sol et la condition hydrique utilisés, le cv. Skado semble utiliser davantage d'eau par rapport au Lena, ceci pouvant expliquer les résultats obtenus en culture hydroponique.

D'autre part, la biodisponibilité des métaux constitue un autre facteur important pouvant expliquer une partie des différences entre les résultats obtenus en culture hydroponique ou sur site. Les métaux sont environ 3 fois plus biodisponibles sur le sol de Leforest que sur le sol de Pierrelaye. Ceci est probablement dû à la différence de composition entre les deux sols. Concernant le Cd, nous obtenons un facteur de bioconcentration dans les feuilles de 1,33 pour le cv. Lena et 1,30 pour le Skado sur le sol de Pierrelaye donc il n'y a pas de différence significative entre les deux cultivars quant à l'accumulation foliaire de Cd. Ces valeurs sont respectivement de 2,9 pour le cv. Lena et 3,5 pour le Skado sur le sol de Leforest, ce qui laisse présager un potentiel accumulateur de Cd plus important pour le cv. Skado. Quant au Zn, nous obtenons un facteur de bioconcentration dans les feuilles de 0,6 pour le cv. Lena et 0,7 pour le Skado sur le site de Pierrelaye contre 0,7 et 0,9 respectivement sur le sol de Leforest. La différence d'accumulation entre les 2 cultivars est moins marquée pour le Zn que pour le Cd.

Les méthodes de criblage en laboratoire sur sol ou en culture hydroponique donnent des résultats différents de ceux obtenus par des essais en champ. Les cultivars de *P. trichocarpa* présentent les meilleures performances en laboratoire alors que nous venons de voir qu'ils sont les moins bons accumulateurs sur site. L'explication la plus probable concernant le cv. Skado et les *P. trichocarpa* en général est que leur besoin en ressource hydrique est supérieur au cv. Lena. Ils sont probablement cultivés dans des conditions optimales en culture hydroponique ainsi qu'en chambre phytotronique dans le cas du traitement « arrosage non limitant ». Ces conditions n'étant plus optimales sur site expérimental, leur potentiel accumulateur s'en trouve altéré. De plus, les interactions avec les champignons, les bactéries et tout autre organisme présent dans le sol sont absentes dans le cadre de ces études en laboratoire. L'effet de ces interactions sur le potentiel accumulateur n'est donc pas pris en compte dans le cadre des cultures hydroponiques et pourrait expliquer une partie des différences entre les résultats obtenus en culture hydroponique ou sur site.

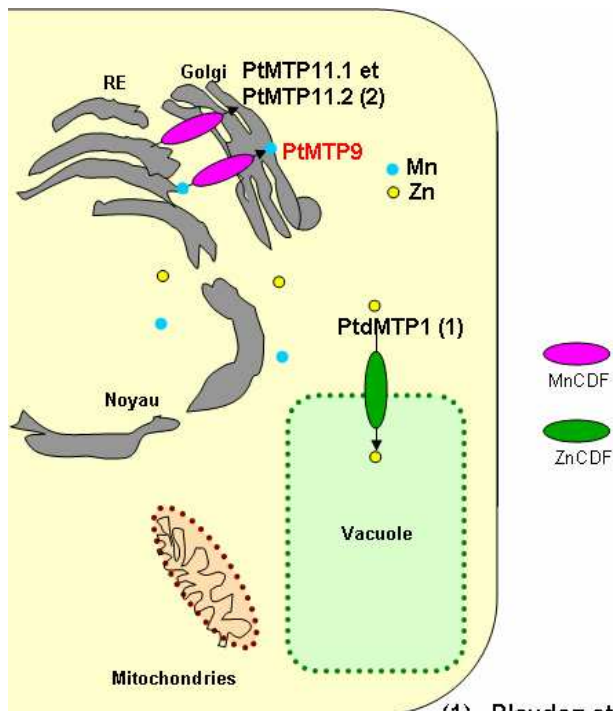
En considérant les variations de concentrations mesurées entre les techniques de criblage en laboratoire et la valorisation *in situ*, il serait intéressant d'étudier les souches fongiques présentes sur les deux sites expérimentaux. Une étude plus détaillée de ces souches permettrait de déterminer si elles ont tendance à augmenter ou diminuer l'absorption des métaux et ainsi leur transfert vers les parties aériennes. *In fine*, cela permettrait de conclure quels couples peuplier/champignon sont les plus adaptés en phytoextraction, les champignons

favorisant le transfert des métaux vers les plantes, ou au contraire en phytostabilisation, les champignons piègeant les métaux au niveau de leurs hyphes et inhibant le transfert vers le peuplier. D'autre part, les symbiotes fongiques peuvent également permettre une augmentation de la biomasse du végétal qui leur est associé, leur étude serait donc très intéressante.

Parallèlement à l'étude des réponses du peuplier à une exposition métallique en conditions contrôlées, nous avons tenté de localiser les métaux au niveau tissulaire sur des peupliers cultivés sur sol contaminé. L'analyse en microscopie électronique à balayage de tiges de peupliers récoltées sur le site de Métaleurop a mis en évidence une accumulation de Pb à la surface de l'écorce. Des traces de Zn ont également été décelées. La confirmation de la présence de Pb et Zn dans les tiges devrait être réalisée par des analyses en WDS (spectromètre à dispersion de longueur d'onde). Pour compléter ces analyses préliminaires, des peupliers de cv. Lena ont été plantés sur du sol contaminé provenant de Leforest et leurs feuilles ont été analysées par spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS). Ces analyses mettent en évidence de plus **fortes concentrations de Zn au niveau de l'épiderme ainsi que du mésophylle** alors que le Cd n'a pas pu être détecté. Ces analyses en SIMS ayant donné des résultats satisfaisants, il serait intéressant de renouveler l'expérience sur des feuilles de Lena prélevées sur le site de Leforest qui présentent les plus fortes teneurs en Cd (70 mg kg MS⁻¹) et Zn (820 mg kg MS⁻¹) (en effet, les teneurs des feuilles analysées ici étaient 3 fois moins importantes), ainsi que sur les tissus pérennes.

Le dernier objectif de mon travail était l'étude phylogénétique et la caractérisation fonctionnelle de transporteurs de métaux.

Nous avons réalisé une analyse phylogénétique des familles ZIP (Zrt-Irt like Proteins) et CDF (Cation Diffusion Facilitator) portant sur huit organismes photosynthétiques: une algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*), une bryophyte (*Physcomitrella patens*), une lycophyte (*Selaginella mollendorffii*), deux monocotylédones (*Oryza sativa* et *Sorghum bicolor*), trois dicotylédones (*Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* et *Populus trichocarpa*), ainsi que sur la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Le nombre de transporteurs dans ces familles est plus important pour les dicotylédones, puis pour les monocotylédones, les quatre autres organismes possèdent un nombre moins important de transporteurs putatifs de métaux.



(1) Blaudez et al., 2003

(2) Peiter et al., 2007

Figure 95: Récapitulatif des caractérisations fonctionnelles et localisations des transporteurs de métaux de la famille CDF réalisées chez le peuplier (PtMTP).

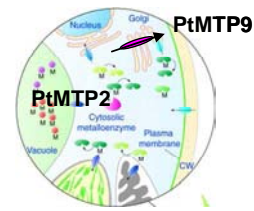
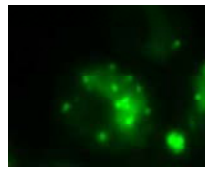
Nous avons également identifié les ESTs de peuplier correspondant à 12 PtZIPs et 12 PtMTPs. De manière générale, les ZIPs et les CDFs sont surtout exprimés dans les feuilles et dans les tissus vasculaires suggérant un rôle de ces différents transporteurs dans la translocation et le stockage des métaux dans les parties aériennes de la plante. D'autre part, les ZIPs sont plus exprimés dans les racines que les CDFs, ceci pouvant s'expliquer par le fait que les ZIPs sont souvent exprimés en cas de carence alors que les CDFs ont plutôt tendance à être surexprimés en cas d'excès. Ainsi, nous avons décidé d'étudier plus en détail les transporteurs CDFs.

Les analyses d'expression par RT-PCR montrent que tous les membres de la famille CDF sont exprimés, et certains présentent une expression différente en fonction du tissu analysé. Toutefois, la majorité des CDFs présente une expression similaire quelque soit le tissu considéré. Enfin, les CDFs, nommés MTPs chez les plantes semblent **davantage exprimés dans les tissus aériens que dans les racines**.

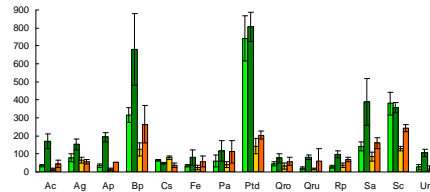
L'étude de l'expression des *MTPs* en condition de stress métallique a montré que **PtMTP1, PtMTP8.2 et PtMTP9 étaient plus exprimés sur sol pollué** (notamment au Cd, Pb et Zn) que sur sol témoin. Considérant les analyses phylogénétiques précédentes, PtMTP8.2 et PtMTP9 sont des transporteurs de Mn. D'autre part, le Mn est présent en quantité plus faible dans le sol pollué que dans le sol témoin. Le Mn étant un élément essentiel, les transporteurs de Mn semblent être exprimés davantage lorsque la concentration en Mn dans le sol est plus faible. Les plantes possèdent des mécanismes homéostatiques pour maintenir les concentrations internes des métaux essentiels entre les limites déficient et toxique et pour maintenir à l'extérieur les métaux non essentiels (Di Baccio et al., 2003). Considérant les analyses phylogénétiques précédentes, PtMTP2, PtMTP3.1 et PtMTP3.2 sont des transporteurs de Zn. Ces trois transporteurs sont moins exprimés lors de stress métallique et ceci dans tous les tissus. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : soit ils ne permettent pas la tolérance aux métaux, soit ils participent au fonctionnement cellulaire non perturbé, puisque le Zn est un élément essentiel.

Pour compléter ces travaux et confirmer la spécificité hypothétique des différents transporteurs analysés, nous avons entrepris la caractérisation fonctionnelle des CDFs de peuplier par expression hétérologue dans la levure. Nous avons ainsi montré que **PtMTP2 est un transporteur spécifique du Zn alors que PtMTP9 est un transporteur spécifique du Mn** (Figure 95). Les autres membres de la famille CDF n'ont pas pu être caractérisés. De

Mécanismes de séquestration
(PtMTP2 – transport de Zn)
(PtMTP9 – transport de Mn)



Caractère d'accumulation du Cd et du Zn par le peuplier:
(Migeon et al., 2009)



Capacité de phytoextraction
Variabilité intraspécifique

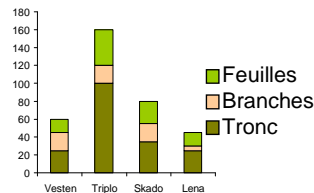


Figure 96 : Récapitulatif des données les plus marquantes obtenues au cours de cette thèse. Nous avons pu démontrer la présence de mécanismes de séquestration des métaux qui expliquent en partie le caractère d'accumulation du Cd et du Zn du peuplier par rapport aux autres espèces. De plus, le peuplier montre des capacités de phytoextraction variables entre cultivars.

futurs travaux sont donc nécessaires afin de compléter ces travaux et de caractériser les différents membres de la famille CDF de peuplier.

D'autre part, la localisation cellulaire par fusion GFP montre que PtMTP9 est localisé au niveau de l'appareil de Golgi quand l'expression transitoire est réalisée chez *S. cerevisiae*. Nous avons donc tenté de confirmer ce résultat par expression transitoire *in planta* par transformation de protoplastes d'*A. thaliana*. Malheureusement, ces expériences n'ont pas permis d'obtenir des résultats convaincants. Dans l'avenir, il serait donc intéressant de renouveler ces expériences et de réaliser une expression transitoire dans les cellules de mésophylle de tabac. De plus, l'élucidation de la localisation cellulaire d'autres transporteurs d'intérêt tels que PtMTP2, PtMTP3.2, PtMTP10.2 pourrait être réalisée par expression transitoire dans la levure et *in planta*.

Au cours de mon travail de thèse je me suis principalement intéressée aux transporteurs de la famille CDF. Toutefois, des analyses phylogénétiques ont également été réalisées sur les membres de la famille ZIP. Ainsi nous avons pu identifier les différents membres putatifs de la famille ZIP du peuplier. Parallèlement à la poursuite de la caractérisation des transporteurs CDFs, il serait intéressant de caractériser également les transporteurs ZIPs de peuplier. Ces différentes études permettraient d'élucider une partie des mécanismes moléculaires et cellulaires de transport et d'accumulation des métaux chez le peuplier et ainsi mieux comprendre pourquoi cette espèce présente des capacités d'accumulation de métaux lourds plus importantes que les autres espèces ligneuses. De plus, l'étude des autres familles de transporteurs de métaux est réalisée par d'autres membres du projet PHYTOPOP.

Pris dans leur ensemble (Figure 96), tous ces résultats montrent que (i) le peuplier possède un potentiel accumulateur important de métaux et notamment de Cd et de Zn, (ii) le potentiel accumulateur du peuplier varie en fonction du cultivar, (iii) la méthode la plus adaptée pour cribler les différents cultivars de peuplier est la plantation sur sites pollués, (iv) l'expression des transporteurs de métaux varie en cas d'exposition métallique.

Références bibliographiques

- ADEME et Cabinet Arthur ANDERSEN, 1999. Examen de la situation de la filière de recyclage agricole des boues d'épuration urbaines en Europe et dans divers autres pays du monde". ADEME Éditions n° 3358.
- Adriano D.C., Chlopecka A., Kaplan D.I., Clijsters H., Vangronsveld J., 1998. Soil contamination and remediation: philosophy, science and technology. Contaminated soils, IIIrd international conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Paris, Mai 1995. R. Prost (Ed). "Les colloques" n°85. INRA, Paris, p 465-505.
- Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J., Bolan, N.S., 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122, 121-142.
- Ager, F.J. , Ynsa, M.D., Domínguez-Solís, J.R., López-Martín, M.C., Gotor, C., Romero, L.C., 2003. Nuclear micro-probe analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 210, 401-406
- Altschul S.F., Boguski M.S., Gish W., Wootton J.C., 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genetics* 6: 119-129.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Arambourou H., Frasca B., Haddad A., Huvier Berkani C., Mascher N., Van de Voorde A., 2008. Possibilité de cultures sur les sols pollués d'Achères: prise en compte du potentiel de dépollution de la culture. Rapport SAGE M2. Projet PICRI CRIF 2005.
- Arrivault S., Senger T., Kramer U., 2006. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *Plant Journal* 46(5):861-879.
- Assuncao A.G.L., Martins P.D., De Folter S., Vooijs R., Schat H., Aarts M.G.M., 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment* 24: 217-226
- Atkinson, R., Aschmann, S.M., Hasegawa, D., Eagle-Thompson, E.T., Frankenberger, J. R., 1990. Kinetics of the atmospherically important reactions of dimethylselenide. *Environmental Science and Technology* 24, 1326-1332.
- Atkinson, M.D., Atkinson, E., 2002. *Sambucus nigra* L. *Journal of Ecology* 90, 895-923.
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments trace métalliques dans les sols (France). Paris.
- Baize, D., 2000. Teneurs en métaux lourds dans les sols : résultats généraux du programme ASPIPET. *Courrier de l'Environnement* 39 : 39-54.
- Baize D., Tercé M., 2002. Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales. Paris, INRA Editions.
- Baker, A.J.M. & Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metal elements: A review of their distribution, ecology, and phytochemistry. *Biorecovery*, vol. 1, 81-126.
- Baker, A.J.M. & Proctor, J., 1990. The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematics and Evolution* 173, 91-108.
- Baker, A.J.M. & Walker, P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects* (A. J. Shaw),. CRC Press. Florida . pp. 155-177.
- Banuelos, G.S., Meek, D.W., 1990. Accumulation of Selenium in Plants Grown on Selenium-Treated Soil. *Journal of Environmental Quality* 19, 772-777.
- Banuelos, G.S., Shannon, M.C.; Ajwa, H., Draper, J.H., Jordahl, J., Licht, J., 1999. Phytoextraction and accumulation of boron and selenium by poplar (*Populus*) hybrid clones. *International Journal of Phytoremediation* 1, 81-96.

- Banuelos, G.S., Cardon, G., Mackey, B., Ben-Asher, J., Wu, L., Beuselinck, P., Akohoue, S., Zambrzuski, S., 1993. Boron and selenium removal in boron-laden soils by four sprinkler irrigated plant species. *Journal of Environmental Quality* 22, 786-792.
- Barber S.A., 1995. *Soil Nutrient Bioavailability, a mechanistic approach*. John Wiley and Sons, New-York.
- Bargagli R., 1998. Trace elements in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer. 324 p.
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., and Kramer, U., 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*. 37: 251-268.
- Benton Jones J., 1998. *Plant Nutrition Manual*. CRC Press, 2000 Corporate Blvd., Boca Raton. 149 pp.
- Berti, W.R., & Cunningham, S. D., 2000. Phytostabilization of metals. In I. Raskin & B. D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean-up the environment*. New York: Wiley. pp. 71–88.
- Bidar, G, Intérêt du phytomanagement dans la gestion durable des sols pollués. Recherche des mécanismes biologiques de transfert et de localisation de Cd, Pb, Zn dans les strates herbacées et arborées. Thèse, 2007.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., and Chalot, M., 2003. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* 15: 2911-2928.
- Blaylock, M.J., Huang, J.W., 2000. "Phytoextraction of metals" In: Raskin. & B D Ensley, I eds. , *Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean up the Environment*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 53-70.
- Bloss, T., Clemens, S., Nies, D.H., 2002. Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta*, 214(5):783-791.
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Naidu, R., 2003. Role of phosphorus in (im)mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 177, 1-44.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Abouddrar, W., Ouhammou, A., Morel, J.L. 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* 63, 811-817.
- Bourennane, H., Dère, C., Lamy, I., Cornu, S., Baize, D., van Oort, F., King, D., 2006. Enhancing spatial estimates of metal pollutants in raw wastewater irrigated fields using a topsoil organic carbon map predicted from aerial photography. *Science of the Total Environment* 361, 229-248.
- Bradshaw H.D., Ceulemans R., Davis J., Stettler R., 2000. Emerging model system in plant biology : Poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 306-313.
- Broadhurst, C.L. , Chaney, R.L., Angle, J.S., Mangel, T.K., Erbe, E.F., Murphy, C.A., 2004. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environmental Science and Technology* 38, 5797-5802.
- Brooks, R.R., 1998. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. In: Brooks, R.R. (Ed.). *CAB International*, Wallingford, pp. 289-312.
- Brooks, R.R. , Chambers, M.F., Nicks, L.J., Robinson, B.H., 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science* 3, 359-362.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J., 1995. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal* 59, 125-133.

- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M. 1995. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. *Environmental Science and Technology* 29, 1581-1585.
- Brunner, A.M., Busov V.B., Strauss S.H., 2004. Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science* 9: 49-56.
- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R.L., 2002. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* American Society of Plant Physiologists (distribution through Wiley & Sons) Monona Drive, Rockville, USA.
- Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., Karin, M., 1989. The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 9(9):4091-5
- Bughio, N, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Nakanishi H, Mori S. 2002. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany* 53: 1677–1682.
- Burd, G.I. , Dixon, D.G., Glick, B.R., 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 237-245.
- Busch, W., Saier Jr, M.H., 2002. The Transporter Classification (TC) system, 2002. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37, 287-337.
- Castiglione, S., Todeschini, V., Franchin, C., Torrigiani, P., Gastaldi, D., Ciatelli, A., Rinaudo, C., Berta, , Biondi, S. , Lingua, G., 2009. Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: A large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environmental Pollution*. In press.
- Cervera, M.T., Storme, V., Soto, A., Ivens, B., Van Montagu, M., Rajora, O.P., Boerjan, W. 2005. Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 1440-1456.
- Chaîneau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J. 2000. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *Journal of Environmental Quality* 29, 569-578.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 279-284.
- Chang, P., Kim, J.Y., Kim, K.W., 2005. Concentrations of arsenic and heavy metals in vegetation at two abandoned mine tailings in South Korea. *Environmental Geochemistry and Health* 27:109-119.
- Chien A., Edgar D.B., Trela J.M., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127: 1550-1557.
- Christie, P. , et al., 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil* 261, 209-217.
- Clemens, S., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7: 309-315.
- Clemente, R., Almela, C., Bernal, P.M. 2006. A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environmental Pollution* 143 (3), 397–406.
- Clemente, R., Walker, J.D., Roig, A., Bernal, P.M., 2003. Heavy metal bioavailability in a soil affected by mineral sulphides contamination following the mine spillage at Aznalcóllar (Spain). *Biodegradation* 14, 199–205.
- Colangelo, E.P., Guerinot, M.L., 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 322-330.
- Collins, R.N., Merrington, G., McLaughlin, M.J., Morel, J.L., 2003. Organic ligand and ph effects on isotopically exchangeable cadmium in polluted soils. *Soil Science Society of America Journal* 67, 112-121.

- Conesa, H.M., Faz, A., Arnaldos, R., 2007. Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain). *Chemosphere* 66, 38-44.
- Conklin, D.S., McMaster, J.A., Culbertson, M.R., Kung, C., 1992. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology*, 12(9):3678-3688.
- Connolly, E.L., Fett, J.P., Guerinot, M.L., 2002. Expression of the *irt1* metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14: 1347-1357.
- Cooper, E.M., Sims, J.T., Cunningham, S.D., Huang, J.W., Berti, W.R. 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 28, 1709-1719.
- Culotta V.C., Yang, M., Hall, M.D., 2005. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4(7):1159-65
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13, 393-397.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110, 715-719.
- Cunningham, S.D., Shann, J.R., Crowley, D.E., & Anderson, T.A., 1997. Phytoremediation of contaminated water and soil. In E. L. Kruger, T. A. Anderson, & J. R. Coats (Eds.), *Phytoremediation of soil and water contaminants*. ACS Symposium series 664 (pp. 2-19). Washington, DC: American Chemical Society.
- D'Arcimoles, M., Borraz, O., Salomon, D., 2000. Les mondes des boues: la difficile institutionnalisation des filières d'épandage des boues d'épuration urbaines en agriculture, convention ADEME/CNRS. n° 9875044.
- De Varennes, A. , Torres, M.O, Coutinho, J.F., Rocha, M.M.G.S., Neto, M.M.P.M., 1996. Effects of heavy metals on the growth and mineral composition of a nickel hyperaccumulator. *Journal of Plant Nutrition* 19, 669-676.
- Dec, J., Bollag, J.M., 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 1132-1139.
- Delhaize, E. , Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., Ryan, P.R., 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* 15, 1131-1142.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, C., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, J., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol.
- Dère, C., 2006. Mobilité et redistribution à long terme des éléments traces métalliques exogènes dans les sols : Application à des Luvisols pollués par 100 ans d'épandage d'eaux usées brutes dans la plaine de Pierrelaye. Thèse pour le grade de docteur. ENGREF.
- Dère, C., Lamy, I., Jaulin, A., Cornu, S. 2007. Long-term fate of exogenous metals in a sandy Luvisol subjected to intensive irrigation with raw wastewater. *Environmental Pollution* 145, 31-40.
- Desouza, M.P., Pilon-Smits, E.A. H., Terry, N., 2000. The physiology and biochemistry of selenium volatilization by plants. In I. Raskin, & B. D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean-up the environment*. New York: Wiley. pp. 171-190.
- Di Baccio, D., Tognetti, R., Sebastiani, L., and Vitagliano, C., 2003. Responses of *Populus deltoides* x *Populus nigra* (*Populus* x *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytologist*. 159: 443-452.

- Dierberg, F.E., Débuts, T.A., Goulet, J.R.N.A., 1987. Removal of copper and lead using a thin-film technique. In K. R. Reddy & W. H. Smith (Eds.), *Aquatic plants for water treatment and resource recovery*. Magnolia. pp. 497–504.
- Dominguez M.T., Maranon, T., Murillo, J.M., Schulin, R., Robinson, B.H., 2008. Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain : A large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution* 152: 50-59.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Loriette, A., Fourrier, H., 2008a. Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *Science of the Total Environment* 401, 29-38.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008b. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water, Air, and Soil Pollution* 188, 247-260.
- Downs, R.J. & Hellmers H., 1975. *Environment and the Experimental Control of Plant Growth*, Academic (New York) 145 pp.
- Dräger, D.B. , Desbrosses-Fonrouge, A.-G., Krach, C., Chardonens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P., Krämer, U., 2004. Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *Plant Journal* 39, 425-439.
- DRIAF-SRPV 2008. Rapport de synthèse. De Comarmond, H., Dron C., Serrec, K., Therre, N. Des plans de surveillance des cultures et des récoltes des campagnes 2005-2006-2007 mis en œuvre sur les périmètres agricoles des communes de Pierrelaye-Bessancourt-Achères pollués par les épandages des eaux usées brutes d'épuration de la ville de Paris.
- DRIRE, 2003. *L'industrie au regard de l'environnement*. Direction Régionale de l'Industrie et de la Recherche de l'Environnement, Douai, 308p.
- Dushenkov, S., Kapulnik, Y., 2000. Phytofiltration of metals. In I. Raskin & B. D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals – Using plants to clean-up the environment*. New York: Wiley. pp. 89–106.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H., Raskin, I., 1995. Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology*, 29, 1239–1245.
- Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K.C., et al. 1997a. Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environmental Science and Technology*, 31(12), 3468–3474.
- Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K.C., et al. 1997b. Phytoremediation: A novel approach to an old problem. In D. L. Wise (Ed.), *Global environmental biotechnology*. Amsterdam: Elsevier. pp. 563–572.
- Ebbs, S.D., Lasat, M.M., Brady, D.J., Cornish, J., Gordon, R., Kochian, L.V., 1997. Heavy metals in the environment: Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 26, 1424-1430.
- Eckenwalder J.E., 1996. Systematics and evolution of *Populus*. *Biology of Populus*. Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, et Hinckley TM. (Eds) NRC Research Press: 7-32.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5624-5628.
- Ellis C.D., Macdiarmid C.W., Eide D.J., 2005,: Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry* 280(31):28811-28818
- Ensley, B.D. 2000. Rationale for use of phytoremediation. In I. Raskin, & B. D. Ensley

- (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean- up the environment*. New York: Wiley. pp. 3–12.
- Esnaola, M.V., Millan, E., 1998. Evaluation of heavy metal lability in polluted soils by a cation exchange batch procedure. *Environmental Pollution* 99, 79-86.
- Evans, C.S., Asher, C., & Johnson, C.M., 1968. Isolation of dimethyl diselenide and other volatile selenium compounds from *Astragalus racemosus* (Pursh.) *Aust. Journal of Biological Sciences*, 21, 13–20.
- Farago M.E., 1994. *Plants and the chemical elements, biochemistry, uptake and toxicity*. VCH, Weinheim, Allemagne.
- Fernando, D.R. , Batianoff, G.N., Baker, A.J., Woodrow, I.E., 2006. In vivo localization of manganese in the hyperaccumulator *Gossia bidwillii* (Benth.) N. Snow & Guymmer (Myrtaceae) by cryo-SEM/EDAX. *Plant, Cell and Environment* 29, 1012-1020.
- Fernando, D.R. , Woodrow, I.E., Jaffré, T., Dumontet, V., Marshall, A.T., Baker, A.J.M., 2008. Foliar manganese accumulation by *Maytenus founieri* (Celastraceae) in its native New Caledonian habitats: Populational variation and localization by X-ray microanalysis. *New Phytologist* 177, 178-185.
- Flathman, P.E., Lanza, G.R., 1998. Phytoremediation: Current views on an emerging green technology. *Journal of Soil Contamination*, 7(4), 415–432.
- Franklin, R.E., Duis, L., Brown, R., Kemp, T., 2005. Trace element content of selected fertilizers and micronutrient source materials. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36, 1591-1609.
- Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., Escarre, J., 2006. Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil* 282, 53-65.
- Gaither, L.A.Eide, D.J., 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* 14, 251-270.
- Garbisu, C.Alkorta, I., 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77, 229-236.
- Gardea-Torresdey, J.L. , De La Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., 2004. Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure and Applied Chemistry* 76, 801-813.
- Gaur, A.Adholeya, A., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86, 528-534.
- Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle Size Analysis. Klute, A. (Ed.), *Methods of soil analysis*. American Society of Agronomy and Soil Science Society of Agronomy, Madisson, pp. 383-411.
- Glass, D.J., 1999. *US and International Markets for Phytoremediation, 1999-2000*. D. Glass Associates, Inc, Needham, MA, USA. 270 p.
- Gleave A.P., 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* 20: 1203–1207.
- Godin, P.M., Feinberg, M.H., Ducauze, C.J., 1985. Modelling of soil contamination by airborne lead and cadmium around several emission sources. *Environmental Pollution Series B: Chemical and Physical* 10, 97-114.
- Gohre, V., Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115-1122.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., Eide, D., 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95:7220–7224

- Guedry O, Lazard, M., Delort, F., Dauplais, M., Grigoras, I., Blanquet, S., Plateau, P., 2003. Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 270 (11):2486-96.
- Guerinot, M.L., 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1465, 190-198.
- Hall, J.L., Williams, L.E., 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54, 2601-2613.
- Hammer, D., Kayser, A., Keller, C., 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Management* 19, 187-192.
- Haney, C.J., Grass, G., Franke, S., Rensing, C., 2003. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 32(6):215-226
- Hawf, L.R., Schmid, W.E., 1967. Uptake and translocation of zinc by intact plants. *Plant and Soil*, 27, 249-260..
- Hawkins, S., Leplé, J.C., Cornu, D., Jouanin, L., Pilate, G., 2003. Stability of transgene expression in poplar : A model of forest tree species. *Annals of Forest Science* 60: 427-438.
- Heaton, A.C.P., Rugh, C.L., Wang, N., Meagher, R.B. 1998. Phytoremediation of mercury- and methyl mercury-polluted soils using genetically engineered plants. *Journal of Soil Contamination*, 74, 497-510.
- Homer, F.A., Reeves, R.D, Brooks, R.R., Baker, A.J.M., 1991. Characterization of the nickel-rich extract from the nickel hyperaccumulator *Dichapetalum gelonioides*. *Phytochemistry* 30, 2141-2145.
- Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., Van Vark, W., 2000. Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31, 1299-1396.
- HPC-Envirotec 2008. Karg F., Langlois F., Guyot F., François L. SIAAP_Etude environnementale de l'actuelle plaine d'épandage de Méry-sur-Oise et Pierrelaye (95). Etude historique et documentaire.
- Huang, J.W., Cunningham, S.D., 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134, 75-84.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R., Cunningham, S.D., 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31, 800-805.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2005. Oszip4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *Journal of Experimental Botany* 56: 3207-3214
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsubishi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant Journal* 45, 335-346.
- Ito H., Fukuda Y., Muruta K., Kimura A., 1983. Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 153: 163-168.
- Jain, S.K., Vasudevan, P., Jha, N.K., 1989. Removal of some heavy metals from polluted water by aquatic plants: Studies on duckweed and water velvet. *Biological Wastes* 28(2), 115-126.
- Jones, J.B., 1997. *Hydroponics: a practical guide for the soilless grower*. Boca Raton, Fla: St. Lucie Press XIV, 230p.
- Juste, C., 1988. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Science du sol* 26(2) : 103-112.

- Juste, C., Chassin, P., Gomez, A., Lineres, M., Mocquot, B., Feix, I., Wiart, J., 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. ADEME. 209p.
- Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., Kimura, A., 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics*, 219(1-2):161-167
- Kay, H., Haller, W.T., Garrard, L.A., 1984. Effects of heavy metals on water hyacinths (*Eichhornia crassipes* (mart.) solms). *Aquatic Toxicology* 5, 117-128.
- Khan, A.G. , Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41, 197-207.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 355-364.
- Kim, D., Gustin, J.L., Lahner, B., Persans, M.W., Baek, D., Yun, D.-J., and Salt, D.E., 2004. The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Plant Journal* 39: 237-251.
- Kirkham, M.B. 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137, 19-32.
- Klang-Westin, E., Eriksson, J., 2003. Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant and Soil* 249, 127-137.
- Koncz C., Schell J., 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L., Pakrasi, H.B., 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* 40:37-44.
- Krämer, U., Smith, R.D., Wenzel, W.W., Raskin, I., Salt, D.E. 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology* 115, 1641-1650.
- Krämer, U. , Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I., Salt, D.E., 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* 122, 1343-1353.
- Kumanovics, A., Poruk, K.E., Osborn, K.A., Ward, D.M., Kaplan, J., 2006. YKE4 (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22566-22574.
- Kumar, P.B.A.N. , Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., 1995. Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environmental Science & Technology* 29, 1232-1238.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5: 150-163.
- Kuo, S., Jellum, E.J., Baker, A.S., 1985. Effects of soil type, liming, and sludge application on zinc and cadmium availability to Swiss chard. *Soil Science* 139, 122-130.
- Küpper, H., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 119, 305-311.
- Küpper, H., 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212: 75-84.

- Landberg, T., Greger, M., 1996. Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry* 11, 175-180.
- Lamy et al. 2003. Etude EPANDAGRI: Etude d'un secteur agricole pollué par les épandages d'eaux usées: bilan environnemental et possibilités de reconversion végétales. Troisième rapport d'avancement des travaux, 204p.
- Larcher, W. 2003. *Physiological plant ecology*. 4e éd. Springer. 513p.
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Lasat, M.M., Fuhrmann, M., Ebbs, S.D., Cornish, J.E., Kochian, L.V., 1998. Phytoremediation of a radiocesium-contaminated soil: Evaluation of cesium-137 bioaccumulation in the shoots of three plant species. *Journal of Environmental Quality* 27, 165-169.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 51, 71-79.
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., Ceulemans, R., 2004. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, 131, 485-494
- Lefevre, P. 1961. Contribution à l'étude de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols non calcaires. I. Capacité d'échanges. Discussion et choix des méthodes. *Annales d'agronomie*, 12, 169-206.
- Leschber R., Davis R.D., L'Hermite P., 1984. Chemical methods for assessing bio-available metals and soils. CEC, Elsevier Applied Science Publishers.
- Lewis, B.G., Johnson, C.M., Delwiche, C.C., 1966. Selenium: Release of volatile selenium compounds by plants. Collection procedures and preliminary observations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 14, 638-640.
- Li, L., Kaplan J., 1997. Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45):28485-28493
- Li, L., Kaplan, J., 1998. Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* 273, 22181-22187
- Li, L., Kaplan, J., 2001. The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7):5036-5043
- Li ZS, Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczyepka, M., Thiele, D.J., Rea, P.A., 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1):42-7
- Lin, S.J., Culotta, V.C., 1996. Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* *ATX2*, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Molecular and Cellular Biology* 16, 6303-6312.
- Loganathan, P. & Hedley, M.J., 1997. Downward movement of cadmium and phosphorus from phosphatic fertilisers in a pasture soil in New Zealand. *Environmental Pollution* 95, 319-324.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J. McGrath, S.P., 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* 30, 1919-1926.

- Lombi, E., Zhao, F.J., Fuhrmann, M., Ma, L.Q., McGrath, S.P. 2002. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist* 156, 195-203.
- Lombini, A., Llugany, M., Poschenrieder, C., Dinelli, E., Barcelo, J., 2003. Influence of the Ca/Mg ratio on Cu resistance in three *Silene armeria* ecotypes adapted to calcareous soil or to different, Ni- or Cu-enriched, serpentine sites. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1451-1456.
- Lopez-Millan, A.F., Ellis D.R., Grusak M.A., 2004. Identification and characterization of several new members of the zip family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 54: 583–596
- Lunackova, L., Masarovicova, E., Kral'Ova, K., Stresko, V., 2003. Response of fast growing woody plants from family Salicacées to cadmium treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 576-585.
- Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J., 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6.
- Luttringer, M., de Cormis, L., 1979. La pollution par les métaux lourds à Noyelles-Godault et ses environs (Pas de Calais), Technical Report, INRA, Station d'étude de la pollution atmosphérique, 12p.
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., Eide, D.J., 2002. Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 39187-39194.
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., Eide, D., 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 19, 2845-2855.
- McIntyre, T., 2003. Phytoremediation of heavy metals from soils. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 78, 97-123.
- Mains, D., Craw, D., Rufaut, C.G., Smith, C.M.S., 2006a. Phytostabilization of gold mine tailings, New Zealand. Part 1: Plant establishment in alkaline saline substrate. *International Journal of Phytoremediation* 8(2), 131–147.
- Mains, D., Craw, D., Rufaut, C.G., & Smith, C.M.S., 2006b. Phytostabilization of gold mine tailings from New Zealand. Part 2: Experimental evaluation of arsenic mobilization during revegetation. *International Journal of Phytoremediation* 8(2), 163–183.
- Maiz, I., Arambarri, I., Garcia, R., Millán, E., 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental Pollution* 110, 3-9.
- Martinoia, E., Massonneau, A., Frangne, N., 2000. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant & Cell Physiology*. 41: 1175-1186.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchiew, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., and Guerinot, M.L., 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 1646-1667.
- Meers, E., Lamsal, S., Vervaeke, P., Hopgood, M., Lust, N., Tack, F.M.G., 2005. Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environmental Pollution* 137, 354-364.
- Mench M., 1993. Notions sur les éléments en trace pour une qualité des sols et des produits végétaux. *Purpan* 166. 118-127.
- Mench, M., Baize, D., Mocquot, B., 1997. Cadmium availability to wheat in five soil series from the Yonne district, Burgundy, France. *Environmental Pollution* 95, 93-103.

- Mench, M. & Baize, D., 2004. Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en trace. *Courrier de l'Environnement*, n°52 p31-56.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., 2001. Principles of plant nutrition, Dorrecht, 849 pp.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145: 121-130.
- Merian, E., 1991. Metals and their compounds in the environment, Occurrence, Analysis, and Biological relevance. VCH, Weinheim, Allemagne
- Minet M. , Dufour M.E., Lacroute F., 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *The Plant Journal* 2: 417-422.
- Miyabe, S., Izawa, S., and Inoue, Y., 2001. The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical & Biophysical Research Communication*. 282, 79–83.
- Mo, S.C., Choi, D.S., Robinson, J.W., 1989. Uptake of mercury from aqueous solution by duckweed: The effect of pH, copper, and humic acid. *Journal of Environmental Health* 24, 135–146.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., Chalot, M., 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8, 107.
- Morel, J.L., 1997. Bioavailability of Trace Elements to Terrestrial Plants. Tarradellas J., Bitton D. (Eds). *Soil ecotoxicology*. CRC. Lewis Publishers, Boca Raton 6. 141-175.
- Nanjo, T., Futamura, N., Nishiguchi, M., Igasaki, T., Shinozaki, K., Shinohara, K., 2004. Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant and Cell Physiology* 45: 1738-1748.
- Newman, L.A. , Strand, S.E., Choe, N., Duffy, J., Ekuan, G, Ruszaj, M., Shurtleff, B.B., Wilmoth, J., Heilman, P., Gordon, M.P. 1997. Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environmental Science and Technology* 31, 1062-1067.
- Nies, D.H., Silver, S., 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 186-199.
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313-339.
- OFEFP 1996. Sols pollués- métaux lourds et plantes bioindicatrices. Documents Environnement n°58, Sol, Berne, Suisse.
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 184, 105-126.
- Palmer, C.E., Warwick, S., Keller, W., 2001. Brassicaceae (Cruciferae) Family, Plant Biotechnology, and Phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 3, 245-287.
- Palmiter, R.D., Cole, T.B., Findley, S.D., 1996. ZnT-2, a mamalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO* 15: 1784-1791
- Palmiter, R.D., Findley, S.D., 1995. Cloning and functional characterization of a mamalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO* 14: 639-649
- Paulsen, I.T., Saier, J.M.H., 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *Journal of Membrane Biology* 156, 99-103.
- Peijnenburg, W.J.G.M. , Zablotzkaja, M., Vijver, M.G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 163-179.
- Peiter E., Maathuis F.J., Mills L.N., Knight H., Pelloux J., Hetherington A.M., Sanders D., 2005. The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434: 404-408.

- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M., Blaudez, D., Chalot, M., Sanders, D., 2007. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4956-4960.
- Persans, M.W., Nieman, K., Salt, D.E., 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9995-10000.
- Piczak, K., Lesniewicz, A., Zyrnicki, W., 2003. Metal concentrations in deciduous tree leaves from urban areas in Poland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 86, 273-287.
- Pilon-Smits, E.A.H., De Souza, M.P., Hong, G., Amini, A., Bravo, R.C., Payabyab, S.T., Terry, N., 1999. Selenium volatilization and accumulation by twenty aquatic plant species. *Journal of Environmental Quality* 28, 1011-1018.
- Pilon-Smits, E., Pilon, M., 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 439-456.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation, *Annual Review of Plant Biology*, pp. 15-39.
- Portnoy, M.E., Jensen, L.T., Culotta, V.C., 2002. The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochemical Journal* 362(Pt 1):119-24
- Prasad, M.N.V., De Oliveira Freitas, H.M., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 110-146
- Prasad, M.N.V., 2004. Heavy metal stress in plants : from biomolecules to ecosystems (2^{ème} édition). Springer.
- Prudente, D., 1999. Distribution des teneurs naturelles en cadmium dans les sols de la forêt communale des Fourgs (Doubs, France). Dipl. Et. Sup. Univ. Genève et EPF. Lausanne. 68p.
- Pruvot, C., Douay, F., Hervé, F., Waterlot, C., 2006. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *Journal of Soils and Sediments* 6, 215-220.
- Pugh, R.E., Dick, D.G., Fredeen, A.L., 2002. Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe, and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 273-279.
- Pulford, I.D., Watson, C., McGregor, S.D., 2001. Uptake of chromium by trees: Prospects for phytoremediation. *Environmental Geochemistry and Health* 23, 307-311.
- Pulford, I.D., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - A review. *Environment International* 29, 529-540.
- Ramesh, S.A., Shin, R., Eide D.J., Schachtman, D.P., 2003. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiology* 133: 126-134.
- Raskin, I., 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29, 1232-1238.
- Raskin, I., Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, S., Salt, D.E., 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 285-290.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 221-226.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2000. Metal-accumulating plants. In: I. Raskin and B.D. Ensley, Editors, *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, John Wiley and Sons Inc., New York, USA. pp. 193-229.

- Remon, E., Bouchardon, J.L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J.C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137, 316-323.
- Rinaldi C., 2007. Caractérisation des déterminants géniques impliqués dans l'interaction entre un agent pathogène, *Melampsora larici-populina*, et le Peuplier. Thèse
- Rizzi, L., Petruzzelli, G., Poggio, G., Vigna, G., 2004. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere* 57(9), 1039–1046.
- Robinson, B.H., Brooks, R.R., Howes, A.W., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., 1997. The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *Journal of Geochemical Exploration* 60, 115-126.
- Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., De Dominicis, V., 1997. The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration* 59, 75-86.
- Robinson, B.H. , Mills, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R., Clothier, B.E., 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227, 301-306.
- Robinson, B.H. , Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 2003. Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytologist* 158, 279-285.
- Roper, J.C., Dec, J., Bollag, J.M., 1996. Using minced horseradish roots for the treatment of polluted waters. *Journal of Environmental Quality* 25, 1242-1247.
- Rose, A.W., Hawkes, H.E., Webb, J.S., 1979. *Geochemistry in mineral exploration*. 2nd edition, Press.
- Rosselli, W., Keller, C., Boschi, K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil* 256, 265-272.
- Rugh, C.L. ,Gragson, G.M., Meagher, R.B., Merkle, S.A., 1998. Toxic mercury reduction and remediation using transgenic plants with a modified bacterial gene. *HortScience* 33, 618-621.
- Saier J.M.H., 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 354-411.
- Saier J.M.H., Tran, C.V., Barabote, R.D., 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic acids research*. 34, D181-186.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, M., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H., and Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 239: 487-491.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 643-668.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology* 13, 468-474.
- Santos, F.S., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amaral-Sobrinho, N., Mazur, N., Garbisu, C., 2006. Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere* 65, 43-50.

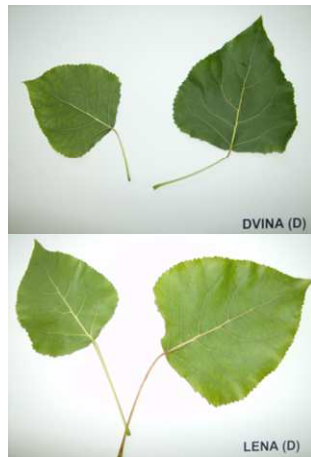
- Saxena, P.K., Krishnaraj, S., Dan, T., 1999. Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated and Polluted Soils. In: Prasad MNV, Hagemeyer J., editors. Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystems. Berlin: Springer. pp. 305–329.
- Schnoor, J.L., 2000. Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees. In I. Raskin & B. D. Ensley (Eds.), Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean-up the environment. New York: Wiley. pp. 133–150.
- Sebastiani, L., Scebba, F., Tognetti, R., 2004. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. Environmental and Experimental Botany 52, 79-88.
- Sezgin, N., Ozcan, H.K., Demir, G., Nemlioglu, S., Bayat, C., 2004. Determination of heavy metal concentrations in street dusts in Istanbul E-5 highway. Environment International 29, 979-985.
- Siberlin, N. 1996. Biodisponibilité des éléments traces dans un sol cultivé : étude du transfert dans une culture de maïs en champ et conséquences sur le rendement. Mémoire de fin d'études, IUT Louis Pasteur ; Schiltigheim.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. Applied Microbiology and Biotechnology 61, 405-412.
- Smart, K.E., Kilburn, M.R., Salter, C.J., Smith, J.A.C., Grovenor, C.R.M., 2007. NanoSIMS and EPMA analysis of nickel localisation in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. International Journal of Mass Spectrometry 260, 107-114.
- Smit, H., 1998. Pollution prevention policies for agricultural soils in the Netherlands. Proc. IIIrd international conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Paris, Mai 1995. R. Prost (Ed). "Les colloques" n°85. INRA, Paris.
- Smith, R.A.H., Bradshaw, A.D., 1992. Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. Transactions of the Institution of Mining and Metallurgy, 81, A230–A237.
- Soltner, D., 1999. Les bases de la production végétale. Tome III- la plante et son alimentation. Collection sciences et techniques agricoles. 304p.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. Environmental Pollution 107, 377-389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. Water, Air, and Soil Pollution, 135, 173-194.
- Sterckeman, T., Douay, F., Baize, D., Fourrier, H., Proix, N., Schwartz, C., Carignan, J., 2006. Trace element distributions in soils developed in loess deposits from northern France. European Journal of Soil Science, 57, 392-410.
- Stoltz, E., Greger, M., 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. Environmental and Experimental Botany 47, 271-280.
- Stomp, A.M., Han, K.H., Wilbert, S., Gordon, M.P., Cunningham, S.D., 1994. Genetic strategies for enhancing phytoremediation. Annals of the New York Academy of Sciences 721, 481-491.
- Strand, S.E., Newman, L., Ruszaj, M., Wilmoth, J., Shurtleff, B., Brandt, M., Choe, N., Ekuan, G., Duffy, J., Massman, J. W., Heilman, P.E., Gordon, M.P., 1995. Removal of trichloroethylene from aquifers using trees. Proceedings of the National Conference of the Environmental Engineering Division of the American Society of Civil Engineers.

- Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18, 647-658.
- Suszcynsky, E.M., Shann, J.R., 1995. Phytotoxicity and accumulation of mercury in tobacco subjected to different exposure routes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 61-67.
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2006. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere* 62, 1454-1463.
- Taylor G., 2002. *Populus/ Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany (London)* 90: 681-689.
- Terry, N., Carlson, C., Raab, T.K., Zayed, A.M., 1992. Rates of selenium volatilization among crop species. *Journal of Environmental Quality* 21, 341-344.
- Thomine, S., Wang, R.C., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 4991-4996.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tomasevic, M. , Vukmirovic, Z. Rajsic, S, Tasic, M., Stevanovic, B., 2008. Contribution to biomonitoring of some trace metals by deciduous tree leaves in urban areas. *Environmental Monitoring and Assessment* 137, 393-401.
- Thomine, S., Wang, R.C., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 4991-4996.
- Tremel-Schaub A., Feix I., 2005. Contamination des sols. Transfert des sols vers les plantes. ADEME et EDP Sciences (Eds).
- Tuskan G.A., Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D., 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Unterbrunner, R. , Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustoš, P., Zupan, M., Wenzel, W.W., 2007. Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution* 148, 107-114.
- Vallee, B.L.Auld, D.S., 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647-5659.

- Vandecasteele, B., De Vos, B., Tack, F.M.G., 2002. Cadmium and Zinc uptake by volunteer willow species and elder rooting in polluted dredged sediment disposal sites. *Science of the Total Environment* 299, 191-205.
- Vandecasteele, B., Samyn, J., De Vos, B., Muys, B., 2008. Effect of tree species choice and mineral capping in a woodland phytostabilisation system: A case-study for calcareous dredged sediment landfills with an oxidised topsoil. *Ecological Engineering*, 32, 263-273.
- Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonnens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C., and Hooykaas, P.J.J., 1999. Overexpression of a novel *Arabidopsis* Gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology* 119: 1047-1055.
- Watson, C., Pulford, I.D., Riddell-Black, D., 2003. Development of a hydroponic screening technique to assess heavy metal resistance in willow (*salix*). *International Journal of Phytoremediation* 5(4) : 333-349
- Vázquez, M.D., Barceló, J., Poschenrieder, C., Mádico, J., Hatton, P., Baker, A.J.M., Cope, G.H., 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can accumulate both metals. *J. Plant Physiology* 140, 350–355.
- Vedry, B., Gousailles, M., Affholder, M., Lefaux, A., Bontoux, J., 2001. From sewage water treatment to wastewater reuse. One century of Paris sewage farms history, *Water Science and Technology*, pp. 101-107.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., & Richaud, P., 2004. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *Febs Letters* 576: 306-312.
- Vert, G., Briat, J.F., Curie, C., 2001. *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *The Plant Journal*, 26:181–189.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F., Curie, C., 2002. Irt1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14: 1223–1233.
- Wang, X.P., Shan, X.Q., Zhang, S.Z., Wen, B., 2004. A model for evaluation of the phytoavailability of trace elements to vegetables under the field conditions. *Chemosphere* 55, 811-822.
- Watanabe, M.E., 1997. Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environmental Science and Technology* 31, 182A-187A.
- Watmough, S.A., and Dickinson, N.M., 1995. Multiple Metal Resistance and Coresistance in *Acer- Pseudoplatanus L* (Sycamore) Callus-Cultures. *Annals of Botany* 76: 465-472.
- Watson, C., Pulford, I.D., Riddell-Black, D., 2003. Development of a Hydroponic Screening Technique to Assess Heavy Metal Resistance in Willow (*Salix*). *International Journal of Phytoremediation* 5, 333-349.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye Ev, E., Clemens, S., 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J.* 37: 269-281.
- Wiame J.M., Grenson M., Arst H.N., 1985. Nitrogen catabolic repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in Microbiological Physiology* 26: 1-87.
- Williamson, A., Johnson, M.S. 1981. Reclamation of metalliferous mine wastes. In N. W. Lepp (Ed.), *Effect of heavy metal pollution on plants*, vol. 2. Barking, Essex, UK: Applied Science Publishers. pp. 185–212.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.Y., Feng, V., Chen, W.Q., Chang, H.S., Zhu, T., Vulpe, C., 2003. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel

- transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 278: 47644–47653.
- Wu, Q.T., 1989. Biodisponibilité du cadmium dans les systèmes sol-plante. Thèse de doctorat, INPL, Nancy.
- Wu, J., Hsu, F.C., Cunningham, S.D., 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints. *Environmental Science and Technology* 33, 1898-1904.
- Ya-Fen Lin, H.-M.L., Shu-Yi Yang, Annegret Boch, Stephan Clemens, Chyi-Chuann Chen, Jing-Fen Wu, Jing-Ling Huang, Kuo-Chen Yeh., 2009. *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytologist* 182, 392-404.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment*, 368(2–3), 456–464.
- Yang, X. , Huang, J., Jiang, Y., Zhang, H.S., 2009. Cloning and functional identification of two members of the ZIP (Zrt, Irt-like protein) gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Biology Reports* 36, 281-287.
- Zhao, H., Eide, D., 1996. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 23203-23210.
- Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T., McGrath, S.P., 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment*, 23, 507-514.
- Zhu, Y. L., Zayed, A.M., Quian, J.H., De Souza, M., Terry, N., 1999a. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *Journal of Environmental Quality*, 28, 339–344.
- Zhu, Y.L., Zayed, A.M., Quian, J.H., De Souza, M., Terry, N., 1999b. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *Journal of Environmental Quality* 28, 339-344.

LENA & DVINA (D)



Lena sur le site de Pierrelaye (juillet 2008)

Figure 97: Feuilles de Lena et de Dvina (à gauche) et Lena planté il y a 15 mois en TCR sur le site de Pierrelaye (à droite).

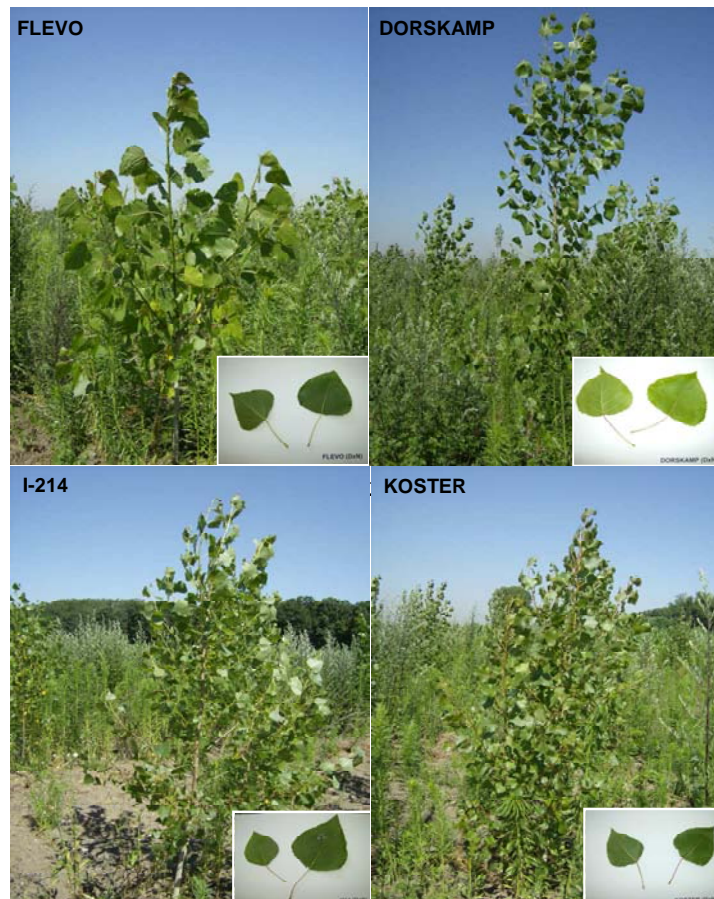


Figure 98: Flevo et I-214 (à gauche), Dorskamp et Koster (à droite) plantés il y a 15 mois en TCR sur le site de Pierrelaye.

Annexe I : Description des cultivars de peuplier utilisés

Peupliers deltoïdes et hybrides de deltoïdes

Lena et **Dvina** sont deux *P. deltoïdes* mâles de la section Aigeros provenant d'Italie (Figure 97). Ils ont tendance à débourrer tardivement et sont plutôt adaptés au climat méridional. Il n'est donc pas conseillé de les implanter dans le nord de la France. Lena présente également une fragilité au vent. Ces cultivars ont un comportement satisfaisant par rapport à *Melampsora larici-populina*, *Marssonia brunnea*, *Melampsora allii-populina* et *Discosporium populeum* qui sont les principaux parasites du peuplier. Par contre, Lena est sensible au chancre bactérien. Lena et Dvina sont subventionnés dans les régions Rhône-Alpes, Midi-Pyrénées, Aquitaine, Poitou-Charentes, Pays de la Loire et Centre. Ils ont une croissance rapide et par conséquent une forte production de biomasse c'est pourquoi ils sont très intéressants en populiculture.

Eridano est un hybride *P. deltoïdes* x *P. maximowiczii*. Il ne fait pas partie d'une section car il est issu de peupliers provenant de sections différentes. Son pays d'origine est l'Italie. *P. maximowiczii* est l'un des plus connus des baumiers asiatiques. Eridano a un port érigé, un débourrement précoce et souffre des gelées tardives.

Le cultivar **L 155 A 56** est un *P. deltoïdes*. **Sile** est un hybride *P. deltoïdes* x *P. ciliata*. Ils ne sont pas trop utilisés en France.

De nombreux hybrides de *P. deltoïdes* x *P. nigra* ont été étudiés : Flevo, Dorskamp, I-214, Koster, Triplo, A4A, Soligo, Muur, Vesten et Ghoy. On parle dans leurs cas de *P. x canadensis* Moench ou de *P. euramericana*. Ils présentent des caractères intermédiaires entre ceux des parents. Ils sont difficiles à distinguer entre eux tant leurs caractères sont communs. Ils font partie de la section Aigeros.

Ghoy est un peuplier femelle. Ce cultivar euraméricain, plutôt nordique, est relativement ancien. On le retrouve en Belgique (pays où il a été sélectionné), au Royaume-Uni, aux Pays-Bas et en France (Nord et Nord-Est). Il a été peu planté du fait de la concurrence des interaméricains, du Beaupré en particulier. De plus, sa croissance juvénile lente l'a souvent pénalisé. Ce cultivar ne supporte pas bien la concurrence et doit par conséquent être planté à faible densité. Il nécessite des stations bien alimentées en eau mais

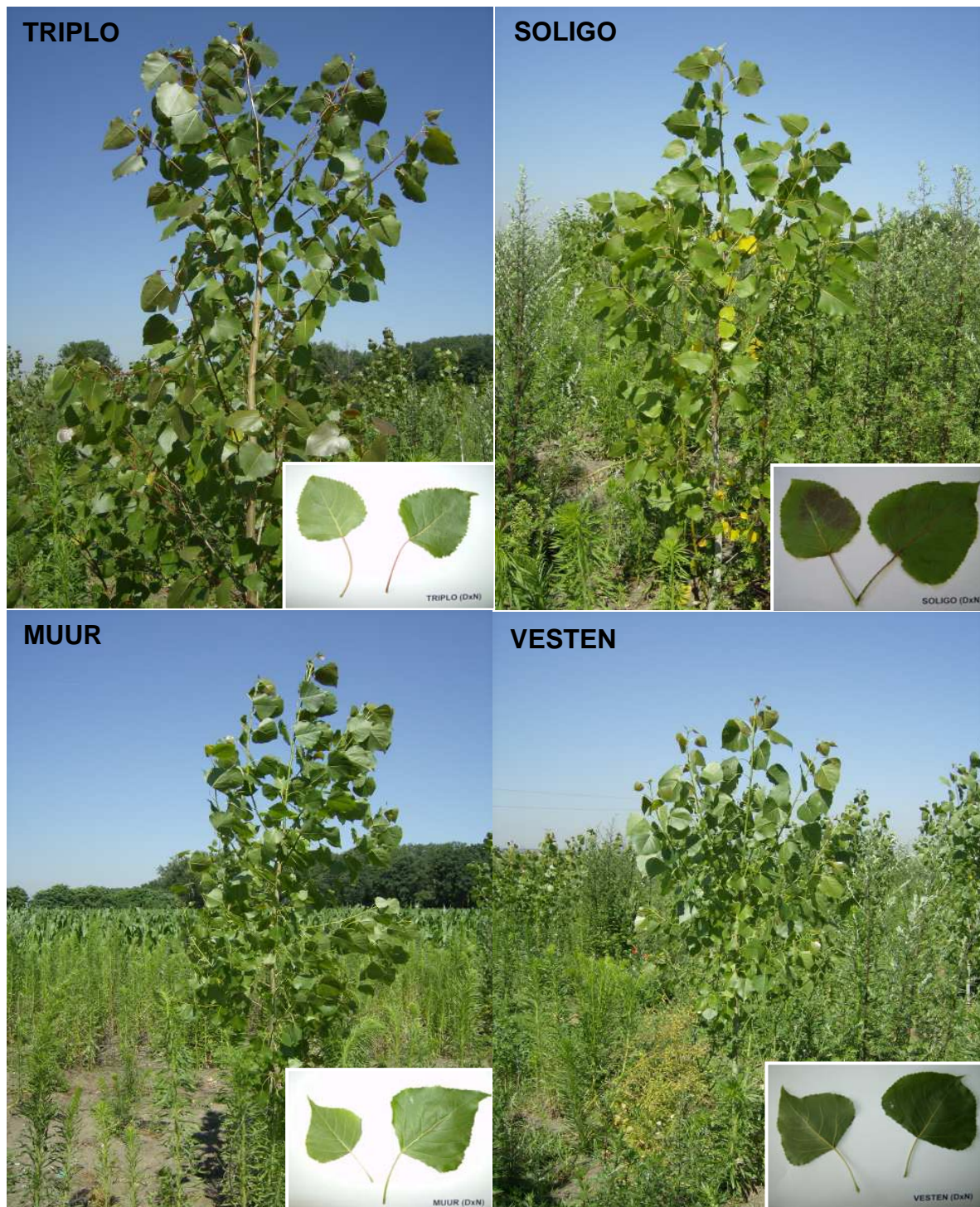


Figure 99: Triplo et Muur (à gauche), Soligo et Vesten (à droite) plantés il y a 15 mois en TCR sur le site de Pierrelaye.

supporte l'absence de nappe phréatique. De plus, il est sensible à *Melampsora larici-populina* et à *Marssonia brunnea*.

Flevo (Figure 98) est un peuplier mâle. On le retrouve fréquemment aux Pays-Bas (pays où il a été sélectionné), en Espagne et en France. Ses besoins en eau sont peu importants. Son comportement face aux pathogènes du peuplier est satisfaisant sauf pour *Discopodium populeum*. Ses principaux avantages sont sa large amplitude édaphique ainsi que la qualité du bois qu'il engendre. Sa croissance juvénile est faible et il ne supporte pas trop le vent. On le trouve préférentiellement sur des stations alluviales même si celles-ci sont sèches au nord du bassin parisien.

Dorskamp (Figure 98) est un peuplier mâle. Il est originaire des Pays-Bas et on le trouve également en France. Ce cultivar euraméricain est un proche parent de Flevo. Sa productivité et sa résistance globale aux maladies en fait actuellement un cultivar attrayant. Ainsi, depuis une dizaine d'années les plantations de Dorskamp se multiplient. Il est cependant sensible au chancre bactérien, il faut donc éviter de le planter dans les zones sensibles comme au nord du bassin parisien. Ses besoins en eau sont importants, il se plaît plus particulièrement sur les stations alluviales. La production de biomasse est importante et le bois de bonne qualité.

I-214 (Figure 98) est un peuplier femelle. Il est originaire d'Italie et on le trouve également en Autriche, en Belgique, en Allemagne, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni et en France. Il est utilisé en populiculture intensive sur des stations riches. Il est très sensible à *Marssonia brunnea*. Son débourrement est précoce. Ce cultivar est exigeant puisqu'il nécessite des ressources en eau importantes et pas d'eau stagnante. De plus, il est très sensible au phototropisme c'est pourquoi il n'est pas du tout adapté à la TTCR. La production de biomasse est importante et le bois est de bonne qualité.

Koster (Figure 98) est un peuplier mâle originaire des Pays-Bas. A vocation plutôt nordique de par son origine hollandaise, il a cependant été expérimenté dans toute la France. Les résultats des essais sont satisfaisants tant du point de vue de sa croissance et de sa plasticité, que de son bon comportement face aux maladies. Il est cependant sensible à *Marssonia brunnea*. Sa production de biomasse est importante et le bois est de bonne qualité. Cependant, la croissance juvénile n'est pas très importante. Il n'a pas besoin de beaucoup d'eau mais est adapté aux stations alluviales. On le retrouve dans toutes les régions sauf en Corse, PACA et Languedoc-Roussillon.

Triplo (Figure 99) est un peuplier mâle issu d'un croisement entre un peuplier diploïde et d'un tétraploïde, il est donc triploïde (trois jeux de chromosomes au lieu de deux). Il a récemment été sélectionné en Italie. On le retrouve également en Espagne. Il est sensible à *Marssonia brunnea* et à un puceron lanigère (*Phloeomyzus passerinii*). Il ne nécessite pas beaucoup d'eau. Sa production de biomasse est importante.

A4A est un peuplier femelle de père inconnu car le croisement a été effectué en pollinisation libre. Ce cultivar a été sélectionné en Italie. Il est sensible à *Melampsora larici-populina*. Ce cultivar n'a pas été très étudié donc nous possédons peu de données à son sujet.

Soligo (Figure 99) est un peuplier mâle d'origine italienne et de père inconnu car le croisement a été effectué en pollinisation libre. Son comportement face aux pathogènes du peuplier est satisfaisant car il n'a pas de sensibilité particulière mise à part de virus de la mosaïque du peuplier. Sa production de biomasse est importante et il s'adapte facilement aux conditions édaphiques. On le retrouve plus particulièrement sur les stations alluviales au sud du Bassin parisien.

Muur est un peuplier mâle, **Vesten** un peuplier femelle. Ils sont originaires de Belgique (Figure 99). Leur débourrement est tardif. Ils sont sensibles à *Melampsora larici-populina* et pas sensibles au chancre bactérien. Les sensibilités aux autres pathogènes ne sont pas encore connues car ces cultivars ne sont pas trop utilisés en France.

Peupliers nigra et hybrides de nigra

Nous avons testé 4 *P. nigra* mais aucun n'ont été implantés sur nos sites expérimentaux.

P. nigra L. ou peuplier noir européen est un peuplier plastique au point de vue climatique et édaphique. Il se sème abondamment sur les délaissés et les berges des fleuves, rivières et même torrents, ce qui lui donne un intérêt pour la lutte contre l'érosion. Le cultivar le plus présent en Europe est **Italica**. C'est un peuplier mâle qui n'est pas sensible au phototropisme. Sa croissance juvénile en hauteur est très rapide. Son port facilite son emploi en alignement et notamment en rideaux brise-vent, malheureusement son bois dont les qualités mécaniques sont excellentes, n'est pas propre aux utilisations modernes notamment au déroulage. Il est cependant toujours utilisé en Europe pour l'ornement et les architectes paysagistes l'apprécient particulièrement.



Figure 100: *P. trichocarpa* (en haut) Fritzi Pauley et Trichobel et hybrides *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* (en bas) plantés il y a 15 mois en TCR sur le site de Pierrelaye.

Nous avons également étudié les cultivars **Blanc de Garonne**, **AFO-662** et **AFO-678** en culture hydroponique.

Rochester est un hybride de *P. nigra* et de *P. maximowiczii*. On le retrouve en Autriche et en Allemagne. Il est sensible au chancre bactérien.

Nous avons décrit précédemment les hybrides de *P. deltoides* et de *P. nigra*.

Peupliers trichocarpa et hybrides de trichocarpa

Les *P. trichocarpa* font partie de la section Tacamahaca. On les appelle peupliers baumiers car leurs feuilles et leurs bourgeons sont enduits d'une résine odorante, un baume d'où leur nom. Ils sont tous asiatiques ou américains. Ils sont généralement résistants aux agents de la rouille.

Trichobel (Figure 100) est un peuplier mâle. On le trouve en France, en Belgique (pays d'origine) et au Royaume-Uni. Il a une bonne résistance à la concurrence et supporte les pH acides. Il n'aime pas être immergé et doit être sur un sol sans rupture d'alimentation estivale en eau c'est pour cela qu'on le retrouve surtout dans le nord de la France. Il est bien adapté en populiculture forestière en dehors des zones alluviales, est peu sensible aux parasites du peuplier et résiste bien à la concurrence.

Fritzi Pauley (Figure 100) est un peuplier femelle originaire de Belgique. On le trouve également en France, en Allemagne et au Royaume-Uni. Il est sensible au vent et à la chaleur donc on le retrouve surtout dans le nord de la France. Il résiste bien à la concurrence et aux parasites et supporte les pH acides. Cependant, la qualité du bois n'est pas très bonne.

Nisqually est le cultivar qui a été utilisé lors du séquençage du génome du peuplier. C'est un peuplier femelle.

Trois hybrides de *P. trichocarpa* et *P. deltoides* ont été étudiés : Beupré, Rap et Raspalje.

Beaupré est un croisement de peupliers issus de 2 sections différentes. C'est un peuplier femelle originaire de Belgique. On le trouve aussi en France, en Espagne et au Royaume-Uni. Il produit une quantité de biomasse importante. Il est sensible au vent et à l'immersion temporaire. Il est à proscrire actuellement car il est très sensible à *Melampsora larici-populina* et *Melampsora allii-populina*.

Raspalje est un cultivar interaméricain, de la même génération que Beaupré. C'est un peuplier femelle originaire de Belgique. On le retrouve également en Espagne, en France et au Royaume-Uni. Il est sensible au vent, à l'immersion et à *Melampsora larici-populina* et *Melampsora allii-populina*. Il n'a pas besoin de beaucoup d'eau mais est sensible à l'immersion temporaire. Raspalje a été planté en essai sur une petite parcelle sur la partie basse du terrain de Pierrelaye. **Rap** a été moins étudié pour l'instant.

Deux hybrides de *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* ont été étudiés : **Bakan** et **Skado** (Figure).

Tremble

Le tremble est un hybride *P. tremula* x *P. tremuloides*. C'est un arbre commun que l'on retrouve dans les forêts mixtes. On l'appelle tremble car ses feuilles s'agitent au moindre souffle de vent. C'est une espèce pionnière et héliophile que l'on retrouve un peu partout sauf en région méditerranéenne. Le tremble est peu exigeant quant à la richesse chimique des sols, il supporte tant des pH acides que basiques. Il n'est pas utilisé en populiculture intensive.

Annexe II : Amorces utilisées

Gène	Amorces
MTP1	F : 5'-AAGCTTATGGAAGCACAAAATCCTCA-3' R : 5'-GGATCCCCTAACGCTCTATCTGGATGGTT-3'
MTP2	F: 5'-ATGGAAGAACAAAATACTCAGCATG-3' R: 5'-CTAACGTTCTATCTGGATGGTTACAT-3'
MTP3.1	F : 5'-ATGGACGTGCGAAATTCAGAG-3' R: 5'-TTTACGGTCGCTCTATCTGAATGG-3'
MTP3.2	F : 5'-ATGGAAGTGCAGAAATTCAGAACA-3' R: 5'-TTACTGTGCTCTATCTGAATGGTC-3'
MTP4.1	F : 5'-ATGGAACATGACGGAGTCTCCA-3' R: 5'-TCGAGTTGTAGAGATCTGAAAGCT-3'
MTP4.2	F : 5'-CTGTGGAATCAGAAGAGCGATC-3' R: 5'-CTACTCAATTTGTACAGTTACATTATG-3'
MTP5	F : 5'-CCAAAATGGAGACGCCCA-3' R : 5'-TCAATCATAATTGGTTTGCCTG-3'
MTP6	F : 5'-ATGGGATTCAAATTCTACAAAAGA-3' R : 5'-CTACTCATTGACAAACTTGGGGATG-3'
MTP7	F : 5'-ACGAGAGCTAAACCAGTAAAGAG-3' R : 5'-TCATGGGTTTGGGCCACTTGG-3'
MTP8.1	F : 5'-CCAATAATGGAGGATATGAATTCTG-3' R: 5'-CTAACTGTTGGGTAACCTGCTGA-3'
MTP8.2	F : 5'-ATGGAGGATAATACGGGTTGTTTG-3' R: 5'-CTAACTGTTGGGTAACCTGCTGA-3'
MTP8.3	F : 5'-ATGGAGGGGAATTCAGGTTCT-3' R: 5'-TCAAGGATCATTGCCAGGC-3'
MTP9	F : 5'-ATGGCGAGCAGACAGAGCAGT-3' R: 5'-TCATGGACGTTTGGACTTGTGC-3'
MTP10.1	F : 5'-ATGGTGAGCAAACAGAGCAGTC-3' R: 5'-TCAGAATATTCCTGGAGG-3'
MTP10.2	F : 5'-ATGGTTACGAGTCCTCGAATCG-3' R: 5'-CTAGCTAGCTCGCTTCGGCTT-3'
MTP11.1	F : 5'-ATGTTGGAGCCGGTGAACA-3' R: 5'-CTATGAGTGTGACTGTGCGTGCT-3'
MTP11.2	F : 5'-ATGGTGGAACCGGTGAACAA-3' R: 5'-ATATATGGCTACGAGCGCGAC-3'
MTP12	F : 5'-ATGGCCGACCACCACCACCAT-3' R : 5'-TTACTTGCCACGTTCCACCTGCAC-3' Pour RT : F : 5'- CATGAGCACTGTGATCATTACCAGA-3'
UBIQUITINE (UBQ)	F : 5'-GCACCTCTGGCAGACTACAAA-3' R : 5'-TAACAGCCGCTCCAAACAGT-3'

MTP9 KpnI	F : 5'-AAAGGTACCATGGCGAGCAGACAGAGC-3' R : 5'-AAAGGTACCGGACGTTTGGACTTGTGCTC-3'
PGEM-T easy	T7: 5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3' SP6: 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
pFL61	L2: 5'-CGTAGTTTTCAAGTTCTTAGATGC-3' R2 5'-TTTAGCGTAAAGGATGGGG-3'

Annexe III : Numéros d'accèsion des transporteurs des familles ZIP et CDF

1) CDF

Nom du gène sur l'arbre phylogénétique	Numéros d'accèsion
AtMTP3	At3g58810
AtMTP8	At3g58060
AtMTP5	At3g12100
AtMTP7	At1g51610
AtMTP2	At3g61940
AtMTP4	At2g29410
AtMTP12	At2g04620
AtMTP1	At2g46800
AtMTP6	At2g47830
AtMTP9	At1g79520
AtMTP10	At1g16310
AtMTP11	At2g39450
CrMTP4.1	e_gwW.27.43.1
CrMTP4.2	SKA_Chltre2_kg.scaffold_27000158
CrMTP7	Chltre2_kg.scaffold_26000205
CrMTP8	HAN_fgenes2_pg.C_scaffold_34000009
CrMTP9	Chltre2_kg.scaffold_34000008
CrMTP10	Chltre2_kg.scaffold_34000014
OsMTP1	12005.m04912
OsMTP6	12003.m07656
OsMTP8.1	12002.m10378
OsMTP8.2	12003.m06703
OsMTP9	12001.m43409
OsMTP11.1	12001.m12330
OsMTP11.2	12005.m08046
OsMTP12	12008.m07259
PpMTP1	fgenes1_pm.scaffold_102000004
PpMTP4	e_gw1.30.150.1
PpMTP5	estExt_Genewise1.C_200037
PpMTP6.1	estExt_fgenes1_pg.C_950048
PpMTP6.2	estExt_Genewise1.C_2550020
PpMTP7	e_gw1.152.40.1
PpMTP8	estExt_fgenes2_pg.C_1060042
PpMTP9	fgenes1_pg.scaffold_55000094
PpMTP11.1	estExt_gwp_gw1.C_870033
PpMTP11.2	e_gw1.11.107.1
PpMTP11.3	fgenes1_pm.scaffold_119000002
PpMTP12	e_gw1.478.9.1

PtMTP1	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV1924
PtMTP2	fgenesh4_pm.C_LG_II000836
PtMTP3.1	gw1.I.5578.1
PtMTP3.2	eugene3.00111272
PtMTP4.1	gw1.I.1107.1
PtMTP4.2	gw1.18419.4.1
PtMTP5	grail3.0004008301
PtMTP6	gw1.XIV.294.1
PtMTP7	gw1.X.3157.1
PtMTP8.1	fgenesh4_pm.C_LG_III000766
PtMTP8.2	gw1.I.6617.1
PtMTP8.3	gw1.I.6615.1
PtMTP9	fgenesh4_pg.C_LG_VIII000724
PtMTP10.1	eugene3.00101644
PtMTP10.2	fgenesh1_pg.C_LG_X001565
PtMTP11.1	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_X0839
PtMTP11.2	eugene3.00080435
PtMTP12	fgenesh4_pm.C_scaffold_57000020
SbMTP1	Sb09g002460
SbMTP2	estExt_Genewise1.C_chr_90576
SbMTP5.1	e_gw1.4.17684.1
SbMTP5.2	Sb04g038530
SbMTP6	Sb01g035530
SbMTP7	e_gw1.6.4594.1
SbMTP8.1	Sb04g034705
SbMTP8.2	estExt_fgenesh1_pg.C_chr_43034
SbMTP8.3	e_gw1.1.17242.1
SbMTP8.4	Sb01g041820
SbMTP9	estExt_Genewise1Plus.C_chr_31576
SbMTP11	Sb03g039220
SbMTP12.1	Sb07g020630
SbMTP12.2	fgenesh1_pg.C_chr_7001353
SmMTP1	e_gw1.72.268.1
SmMTP2	e_gw1.65.355.1
SmMTP4.1	e_gw1.0.613.1
SmMTP4.2	gw1.8.1611.1
SmMTP5.1	e_gw1.47.418.1
SmMTP5.2	e_gw1.54.430.1
SmMTP6.1	gw1.22.420.1
SmMTP6.2	gw1.28.515.1
SmMTP7.1	e_gw1.59.343.1
SmMTP7.2	e_gw1.93.185.1
SmMTP8.1	e_gw1.18.155.1
SmMTP8.2	e_gw1.19.165.1

SmMTP8.3	e_gw1.18.643.1
SmMTP8.4	e_gw1.19.164.1
SmMTP11.1	estExt_Genewise1.C_310251
SmMTP11.2	estExt_Genewise1Plus.C_210219
SmMTP12.1	gw1.26.663.1
SmMTP12.2	gw1.34.647.1
VvMTP1	GSVIVP00026173001
VvMTP3	GSVIVP00000481001
VvMTP4	GSVIVP00024226001
VvMTP5	GSVIVP00025388001
VvMTP6	GSVIVP00023567001
VvMTP7	GSVIVP00029545001
VvMTP8.1	GSVIVP00024731001
VvMTP8.2	GSVIVP00025407001
VvMTP10.1	GSVIVP00002080001
VvMTP10.2	GSVIVP00001791001
VvMTP11	GSVIVP00029533001
VvMTP12	GSVIVP00020819001

2) **ZIP**

Nom du gène sur l'arbre phylogénétique	Numéros d'accèsion
AtZIP1 AtZIP2 AtZIP3 AtZIP4 AtZIP5 AtZIP6 AtZIP7 AtZIP8 AtZIP9 AtZIP10 AtZIP11 AtZIP12 AtZIP13 AtIRT1 AtIRT2 AtIRT3 AtIAR1	AT3G12750.1 AT5G59520.1 AT2G32270.1 AT1G10970.1 AT1G05300.1 AT2G30080.1 AT2G04032.1 AT5G45105.1 AT4G33020.1 AT1G31260.1 AT1G55910.1 AT5G62160.1 AT3G08650.1 AT4G19690.1 AT4G19680.1 AT1G60960.1 AT1G68100.1
CrZIP1 CrZIP2 CrZIP3 CrZIP4.1 CrZIP4.2 CrZIP12 CrZIP13 CrZIP14.1 CrZIP14.2 CrZIP15	Chlre2_kg.scaffold_71000034 estExt_fgenes2_kg.C_120074 Chlre2_kg.scaffold_16000243 SKA_fgenes2_pg.C_scaffold_71000033 fgenes2_pg.C_scaffold_2000230 fgenes2_pg.C_scaffold_23000018 SKA_estExt_fgenes2_pg.C_260082 e_gwH.18.247.1 estExt_gwp_1H.C_510013 SKA_Chltre2_kg.scaffold_14000093
OsZIP1 OsZIP2 OsZIP3 OsZIP4 OsZIP5 OsZIP6 OsZIP7.1 OsZIP7.2 OsZIP11 OsZIP12 OsZIP13 OsZIP15.1 OsZIP15.2 OsIRT1 OsIRT2	Os07g12890 Os05g39540 Os04g52310 Os08g10630 Os05g39560 Os05g07210 Os05g10940 Os06g37010 Os03g29850 Os01g74110 Os05g25194 Os02g1023 Os08g01030 Os03g46470 Os03g46454
PpZIP2.1 PpZIP2.2	estExt_gwp_gw1.C_1440078 e_gw1.225.36.1

PpZIP2.3 PpZIP9.1 PpZIP9.2 PpZIP9.3 PpZIP13 PpZIP14 PpZIP15	e_gw1.17.136.1 e_gw1.157.57.1 fgenes1_pg.scaffold_14000217 estExt_fgenes1_kg.C_1440001 estExt_Genewise1.C_140113 fgenes1_pg.scaffold_372000031 e_gw1.157.57.1
PtZIP1.1 PtZIP1.2 PtZIP2 PtZIP3 PtZIP4 PtZIP5.1 PtZIP5.2 PtZIP5.3 PtZIP6.1 PtZIP6.2 PtZIP7.1 PtZIP7.2 PtZIP10.1 PtZIP10.2 PtZIP11.1 PtZIP11.2 PtZIP13.1 PtZIP13.2 PtZIP14 PtZIP15.1 PtZIP15.2	eugene3.00080763 fgenes4_pm.C_LG_X000669 gw1.IX.4119.1 estExt_fgenes4_pm.C_290013 estExt_fgenes4_pm.C_LG_XVIII0049 eugene3.00060074 eugene3.00060077 gw1.VI.2613.1 fgenes4_pg.C_LG_IX000872 fgenes4_pg.C_LG_I002044 gw1.X.438.1 gw1.X.466.1 gw1.XV.2690.1 fgenes4_pg.C_LG_XV000907 estExt_fgenes4_pm.C_LG_I1142 eugene3.41830001 eugene3.00280350 eugene3.00161356 fgenes4_pg.C_scaffold_3442000001 estExt_fgenes4_pg.C_LG_III1612 estExt_fgenes4_pm.C_LG_I0113
SbZIP1.1 SbZIP1.2 SbZIP2 SbZIP3 SbZIP4 SbZIP5 SbZIP6 SbZIP8.1 SbZIP8.2 SbZIP8.3 SbZIP9.1 SbZIP9.2 SbZIP11 SbZIP13 SbZIP15.1 SbZIP15.2	Sb06g028270 Sb07g006060 Sb03g047340 Sb02g006960 Sb07g005140 Sb09g023160 Sb09g004880 Sb01g012430 Sb01g013660 Sb01g012440 Sb10g022390 Sb09g006150 Sb01g032670 Sb08g004950 Sb04g006580 Sb01g006170
SmZIP2 SmZIP9.1 SmZIP9.2 SmZIP9.3 SmZIP9.4 SmZIP13	estExt_fgenes1_pm.C_680004 e_gw1.13.219.1 fgenes1_pm.C_scaffold_3000063 fgenes1_pm.C_scaffold_20000028 e_gw1.12.948.1 gw1.82.144.1

SmZIP14.1	fgenesh2_pg.C_scaffold_39000051
SmZIP14.2	fgenesh2_pg.C_scaffold_64000172
SmZIP15	fgenesh1_kg.C_scaffold_7000024
VvZIP1.1	VviGSVIVT00002087001
VvZIP1.2	VviGSVIVT00002088001
VvZIP2	VviGSVIVT00024285001
VvZIP3	VviGSVIVT00030117001
VvZIP4	VviGSVIVT00032208001
VvZIP5.1	VviGSVIVT00037538001
VvZIP5.2	VviGSVIVT00037540001
VvZIP6.1	VviGSVIVT00024060001
VvZIP6.2	VviGSVIVT00029326001
VvZIP7.1	VviGSVIVT00027686001
VvZIP7.2	VviGSVIVT00031911001
VvZIP10	VviGSVIVT00031915001
VvZIP11.1	VviGSVIVT00033348001
VvZIP11.2	VviGSVIVT00033353001
VvZIP11.3	VviGSVIVT00033352001
VvZIP11.4	VviGSVIVT00033350001
VvZIP12	VviGSVIVT00030116001
VvZIP13	VviGSVIVT00033649001
VvZIP15	VviGSVIVT00024638001

Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France.
Aude Migeon, Pierre Richaud, Frédéric Guinet, Michel Chalot, Damien Blaudez.
Water, Air, Soil Pollution.
DOI 10.1007/s11270-009-0029-5

Les différentes études entreprises ont porté sur la détermination du potentiel accumulateur du peuplier à une fin d'utilisation en phytoremédiation. Chez les végétaux, les éléments traces comme le Zn, Fe, Cu, Co, Mn, Mo et Ni sont nécessaires aux processus biologiques mais leur accumulation excessive peut être toxique. D'autres éléments non essentiels comme le Cd et le Pb peuvent également être absorbés par les végétaux, et donc constituer un danger potentiel puisqu'ils entrent ainsi dans la chaîne alimentaire. La phytoremédiation est l'utilisation de plantes et de leurs microbes associés pour la dépollution de l'environnement. Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que le peuplier (*Populus* spp.) pouvait accumuler de relativement fortes concentrations de certains métaux (Cd, Zn et Ni) par rapport à d'autres espèces ligneuses, par exemple 30-50 µg de Cd /g de matière sèche foliaire, soit 20 fois plus que les autres espèces. Après avoir mis en évidence le potentiel accumulateur du peuplier, nous avons testé différents cultivars en culture hydroponique et avons ainsi mis en évidence des potentiels accumulateurs variés entre cultivars. Nous avons montré que les hybrides de *P. trichocarpa* accumulaient davantage que les autres hybrides. Parallèlement à cette étude, nous avons implanté ces mêmes cultivars sur deux sites pollués dans le cadre du projet ANR PHYTOPOP. Combiné à la production d'une forte biomasse qui peut être utilisée pour produire de l'énergie, ce caractère accumulateur fait du peuplier un bon candidat pour la phytoremédiation.

Les membres de la famille des CDF (Cation Diffusion Facilitator) sont impliqués dans le transport des métaux. Après une étude phylogénétique des membres de cette famille (démonstration d'un nombre supérieur de CDF chez le peuplier par rapport aux autres espèces), leur expression dans différents tissus et dans différentes conditions physiologiques (sur sol témoin et sur sol pollué) a été étudiée. De plus, la caractérisation fonctionnelle a permis de mettre en évidence un transporteur de Zn (PtMTP2) et un transporteur de Mn (PtMTP9). Une tentative de localisation de ces transporteurs a également été entreprise. Dans le but de localiser les métaux dans les tissus de la plante, nous avons effectué des analyses en spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS) sur des feuilles de peupliers soumis à un stress métallique. Cette dernière technique a permis de montrer que le Zn était essentiellement concentré au niveau du mésophylle.

Mots-clés : phytoremédiation, *Populus* spp., Cation Diffusion Facilitator, caractérisation fonctionnelle

The present study beared on the capacity of poplar to be used in phytoremediation programmes. In plants, trace elements such as Zn, Fe, Cu, Co, Mn, Mo and Ni are necessary to biological processes but they also can be toxic when present at high concentrations. Other non essential elements, such as Cd and Pb also can be taken up by plants and therefore constitute a potential risk for health via accumulation into the food chain. Phytoremediation is the use of plants and associated microorganisms to clean up the environment. First, we have shown that poplar (*Populus*) species could relatively accumulate high concentrations of metals (Cd, Zn and Ni) compared to other woody plants. For instance, poplar is able to accumulate 30 times more Cd than other woody species. Second we have measured in hydroponic cultures, the potential of metal accumulation by different poplar cultivars. We found that *P. trichocarpa* hybrids accumulated more metals than the other hybrids. As part of the PHYTOPOP programme, we have also grown the same cultivars on two different polluted sites. Finally, by secondary ion mass spectrometry, we were able to localize Zn in poplar leaf mesophyll. The high biomass, which can also be used for energetic processes, and the heavy metals accumulation properties of poplar lead to the conclusion that poplar can constitute a good candidate for phytoremediation.

The CDF (Cation Diffusion Facilitator) members are proteins involved in the transport of heavy metals. Phylogenetic analyses of the CDF family have shown that poplar contains a higher number of CDF members compared with other species. Expression levels of CDF members were studied in different tissues and in different physiological conditions. Moreover, heterologous expression in yeast has shown that PtMTP2 and PtMTP9 transport Zn and Mn respectively. Localization experiments *in planta* were also realized.

Key words: phytoremediation, *Populus* spp., Cation Diffusion Facilitator, heterologous expression.