

# VetAgro Sup

## Mémoire de fin d'études

COMPARAISON DE LA REPONSE DE DEUX  
GENOTYPES DE PEUPLIER UTILISES EN  
PHYTOREMEDIATION D'UN SOL POLLUE AU PLOMB

Marie Mennesson

Option APVE : Agronomie, Productions Végétales  
et Environnement

## Sommaire

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Remerciements .....                                                                                | 6  |
| Introduction .....                                                                                 | 7  |
| 1 Etat de l'art .....                                                                              | 9  |
| 1.1 La problématique des sols pollués en France .....                                              | 9  |
| 1.1.1 Les sites et sols pollués .....                                                              | 9  |
| 1.1.2 La contamination locale des sols .....                                                       | 9  |
| 1.1.3 Le suivi et la gestion des Sites et Sols Pollués (SSP) .....                                 | 15 |
| 1.2 Les filières de réhabilitation des sols pollués .....                                          | 19 |
| 1.3 Les phytotechnologies : une filière en développement.....                                      | 21 |
| 1.3.1 Le principe de la phytoremédiation .....                                                     | 21 |
| 1.3.2 Les phytotechnologies .....                                                                  | 23 |
| 1.3.3 La phytoremédiation appliquée aux arbres .....                                               | 25 |
| 1.3.4 La phytoremédiation appliquée aux peupliers .....                                            | 25 |
| 1.4 Synthèse et présentation de la problématique de l'étude.....                                   | 29 |
| 2 Matériel et méthodes.....                                                                        | 33 |
| 2.1 Matériel végétal .....                                                                         | 33 |
| 2.1.1 Le genre <i>Populus</i> .....                                                                | 33 |
| 2.1.2 Les peupliers .....                                                                          | 33 |
| 2.1.3 Les deux génotypes de peuplier : Skado et PTA .....                                          | 35 |
| 2.1.4 Culture des peupliers .....                                                                  | 35 |
| 2.1.5 Sélection des pots et des pilotes pour les essais.....                                       | 37 |
| 2.1.6 Sélection des pilotes.....                                                                   | 39 |
| 2.2 Présentation des essais.....                                                                   | 39 |
| 2.2.1 Essai en hydroponie .....                                                                    | 39 |
| 2.2.2 Essai sur un sol issu d'une friche industrielle multi-contaminée en<br>éléments traces ..... | 43 |
| 2.3 Les paramètres étudiés.....                                                                    | 47 |
| 2.3.1 Les paramètres suivis en cours d'essai .....                                                 | 47 |
| 2.3.2 En fin d'essai .....                                                                         | 53 |
| 2.4 Traitement statistiques générale des données.....                                              | 55 |
| 3 Résultats.....                                                                                   | 59 |
| 3.1 Résultats de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA.....                                   | 59 |
| 3.1.2 Prélèvement journalier de l'eau .....                                                        | 61 |
| 3.1.3 Courbes de saturation de la photosynthèse à la lumière .....                                 | 61 |
| 3.1.4 Résultats associés au suivi des échanges gazeux au cours de l'essai .....                    | 61 |
| 3.1.5 Résultats associés aux mesures de conductivité hydraulique .....                             | 63 |

|                                       |                                                                                        |    |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PTA                                   | 3.2 Synthèse des résultats et discussion de l'essai en hydroponie avec le géotype      |    |
|                                       | 63                                                                                     |    |
|                                       | 3.2.1 Caractérisation du comportement du géotype PTA face à une pollution              |    |
|                                       | par le plomb                                                                           | 63 |
|                                       | 3.2.2 Effet de l'excès de fer sur les effets néfastes du plomb .....                   | 67 |
|                                       | 3.2.3 Perspectives de l'essai .....                                                    | 67 |
|                                       | 3.3 Résultats des essais sur sol .....                                                 | 71 |
|                                       | 3.3.1 Résultats associés au géotype Skado .....                                        | 71 |
|                                       | 3.3.2 Résultats de l'essai sur sol avec le géotype PTA .....                           | 77 |
|                                       | 3.3.3 Synthèse des résultats et discussion.....                                        | 81 |
|                                       | Conclusion.....                                                                        | 85 |
|                                       | Bibliographie .....                                                                    | 86 |
|                                       | Annexe 1: Etat de l'art des essais de phytoextraction et phytostabilisation en plein   |    |
| champ                                 | .....                                                                                  | 89 |
|                                       | Annexe 2 : Faisabilité technique et financière d'une réhabilitation de site pollué par |    |
| phytoextraction ou phytostabilisation | .....                                                                                  | 90 |
|                                       | Annexe 3: Principe des différentes phytotechnologies .....                             | 92 |
|                                       | Annexe 4 : Synthèse des études de phytoremédiation appliquées au peuplier.....         | 93 |
|                                       | Annexe 5 : Protocole cartographie lumière phytotron.....                               | 94 |
|                                       | Annexe 6 : Protocole de minéralisation.....                                            | 96 |
|                                       | RESUMÉ.....                                                                            | 97 |

|                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1: Localisation des sites et sols pollués en France en 2012 (Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012)                                                                   | 8  |
| .....                                                                                                                                                                                                                                   | 8  |
| Figure 2: Principales fonctions du sol                                                                                                                                                                                                  | 8  |
| Figure 3: Enjeux associés à la gestion des sites et sols pollués                                                                                                                                                                        | 10 |
| Figure 4: Teneurs en plomb dans les sols en fonction de la profondeur et de la source de ce plomb (source : <a href="http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr">http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr</a> ) | 10 |
| Figure 5: Cycles biogéochimiques naturel et anthropique du plomb                                                                                                                                                                        | 12 |
| Figure 6: Sources de pollution par le plomb (Sharma&Dubey, 2005)                                                                                                                                                                        | 12 |
| Figure 7: Effet du plomb sur les enfants et sur les adultes en fonction de la plombémie (Bretin et al., 2008)                                                                                                                           | 16 |
| Figure 8: Les différents comportements des plantes face aux ETM (d'après (Migeon, 2009))                                                                                                                                                | 20 |
| Figure 9 : Impact d'une forte densité de peuplement à l'hectare sur la rhizosphère et les activités qui lui sont associées                                                                                                              | 26 |
| Figure 10: Schéma du dispositif de la chaudière associée au filtre à manches et résultats associés à son utilisation sur la répartition des ETM dans les différents compartiments (Bert et al., 2012)                                   | 28 |
| Figure 11: Rangs taxonomiques au sein de la classification du genre <i>Populus</i>                                                                                                                                                      | 32 |
| Figure 13: Exemple de sélection des plantes pour un essai avec deux modalités                                                                                                                                                           | 38 |
| Figure 14: Dispositif expérimental de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA                                                                                                                                                        | 40 |
| Figure 15: Localisation d'Auzon sur une carte de France et des sites d'études (AP : Auzon Pollué et AT: Auzon Témoin) sur une vue aérienne et sur une carte IGN                                                                         | 44 |
| Figure 16: Dispositifs d'essai (vert : modalité témoin (sol AT), orange : modalité "sol moyennement pollué" (sol AMP) et rouge : modalité "sol très pollué (sol ATP))                                                                   | 46 |
| Figure 17: Exemple du suivi du prélèvement en eau pour une plante lors des essais réalisés sur sol                                                                                                                                      | 46 |
| Figure 18: Principe du calcul du prélèvement en eau                                                                                                                                                                                     | 48 |
| Figure 19: Correspondance entre les pesée et les données utilisées pour les calculs                                                                                                                                                     | 48 |
| Figure 20: Représentation schématique simplifiée du fonctionnement du Licor LI-6400                                                                                                                                                     | 50 |
| Figure 21: Dispositif de mesure de la conductivité hydraulique des plantes (Xyl'EM)                                                                                                                                                     | 52 |
| Figure 22: Effet du plomb sur les différentes composantes de la photosynthèse                                                                                                                                                           | 66 |
| Figure 23: Photographie de la plante 1 cultivée sur le sol pollué de l'essai sol avec le génotype PTA et agrandissement du bas de la tige de la même plante                                                                             | 82 |
| Figure 24: Plante 17 de l'essai sol avec le génotype PTA cultivée sur sol pollué et ayant adoptée la stratégie 2                                                                                                                        | 84 |
| Figure 25: Exemple d'organisation des données sur Excel pour la carte d'intensité lumineuse réalisée dans le phytotron 4 le 16 mai 2013                                                                                                 | 95 |
| Figure 26 : Exemple de figure issue de l'analyse statistique réalisée sous R des données issues de la carte d'intensité lumineuse du 16 mai 2013                                                                                        | 95 |

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graphique 1: Gain en hauteur cumulé des plantes au cours de l'essai pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA .....                                         | 58 |
| Graphique 2: Surface foliaire totale et par feuilles et nombre de feuilles moyen pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA .....                            | 58 |
| Graphique 3: Poids sec moyen des différents organes pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA .....                                                         | 60 |
| Graphique 4: Répartition de la biomasse sèche totale entre les différents organes.....                                                                                                         | 60 |
| Graphique 5: Cinétique du prélèvement et de l'évapo-transpiration en eau au cours de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA pour les différentes modalités .....                           | 62 |
| Graphique 6: Courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA.....                                             | 62 |
| Graphique 7: Evolution moyenne des échanges gazeux pour les différentes modalités de l'essai hydroponie avec le génotype PTA .....                                                             | 64 |
| Graphique 8: Taux d'embolie moyen pour les différentes modalités de l'essai hydroponie avec le génotype PTA .....                                                                              | 64 |
| Graphique 9: Evolution du gain en hauteur moyen en fonction des modalités au cours de l'essai sol avec le génotype Skado .....                                                                 | 70 |
| Graphique 10: Surface foliaire moyenne et totale des feuille et nombre de feuilles moyen pour les différentes modalités de l'essai sol avec le génotype Skado.....                             | 70 |
| Graphique 11: Poids sec moyen des différents organes pour les différentes modalités de l'essai sur sol avec le génotype Skado .....                                                            | 72 |
| Graphique 12: Répartition de la biomasse totale entre les différents organes pour les différentes modalités .....                                                                              | 72 |
| Graphique 13: Evolution moyenne du poids d'eau prélevé par les plantes et évaporé au cours de l'essai sol avec le génotype Skado .....                                                         | 72 |
| Graphique 14: Photosynthèse nette, conductance stomatique et transpiration moyenne pour les différentes modalités aux dates de relevé (J7 et J14) pour l'essai sol avec le génotype Skado..... | 74 |
| Graphique 15: Taux d'embolie moyen pour les différentes modalités de l'essai sol sur le génotype Skado .....                                                                                   | 74 |
| Graphique 16: Gain en hauteur cumulé moyen des plantes au cours de l'essai sur sol avec le génotype PTA pour les différentes modalités .....                                                   | 76 |
| Graphique 17: Surface foliaire totale et par feuille et nombre de feuilles final pour les différentes modalités pour l'essai sol avec le génotype PTA .....                                    | 76 |
| Graphique 18: Poids sec moyen des différents organes des plantes selon les modalités de l'essai sol avec le génotype PTA .....                                                                 | 78 |
| Graphique 19: Répartition de la biomasse totale entre les différents organes pour les modalités testées dans le cadre de l'essai sol avec le génotype PTA .....                                | 78 |
| Graphique 20: Cinétique du prélèvement et de l'évaporation en eau au cours de l'essai sur sol avec le génotype PTA pour les différentes modalités.....                                         | 80 |
| Graphique 21: Evolution au cours de l'essai sol avec le génotype PTA de la photosynthèse nette (a), de la conductance stomatique (b) et de la transpiration (c).....                           | 80 |
| Graphique 22: Taux d'embolie moyen, conductivités moyennes initiale et maximale pour les différentes modalités de l'essai sol avec le génotype PTA .....                                       | 82 |

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Tableau 1: Consommation et productions de plomb à l'échelle mondiale (Wikipedia)</i>                                                                 | 14 |
| Tableau 2: Caractéristiques de la toxicité du plomb pour l'homme (Agence-De-L'eau-De-Seine-Et-Normandie, 2008)                                          | 14 |
| Tableau 3: Principales sources d'intoxication pour les hommes et les animaux (Wikipedia)                                                                | 16 |
| Tableau 4: Définition des familles et des types de traitement utilisés pour la réhabilitation des sites et sols pollués (Ernest&Young, 2012)            | 18 |
| Tableau 5: Famille, tonnage et taux d'utilisation pour les différentes filières de réhabilitation des sites et sols pollués (Ademe, s.d.)               | 18 |
| Tableau 6: Nombre d'espèces et de familles hyperaccumulatrices et teneurs limites pour l'hyperaccumulation de différents ETM (Morel, 2012)              | 20 |
| Tableau 7: Intérêts et limites des phytotechnologies                                                                                                    | 22 |
| Tableau 8: Comparaison de la phytoextraction et de la phytostabilisation                                                                                | 24 |
| Tableau 9 : Principales voies de valorisation du bois de peuplier                                                                                       | 26 |
| <i>Tableau 10: Fiche botanique du genre Populus</i>                                                                                                     | 32 |
| Tableau 11: Place dans la classification des deux géotypes étudiés (PTA et Skado)                                                                       | 34 |
| Tableau 12: Dates clés de la culture des plants de peuplier                                                                                             | 36 |
| Tableau 13: Descriptif des solutions nutritives apportées à PTA et à Skado                                                                              | 36 |
| <i>Tableau 14: Synthèse des dispositifs expérimentaux pour les différents essais</i>                                                                    | 38 |
| Tableau 15: Teneurs moyennes en ETM dans les horizons de surface des sols étudiés et valeur de constat d'impact zone sensible (VCI)                     | 42 |
| Tableau 16 : Caractéristiques géographiques principales du site d'Auzon                                                                                 | 42 |
| Tableau 17: Caractéristiques physico-chimiques et granulométrie des sols étudiés                                                                        | 44 |
| Tableau 18: Valeurs clés pour l'interprétation des courbes de réponse à la lumière réalisées dans le cadre de l'essai en hydroponie avec le géotype PTA | 62 |
| Tableau 19: Synthèse des résultats concernant les analyses statistiques pour les différents paramètres                                                  | 66 |

## Remerciements

Je tiens à remercier M. Jean Louis JULIEN, Directeur de l'UMR A 547 PIAF, d'avoir accepté que mon stage se déroule au sein de l'Unité mixte de recherche Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (UMR PIAF) et que mes premières semaines de stage se soient déroulées dans les locaux de l'unité à l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) de Croüel à Clermont Ferrand. Je remercie également M. Jean Marc Lavest, Directeur de l'IUT de Clermont-Ferrand, d'avoir accepté que la majorité de mon stage se soit déroulée dans les locaux de l'IUT à Aurillac.

Je tiens également à remercier particulièrement mes deux maîtres de stage M. Adnane Hitmi et M. Hervé Cochard d'avoir accepté de me prendre en stage et pour leur aide et leur soutien pendant tout le déroulement de celui-ci.

Je remercie VetAgro Sup Campus Agronomique de Clermont et notamment M. Gaël ALVAREZ, mon tuteur de stage qui m'a suivi, aidé et conseillé pendant les différentes étapes de mon stage.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes travaillant à l'UMR PIAF à l'INRA de Crouël pour leur accueil chaleureux et le temps qu'ils m'ont accordé lors de mes périodes de formation au sein de leur unité. Je tiens à remercier plus particulièrement M. Têtè Barigah qui m'a formé à l'utilisation du Xyl'EM et qui est venu plusieurs fois sur Aurillac pour m'aider lors des récoltes. Je le remercie également pour ses multiples conseils et aides lors de la rédaction du mémoire. Je remercie également M. Marc VANDAME pour son aide et le partage de ces connaissances notamment sur le Licor. Je remercie également M. Christophe SERRE pour ses connaissances sur l'extraction de la sève brute, M. François BEAUJARD pour ses connaissances sur la culture du peuplier en hydroponie, M. Eric BADEL pour ses connaissances sur la tomographie et pour avoir accepté de réaliser des analyses préliminaires sur nos échantillons. Je remercie également M. Jérôme NGAO pour avoir accepté d'être l'expert au sein du jury qui expertisera mon travail et pour avoir partagé ses connaissances, notamment sur l'utilisation du Licor.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes travaillant au sein de l'IUT d'Aurillac pour leur accueil et leur gentillesse, ce qui m'a permis de travailler dans une ambiance conviviale. Je remercie également les autres stagiaires qui ont permis la mise en place d'une ambiance de travail vraiment sympathique et notamment M. François HERVE, mon "binôme" qui m'a beaucoup aidé pendant toute la période de stage pour réaliser les différents essais.

## Introduction

Le sol est un écosystème complexe qui remplit de multiples fonctions. Ce milieu non renouvelable à échelle humaine est particulièrement sensible. Des études scientifiques ont permis de définir les principales menaces qui pèsent sur ce milieu. La prise en compte de ces menaces a entraîné la mise en place à partir des années 1990 de différentes réglementations en Europe et en France pour protéger ces milieux. Un projet de directive pour la protection des sols est d'ailleurs en cours d'élaboration. Les principaux objectifs de cette directive sont : l'inventaire des sites et sols pollués et de développer les connaissances autour de ces menaces pour trouver des solutions pour remédier à cette situation.

Parmi les menaces qui pèsent sur le sol, les contaminations dues aux éléments métalliques et/ou organiques sont particulièrement préoccupantes. Différentes filières se sont donc mises en place pour réhabiliter les sols pollués. Actuellement, la filière des phytotechnologies est en plein essor. Cette filière se base sur l'utilisation de plantes pour traiter des sols pollués. Le principal intérêt de cette filière est qu'elle est respectueuse des principes du développement durable et qu'une valorisation des produits en cours où à la fin des traitements est envisageable. Les principaux procédés en cours de développement sont la phytoextraction et la phytostabilisation.

Parmi les espèces utilisables en phytoremédiation, on trouve notamment des arbres de la famille des Salicacées (saules et peupliers). Ces espèces ligneuses sont particulièrement intéressantes puisqu'elles sont capables de produire de la biomasse et celle-ci est valorisable notamment dans les filières de bois énergie. De plus, des études ont mis en évidence que certaines espèces étaient capables de prélever les polluants dans les sols et de les stocker.

Le projet lié à ce stage de fin d'étude s'inscrit dans ce contexte. En effet, le but du projet qui m'a été confié est de **comparer la réponse de deux génotypes de peuplier à un stress au plomb**. Le polluant choisi fait partie des éléments traces métalliques. Pour répondre à cet objectif, deux types d'essai ont été mis en place :

- un sur sol multicontaminé aux éléments traces métalliques et notamment au plomb
- un autre en hydroponie où du nitrate de plomb a été apporté.

Afin de caractériser le comportement des plantes, différentes composantes du développement (la biomasse produite, le transport de l'eau dans la plante, les capacités photosynthétiques et les capacités d'accumulation des polluants) de la plante ont été étudiés.

Un objectif supplémentaire a été ajouté à l'essai hydroponie, le but étant de **caractériser si un excès en fer permet de limiter les effets néfastes du polluant sur le développement de la plante**.

Dans un premier temps, un état de l'art sera présenté avec les différents éléments de contexte nécessaire à la compréhension du rapport puis le matériel et les paramètres étudiés seront présentés et enfin les résultats des différents essais seront présentés et discutés.

Figure 1: Localisation des sites et sols pollués en France en 2012 (Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012)

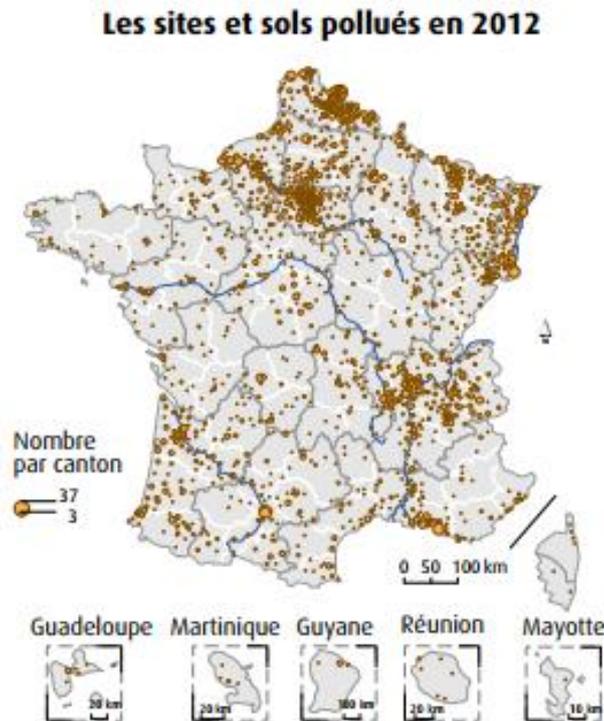


Figure 2: Principales fonctions du sol



## **1 Etat de l'art**

L'étude présentée dans ce mémoire s'intéresse aux comportements de deux génotypes de peuplier cultivés sur un sol pollué majoritairement au plomb, pour déterminer les possibilités de leur utilisation dans le cadre de procédés de phytoremédiation. Dans un premier temps, le contexte général de l'étude c'est-à-dire la problématique des sols pollués et du plomb en France va être présenté puis ce seront les différentes filières existantes utilisées pour remédier à ce problème. Un focus sera enfin réalisé sur les procédés de phytoremédiation puisqu'il s'agit de la filière qui nous intéresse principalement dans cette étude.

### **1.1 La problématique des sols pollués en France**

#### **1.1.1 Les sites et sols pollués**

"Selon le ministère de l'Ecologie, *"un site pollué est un site présentant un risque pérenne, réel ou potentiel, pour la santé humaine ou l'environnement du fait d'une pollution résultant d'une activité actuelle ou ancienne sur ce site"*."(Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012).

La Figure 1 présente une carte des sites et sols pollués répertoriés en France en 2012.

L'industrie et les activités agricoles sont les deux sources principales de pollution des sols. Cependant, lorsque la terminologie "sites et sol pollués" est utilisée, on s'intéresse principalement aux pollutions locales dues à l'activité industrielle.

#### **1.1.2 La contamination locale des sols**

##### **1.1.2.1 Définition**

La contamination d'un sol correspond à "L'introduction de contaminants dans le sol qui peut entraîner la détérioration ou la disparition de certaines ou de plusieurs fonctions des sols."(Commission-Des-Communautés-Européennes, 2002). Les principales fonctions du sol sont résumées sur la Figure 2.

On distingue deux types de contamination : les contaminations locales et diffuses des sols.

Les pollutions locales, "à l'inverse des pollutions diffuses, se distinguent par la présence ponctuelle dans les sols et sous-sols de substances dangereuses provenant généralement de déversements, de fuites ou de dépôt de déchets. Non confinées et en fortes concentrations, ces substances donnent naissance à des « sites localement contaminés » (NF ISO 11074 -1, 1997)" (Piedrafita Carnicer, 2007).

Différents types de contaminants existent, les plus courants sont les éléments traces métalliques (ETM) et les hydrocarbures (benzène et hydrocarbures aromatiques polycycliques). Dans cette étude, le contaminant qui nous intéresse est le plomb qui fait partie des ETM.

Figure 3: Enjeux associés à la gestion des sites et sols pollués

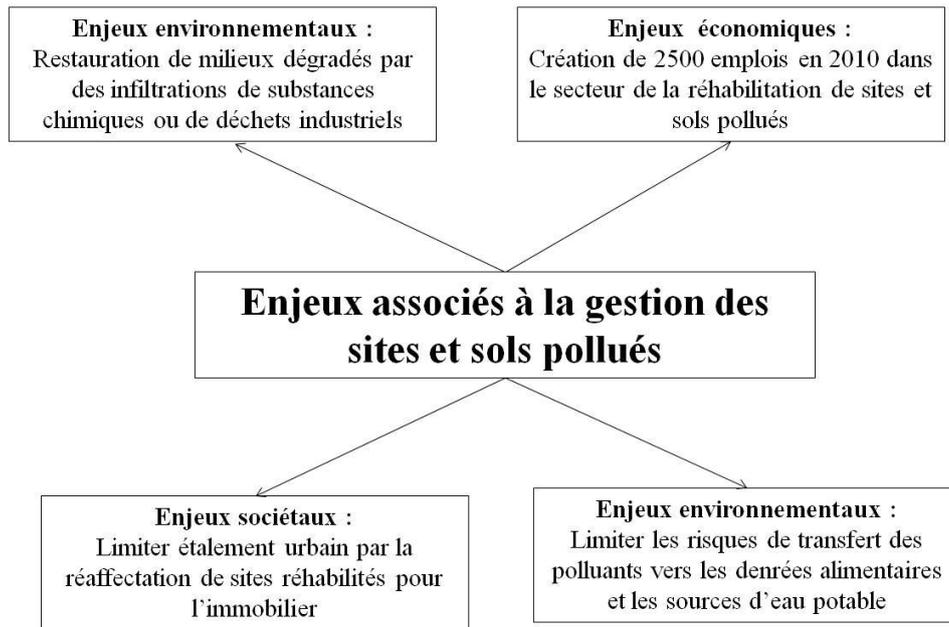
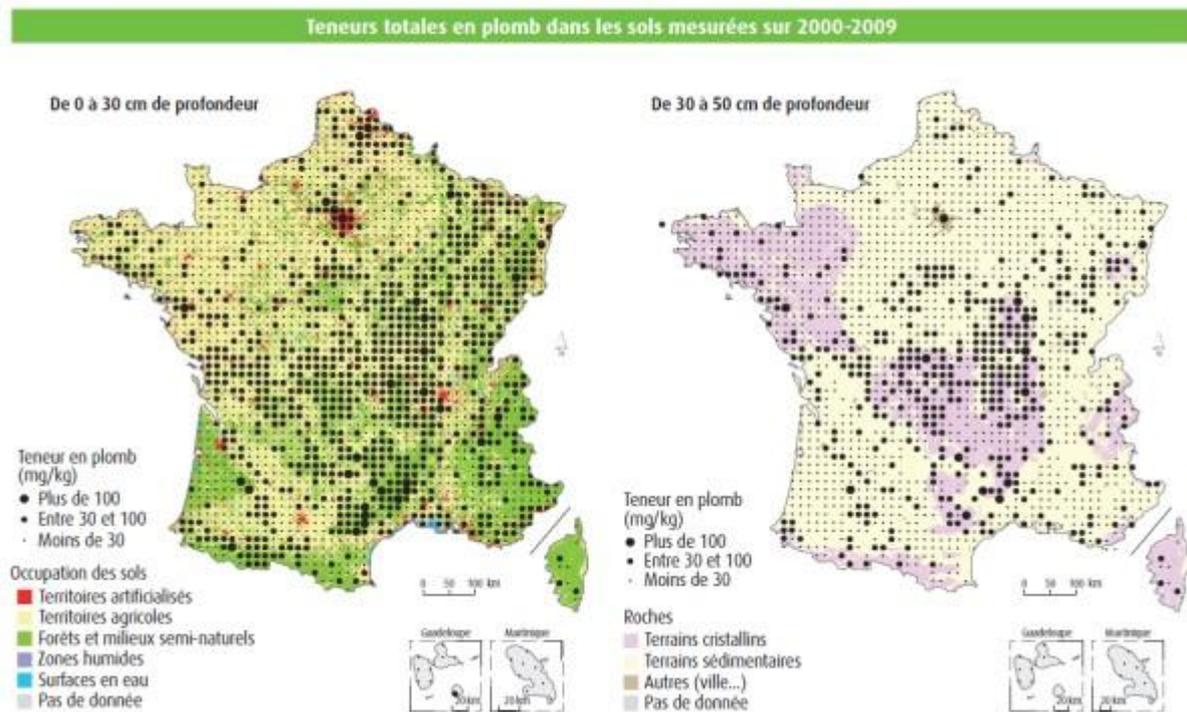


Figure 4: Teneurs en plomb dans les sols en fonction de la profondeur et de la source de ce plomb (source : <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr>)



### 1.1.2.2 Le plomb : un élément trace métallique

Parmi les éléments traces métalliques également appelés métaux lourds, on trouve le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le Thallium (Tl) et le zinc (Zn).

L'appellation métaux lourds est souvent discutée car ils sont réputés toxiques alors que certains, tels que le Cu et le Zn, sont des oligo-éléments indispensables à l'homéostasie des organismes. De plus, certains éléments sont classés comme des métaux lourds alors que ce sont des métalloïdes (Se, As) ou qu'ils ne sont pas «lourds» (Be, Al) (Migeon, 2009). Ces différentes raisons expliquent pourquoi l'appellation éléments traces métalliques est plus utilisée que celle de métaux lourds.

Le terme d'éléments traces métalliques est utilisé pour des éléments présents dans les conditions naturelles à de faibles concentrations massiques dans les milieux. Il est employé lorsque les concentrations en un élément sont inférieures à 0,1 pour mille dans les êtres vivants (parfois on parle de 1% pour les plantes).

Le plomb fait partie des ETM classés comme polluant toxique pour les écosystèmes terrestres et aquatiques et pour la santé humaine. Le Centre international de recherche sur le cancer a déclaré en 2004 que le plomb est probablement cancérigène pour l'homme et l'animal et que deux de ses sels (le chromate de plomb et l'arséniate de plomb) sont carcinogène c'est-à-dire qu'ils favorisent le cancer.

Nous allons dans un premier temps nous intéresser au cycle biogéochimique du plomb et aux sources naturelles et anthropogènes pour comprendre les causes de cette pollution puis nous nous intéresserons à la toxicité du plomb sur les hommes et les animaux.

#### 1.1.2.2.1 Le cycle biogéochimique et les sources naturelles de plomb

"Le plomb, naturellement présent dans les sols, se trouve en quantités généralement faibles. La valeur médiane mesurée dans le cadre du programme RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) est d'environ 28 mg.kg<sup>-1</sup>. Sur les 2200 mesures réparties uniformément sur le territoire français, selon une maille carrée de 16 km de côté, les analyses effectuées par le RMQS ont montré que 95 % des valeurs obtenues sont inférieures à 50 mg.kg<sup>-1</sup>.

Certaines roches, en particulier les roches cristallines, possèdent des teneurs naturelles élevées en plomb" (Groupement-D'intérêt-Scientifique-Sol, 2011). On trouve principalement ces roches et les sols issus de celles-ci dans les grands massifs hercyniens (Vosges et Massif Central). Une autre source de richesse naturelle d'un sol en plomb sont les apports fluviaux comme dans le delta du Rhône et dans les estuaires de la Loire et de la Garonne (Groupement-D'intérêt-Scientifique-Sol, 2011). Ces sols naturellement riches en plomb sont présentés sur la carte de droite de la Figure 4. En effet, pour ces sols, il est possible de relier la teneur en plomb du sol avec le type de roche mère.

Le cycle biogéochimique naturel du plomb est caractérisé par deux types de flux présentés sur la Figure 5 :

- le **flux terrestre** qui correspond au transfert du plomb des écosystèmes terrestres aux écosystèmes aquatiques via le transport des particules de plomb dans l'eau. Ces particules sont souvent liées à des molécules organiques. La valeur de ce flux est de 18 000 t.an<sup>-1</sup>.

Figure 5: Cycles biogéochimiques naturel et anthropique du plomb

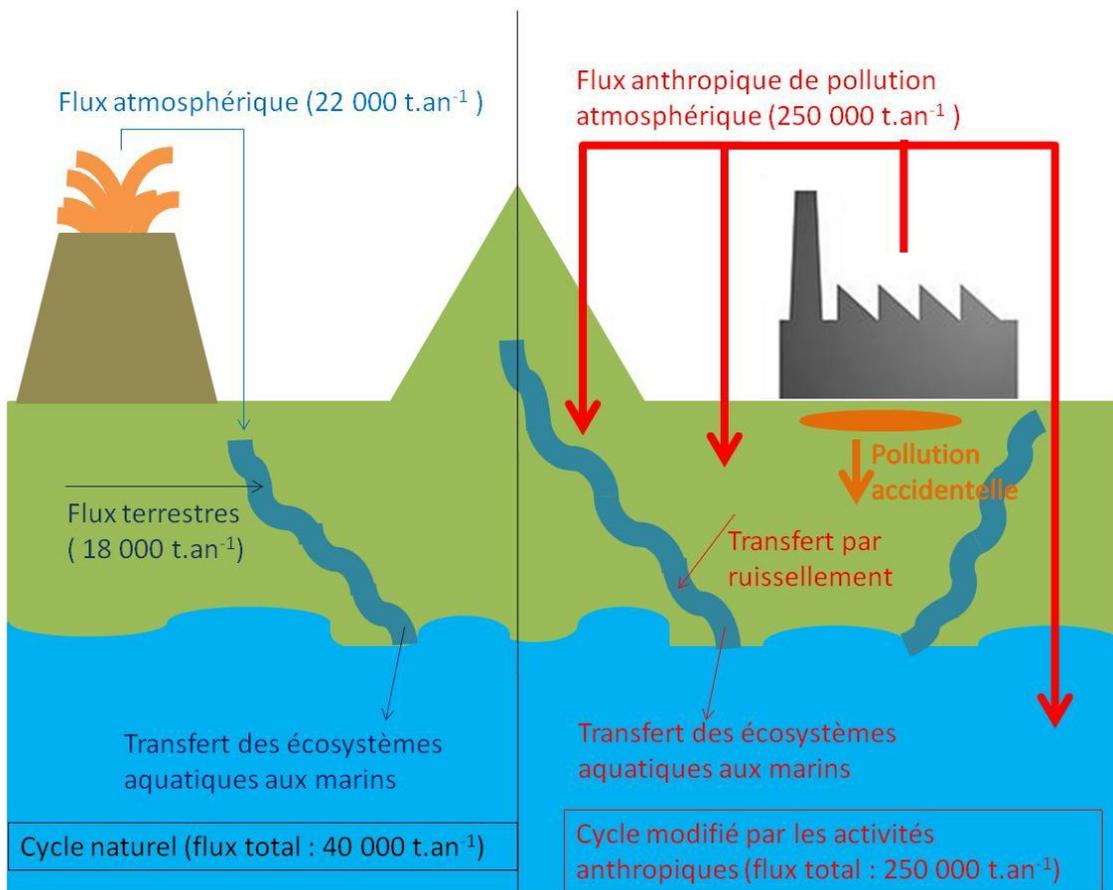
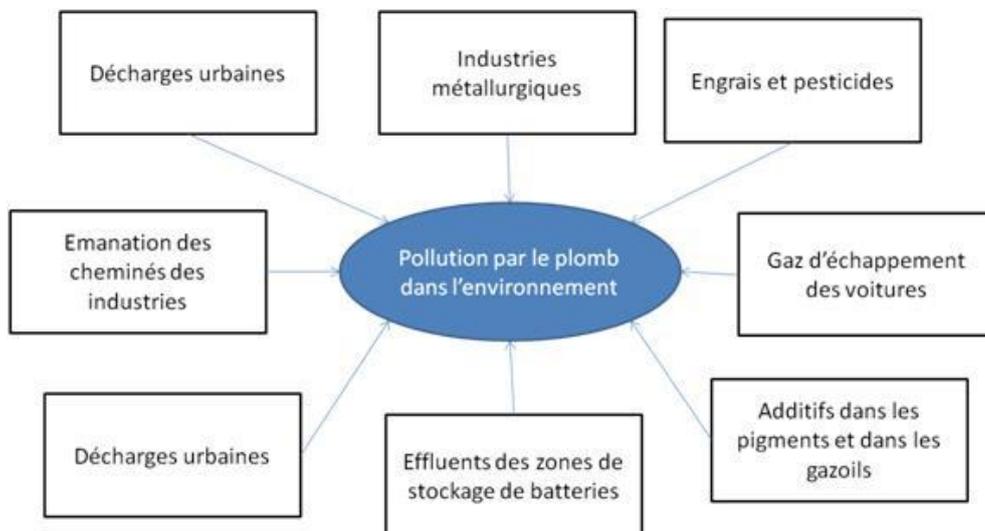


Figure 6: Sources de pollution par le plomb (Sharma&Dubey, 2005)



- le **flux atmosphérique** qui est principalement dû aux activités volcaniques et à l'érosion éolienne et correspond à 22 000 t.an<sup>-1</sup> (Ramade, 2007).

#### 1.1.2.2.2 Les sources anthropogènes et leurs conséquences sur le cycle biogéochimique du plomb

Le plomb est utilisé dans des domaines très diversifiés présentés sur la Figure 6. La principale source de consommation en plomb est la production de batteries de voiture, c'est également la source de pollution par le plomb majoritaire aujourd'hui. Dans les années 1970, la principale source de pollution atmosphérique par le plomb était due aux particules émises par les gaz d'échappement des voitures mais depuis leur limitation et le développement d'un carburant dépourvu de plomb, l'importance de cette source a été réduite.

Du fait de la diversité des domaines d'utilisation de cet élément, la demande mondiale est forte et notamment dans les pays développés. Le *Tableau 1* montre que la consommation et la production mondiale sont assez bien équilibrées. La particularité de cette production est qu'elle est surtout basée sur le recyclage de produits usagés riches en plomb (batteries de voitures, accumulateurs de plomb dans les voitures). En effet, la production minière de plomb, estimée en 2011 à 4,62 millions de tonnes, ne représente que 41% de la production mondiale.

Le flux d'apport de plomb par la pollution anthropogène est de 250 000 t.an<sup>-1</sup>. Il est largement supérieur aux flux terrestre (18 000 t.an<sup>-1</sup>) et atmosphérique (22 000 t.an<sup>-1</sup>) naturels.

De ce fait, la pollution due aux activités humaines est la principale source de plomb dans les écosystèmes entraînant de nombreuses modifications au niveau du cycle biogéochimique.

La Figure 5 montre que la principale voie d'entrée du plomb anthropique dans le cycle biogéochimique est la voie atmosphérique (Ramade, 2007) : les gaz d'échappement des voitures et les fumées des industries produisent des particules de plomb qui sont libérées dans l'atmosphère. Ces particules, étant de taille très réduite, sont facilement transportées et déposées à plusieurs kilomètres de leur source principale de pollution.

Une autre voie moins fréquente et plus négligeable est la pollution ponctuelle du sol (accidentelle ou non).

Le transfert de l'atmosphère à l'écosystème terrestre se fait par dépôt atmosphérique (Ramade, 2007). Les particules de plomb se mélangent avec celles de sol et peuvent se fixer sur les molécules organiques ou se complexer avec d'autres éléments inorganiques (oxydes de fer ou de manganèse) (Groupement-D'intérêt-Scientifique-Sol, 2011).

Ce type de transfert explique pourquoi dans le cas d'une pollution, le plomb est plus concentré dans les horizons de surface (Carte de gauche sur la Figure 4). Cet élément est stocké dans le sol pour deux raisons : il n'existe pas de composés volatils et lorsqu'il est fixé sur des molécules organiques sa solubilité est faible. Le sol est donc un "puits" pour le plomb anthropogène.

Cependant dans certains cas il peut être transféré dans l'hydrosphère qui est composée des écosystèmes aquatiques continentaux et marins. Les voies de transfert pour ces deux écosystèmes sont présentées sur la Figure 5 (ruissellement, transfert direct et dépôt atmosphérique).

Tableau 1: Consommation et productions de plomb à l'échelle mondiale (Wikipedia)

| Consommation mondiale en plomb |                    | Production mondiale de plomb métal |                    | Production minière |                    |            |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| Monde (2004) :<br>7 082 kt     |                    | Monde (2004) :<br>6822 kt          |                    | Monde : 2850 kt    |                    |            |
| Continent                      | Milliers de tonnes | Continent                          | Milliers de tonnes | Pays               | Milliers de tonnes | % du total |
| Asie                           | 2 870              | Asie                               | 2 880              | Australie          | 688,0              | 24,1       |
| Amérique                       | 2 030              | Amérique                           | 2 009              | Chine              | 631,5              | 22,2       |
| Europe                         | 2 011              | Europe                             | 1 551              | Etats Unis         | 435,2              | 15,3       |
| Afrique                        | 131                | Afrique                            | 101                | Pérou              | 308,5              | 10,8       |
| Océanie                        | 40                 | Océanie                            | 281                | Mexique            | 135,4              | 4,8        |

Tableau 2: Caractéristiques de la toxicité du plomb pour l'homme (Agence-De-L'eau-De-Seine-Et-Normandie, 2008)

(DJA: Dose Journalière Admissible, DJT: Dose Journalière Tolérable, DHT: Dose Hebdomadaire Tolérable, CSHPF: Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, OMS: Organisation Mondiale de la Santé, JECFA: Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires)

| Caractéristiques                                  | Concentration        |
|---------------------------------------------------|----------------------|
| Intoxication homme                                | 400 µg/L (plombémie) |
| Intoxication enfant                               | 100 µg/L (plombémie) |
| Intoxication orale                                | 146 mg/kg PS (rat)   |
| Toxicité sublétales                               |                      |
| DJA (CHSPF)                                       | 3,5 µg/kg PS/j       |
| DJT pour le plomb inorganique (OMS, JECFA (1993)) | 3,5 µg/kg PS/j       |
| DHT plomb organique (OMS)                         | 25 µg/kg PS/semaine  |

Au niveau des océans, le plomb est sous forme dissoute, il se fixe sur la matière organique et les sédiments. Les océans sont donc à considérer comme des puits de plomb qu'il soit d'origine anthropique ou naturel (Ramade, 2007).

On peut donc conclure que le plomb est un élément potentiellement dangereux pour l'environnement et les différents écosystèmes à cause des activités anthropiques et du fait qu'il soit difficilement dégradable, il est présent dans les différents écosystèmes et c'est un élément hautement toxique.

De plus, il est qualifié d'ubiquiste car il est présent dans les différentes étapes de la chaîne alimentaire. En effet, il peut être absorbé et accumulé par les végétaux, qui sont consommés par les animaux qui sont eux-mêmes ingérés par l'homme.

#### 1.1.2.2.3 La toxicité du plomb sur l'homme et sur les animaux

Contrairement à certains métaux, le plomb ne joue aucun rôle dans le métabolisme des cellules et donc pour l'homme, les animaux et les végétaux. Il a un effet toxique à de très faibles concentrations (les doses caractérisant la toxicité de cet élément sont présentées dans le Tableau 2).

L'intoxication par le plomb est souvent accidentelle que ce soit pour l'homme ou pour les animaux. Les principales sources d'intoxication sont présentées dans le Tableau 3. C'est un phénomène cumulatif puisque cet élément est très difficilement dégradable qui se traduit par des symptômes diversifiés présentés sur la Figure 7. Sa toxicité a pour origine deux actions moléculaires : la compétition avec l'ion calcique ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et son affinité pour les groupements sulfhydriles (-SH) des enzymes.

L'action du plomb se traduit en deux temps :

- une première phase de stockage dans les reins, le foie et les muscles à court terme
- une deuxième phase de fixation dans les os par substitution avec l'ion calcique à plus long terme (10 à 20 ans (Auguy, 2012))

Les principales conséquences d'une intoxication par le plomb sont l'arrêt de la synthèse de l'hème et des troubles neurologiques (Ben Youssef, 2012).

Différents facteurs influencent la toxicité du plomb : la forme du plomb (qui est plus ou moins hydrosoluble), l'espèce et l'âge de l'individu intoxiqué. En effet, les enfants et les femmes enceintes sont les populations à risque car le plomb a un effet négatif sur le cerveau en développement et est capable de passer la barrière placentaire (Auguy, 2012).

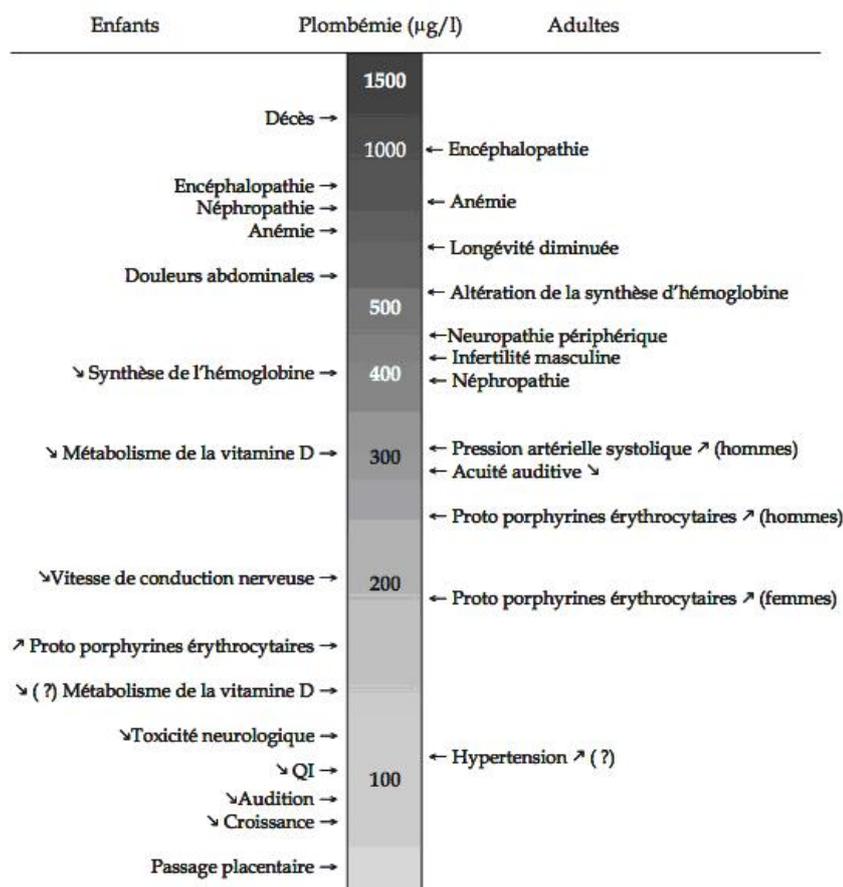
### 1.1.3 **Le suivi et la gestion des Sites et Sols Pollués (SSP)**

A partir des années quatre vingt dix, la pollution des sols par les activités anthropiques est reconnue comme un problème environnemental majeur, l'état français décide alors de mettre en place une politique de gestion nationale. Le premier objectif étant de hiérarchiser et localiser ces sites pollués. Les principaux critères de hiérarchisation sont le niveau de pollution, l'usage actuel et futur du site et son impact environnemental potentiel. Les sites pollués font également partis des actions prioritaires à mettre en place dans le cadre de la loi Grenelle II avec comme objectif principal de finir cet inventaire et de développer des moyens pour traiter ces sites pollués utilisables par l'Etat (Bert *et al.*, 2012).

Tableau 3: Principales sources d'intoxication pour les hommes et les animaux (Wikipedia)

| Principales sources d'intoxication pour les hommes (surtout pour les enfants)            | Principales sources d'intoxication pour les animaux                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Transmission par voie <i>in utero</i> (le plomb passe à travers la barrière placentaire) | Objets riches en plomb (jouets, mur avec peinture au plomb, bijoux ...) |
| Particules provenant d'objets riches en plomb (murs peints avec de la peinture au plomb) | Aliments contaminés par le plomb (végétaux)                             |
| Eau légèrement acide ayant circulé dans des canalisations en plomb                       | Plomb de chasse (surtout pour les oiseaux dans les zones humides)       |
| Aliments contaminés par le plomb (animaux et végétaux)                                   |                                                                         |
| Inhalation de particules de plomb produites dans zone industrielle proche                |                                                                         |
| Cosmétiques pour lesquels les normes françaises ne sont pas respectées                   |                                                                         |

Figure 7: Effet du plomb sur les enfants et sur les adultes en fonction de la plombémie (Bretin et al., 2008)



Effets du plomb inorganique chez les enfants et les adultes : taux minimum où l'effet peut être observé, d'après

### 1.1.3.1 Le suivi des sites et sols pollués : Basias et Basol

Aujourd'hui, deux bases de données existent. Basias recense les sites ayant accueilli par le passé une activité industrielle ou de service (257 000 sites en 2012). Basol répertorie les sites faisant l'objet de mesure de gestion pour prévenir les risques sur les personnes et l'environnement (4100 sites en 2012). Bien que non exhaustive, cette base est généralement utilisée pour estimer le nombre de SSP en France. (Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012).

### 1.1.3.2 La problématique des sites et sols pollués en France

Afin de réduire le nombre de sites et sols pollués, l'état français a mis en place un certain nombre de réglementations pour gérer ces sites qui présentent des enjeux importants. Les principaux enjeux sont résumés sur la Figure 3.

Par exemple, parmi ces réglementations facilitant la gestion des sites, le principe "pollueur-payeur" a été adopté en avril 2004 à travers l'article L 110-1 du Code de l'Environnement. Ainsi, les frais résultant des mesures de prévention, de réduction et de lutte de la pollution doivent être pris en charge par le pollueur. Ce principe est un des principes essentiels qui fondent les politiques environnementales dans les pays développés. En Europe, la directive 2004/35/CE définit les dommages environnementaux à prendre en charge par le pollueur:

- les dommages, directs ou indirects, causés au milieu aquatique couvert par la législation communautaire en matière de gestion des eaux;
- les dommages, directs ou indirects, causés aux espèces et habitats naturels protégés au niveau communautaire par la directive «oiseaux sauvages» et par la directive «habitats»;
- **la contamination, directe ou indirecte, des sols qui entraîne un risque important pour la santé humaine.**

Lorsque l'application de ce principe est possible, c'est l'entreprise utilisant la surface polluée ou celle à l'origine de cette pollution qui doit payer les travaux de réhabilitation du site.

L'ADEME, peut dans certains cas, se substituer aux entreprises exploitants les sites lorsque ceux-ci sont défaillants, non identifiés ou introuvables et assurer la gestion et/ou la réhabilitation des sites orphelins (Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012). C'est ce qui c'est passé pour la gestion de friches situées dans les communes de Noyelles-Godault et de Courcelles-lès-Lens (Pas-de-Calais) issues de la liquidation en 2003 de l'entreprise MetalEurop SA.

Le projet de loi "logement et urbanisme" en cours d'étude présente des dispositions portant sur la gestion des sols pollués dont l'objectif semble être la reconquête des friches urbaines polluées afin de permettre d'y implanter les constructions nécessaires à la densification de la ville. Le projet de loi pourrait créer une entorse au principe pollueur-payeur en prévoyant la possibilité de faire prendre en charge le coût de la dépollution par un tiers. Cette possibilité pourrait permettre de débloquent des situations dans lesquelles les pouvoirs publics se heurtent à l'insolvabilité ou à la disparation du dernier exploitant, alors que des aménageurs seraient prêts à prendre en charge la dépollution du site compte tenu des plus-values escomptées par le lotissement des parcelles.

Tableau 4: Définition des familles et des types de traitement utilisés pour la réhabilitation des sites et sols pollués (Ernest&Young, 2012)

| Famille                                                                                                                                                                                                    | Type                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Technique physique :</b><br>Technique provoquant la modification d'un paramètre physique tel que la température et la pression, (pouvant entraîner un changement d'état).                               | <b>Technique in situ :</b><br>Ensemble de techniques désignant les opérations de traitement des sols ou des eaux souterraines pollués appliquées à l'endroit même où ils se trouvent, sans aucune excavation de terre ni pompage d'eau. |
| <b>Technique chimique :</b><br>Technique mettant en jeu des réactions chimiques avec ou sans ajout d'éléments chimiques étrangers au volume traité.                                                        | <b>Technique sur site :</b><br>Ensemble de techniques qui ont lieu sur le site même, après excavation de terre ou pompage d'eau.                                                                                                        |
| <b>Technique physico-chimique :</b><br>Technique résultant de la combinaison d'une technique chimique avec une technique physique (beaucoup de techniques chimiques comprennent une opération de pompage). | <b>Technique hors site :</b><br>Ensemble de techniques désignant les traitements qui ont lieu en dehors du site pollué, après excavation et transport des terres jusqu'à l'unité de traitement.                                         |
| <b>Technique biologique :</b><br>Technique mettant en jeu des phénomènes biologiques avec ou sans ajout d'éléments biologiques étrangers au volume traité.                                                 |                                                                                                                                                                                                                                         |

Tableau 5: Famille, tonnage et taux d'utilisation pour les différentes filières de réhabilitation des sites et sols pollués (Ademe, s.d.)

| Technique de traitement ou de gestion                       | Famille               | Tonnage   | Taux d'utilisation |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------|--------------------|
| Confinement in situ                                         | physique              | 1 224 200 | 25,40%             |
| Installation de Stockage de Déchets Inertes hors site       | physique              | 1 201 600 | 25,00%             |
| Installation de traitement biologique hors site             | biologique            | 568 200   | 11,80%             |
| Venting – Bioventing in situ                                | biologique - physique | 529 200   | 11,00%             |
| Installation de stockage de Déchets Non Dangereux hors site | physique              | 425 200   | 8,80%              |
| Biodégradation sur site                                     | biologique            | 209 800   | 4,40%              |
| Oxydation / Réduction chimique in situ                      | chimique              | 150 100   | 3,10%              |
| Bio-augmentation / Bio-stimulation in situ                  | biologique            | 126 600   | 2,60%              |
| Installation de stockage de déchets dangereux hors site     | physique              | 87 300    | 1,80%              |
| Installation de traitement thermique hors site              | physique              | 66 200    | 1,40%              |
| Stabilisation physico-chimique in situ                      | physico-chimique      | 56 200    | 1,20%              |
| Confinement sur site                                        | physique              | 46 000    | 1,00%              |
| Stabilisation physico-chimique sur site                     | physico-chimique      | 40 600    | 0,80%              |
| Autres techniques hors site                                 |                       | 25 000    | 0,50%              |
| Cimenterie hors site                                        | physique              | 21 400    | 0,40%              |
| Autres traitements sur site                                 |                       | 17 200    | 0,40%              |
| Installations d'incinération hors site                      | physique              | 10 300    | 0,20%              |
| Phytoremédiation in situ                                    | biologique            | 5 800     | 0,10%              |
| Installation de lavage de terres hors site                  | physico-chimique      | 2 600     | 0,10%              |
| Traitement thermique sur site                               | physique              | 2 000     | 0,00%              |

Hormis ce problème de gestion de la responsabilité de prise en charge des travaux de réhabilitation, une autre limite importante pour la gestion de ces sites est due au fait que les techniques de réhabilitation utilisées actuellement par les professionnels sont coûteuses et ne sont pas accueillies favorablement par l'opinion publique. Ceci peut expliquer le développement de filières alternatives "plus vertes" telles que la phytoremédiation.

## **1.2 Les filières de réhabilitation des sols pollués**

Il existe différentes techniques de traitement des SSP basées sur différents procédés: physique, chimique, biologique ou de confinement. La mise en œuvre de ces traitements se fait soit *in situ* (43% des traitements totaux), soit sur site (7% des traitements totaux), soit *ex situ* (50% des traitements). Les définitions des familles et des types de traitements sont présentées dans le Tableau 4.

Les principales filières de traitement sont présentées dans le Tableau 5 (Ademe, s.d.).

Le choix entre les différentes filières est basé sur différents critères d'ordre économique, juridique, destination future des terrains, relatif au délai, à leur impact environnemental, etc... Le critère sociétal c'est-à-dire le fait que la technique soit plébiscitée par la population et les élus, est également pris en compte notamment pour les sites à proximité des habitations.

Depuis 2000, l'activité du secteur de la réhabilitation des SSP croît de manière forte, en particulier entre 2000 et 2005. Le chiffre d'affaires des entreprises a été multiplié par 2,5 pour atteindre 470 millions d'euros en 2010 (Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012).

En 2010, 200 entreprises était référencées comme spécialisées dans la maîtrise d'œuvre de la dépollution de sites pollués (Service-De-L'observation-Et-Des-Statistiques-Commissariat-General-Au-Developpement-Durable, 2012).

Le marché des prestataires de dépollution est partagé entre 3 types d'acteurs (Ernest&Young, 2012):

– Un noyau d'entreprises spécialisées notamment regroupées au sein de l'UPDS (Union des Professionnels de la Dépollution des Sols) et qui sont soit des PME (Petites et Moyennes Entreprises), soit des filiales de grands groupes acteurs du secteur de l'environnement et de la gestion des déchets tels que Sécché Environnement, SUEZ Environnement et VEOLIA Environnement, ou du secteur de l'aménagement urbain tels que Bouygues Bâtiment, Vinci et Colas. Ce noyau principal domine le marché. Ils se différencient notamment par une expertise dans le domaine des déchets dangereux. Certains, intégrés en amont et en aval, proposent des offres globales (ingénierie et travaux).

– Des entreprises non membres de l'UPDS mais spécialisées dans les travaux de dépollution sont également présentes sur le marché. Parmi ces entreprises il est possible de citer des acteurs spécialisés dans les nouvelles technologies comme la phytoremédiation (Phytorestore) ou la bioremédiation (Biobasic Environnement).

Figure 8: Les différents comportements des plantes face aux ETM (d'après (Migeon, 2009))

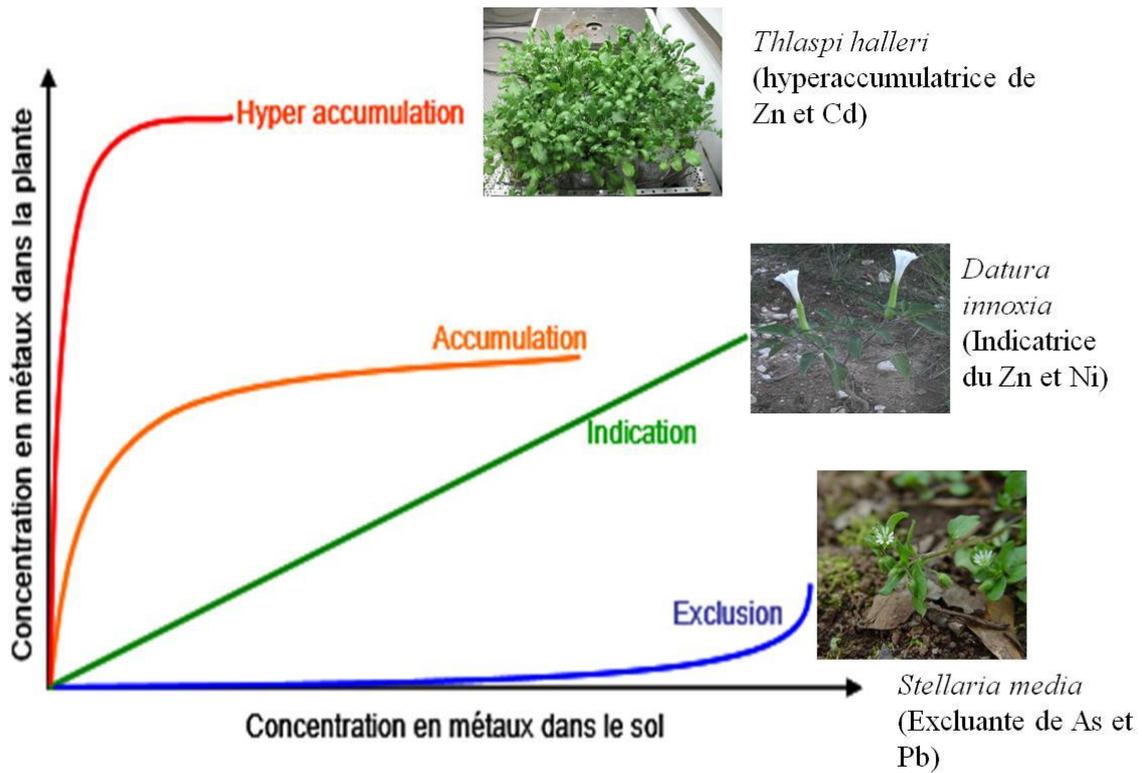


Tableau 6: Nombre d'espèces et de familles hyperaccumulatrices et teneurs limites pour l'hyperaccumulation de différents ETM (Morel, 2012)

| Métal     | Concentration (feuilles % matière sèche) | Nombre d'espèces | Nombre de familles |
|-----------|------------------------------------------|------------------|--------------------|
| Cadmium   | 0,01                                     | 3                | 2                  |
| Cobalt    | > 0,1                                    | 26               | 12                 |
| Cuivre    | > 0,1                                    | 24               | 11                 |
| Nickel    | > 1                                      | > 300            | 35                 |
| Plomb     | > 0,1                                    | 5                | 3                  |
| Manganèse | > 1                                      | 8                | 5                  |
| Zinc      | > 1                                      | 18               | 5                  |

– Des acteurs du domaine des travaux publics qui se positionnent sur le marché depuis quelques années et concurrencent les entreprises spécialisées dans la dépollution des sites. En effet, avec l'augmentation de la demande de réhabilitation de sites dans un contexte de promotion immobilière, les acteurs du terrassement sont de plus en plus présents sur le marché.

Dans le cadre de ce projet, une focalisation plus importante sera apportée aux procédés de phytotechnologies appelées plus communément techniques de phytoremédiation (en jaune dans le Tableau 5 qui sont elles-mêmes une sous spécialité de la bioremédiation).

Cette filière est particulièrement intéressante pour différentes raisons : ce sont des techniques de gestion des sols émergentes qui présentent l'intérêt d'être plébiscitées par la société et par les politiques via l'article 43 de la Loi Grenelle II : "les techniques de dépollution des sols par les plantes seront de préférence utilisées" (Bert *et al.*, 2012).

### **1.3 Les phytotechnologies : une filière en développement**

#### **1.3.1 Le principe de la phytoremédiation**

La phytoremédiation a été définie comme l'utilisation de plantes adaptées et de pratiques agronomiques appropriées pour réduire les risques de dissémination des polluants métalliques à partir de sites pollués (sols industriels ou agricoles (épandage de déchets urbains ou industriels)) (Ademe, 2009)).

Afin de mieux comprendre le principe de la phytoremédiation, il est important de prendre en compte le fait que les plantes peuvent avoir des comportements différents face à un sol pollué par des ETM. Afin de caractériser ce comportement, les concentrations en ETM dans la plante sont déterminées et comparées avec celles dans le sol. En fonction des capacités d'absorption et de translocation des ETM, quatre comportements sont identifiés (Figure 8) :

- les **espèces accumulatrices et hyperaccumulatrices** qui exportent les polluants vers leurs parties aériennes. Les plantes qui ont ce comportement peuvent être utilisées dans des programmes de phytoremédiation basés sur la technique de la phytoextraction. Environ 400 espèces végétales sont reconnues comme étant des hyperaccumulateurs de métaux lourds, la majeure partie d'entre elles (300 espèces) accumulant le nickel. La distinction entre espèces accumulatrice et hyperaccumulatrice est basée sur la teneur en ETM dans les feuilles. Cette limite dépend de l'ETM traité. Par exemple, une plante est qualifiée d'hyperaccumulatrice si la teneur en plomb dans les feuilles est supérieure à 100 mg/g de matière sèche. Le Tableau 6 présente pour chaque ETM les teneurs limites et le nombre de taxons et de familles hyperaccumulatrices de cet élément.

- les **espèces excluantes** sont des espèces végétales qui mettent en place une stratégie de séquestration des ETM au niveau de la rhizosphère et du système racinaire et limitent ainsi le transfert vers les parties aériennes. Ceci est par exemple le cas de *Atriplex halimus* pour le cuivre (Mateos-Naranjo *et al.*, 2013).

Tableau 7: Intérêts et limites des phytotechnologies

| Intérêts                                                                                                                                                          | Limites                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Application <i>in situ</i>                                                                                                                                        | Profondeur de traitement limitée<br>(minimum : 50 cm - maximum : 150 cm)                                                                                                                              |
| Réduction du transfert de la pollution vers d'autres milieux soit par transport éolien vers d'autres écosystèmes soit par lixiviation vers les nappes phréatiques | Traitement partiel de la pollution                                                                                                                                                                    |
| Gamme variée de sites pollués traitables (sols agricoles, friches industrielles ...)                                                                              | Durée longue (de 5 à 10 ans)                                                                                                                                                                          |
| Techniques alternatives ou complémentaires avec les techniques "classiques"                                                                                       | Questionnement sur la valorisation de la biomasse produite                                                                                                                                            |
| Mode de gestion économiquement acceptable                                                                                                                         | Peu de connaissances en cas de multipollution sur le devenir des polluants multiples du sol, organiques ou inorganiques sous l'influence de diverses espèces végétales et de microorganismes associés |
| Adéquation avec les principes du développement durable (perturbation minimale, bonne intégration paysagère, utilisation des ressources naturelles)                |                                                                                                                                                                                                       |
| Echo favorable dans l'opinion publique                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                       |
| Possibilité de valorisation financière en cours de traitement                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                       |

- les **espèces indicatrices** présentent une fréquence de présence des plantes dans des environnements pollués qui donne une indication sur les concentrations en ETM dans le sol. Chez certaines espèces, une corrélation linéaire a été observée entre la teneur totale en un métal dans le sol et la quantité absorbée et transférée vers la partie aérienne de ces plantes. Par exemple, *Glycine max (L.)* est une indicatrice pour le plomb et pour le cadmium (Salazar *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Les phytotechnologies

Les phytotechnologies sont des techniques utilisant des plantes avec ou sans combinaison à des amendements, pour immobiliser, extraire ou dégrader les polluants du sol. Les polluants pouvant être traités grâce à ces techniques sont les ETM, les radionucléides et les composés organiques (Ali *et al.*, 2013). Le Tableau 7 résume les intérêts et les limites des phytotechnologies en général.

Au sein des phytotechnologies, différentes techniques ont été caractérisées en fonction de l'interaction entre les plantes, les organismes du sol et les polluants minéraux et organiques. Il a été ainsi distingué: la phytoextraction, la phytostabilisation, la phytodégradation, la rhizodégradation, la phytovolatilisation, la phyto/rhizo/caulo/blastofiltration et la phytodésalinisation.

Actuellement, les programmes de recherche étudient surtout les deux premières techniques (Annexe 1). Le Tableau 8 compare ces deux techniques. Le principe des autres techniques est présenté en Annexe 3.

Selon l'Union des Professionnels de la Dépollution des Sols (UPDS), en 2009 les phytotechnologies ne représentaient que 0,03% du chiffre d'affaire de leurs adhérents. En effet, actuellement en France, les phytotechnologies sont testées dans les domaines de la recherche et développement pour mieux comprendre les principes de leur fonctionnement.

Cependant, des appels d'offre ont été proposés par des collectivités territoriales et par l'ADEME pour des projets d'aménagement et de traitement des sols pollués proposant l'utilisation de phytotechnologies (surtout de la phytostabilisation) parmi les techniques de dépollution envisageables.

Ces technologies pourraient être potentiellement utilisées pour des projets d'aménagement impliquant différents acteurs :

- dans les espaces ruraux : les professionnels de la forêt et des milieux agricoles
- dans les espaces urbains : les architectes et les paysagistes
- les professionnels des productions végétales : les semenciers, les pépiniéristes, et les vendeurs d'amendement
- et les professionnels de la dépollution

Tableau 8: Comparaison de la phytoextraction et de la phytostabilisation

|                              |                                                 | Phytoextraction                                                                                                                                                                                                       | Phytostabilisation                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Définition                   |                                                 | Utilisation d'espèces végétales hyperaccumulatrices capables de <b>prélever les métaux toxiques situés dans les horizons de surface (jusqu'à 80 cm de profondeur) et de les accumuler dans les parties aériennes.</b> | <b>Immobilisation</b> du polluant <i>in situ</i> grâce à des plantes (réduction de la fraction d'ETM dans la solution du sol pour éviter le transfert vers les autres écosystèmes)                                         |
| Amendements                  | Utilisation en combinaison avec des amendements | phytostabilisation assistée                                                                                                                                                                                           | phytoextraction assistée (75% des études de phytostabilisation)                                                                                                                                                            |
|                              | Type d'amendement                               | Chimiques (EDTA, acides organiques) et biologiques (bactéries rhizosphériques et champignons mycorhiziens)                                                                                                            | Divers (substrats organiques, minéraux phosphatés, amendements calciques, aluminosilicates, oxy(hydroxy)des de Fe, Al et Mn)                                                                                               |
|                              | Fonction des amendements                        | Augmenter la fraction biodisponible des ETM dans le sol                                                                                                                                                               | Diminuer la phytodisponibilité                                                                                                                                                                                             |
|                              |                                                 | Aider au développement de la plante                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                            |
| Espèces utilisées            | Comportement des espèces utilisées face aux ETM | Plantes accumulatrices à forte biomasse (arbres ou herbacées à croissance rapide) ou hyperaccumulatrices (plantes endémiques des sites pollués à faible biomasse)                                                     | Plantes tolérantes aux ETM                                                                                                                                                                                                 |
|                              | Espèces proscrites                              | Espèces invasives, appétentes pour les herbivores ou alimentaires                                                                                                                                                     | Plantes hyper- ou accumulatrices                                                                                                                                                                                           |
|                              | Autres caractéristiques des espèces utilisées   | Espèce à cycle court ou pérenne (plusieurs récoltes par an)                                                                                                                                                           | Espèces pérennes pour assurer une couverture du sol tout au long de l'année                                                                                                                                                |
|                              |                                                 | Espèces locales (adaptées aux conditions climatiques)                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                            |
| Coût de la technique         |                                                 | Annexe 2                                                                                                                                                                                                              | Annexe 2                                                                                                                                                                                                                   |
| Perspectives                 |                                                 | Approfondissement des recherches fondamentales et appliquées pour permettre le transfert aux professionnels, Développement des voies de valorisation des produits                                                     | Développement des applications par des professionnels, Approfondissement des connaissances scientifiques (stabilisation à long terme ?), Validation de la viabilité économique (réflexion sur la valorisation des espaces) |
| Evaluation de la performance |                                                 | <b>Rendement = Taux d'accumulation du métal dans les tissus x Taux de croissance de la plante (exprimé en <math>mg \cdot ha^{-1} \cdot an^{-1}</math>)</b>                                                            | <b>Suivi du taux de couverture qui doit tendre vers les 100%</b><br><b>Suivi du transfert des ETM vers les autres écosystèmes qui doit être réduit significativement voir même arrêté</b>                                  |

### 1.3.3 La phytoremédiation appliquée aux arbres

Dans le cadre de la phytoextraction, le rendement correspond à la part d'ETM extrait par hectare et par an. Il correspond donc au produit de la part d'ETM par matière sèche par la biomasse produite. Ces deux éléments sont donc essentiels pour garantir une phytoextraction efficace, ceci explique donc l'évolution dans les critères de sélection des chercheurs :

- dans un premier temps, ils souhaitent utiliser des plantes hyperaccumulatrices : des plantes endémiques des sites pollués qui possèdent une grande capacité d'absorption et de séquestration des ETM mais produisent peu de biomasse (exemple : *Thlapsi caerulea*)

- dans un second temps, la prise en compte de l'importance de la biomasse dans le calcul du rendement a permis le développement de l'utilisation d'espèces avec de plus faibles capacités d'accumulation mais produisant plus de biomasse, soit des espèces utilisées en grandes cultures (exemple : *Brassica juncea*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*) ou des arbres (exemple : arbres de la famille des Salicacées, robinier ...)

Le principal intérêt de l'utilisation des arbres dans les procédés de phytoremédiation est que cette technique est peu coûteuse et durable. Elle est donc particulièrement bien adaptée au site où il n'y a pas de délai de traitement et pour lesquels aucun projet d'aménagement n'est proposé puisqu'ils peuvent permettre une valorisation économique de cette surface (production de bioénergie, tourisme via des aménagements paysagers ...). De plus, les arbres sont particulièrement intéressants car ils sont peu exigeants en intrants par rapport aux grandes cultures et ils peuvent donc se développer sur des sols moyennement voire peu fertiles (Pulford&Watson, 2003).

Les arbres peuvent être utilisés soit en phytoextraction, soit en phytostabilisation. Comme il est présenté dans le Tableau 8, le choix de la filière dépend surtout du comportement de l'espèce face aux ETM.

### 1.3.4 La phytoremédiation appliquée aux peupliers

Parmi les ligneux utilisés, les arbres appartenant à la famille des Salicacées (peupliers, saules et trembles) sont particulièrement intéressants. En France, actuellement les surfaces où le peuplier est utilisé en phytoremédiation sont limitées (quelques dizaines d'hectares) par rapport aux 236 000 ha de populiculture. Au sein de l'Union Européenne, c'est la Suède qui est la plus engagée avec quelques centaines d'hectares réservés à de la phytoremédiation avec des saules (arbres appartenant au genre *Salix*) (Chalot *et al.*, 2012).

Les peupliers (arbres appartenant au genre *Populus*) sont particulièrement intéressants dans le cadre de programme de phytoremédiation pour différentes raisons : certaines espèces sont capables d'accumuler des ETM et ce sont des arbres à biomasse importante ( $15 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$ ), car ce sont les espèces qui ont la croissance la plus rapide dans les milieux tempérés (Crpf-Rhône-Alpes, 2000).

Cette croissance rapide est permise grâce à sa capacité de croissance continue, en effet, après le débourrement des bourgeons, des feuilles sont initiées et se développent. Ces feuilles néoformées sont différentes en terme de forme, de texture et de toucher par rapport aux feuilles préformées. Elles ont notamment de grandes capacités de photosynthèse. Un autre intérêt de cette croissance rapide est que le peuplier constitue un modèle végétal pour

Figure 9 : Impact d'une forte densité de peuplement à l'hectare sur la rhizosphère et les activités qui lui sont associées.

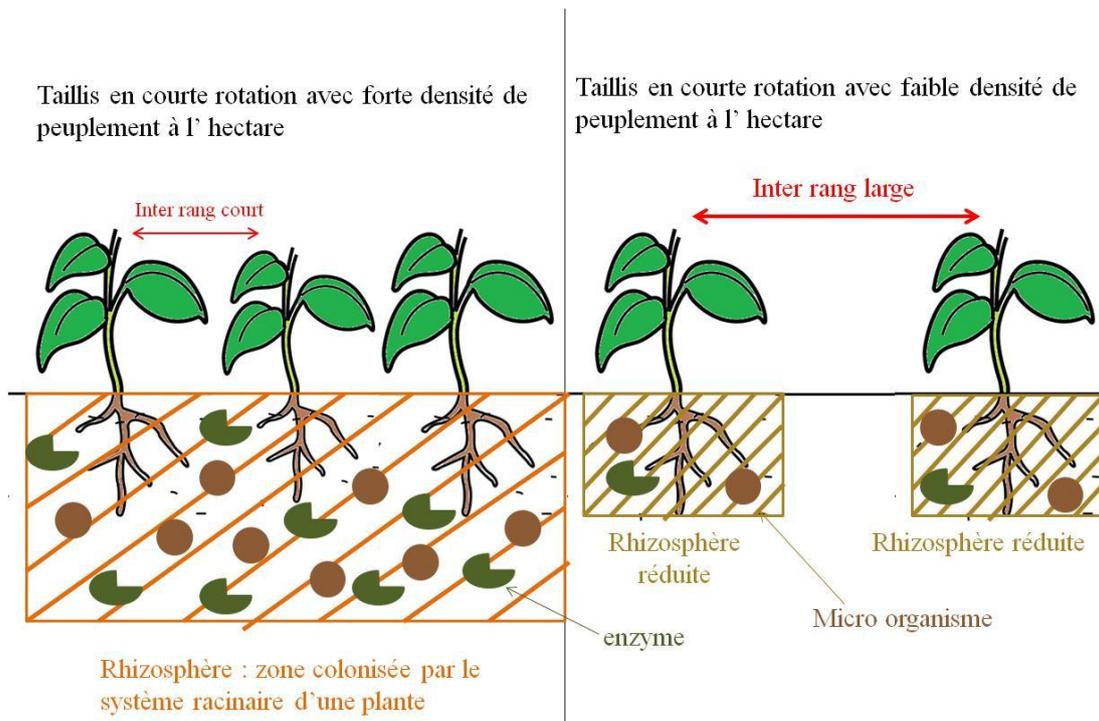


Tableau 9 : Principales voies de valorisation du bois de peuplier

| Nom de la filière              | Produits                                                                                                                                   |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Déroutage                      | Emballages légers (fruits et légumes, fromages, fruits de mer (huîtres)) , panneaux de contreplaqué et tiges et boîtes d'allumettes        |
| Sciage                         | Sommiers, menuiseries d'intérieur, panneaux lattés, moulure, charpente, caisses, palettes, emballage, fonds de meubles et côtes de tiroirs |
| Panneaux                       | Panneaux lattés, panneaux de fibres, panneaux de particules ...                                                                            |
| Papeterie                      | Pâte à papier                                                                                                                              |
| Bois Energie                   | Plaquettes de bois-énergie                                                                                                                 |
| Construction de maison en bois | Bardages extérieurs, aménagements intérieurs (agencements, parquets, portes massives, lambris et contreplaqués)                            |

l'expérimentation en physiologie végétale des arbres (en particulier pour l'étude de la réponse des arbres aux facteurs de nature biotiques ou abiotiques (Bradshaw *et al.*, 2000)).

Un autre intérêt des arbres en général est qu'ils possèdent une grande diversité génétique. Ceci permet de proposer l'hypothèse qu'au sein d'un genre, la probabilité d'adaptation d'une espèce à des conditions très contrastées est plus forte. Par exemple, des études (Marmioli *et al.*, 2011) ont mis en évidence que certains génotypes de peuplier produisent et libèrent plus d'acides organiques fixateurs de polluants minéraux au niveau de la rhizosphère que d'autres. Cette capacité présente l'intérêt de réduire les fractions biodisponibles en ETM dans les sols ce qui rend avantageux l'utilisation de ces génotypes dans des programmes de phytostabilisation. Le principal intérêt du peuplier par rapport à l'aspect sélection variétale et génétique des études est que son génome est de taille réduite (550 millions de paires de bases par rapport à celui du pin qui est 400 fois plus gros) ce qui facilite les études dans le domaine de la génétique. (Bradshaw *et al.*, 2000, Marmioli *et al.*, 2011). De plus, les manipulations génétiques (clonage et hybridations) sont facilitées puisque le génome du peuplier a été séquencé (celui de *Populus trichocarpa* en 2006).

De plus, la populiculture est basée sur la technique des taillis à courte rotation (TCR) ce qui permet une production de biomasse conséquente dans un délai court (10-12 t.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> sur une période de 2-4 ans avec une densité de 15 000 pieds à l'hectare). Le choix de l'intervalle entre deux récoltes et de la densité de peuplement influence significativement le taux de croissance annuel. Des projets tels que PhytoPOP, sont en cours pour trouver l'itinéraire technique basé sur les TCR qui permettrait le meilleur rendement en bois exploitable dans les filières de bioénergie en parallèle à la mise en place de procédés de phytoremédiation de sols multicontaminés (Marmioli *et al.*, 2011, Chalot *et al.*, 2012, Chalot *et al.*, 2012).

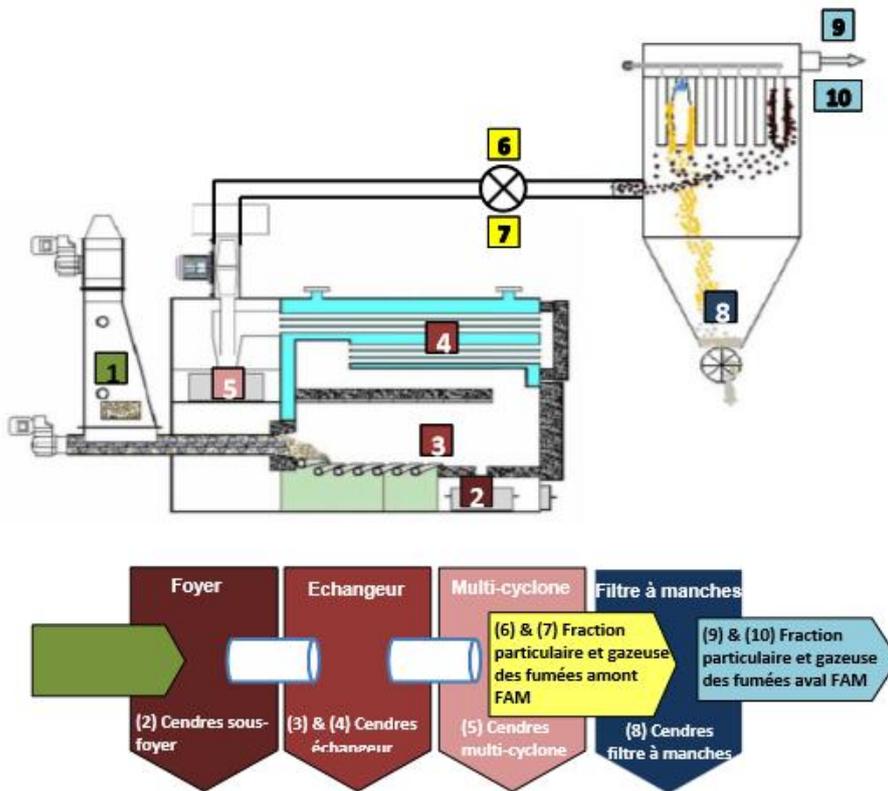
L'explication de ce phénomène est que la culture de plants de peuplier avec une densité de peuplement élevée (donc des inter-rangs courts) permet la mise en place d'une rhizosphère développée (Figure 9). En effet, les racines se développent sous chaque arbre et sous les inters-rangs réduits, ce qui permet une occupation plus homogène et une influence sur un grand volume de sol. Ceci facilite le prélèvement des nutriments et influe sur la spéciation des ETM dans le volume de sol colonisé. Des études (Marmioli *et al.*, 2011) ont également mis en évidence que la forte densité racinaire augmente l'activité des enzymes et des microorganismes ce qui facilite le prélèvement, la fixation ou la dégradation des polluants de nature organiques ou minérale.

Parmi les voies de valorisation classiques du bois de peuplier (Tableau 9), des études sont en cours pour déterminer si la filière bois énergie serait applicable pour les produits ligneux issus de la phytoremédiation (Migeon, 2009, Bert *et al.*, 2012).

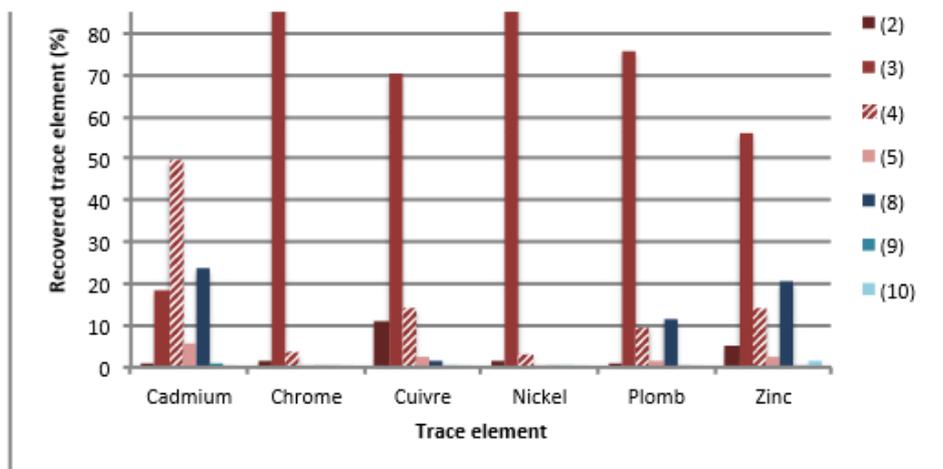
Par exemple, dans le cadre du projet PhytoPOP, une chaudière avec un filtre à manche ayant une puissance de 200 kW a été testée. Le but de cette étude était de suivre le cheminement de différents ETM (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) dans ce dispositif pour déterminer si oui ou non le filtre permettait de limiter la part d'ETM libérés dans l'atmosphère lorsque des dispositifs classiques étaient utilisés.

Les résultats de l'étude sont présentés sur la Figure 10. Ils ont montré que les ETM sont principalement concentrés dans les cendres piégées par le filtre à manche ce qui permet une réduction de la part des ETM libérés dans l'atmosphère au cours du processus d'incinération du bois.

Figure 10: Schéma du dispositif de la chaudière associée au filtre à manches et résultats associés à son utilisation sur la répartition des ETM dans les différents compartiments (Bert et al., 2012)



## Résultats et interprétations



Distribution des différents métaux dans les cendres et fumées. (2) Cendres sous-foyer ; (3) & (4) Cendres échangeur ; (5) Cendres multi-cyclone ; (8) Cendres FAM ; (9) Fraction particulaire aval FAM ; (10) Fraction gazeuse aval FAM

Les perspectives associées à ce dispositif sont de développer des essais pilotes pour tester des conditions variées (qualité de la biomasse) et évaluer l'utilisation de ce dispositif dans différents contextes pour en connaître les limites. Ces essais seront réalisés dans le cadre du projet AFFAM (AAP CORTEA 2012) (Bert *et al.*, 2012).

En conclusion de cette partie, le peuplier est un bon candidat pour la phytoremédiation pour différentes raisons :

- sa croissance rapide
- la grande diversité génétique qui existe dans ce genre
- l'itinéraire technique classique (TCR) est applicable en phytoremédiation et pourrait permettre d'obtenir de bons rendements
- le bois produit pourrait être valorisé en bois énergie en utilisant un dispositif similaire à celui développé dans le cadre du projet PhytoPOP (chaudière avec filtre à manches)

Ces différents points expliquent pourquoi le peuplier a déjà été utilisé dans différentes études de phytoremédiation (Annexe 4). Les principaux ETM qui ont été traités dans le cadre de ces études sont le cadmium (Cd) et le zinc (Zn). Ces études ont été réalisées soit sur des sites multipollués *in situ* soit en laboratoire (en hydroponie ou en serre).

D'autres études utilisant le peuplier ont également été réalisées pour traiter des sols pollués par des polluants organiques et des peupliers transgéniques ont été mis au point principalement aux Etats Unis pour traiter également des polluants organiques ou des ETM (Marmiroli *et al.*, 2011).

#### **1.4 Synthèse et présentation de la problématique de l'étude**

Les sites et sols pollués, qui correspondent à des sites contaminés par des éléments chimiques de natures minérale ou organique lors d'activité industrielle passée, sont un problème important en France et en Europe. Des politiques de gestion ont donc été mises en place pour limiter la dégradation de la qualité des sols et pour réhabiliter ces anciens sites industriels. Parmi les contaminants des sols, les Eléments traces métalliques (ETM) sont particulièrement problématiques et notamment le plomb qui est toxique, ubiquiste et non dégradable.

Afin de remédier à ce type de contamination, des techniques de traitement du sol sont développées et utilisées par les professionnels de la dépollution. Parmi ces techniques, les phytotechnologies, qui sont en cours de développement, semblent particulièrement intéressantes pour les sites de grande surface et à faible pollution. Leurs principaux intérêts sont qu'elles sont plébiscitées par le public car considérées comme des technologies "vertes" respectueuses des principes du développement durable et permettant potentiellement une valorisation économique. Leurs principales limites sont que ces techniques sont assez récentes et que peu d'études réalisées sur le terrain sont disponibles à ce jour. Actuellement, les deux phytotechnologies les plus étudiées sont la phytoextraction et la phytostabilisation.

Parmi les espèces végétales utilisables, le peuplier semble particulièrement intéressant vu ses capacités de production de biomasse importante et rapide et vu le développement de la filière de valorisation "bois énergie" qui peut être utilisée pour valoriser les "produits" de la phytoremédiation et notamment ceux de la phytoextraction.



Notre étude entre dans ce contexte puisque ces principaux objectifs sont de caractériser le comportement de deux génotypes de peuplier face à un sol pollué par un ETM, le plomb. Afin de répondre à cette question, deux types d'essais seront menés.

Dans un premier temps, des essais en hydroponie ont été réalisés pour caractériser le comportement d'un génotype face au plomb et pour déterminer si un apport de fer en excès permet de limiter les effets néfastes de cet ETM sur le développement de la plante.

Dans un deuxième temps, des essais en serre ont été mis en place, le sol utilisé est un sol pollué (sol issu d'une friche industrielle multipolluée aux ETM) pour déterminer les capacités d'épuration de ces plantes et leur comportement face à cette multipollution.

Les problématiques de cette étude sont donc de comprendre:

1. Comment le plomb influence-t-il le développement de plants de peuplier appartenant à deux génotypes différents et de quelle façon un excès de fer peut-il permettre de limiter l'effet néfaste du plomb sur le développement de ces plantes ?

2. Comment deux génotypes de peupliers se comportent-ils sur un sol multicontaminé aux éléments traces métalliques et est ce que ce comportement est favorable à la mise en place de procédés de phytoremédiation ?

L'objectif étant de sélectionner des génotypes de peuplier exploitables dans des programmes de phytoréhabilitation de sites pollués.

Figure 11: Rangs taxonomiques au sein de la classification du genre *Populus*

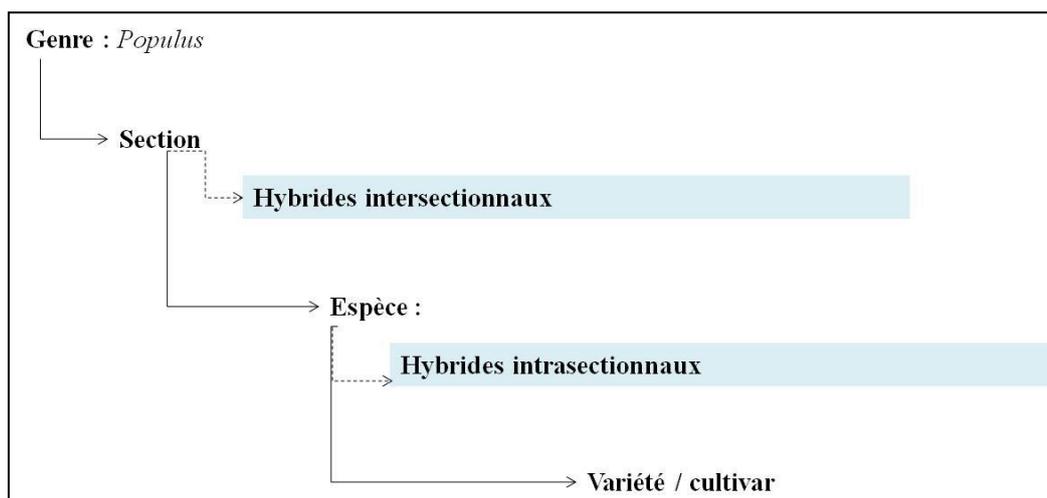


Tableau 10: Fiche botanique du genre *Populus*

| <u>Fiche botanique du genre <i>Populus</i></u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Appareil végétatif</b>                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Feuilles                                       | Simples, alternes, caduques ou semi-persistantes, de forme ovale la plupart du temps, acuminées, stipulées, pétiolées et à nervure palmatipennée caractéristique. On distingue sur une même plante les feuilles préformées et des néoformées qui apparaissent après le débournement. |
| Système racinaire                              | Traçant et contribuant à la dissémination par drageonnage à partir des racines superficielles                                                                                                                                                                                        |
| Bois                                           | Léger, à pores diffus avec des cernes difficiles à distinguer                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Appareil reproducteur</b>                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Sexualité                                      | Plante dioïque et dichogame à pollinisation anémogame                                                                                                                                                                                                                                |
| Inflorescence                                  | Chatons pendants (fleurs attachées par une bractéole caduque)                                                                                                                                                                                                                        |
| Périanthe                                      | Réduit à un disque floral (pas de sépales ni de pétales)                                                                                                                                                                                                                             |
| Parties reproductrices mâles                   | 8 à 30 étamines rougeâtres                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Parties reproductrices femelles                | Ovaire uniloculaire à deux carpelles                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Fruit                                          | Capsule uniloculaire à deux valves contenant de nombreuses graines avec aigrette et placentation pariétale.                                                                                                                                                                          |

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Matériel végétal**

#### **2.1.1 Le genre *Populus***

Le genre *Populus* (peupliers et trembles) appartient à la famille des *Salicaceae* (comme le genre *Salix* (saules)). Les arbres appartenant au genre *Populus* ont une aire de répartition naturelle qui correspond à l'hémisphère Nord et à une petite partie de l'Afrique tropicale (Bradshaw *et al.*, 2000).

Au sein du genre *Populus*, différents rangs taxonomiques sont distingués (Figure 11). Les sections, au nombre de six, regroupent un certain nombre d'espèces ayant des traits morphologiques et écologiques communs. L'espèce est subdivisée en variétés ou en cultivars. Un cultivar correspond à un clone cultivé couramment, reproduit par bouturage et produit à partir d'un individu appelé tête de clone (Crpf-Poitou-Charente, s.d.).

De nombreuses hybridations sont possibles au sein du genre *Populus*. On trouve notamment des hybrides intersectionnaux (entre deux espèces appartenant à des sections différentes). En effet, il existe des hybrides entre les sections Aigeiros et Tacamahaca (Eckenwalder, 1996), ces hybrides forment la "dernière section" de la classification et sont regroupés sous le terme de peupliers interaméricains. On trouve également des hybrides intrasectionnaux (entre deux espèces appartenant à la même section).

L'aspect de la classification qui est le plus critiqué concerne celle des espèces. En effet, en fonction des auteurs, le genre *Populus* comprend entre 22 et 85 espèces. Du fait de l'existence de nombreux hybrides naturels, certains auteurs les considèrent comme des espèces à part entière et d'autres non (Eckenwalder, 1996).

Nous emploierons pour la suite de cette étude le terme générique de peuplier pour parler des arbres appartenant à ce genre, si nécessaire des précisions relatives à une espèce donnée seront apportées.

#### **2.1.2 Les peupliers**

Les peupliers sont des arbres à tige principale, à feuilles caduques ou semi-persistantes. Les caractéristiques botaniques principales des peupliers sont présentées dans le Tableau 10.

Le peuplier a un certain nombre d'exigences écologiques : il est exigeant en eau mais ne supporte pas les sols asphyxiants. Il se développe plus facilement sur des sols profonds, fertiles, bien aérés et légers. Son pH optimal est compris entre 5,5 et 7,5. Si le pH est inférieur à 5, une diminution de la croissance peut être observée (Chalot *et al.*, 2012). Concernant le climat, il a besoin d'une longue période de végétation et est sensible au froid. Il a également besoin de lumière pour se développer. Des différences d'exigences existent au sein des cultivars et des espèces (Crpf-Rhône-Alpes, 2000).

Tableau 11: Place dans la classification des deux géotypes étudiés (PTA et Skado)

| SECTION                                                    | REMARQUES                                                                  | ESPÈCES                                 | VARIÉTÉS/CULTIVARS                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 <sup>ère</sup> section<br><b>LEUCE</b>                   | Peupliers trembles<br>(Europe et Amérique)                                 | Populus tremula                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                            | Peupliers blancs                                                           | Populus alba (une espèce collective)    | var. 'Nivea'<br>var. 'Hickeliana'                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                            | Hybrides<br>(P tremula x P alba)                                           | Populus canescens<br>(Peuplier grisard) |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 2 <sup>ème</sup> section<br><b>TACAHAMACA</b>              | Appelés aussi peupliers baumiers                                           | Populus simonii                         | c.v. 'Obtusata'                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                            |                                                                            | Populus yunnanensis                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                            |                                                                            | Populus trichocarpa                     | c.v. 'Fritzi Pauley'<br>c.v. 'Columbia River'                                                                                                                                                                                                                                         | c.v. 'Trichobel'                                                                                                                                                                                                                                |
| 3 <sup>ème</sup> section<br><b>LEUCOÏDE</b>                | Petit groupe très localisé en Extrême-Orient et dans le sud des Etats-Unis | Populus lasiocarpa                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4 <sup>ème</sup> section<br><b>TURANGA</b>                 | Espèces principalement asiatiques                                          | Populus euphratica                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5 <sup>ème</sup> section<br><b>AIGEIROS</b>                | Appelés aussi peupliers noirs                                              | Populus nigra                           | var. 'Italica'<br>c.v. 'Pourtet'                                                                                                                                                                                                                                                      | var. 'Hamoui'<br>c.v. 'Vert de Garonne'                                                                                                                                                                                                         |
|                                                            |                                                                            | Populus deltoïdes                       | c.v. 'Carolin'<br>c.v. 'H.402'<br>c.v. 'Lena'                                                                                                                                                                                                                                         | c.v. 'Lux'<br>c.v. 'Alcinde'<br>c.v. 'Dvina'                                                                                                                                                                                                    |
|                                                            |                                                                            | Populus X euraméricana                  | c.v. 'Batard d'Hauterive'<br>c.v. 'Tardif de Champagne'<br>c.v. 'Blanc du Poitou'<br>c.v. 'Robusta'<br>c.v. 'I.214'<br>c.v. 'I.45.51'<br>c.v. 'Dorskamp'<br>c.v. 'Flévo'<br>c.v. 'San Martino'<br>c.v. 'Ghoy'<br>c.v. 'Luisa Avanzo'<br>c.v. 'Cima'<br>c.v. 'Lambro'<br>c.v. 'Soligo' | c.v. 'Florence Blondi'<br>c.v. 'Gaver'<br>c.v. 'Guariento'<br>c.v. 'Belloto'<br>c.v. 'Triplo'<br>c.v. 'Cappa Bigliona'<br>c.v. 'Branagesi'<br>c.v. 'Broccalari'<br>c.v. 'Neva'<br>c.v. 'Bellini'<br>c.v. 'Koster'<br>c.v. 'Hees'<br>c.v. 'Taro' |
| Groupe<br><b>TACAHAMACA</b><br><b>X</b><br><b>AIGEIROS</b> | Hybrides intersectionaux                                                   | Populus X interaméricana                | c.v. 'Unal'<br>cv. 'Beaupré'<br>c.v. 'Hunnegem'                                                                                                                                                                                                                                       | c.v. 'Raspalje'<br>c.v. 'Boleare'<br>c.v. 'Donk'                                                                                                                                                                                                |

Source : (Crfp-Poitou-Charente, s.d.)

### 2.1.3 Les deux génotypes de peuplier : Skado et PTA

Les boutures utilisées dans cet essai sont issues de plants de peuplier appartenant à deux génotypes différents : Skado et PTA. La place de ces deux génotypes dans la classification des peupliers est présentée dans le Tableau 11.

Skado est un hybride entre *Populus trichocarpa* et *Populus maximowiczii*. Il appartient à la Section II Tacahamaca. Ce peuplier a été sélectionné pour cette étude, car il a déjà été utilisé dans des programmes de recherche en phytoremédiation (PhytoPOP (Migeon, 2009)).

PTA est un hybride entre *Populus tremula* et *Populus alba*, c'est le clone modèle utilisé par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) à Clermont-Ferrand. Son identifiant en tant que clone est clone 717-1B. Le choix a été fait de le nommer PTA dans ces travaux pour faciliter la lecture du document. Il appartient à la Section I Leuce. Ce clone a également déjà été utilisé dans des études de phytoremédiation (Bojarczuk, 2004, Migeon, 2009).

### 2.1.4 Culture des peupliers

Les boutures de PTA ont été récoltées en deux temps à l'INRA de Crouël et ont été mises en culture dans des conditions différentes (celles récoltées le 2 avril 2013 ont été utilisées pour l'essai sol, les autres récoltées le 19 avril 2013 ont été utilisées pour l'essai hydroponie (Tableau 12)).

Les boutures de Skado ont été reçues le 26 avril 2013 de l'UMR Chrono-environnement de l'Université de Besançon. Après une semaine de stockage à 4°C, elles ont été mises en culture. Pour ce génotype, l'ensemble des boutures ont reçu un traitement similaire, la sélection des plantes pour les essais (hydroponie et sol) a été basée sur la taille des plantes quelques jours avant le début des essais.

Le Tableau 12 résume les dates clés et la durée de culture pour les différents génotypes. Ce tableau met en évidence que les durées de culture pour les deux génotypes sont différentes, ce qui justifie le fait qu'aucune comparaison directe des réponses aux stress n'ait été faite. En effet, il faut à la fois prendre en compte l'effet du génotype et celui de l'âge des plantes.

Après la réception des boutures, seuls les deux bourgeons apicaux ont été gardés afin d'éviter une compétition dans l'utilisation des réserves de la bouture avec les autres bourgeons non utilisables par la suite. Les plantes ont ensuite été placées quelques jours dans de l'eau pour favoriser la rhizogenèse, l'imbibition des tissus et le débourrement des bourgeons. Les plantes ont été transférées en pot à partir du moment où 4 à 5 racines étaient visibles et que les bourgeons commençaient à débourrer.

Les plantes ont été cultivées dans un premier temps sur un substrat neutre, la perlite, dans des pots de 5l. L'utilisation de substrat neutre permet d'éviter les interactions non contrôlées observées dans un sol et de choisir les éléments nutritifs à apporter.

La solution nutritive apportée au génotype Skado est présentée dans le Tableau 12. Cette solution est composée des différents éléments nécessaires à la croissance du peuplier. Les essais menés avec ce génotype ont mis en évidence que cette solution n'était pas optimale pour les plantes et que la solution apportée au génotype PTA (Tableau 13) est plus adaptée à ce type d'essai.

Tableau 12: Dates clés de la culture des plants de peuplier

| Génotype                          | Skoda      |          | PTA        |          |
|-----------------------------------|------------|----------|------------|----------|
|                                   | hydroponie | sol      | hydroponie | sol      |
| Réception des rameaux             | 29/04/13   |          | 03/04/13   | 19/04/13 |
| Mise en pot des boutures          | 10/05/13   | 17/05/13 | 19/04/13   | 22/04/13 |
| Sélection des plants pour l'essai | 29/05/13   | 03/06/13 | 15/07/13   | 26/06/13 |
| Transfert de serre à phytotron    | 30/05/13   |          | 13/05/13   |          |
| Transfert de phytotron à serre    |            |          | 30/05/13   |          |
| Début de l'essai                  | 04/06/13   | 10/06/13 | 16/07/13   | 27/06/13 |
| Durée de la culture               | 26 jours   | 25 jours | 89 jours   | 67 jours |
| Durée de l'essai                  | 15 jours   | 24 jours | 15 jours   | 32 jours |

Tableau 13: Descriptif des solutions nutritives apportées à PTA et à Skado

| Formule chimique du composé                        | Nom du composé                     | Concentrations de la solution apportée à PTA | Concentrations de la solution apportée à Skado |
|----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Solution mère en macro éléments</b>             |                                    |                                              |                                                |
| CaCl <sub>2</sub>                                  | Dichlorure de calcium              | 0,75 mM                                      | 0,75 mM                                        |
| KNO <sub>3</sub>                                   | Nitrate de potassium               | 4,7 mM                                       | 4,7 mM                                         |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                    | Ammonitrate                        | 5,15 mM                                      | 5,15 mM                                        |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | Sulfate de magnésium               | 0,375 mM                                     | 0,375 mM                                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | Di-hydrogénophosphate de Potassium | 0,3 mM                                       | 0,3 mM                                         |
| MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O                 | Sulfate de manganèse               | 100 µM                                       | 100 µM                                         |
| ZnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O                 | Sulfate de zinc                    | 19 µM                                        | 19 µM                                          |
| <b>Solution mère en Fer</b>                        |                                    |                                              |                                                |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | Sulfate de fer                     | 100 µM                                       | 873 µM                                         |
| <b>Solution mère en micro éléments</b>             |                                    |                                              |                                                |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | Molybdate de sodium                | 0,2 µM                                       | 0,2 µM                                         |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | Sulfate de cuivre                  | 0,01 µM                                      | 0,01 µM                                        |
| CoCl <sub>2</sub>                                  | Dichlorure de cobalt               | 0,005 µM                                     | 0,005 µM                                       |
| KI                                                 | Iodure de potassium                | 0,55 µM                                      | 0,55 µM                                        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | Acide borique                      | 9 µM                                         | 10 µM                                          |

La principale différence entre la solution nutritive apportée au génotype PTA et celle apportée à Skado est qu'il y a un facteur de dilution d'une valeur de 8,63 pour le fer (Tableau 13).

Les pH des solutions nutritives sont ajustés à 5,8. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie 2.1.2, le pH optimal du milieu pour le peuplier est situé entre 5,5 et 7,5. Les solutions nutritives étaient apportées 3 fois par semaine à intervalle de 48h (lundi, mercredi et vendredi) pendant la culture des plantes, le volume apporté est de 250 ml. Avant chaque apport, le surplus de solution présent dans la coupelle était vidé, ceci a permis d'éviter la concentration des éléments au fond de la coupelle.

Les plantes ont été cultivées en serre, les conditions (température, humidité relative, et luminosité) n'étant pas contrôlées. Les essais réalisés avec le génotype PTA ont eu lieu en serre, cependant les plantes ont été placées en phytotron pendant deux semaines en mai puisque les conditions météorologiques du mois de mai n'étaient pas favorables à la pousse des plants (température et luminosité réduite).

Les conditions dans le phytotron étaient : 23°C le jour et 18°C la nuit, une photopériode de 16h et une intensité lumineuse moyenne de  $720 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . L'intensité lumineuse a été évaluée grâce à une carte d'intensité lumineuse réalisée grâce à un photomètre. Cette carte a également permis de s'assurer que l'intensité lumineuse reçue était équivalente pour toutes les plantes. Le protocole de réalisation de la carte d'intensité lumineuse est présenté en Annexe 5. Les essais réalisés sur le génotype Skado ont eu lieu en phytotron, le transfert quelques semaines avant le début des essais a permis l'acclimatation de ces plantes à leurs conditions d'essais.

### **2.1.5 Sélection des pots et des pilotes pour les essais**

Après la période de croissance des plantes en serre, seules les plantes nécessaires aux essais ont été conservées. Parmi ces plantes, les pilotes, sur lesquels les mesures en cours d'essai ont été réalisées, ont été déterminées.

#### *2.1.5.1 Sélection des plantes*

Pour chaque modalité dans chaque essai, 10 plantes étaient utilisées sauf pour l'essai en hydroponie avec le génotype PTA pour lequel seulement 6 plantes par modalité étaient disponibles. Ceci dans le but d'assurer la validité statistique de l'analyse des résultats.

Le but de la sélection des plantes est de garantir une homogénéité de hauteur et de nombre de feuilles) pour les plantes utilisées dans un même essai dans des modalités différentes afin d'éviter tout biais lié à l'état initial.

La sélection des plantes, quelques jours avant le début des essais, a donc été basée sur ces deux critères (hauteur et nombre de feuilles). Ceci a permis de caractériser l'ensemble des individus disponibles pour les essais puis de définir des "groupes d'essai homogènes". L'évaluation de l'homogénéité du groupe est déterminée grâce à l'erreur standard par rapport à la moyenne.

Figure 12: Exemple de sélection des plantes pour un essai avec deux modalités

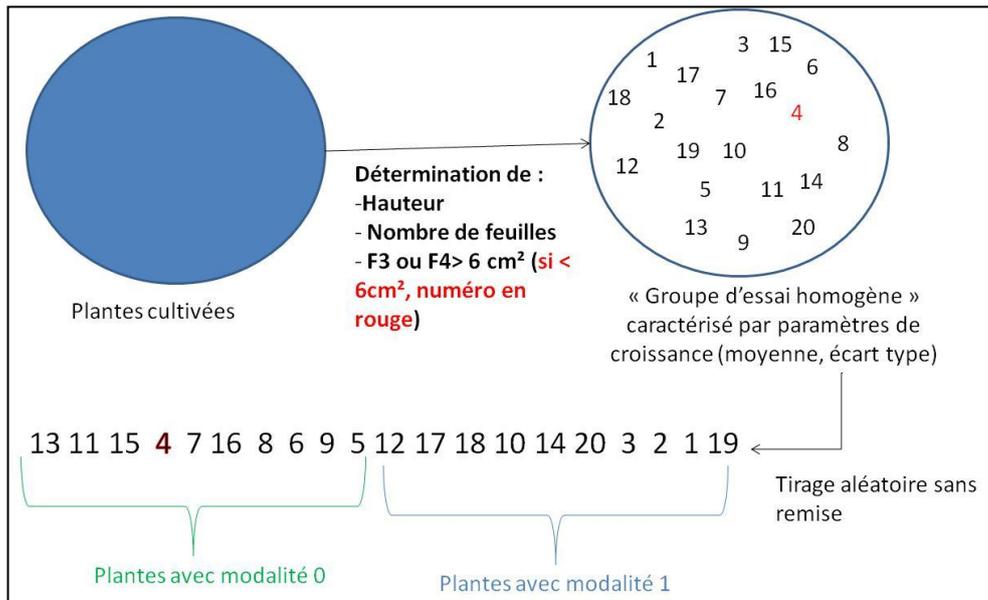


Tableau 14: Synthèse des dispositifs expérimentaux pour les différents essais

| Génotype                       |                                                         | Skado |            | PTA |            |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------|-------|------------|-----|------------|
| Type d'essai                   |                                                         | Sol   | Hydroponie | Sol | Hydroponie |
| Modalités                      |                                                         | 3     | 3          | 2   | 3          |
| Nombre total de plantes        |                                                         | 30    | 30         | 20  | 18         |
| Nombre de plantes par modalité |                                                         | 10    | 10         | 10  | 6          |
| Nombre de pilotes par modalité | Pour les mesures d'échange gazeux                       | 3     | 3          | 3   | 3          |
|                                | Pour le suivi de la croissance et du prélèvement en eau | 6     | 6          | 6   | 6          |

La Figure 12 présente comment la répartition des plantes a été faite.

### **2.1.6 Sélection des pilotes**

Pour les paramètres suivis en cours d'essai, il est intéressant de limiter le nombre d'individus suivis pour augmenter la fréquence de suivi. Ces individus sélectionnés correspondent aux pilotes. Le nombre de pilotes par modalité dépend du paramètres suivi (pour les mesures instantanées d'échanges gazeux, le nombre de pilotes par modalité est de trois, pour la croissance, six pilotes sont utilisés).

Le principal critère de sélection des pilotes est la possibilité de réaliser des mesures d'échanges gazeux fiable, il faut donc que la troisième ou que la quatrième feuille à partir du bourgeon ait une surface minimale de 6 cm<sup>2</sup>.

Le Tableau 14 résume pour chacun des essais, le nombre d'individus ainsi que le nombre de pilotes suivis pour les mesures d'échange gazeux et le suivi de la croissance.

## **2.2 Présentation des essais**

### **2.2.1 Essai en hydroponie**

Dans un premier temps le but de cet essai va être rappelé, puis le dispositif expérimental sera présenté et enfin le calendrier de l'essai sera présenté.

#### **2.2.1.1 But de l'essai**

Le premier objectif est de caractériser l'impact d'une pollution par le nitrate de plomb sur le fonctionnement de plants de peupliers cultivés en hydroponie.

Le deuxième objectif est de déterminer si un apport de fer en excès en plus du plomb permet de limiter les effets néfastes de celui-ci sur le développement de la plante. Cet objectif a été défini après une étude bibliographique qui a mis en évidence que lorsque du fer était apporté en excès par rapport à certains métaux lourds, tel que le cadmium, les effets néfastes de celui-ci sur le développement de la plante étaient réduits (Siedlecka&Krupa, 1999, Sárvári *et al.*, 2011). Il a donc paru intéressant de tester l'hypothèse que l'apport de fer en excès limite les effets néfastes du plomb sur le développement de la plante et notamment sur le fonctionnement des appareils photosynthétiques.

#### **2.2.1.2 Dispositif d'essai**

L'essai en hydroponie a été réalisé sur les deux génotypes étudiés : PTA et Skoda. Le choix a été fait de ne pas présenter les résultats du génotype Skoda car différents problèmes ont eu lieu au cours de cet essai.

L'essai avec le génotype PTA a duré quinze jours, du 9 au 23 juillet 2013 et a été réalisé en serre.

Légende :

 Modalité témoin

 Modalité Pb

 Modalité Pb + Fe

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| 4        | — Numéro de la plante |
| <b>P</b> |                       |

Figure 13: Dispositif expérimental de l'essai en hydroponie avec le géotype PTA

|        |        |        |         |         |    |
|--------|--------|--------|---------|---------|----|
| 3      | 6<br>P | 9<br>P | 12<br>P | 15      | 18 |
| 2      | 5      | 8<br>P | 11<br>P | 14<br>P | 17 |
| 1<br>P | 4<br>P | 7<br>P | 10      | 13<br>P | 16 |

Trois modalités ont été testées dans le cadre de cet essai :

- une modalité témoin : les plantes recevaient la solution nutritive de base utilisée en cours de culture

- une modalité "Pb" : les plantes recevaient la solution nutritive de base avec 150 ppm de plomb en plus (objectif 1)

- une modalité "Pb+Fe" : les plantes recevaient en plus de la solution nutritive de base 150 ppm de plomb et du fer en excès (873  $\mu\text{M}$  contre 100  $\mu\text{M}$  pour la solution témoin) (objectif 2).

Le plomb a été apportée sous forme de nitrate de plomb ( $\text{PbNO}_3$ ). Selon (Stobrawa&Lorenc-Plucińska, 2008), la concentration testée (150 ppm) entraîne des effets toxiques sur les plants de peuplier. Elle permet donc de caractériser le comportement des géotypes face à un niveau toxique de plomb et de déterminer si l'apport de fer est bénéfique pour les plants de peuplier. Le fer a été apporté sous forme de sulfate de fer ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Chaque jour, 250 ml de solution nutritive était apporté. Le surplus non prélevé par les plantes était retiré pour éviter une accumulation des éléments nutritifs au cours du temps.

Les plantes utilisées sont issues des boutures qui ont été cultivées et sélectionnées. Pour le géotype PTA, six plantes par modalité étaient utilisées. Chaque plante était identifiée par son numéro (compris entre 1 et 18), le numéro de la modalité et la lettre P si la plante faisait partie des pilotes sur lesquels les mesures d'échange gazeux étaient réalisées (Figure 13)

#### 2.2.1.3 Calendrier d'essai et paramètres suivis en cours d'essai

Au cours de l'essai, différents paramètres ont été suivis :

- le prélèvement en eau par la plante grâce à la détermination du poids des pots avant et après l'apport en solution nutritive. Ce paramètre était suivi sur l'ensemble des pots quotidiennement.

- la hauteur des plantes a été suivie au cours du temps sur l'ensemble des plantes tous les deux jours.

- la photosynthèse, la conductance stomatique et la transpiration étaient estimées grâce aux mesures d'échanges gazeux réalisées tous les trois jours sur les trois pilotes par modalité réservés à cet usage.

D'autres paramètres ont été déterminés en fin d'essai :

- la conductance hydraulique et le taux de perte de conductivité ont été mesurés grâce au Xyl'EM sur 5 des 6 plantes.

- la biomasse de chaque tissu (racines, tige et feuilles) produite grâce aux mesures de poids frais et sec.

Les plantes disponibles ont également été utilisées pour être minéralisées. Ceci a permis de déterminer ensuite les teneurs en métaux et en éléments minéraux dans les tissus de ces plantes.

Tableau 15: Teneurs moyennes en ETM dans les horizons de surface des sols étudiés et valeur de constat d'impact zone sensible (VCI)

|                                   | Eléments | Valeur moyenne et écart type pour Auzon Très Pollué (ATP) | Valeur moyenne et écart type pour Auzon Moyennement Pollué (AMP) | Valeur moyenne et écart type pour Auzon Témoin (AT) | Valeurs de constat d'impact zone sensible (VCI) |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Teneurs totales (en mg/kg)        | Pb       | 2032,75 ± 936,01                                          | 580,90 ± 129,77                                                  | 51,47 ± 2,71                                        | 400                                             |
|                                   | Sb       | 1624 ± 721,35                                             | 502,90 ± 49,33                                                   | 6,80 ± 1,00                                         | 100                                             |
|                                   | As       | 2148,50 ± 700,13                                          | 890,75 ± 83,10                                                   | 114,50 ± 9,68                                       | 37                                              |
| Fraction biodisponible (en µg/kg) | Pb       | 449 ± 54,13                                               | 372,25 ± 52,87                                                   | 4,03 ± 0,42                                         |                                                 |
|                                   | Sb       | 8512,5 ± 736,47                                           | 2864,5 ± 359,08                                                  | 19,98 ± 0,71                                        |                                                 |
|                                   | As       | 19 270 ± 2849,02                                          | 25 430 ± 2046,86                                                 | 128,75 ± 25,67                                      |                                                 |

Source : Austruy, 2012

**En jaune** : valeurs supérieures au VCI en zones sensibles

Tableau 16 : Caractéristiques géographiques principales du site d'Auzon

| Caractéristiques                        | Détails                                                        |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Région                                  | Auvergne                                                       |
| Département                             | Haute Loire                                                    |
| Commune                                 | Auzon                                                          |
| Nom de la zone d'étude                  | « Vieille Usine » d'Auzon                                      |
| Altitude                                | 456 m                                                          |
| Distance par rapport à Aurillac         | 110 km                                                         |
| Distance par rapport à Clermont Ferrand | 60 km                                                          |
| Distance par rapport à Brioude          | 10 km                                                          |
| Coordonnées GPS                         | 45°23'11.67'' N,<br>3°21'32.42'' E                             |
| Propriétaires                           | Commune d'Auzon, Conseil Général de Haute Loire, Etat français |

## **2.2.2 Essai sur un sol issu d'une friche industrielle multi-contaminée en éléments traces**

Nous allons dans un premier temps nous intéresser à l'objectif de cet essai puis au site d'étude et enfin le dispositif d'essai sera présenté.

### *2.2.2.1 Objectif de l'essai*

Le but de cet essai est de déterminer si les génotypes testés sont aptes à se développer sur des sols pollués par les ETM et s'ils sont capables de prélever les ETM présents dans ces sols. Pour se faire les mêmes paramètres que lors des essais en hydroponie seront étudiés. Le principal intérêt de ce type d'essai est que le milieu utilisé est un "vrai" sol ce qui permet de prendre en compte des interactions négligées dans les essais en hydroponie (effet de la structure du sol, de la microflore et de la microfaune sur le développement de la plante ...). Le site d'étude est une friche industrielle située dans le département de la Haute Loire (43) sur la commune d'Auzon. Cette friche présente une multi-contamination aux ETM, il n'a pas été possible de trouver un sol contaminé avec un seul ETM puisque ceux-ci sont très rares.

### *2.2.2.2 Site d'étude*

Le site d'étude est appelé "La vieille usine" à Auzon (43). Ce site est un atelier sur lequel l'équipe de recherche a effectué au cours des quatre dernières années des travaux pour développer un procédé de phytostabilisation aidée (Austruy, 2012).

Ce site a été inscrit en 1992 au répertoire des sites et sols pollués car il présente des taux anormalement élevés en composés dangereux pour la santé et notamment en ETM (Tableau 15). Il est à noter que l'arsenic (As), le plomb (Pb) et l'antimoine (Sb) sont à des concentrations sur le site pollué supérieur à la valeur de constat d'impact sur zone sensible (VCI). Pour la zone témoin, seul l'arsenic est à une concentration supérieure à la valeur VCI, cette concentration élevée est d'origine naturelle, elle est due à la roche mère comme il a été montré par Austruy en 2012. Les mesures réalisées par le BRGM et par Austruy (2012) montrent une grande variabilité des niveaux de contamination en As, Pb et Sb dans le sol de la friche industrielle (cf écarts types pour ATP et AMP de Tableau 15).

Les informations principales concernant la localisation du site sont présentées dans le Tableau 16 et sur la Figure 14.

Comme on peut le voir sur la carte IGN, le site d'étude est situé à proximité de l'Allier et d'Auzon. Il est également classé comme zone inondable selon le Plan de Prévention des Risques d'Inondation de l'Allier. Ce site est donc particulièrement dangereux pour l'environnement (lessivage/lixiviation vers l'Allier) et pour les populations situées à proximité (habitants d'Auzon et des villages avoisinants). Les prélèvements des échantillons ont été

Figure 14: Localisation d'Auzon sur une carte de France et des sites d'études (AP : Auzon Pollué et AT: Auzon Témoin) sur une vue aérienne et sur une carte IGN



Tableau 17: Caractéristiques physico-chimiques et granulométrie des sols étudiés

| Paramètres Physico-chimiques | Unités    | Auzon très pollué (ATP) | Auzon moyennement pollué (AMP) | Auzon Témoin (AT) |
|------------------------------|-----------|-------------------------|--------------------------------|-------------------|
| pH eau                       |           | 5,83 ± 0,16             | 5,63 ± 0,15                    | 6,20 ± 0,06       |
| CEC                          | cmol.kg-1 | 9,53 ± 1,77             | 10,05 ± 2,10                   | 8,44 ± 0,35       |
| Azote total                  | g.kg-1    | 2,45 ± 0,36             | 3,23 ± 0,47                    | 1,67 ± 0,06       |
| Carbone                      | g.kg-1    | 34,45 ± 4,83            | 42,83 ± 5,92                   | 22,13 ± 0,81      |
| C/N                          |           | 14                      | 13,5                           | 13                |
| Granulométrie                | Unités    | Auzon très pollué (ATP) | Auzon moyennement pollué (AMP) | Auzon Témoin (AT) |
| Sable                        | %         | 72,5                    | 73,3                           | 72,42             |
| Argile                       |           | 10,25                   | 9,25                           | 9,25              |
| Limons                       |           | 17,25                   | 17,45                          | 18,33             |
| Texture                      |           | Limoneux sableuse       |                                |                   |

Source : Austruy, 2012

réalisés dans 2 zones du site contaminé (ATP et AMP) caractérisées d'un point de vue physico-chimiques (Tableau 17) précédemment par (Austruy, 2012).

Le site témoin (AT) est une parcelle localisée à 500 m de la friche industrielle qui s'inscrit dans le même contexte pédoclimatique et qui présente des caractéristiques proches du site pollué sauf pour les teneurs en ETM dans le sol (Tableau 15). Cette parcelle est utilisée comme prairie de pâturage ou pour de rares fauches et d'après l'historique de la parcelle récupéré auprès de l'exploitant de cette parcelle aucun intrant n'y est apporté. Les teneurs élevées en As observées dans le sol de cette parcelle trouvent leur origine de la nature du fond géochimique du massif central.

Le Tableau 17 présente les caractéristiques granulométriques et physico-chimiques des sols. Le pH de ces sols est légèrement acide, les capacités d'échange cationique (CEC) sont correctes ainsi que les taux en matière organique et le rapport Carbone sur Azote (C/N). On peut donc conclure de ces différentes informations qu'hormis la pollution du sol AP, ces sols disposent de l'ensemble des conditions favorables à la culture de plantes.

### 2.2.2.3 *Dispositif d'essai*

Les essais sur sol ont été réalisés sur les deux géotypes étudiés : PTA et Skado.

L'essai avec le cultivar Skado a duré 24 jours du 10 juin au 3 juillet 2013 tandis que l'essai avec le géotype PTA a duré 34 jours du 27 juin au 31 juillet 2013. L'essai avec le géotype PTA a été réalisé en serre tandis que pour le géotype Skado, l'essai a eu lieu en phytotron. Les conditions du phytotron étaient les mêmes qu'au cours de la culture. L'intensité lumineuse moyenne était de  $562,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec un écart type de  $153,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Pour le géotype Skado, trois modalités ont été testées : la culture des peupliers sur le sol témoin (modalité AT en vert sur la Figure 15), celle sur le sol moyennement pollué (modalité AMP en orange sur la Figure 15) et celle sur du sol fortement pollué (modalité ATP en rouge sur la Figure 15). Le Tableau 15 présente les teneurs moyennes en ETM pour les sols utilisés dans les différentes modalités. Seules les deux premières modalités (modalité témoin et moyennement pollué) ont été testées pour le géotype PTA. Chaque plante était identifiée par son numéro (compris entre 1 et 30 pour l'essai Skoda et 1 et 20 pour l'essai PTA) ainsi que par le numéro de la modalité et la lettre P si la plante faisait partie des pilotes (Figure 15).

Afin de garantir le confort hydrique des plantes, le poids de l'ensemble "pot et plante" était suivi quotidiennement et un indicateur a été mis en place pour déterminer si un apport d'eau déminéralisée était nécessaire ou non. Cet indicateur correspond au poids d'eau du pot lorsque la réserve utile est remplie à 75%. La réserve utile (RU) correspond à la masse d'eau disponible pour la plante dans le sol. La formule qui permet de la calculer est :

$$\text{RU} = \text{Pcc} - \text{PS}$$

Le Poids du sol à la capacité au champ (Pcc) et le Poids sec (PS) ont été déterminés empiriquement. Le poids à la capacité au champ a été déterminé en suivant le protocole suivant : de l'eau a été apporté jusqu'à percolation, puis 48h après le Pcc a été déterminé à la fin du drainage. Cette méthode permet une estimation fiable de la réserve utile.

Lors des pesées journalières des pots, si le poids de l'ensemble est inférieur à la limite de 75% de la RU, de l'eau est apportée pour remonter le poids de l'ensemble au moins jusqu'au poids à la capacité au champ.

Figure 15: Dispositifs d'essai (vert : modalité témoin (sol AT), orange : modalité "sol moyennement pollué" (sol AMP) et rouge : modalité "sol très pollué (sol ATP))

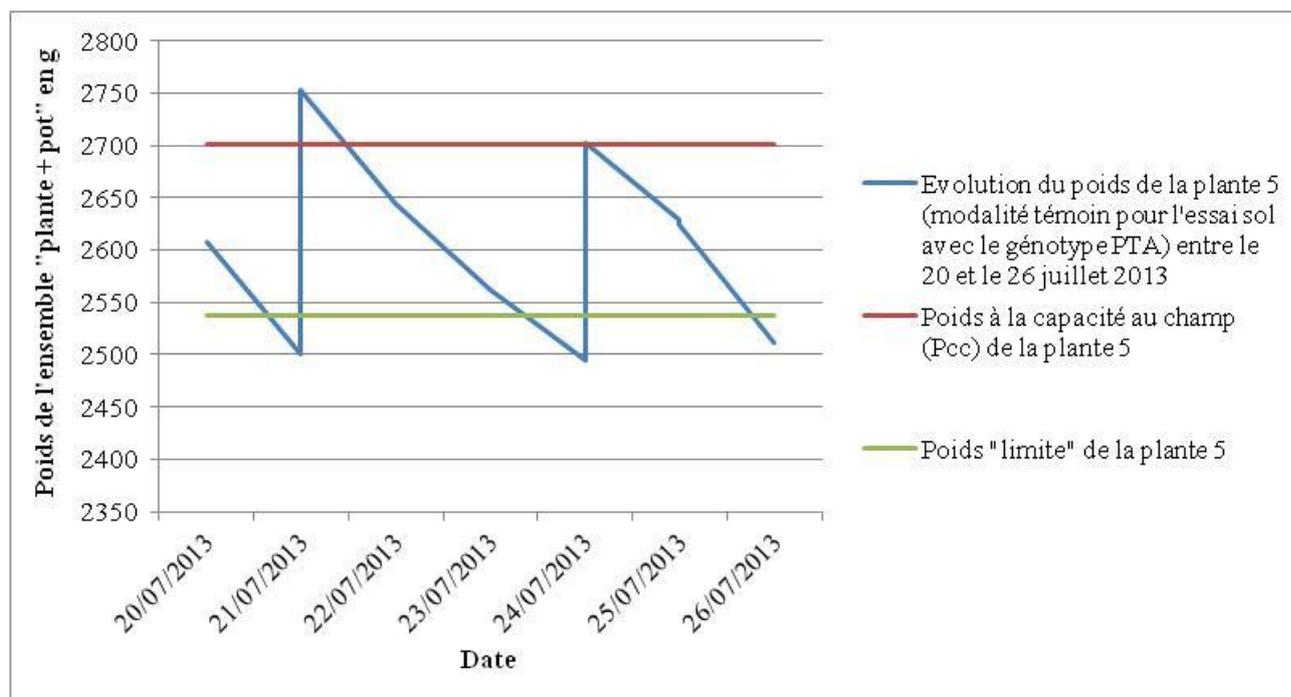
Pour l'essai PTA :

|        |        |        |        |    |         |         |         |    |         |
|--------|--------|--------|--------|----|---------|---------|---------|----|---------|
| 2<br>P | 4<br>P | 6      | 8      | 10 | 12<br>P | 14<br>P | 16<br>P | 18 | 20<br>P |
| 1<br>P | 3<br>P | 5<br>P | 7<br>P | 9  | 11<br>P | 13      | 15      | 17 | 19<br>P |

Pour l'essai Skado :

|         |         |         |         |         |         |        |        |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
|         | 28<br>P | 24<br>P | 20      | 16      | 12<br>P | 8<br>P | 4      |
| 30<br>P | 27      | 23<br>P | 19      | 15<br>P | 11<br>P | 7<br>P | 3      |
| 29<br>P | 26      | 22      | 18      | 14<br>P | 10      | 6<br>P | 2<br>P |
|         | 25<br>P | 21      | 17<br>P | 13<br>P | 9<br>P  | 5<br>P | 1      |

Figure 16: Exemple du suivi du prélèvement en eau pour une plante lors des essais réalisés sur sol



La Figure 16 présente un exemple pour une plante donnée de l'évolution du poids du pot au cours du temps en suivant ce protocole.

## **2.3 Les paramètres étudiés**

### **2.3.1 Les paramètres suivis en cours d'essai**

#### *2.3.1.1 Croissance*

Comme nous l'avons développé précédemment, l'un des buts de ces essais est de déterminer si le développement des plantes a été perturbé par les concentrations élevées en éléments traces métalliques dans le sol. Il paraît donc intéressant pour déterminer cet impact de suivre la croissance des plantes au cours de l'essai. En effet, la croissance est le principal indicateur du développement de la plante. De plus, ces mesures en cours de suivi peuvent aider à l'interprétation des résultats obtenus pour les mesures de biomasse réalisées en fin d'essai.

Pour les "essais en hydroponie", ce paramètre était suivi tous les deux jours sur les six pilotes, tandis que pour les "essai sol" il était également déterminé sur les six pilotes une fois par semaine.

#### *2.3.1.2 Détermination du prélèvement en eau par les plantes*

Le principal intérêt de ce paramètre est qu'il fournit une information sur l'utilisation de l'eau par la plante. En effet, les deux paramètres du milieu qui influence l'évapotranspiration sont la plante qui prélève de l'eau pour la transpirer et le milieu qui évapore une partie de cette eau. Ce paramètre permet de répondre de façon empirique à la problématique suivante : est ce que la teneur en éléments traces métalliques dans le sol influence la capacité de prélèvement en eau de la plante?

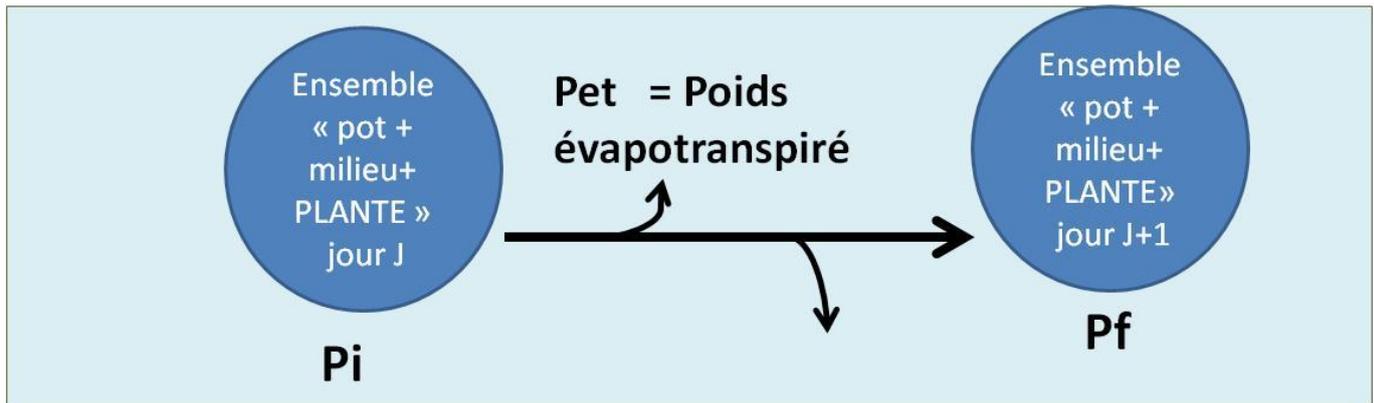
Ce paramètre a été suivi pour les deux types d'essais réalisés.

Afin de déterminer la masse d'eau évapotranspirée par le milieu pendant une journée, il faut déterminer le poids initial (PI) de l'ensemble "pot + milieu + plante" et son poids final (PF) après 24 heures. En effet, la différence PF-PI (Figure 17) correspond à l'ensemble "poids d'eau évapotranspiré dans les conditions de culture" ( $P_e + P_p$ ). C'est ce paramètre qui a été calculé pour les différents essais.

Ce paramètre était suivi quotidiennement sur les six plantes pilotes retenues par modalité. Pour chacune de ces plantes, chaque jour, les poids avant et après le changement de la solution étaient déterminés. Le poids avant le changement de solution correspond au poids final de la journée précédente (J-1). Le poids après l'apport de solution à l'initial pour la journée qui commençait (J) (Figure 18).

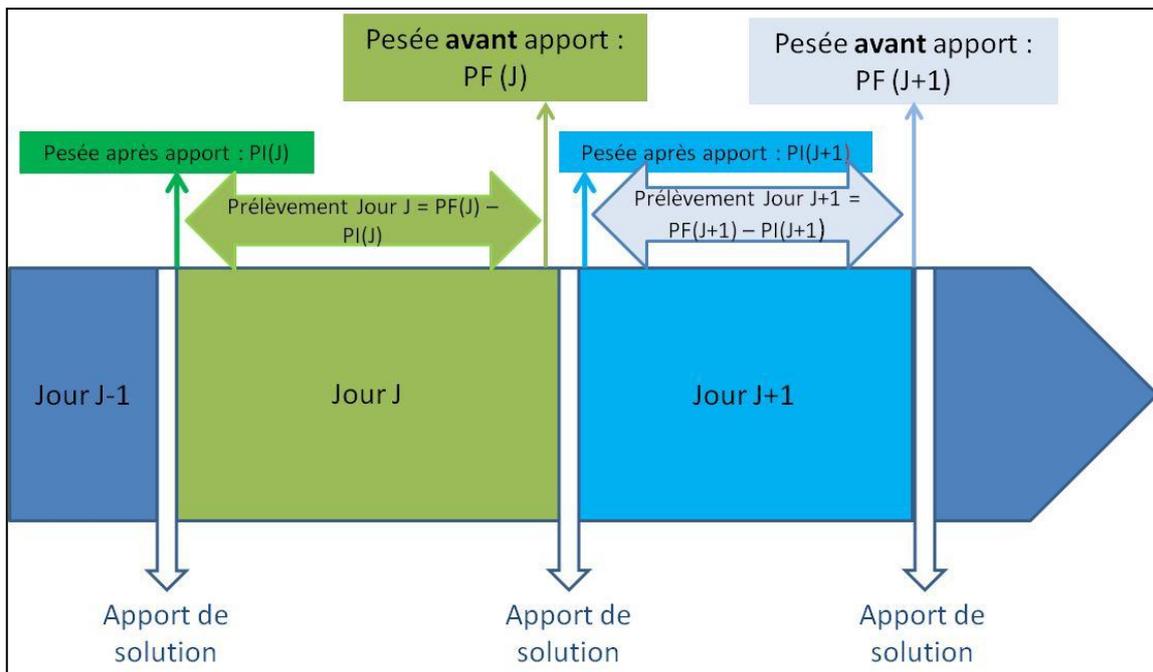
Les mesures étaient ensuite traitées et compilées pour déterminer  $P_{et}$ . Un traitement statistique avec une analyse de variance a été réalisé grâce au logiciel R pour déterminer si des différences significatives de  $P_{et}$  étaient observées en fonction des traitements.

Figure 17: Principe du calcul du prélèvement en eau



Suivi au cours des essais de Pet : poids d'eau évapotranspiré par l'ensemble « plante + conditions de culture »  
 $Pet = Pi - Pf$

Figure 18: Correspondance entre les pesée et les données utilisées pour les calculs



### 2.3.1.3 Suivi de l'activité photosynthétique de la plante grâce aux mesures d'échanges gazeux

#### 2.3.1.3.1 Principe du Licor 6400 : un analyseur des échanges gazeux

Les analyseurs des échanges gazeux permettent de mesurer les échanges gazeux en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et en vapeur d'eau (H<sub>2</sub>O) au niveau d'une feuille grâce à différents paramètres estimés que sont :

- la photosynthèse nette (Pn en  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )
- la concentration intercellulaire en CO<sub>2</sub> (Ci en  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol air}^{-1}$ )
- la conductance stomatique (gs en  $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )
- la transpiration (Tr,  $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Le principe de la technique (Figure 19) repose sur la mesure différentielle du CO<sub>2</sub> et de la vapeur d'eau contenus dans un flux d'air avant et après la mise en contact avec une portion de feuille végétale. Les capteurs de mesure sont deux IRGA (Infra Red Gaz Analysor) affectés l'un à l'air de référence, l'autre soumis à l'échantillon. (Beauclair&Jacquet, 2003).

Les différents paramètres sont calculés par des équations qui prennent en compte différents paramètres estimés au niveau de la cellule de mesure :

- le rayonnement photosynthétique actif (PAR) à l'intérieur et à l'extérieur de la chambre
- la température ambiante, celle de la chambre de mesure et celle de la feuille
- le flux d'air (Beauclair&Jacquet, 2003).

L'utilisation d'appareil basé sur l'analyse des échanges gazeux pour caractériser l'activité photosynthétique est commune pour analyser l'impact d'un stress métallique sur ce processus (Marmioli *et al.*, 2011).

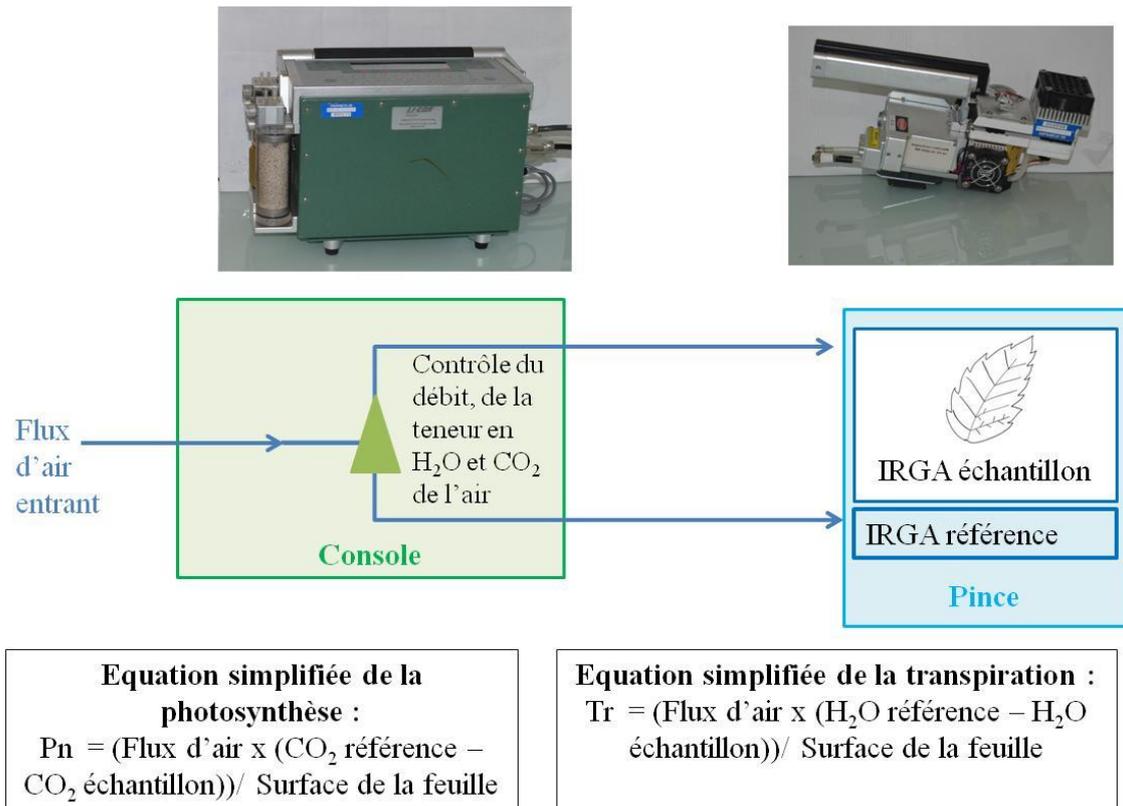
Le principal intérêt de cette technique est qu'elle est non destructive ce qui permet de faire différentes mesures au cours du temps. Un autre intérêt est qu'il est possible de fixer les conditions de température, de luminosité (PAR exprimé en  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), d'humidité et de teneur en CO<sub>2</sub> au niveau de la cellule. Ceci permet notamment de fixer les conditions même si les mesures ont lieu à des moments différents de la journée. L'humidité (teneur en vapeur d'eau) et le CO<sub>2</sub> sont fixés grâce à l'utilisation de pièges chimiques (chaux sodée pour le CO<sub>2</sub> et drierite pour la vapeur d'eau) pouvant être réglés par l'utilisateur.

L'une des limites de ce type d'outils est que la mesure est faite sur une portion de feuille de taille limitée (6 cm<sup>2</sup> maximum), il faut donc répéter les mesures pour obtenir une information générale sur le fonctionnement global de la plante.

#### 2.3.1.3.2 Détermination des cinétiques de la photosynthèse, de la conductance et de la transpiration

Il a paru intéressant de suivre l'impact du polluant sur le développement des plantes au cours du temps, c'est pourquoi les cinétiques de la photosynthèse, de la conductance et de la transpiration ont été déterminées pour les plantes pilotes dans chacune des modalités pour l'ensemble des essais.

Figure 19: Représentation schématique simplifiée du fonctionnement du Licor LI-6400



Pour déterminer ces cinétiques, des mesures des échanges gazeux ont été réalisées à intervalle de temps régulier (tous les trois jours pour les essais en hydroponie et une fois par semaine pour les essais sur sol).

Afin de limiter l'impact des paramètres fluctuants d'une journée à l'autre (température, humidité et luminosité), ces paramètres ont été fixés. La température de la chambre de mesure était fixée à 20°C, la luminosité à 1450  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et l'humidité relative au niveau de la feuille variait entre 60 et 80%. Le choix de cet intervalle pour ce dernier paramètre a été basé sur les connaissances de personnes utilisant quotidiennement le Licor 6400. Ce niveau d'humidité permet notamment de garantir que la feuille ne soit pas en état de stress hydrique au moment de la mesure. Le PAR initial est de 1450  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , il correspond au rayonnement maximal pouvant être apporté par la lampe de l'appareil. Le choix a été fait de fixer les différents paramètres en conditions non limitantes pour permettre une expression optimale de la photosynthèse par les plantes, ainsi les différences pourront seulement être dues aux conditions testées lors des essais.

Une mesure par pilote était réalisée sur la troisième ou la quatrième feuille en fonction de la taille de celles-ci. Le traitement statistique des données a permis de déterminer les cinétiques pour chaque pilote et pour la modalité (moyenne des pilotes appartenant à cette modalité).

Parmi les autres paramètres fournis par le Licor, la concentration intercellulaire en dioxyde de carbone ( $C_i$ ) a également été étudiée. En effet, ce paramètre est particulièrement intéressant lorsqu'il est étudié avec la photosynthèse et la conductance stomatique puisqu'il permet de donner des conclusions plus précises, notamment sur le fonctionnement de la Rubulose 1-5,biphosphate carboxylase oxygenase (RUBISCO). Le rôle de cette enzyme est de fixer le carbone présent dans les feuilles pour initier la phase biochimique de la photosynthèse (Cycle de Calvin). En comparant l'évolution de la photosynthèse avec celle de la conductance stomatique et celle du  $C_i$ , on peut déterminer si la cause de la diminution de la photosynthèse est la diminution de l'absorption de dioxyde de carbone (diminution des trois paramètres) ou si cela est dû à une altération de la RUBISCO (diminution de la photosynthèse et maintien du  $C_i$  au cours du temps).

#### 2.3.1.3.3 Les courbes de réponses de la photosynthèse à la lumière

Il est également possible de tracer des courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière : elles sont établies en déterminant pour une même feuille, la photosynthèse pour différentes intensités lumineuses.

Ceci permet de déterminer les capacités minimales ( $P_n \text{ min}$ ) et maximales ( $P_n \text{ max}$ ) de photosynthèse de la feuille étudiée ainsi que de calculer la vitesse de réponse de la plante à la lumière grâce à la pente de la courbe.

Une seule courbe de réponse a été déterminée pour chaque modalité sur un seul pilote. Ceci étant dû au temps pour établir une courbe, en effet, l'ensemble des mesures doit être réalisée sur une seule journée, il faut faire au minimum dix points pour garantir la fiabilité du tracé et il faut attendre pour chaque point trente minutes pour que la feuille ait le temps de s'adapter aux conditions et que les valeurs de photosynthèse et de conductance stomatique puissent se stabiliser.

*Figure 20: Dispositif de mesure de la conductivité hydraulique des plantes (Xyl'EM)*



Dans le cadre de cette étude, les dix valeurs d'intensité lumineuse utilisées pour établir cette courbes sont : 1450, 1300, 1100, 1000, 800, 600, 400, 200, 100 et 0  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

## 2.3.2 En fin d'essai

### 2.3.2.1 Mesure de la biomasse produite

A la fin des essais, sur l'ensemble des plantes disponibles, les différents organes (racines, tige et feuilles) étaient séparés et pesés après séchage au four pendant un minimum de 72 h à 85°C. Ceci a permis de déterminer le poids sec (MS) des différents tissus.

### 2.3.2.2 Mesure de la surface foliaire

A la fin de chaque essai, pour l'ensemble des plantes disponibles, la surface des feuilles a été mesurée grâce à un planimètre. Les mesures ont été regroupées par plante et la surface foliaire par feuille a été déterminée grâce au rapport suivant :

$$\text{SFF} = \text{SFT}/\text{F}$$

avec SFF : Surface foliaire par feuille en  $\text{cm}^2/\text{feuille}$

SFT : Surface foliaire totale de la plante en  $\text{cm}^2$

F : Nombre de feuilles de la plante à la fin de l'essai

Ce paramètre SFF donne une indication sur la surface moyenne par feuille par plante, ce qui permet des comparaisons entre les différentes modalités. Il fournit une indication supplémentaire par rapport aux deux autres paramètres que sont la surface foliaire totale et le nombre total de feuilles de la plante.

### 2.3.2.3 Conductivité hydraulique et degré d'embolie des vaisseaux du xylème

Des mesures de conductivité ont été réalisées sur des segments de tige des plantes à la fin des essais. Pour se faire, un débitmètre à faible pression a été utilisé. Il s'agit de l'appareil appelé Xyl'EM (Xylem Embolism Meter, Figure 20).

La conductivité hydraulique par gradient de pression ( $k_h$ ,  $\text{kg.s}^{-1}.\text{m.MPa}^{-1}$ ) correspond au rapport du flux d'eau (F exprimé en  $\text{kg.s}^{-1}$ ) à travers un segment de tige de longueur connue (L exprimé en m) et le gradient de pression (P exprimée en MPa) qui est responsable de ce flux.

$$k_h = \text{F}/(\text{P}/\text{L})$$

Pour mesurer ce paramètre, de l'eau est envoyée sous une certaine pression définie par l'expérimentateur dans le segment de tige. L'appareil mesure le débit d'eau. La longueur du segment est ensuite mesurée et la conductivité hydraulique peut être ainsi déterminée.

Le Xyl'EM permet également de mesurer l'embolie vasculaire. Les vaisseaux sont en état d'embolie quand une partie ou la totalité de ceux-ci contiennent des bulles de gaz dans la sève qui est transportée (Cruziat *et al.*, 2003).



Pour déterminer le taux d'embolie, deux mesures de conductivité hydraulique sont requises. Ces mesures sont réalisées en trois étapes :

- 1- injecter à faible pression une solution diluée de 10 mmol de KCl et de 1 mmol de CaCl<sub>2</sub> dans un segment de tige pour mesurer la conductivité hydraulique initiale ( $k_{hi}$ )
- 2- injecter la même solution dans le segment de tige à forte pression pour rétablir la conductivité des conduits embolisés
- 3- injecter à faible pression la même solution pour déterminer la conductivité maximale ( $k_{hmax}$ ) du segment de tige

Le taux d'embolie (TE) est le rapport de la différence ( $k_{hmax}-k_{hi}$ ) à la conductivité maximale ( $k_{hmax}$ ). Il est exprimé en pourcentage.

$$TE = ((k_{hmax} - k_{hi}) / k_{hmax}) * 100$$

#### 2.3.2.4 Teneur en éléments minéraux des différents tissus

Les teneurs en éléments minéraux dans les différents tissus ont été déterminées par spectrométrie d'émission par torche à plasma (ICP AES (Inductive Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)). Cette technique utilise une mesure quantitative de l'émission optique provenant d'atomes stimulés pour déterminer la concentration de l'élément à analyser. Cette technique permet de doser 70 éléments. La précision du dosage est de l'ordre du ppb (part par trillion) (Austruy, 2012).

Les analyses par ICP AES (Jobin-Yvon ULTIMA C spectrometer) ont été réalisées dans le laboratoire GENERIC du centre SPIN de l'Ecole des Mines de St Etienne. Les échantillons qui ont été envoyés pour être analysés sont des minéralisats des différents organes des plantes issues de nos essais, le protocole de minéralisation est présenté en Annexe 6. Les minéralisats ont été obtenus par minéralisation par voie humide des organes des plantes (racines, tiges et feuilles) après la récolte. Trois individus par modalité ont été échantillonnés. Chaque échantillon est répliqué 3 fois et un blanc est réalisé pour chaque série de minéralisation.

Les analyses n'ont pas pu être réalisées avant la rédaction du mémoire, les résultats ne seront donc pas présentés dans ce document.

## **2.4 Traitement statistique générale des données**

Les données issues des mesures des différents paramètres sont organisées et traitées grâce aux logiciels Excel de la suite Microsoft<sup>®</sup> qui permet la mise en forme de tableur et de graphique et R<sup>®</sup> qui est un logiciel de traitement statistique.

Le traitement avec Excel a consisté à organiser et mettre en forme les données pour les regrouper par modalité afin de faciliter le traitement statistique. De plus, la moyenne et l'erreur standard par modalité pour les différents paramètres ont été calculées. Le choix a été fait d'utiliser l'erreur standard. Cet indicateur de la dispersion des données correspond au rapport entre l'écart type et la racine carré du nombre d'individus. Il s'agit donc d'un indicateur qui permet des comparaisons pour des essais avec des nombres d'individus par modalité différents. Il est donc adapté aux essais réalisés dans le cadre de ce stage.

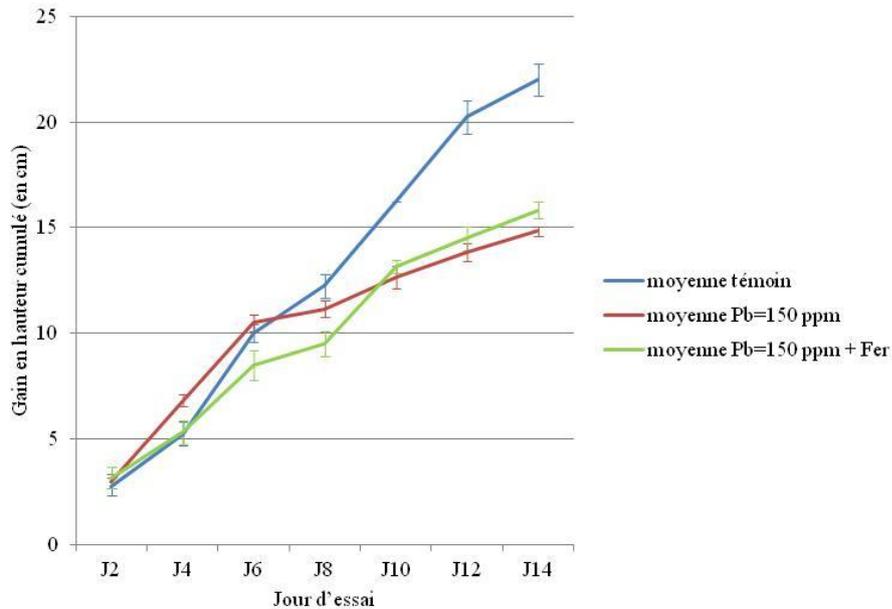


Lorsque cela était possible (3 dates de relevés minimum) pour les paramètres suivis en cours d'essai notamment, un traitement supplémentaire a permis la représentation de l'évolution du paramètre au cours du temps.

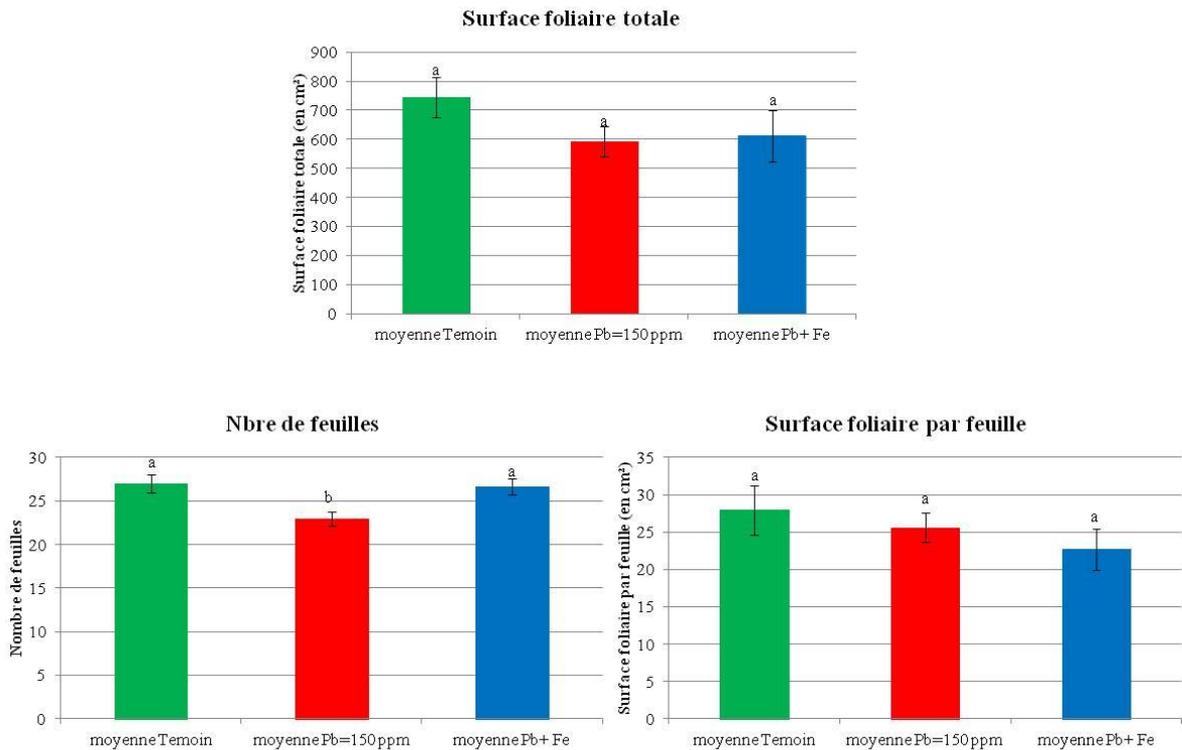
Le traitement statistique a surtout consisté en l'utilisation d'analyse de variance (ANOVA) à un facteur. Le but étant de déterminer si le facteur "modalité" a eu un impact sur le développement des plantes. Si un effet significatif était détecté et que l'ANOVA était valable (résidus indépendants, suivant une loi normale et ayant des variances homogènes par rapport au facteur étudié), un test de Newman Keuls était réalisé par la suite pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes de l'analyse de variance. Ces différences sont ensuite reportées sur les graphiques issus du traitement des données sur Excel.

Pour les mesures d'échanges gazeux, une analyse de variance à deux facteurs était réalisée. Les deux facteurs pris en compte étant "modalité" et "plante", en effet pour ces données, cinq répétitions par plante des mesures étaient faites, il est donc possible de prendre ce facteur en compte également.

Graphique 1: Gain en hauteur cumulé des plantes au cours de l'essai pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA



Graphique 2: Surface foliaire totale et par feuilles et nombre de feuilles moyen pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA



L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% selon le Test de Newman Keuls

### **3 Résultats**

Les résultats et les discussions associés aux différents essais sont présentés dans cette partie, dans un premier temps, les résultats de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA puis ceux des essais sur sol avec les deux génotypes. L'ordre de présentation des résultats des différents paramètres est le suivant : dans un premier temps les résultats associées à la biomasse produite et au suivi de la croissance, puis ceux associés au prélèvement en eau, puis aux échanges gazeux et enfin ceux associés aux mesures de conductivité hydraulique.

#### **3.1 Résultats de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA**

##### **3.1.1.1 Hauteur des plantes**

L'évolution de la hauteur des plantes a été suivie durant cet essai. Pour cela, une mesure de la taille de chaque plante était réalisée tous les deux jours. Ceci a permis de calculer le gain de croissance entre deux dates de relevés. Le Graphique 1 présente le gain de hauteur cumulé entre le début et la fin de l'essai. Les données ont été regroupées par modalité. Ce graphique met en évidence qu'à partir du huitième jour d'essai (J8), le gain en hauteur des plantes de la modalité témoin est supérieur à celui des plantes des deux autres modalités. A partir du J10, le gain des plantes traitées avec du fer est intermédiaire entre les deux, on peut donc supposer que le fer limite l'effet néfaste du plomb sur ce paramètre. L'analyse de variance a mis en évidence qu'il y a une différence significative de gain de 5% pour le J12 entre la modalité témoin et les deux autres. Aucune autre différence n'a été mise en évidence. On peut donc conclure que l'apport de 150 ppm de plomb a tendance à limiter la croissance en hauteur des plantes mais que cet effet n'est pas significatif et que l'apport de fer en plus du plomb, semble limiter l'effet néfaste du plomb.

##### **3.1.1.2 Surface foliaire et nombre de feuilles**

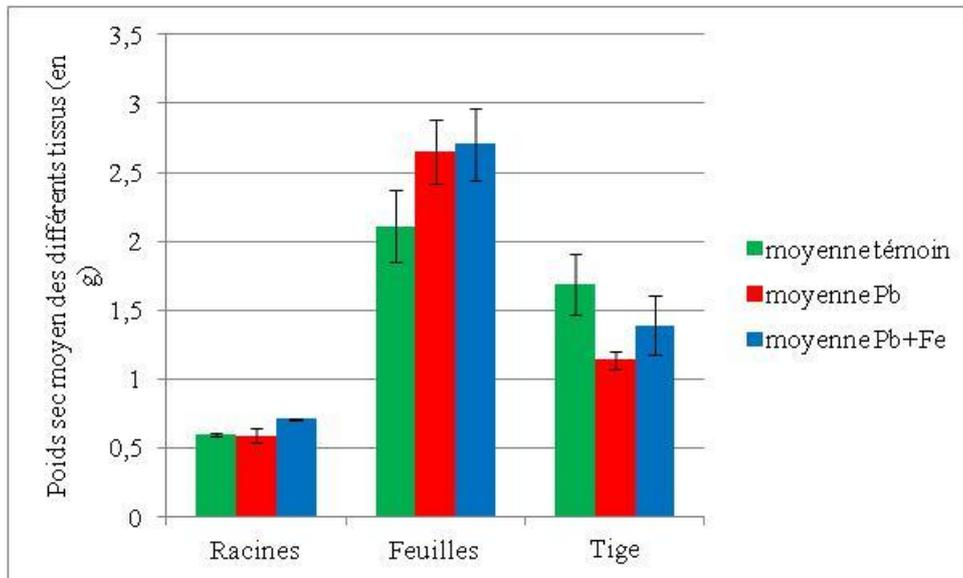
A la fin de l'essai, la surface foliaire totale des plantes disponibles a été déterminée grâce à un planimètre. Le nombre de feuilles a également été déterminé. Le rapport entre les deux correspond à la surface foliaire par feuille et donne une information sur la taille moyenne des feuilles des plantes. Le Graphique 2 présente les résultats moyens associés à ces paramètres et semble montrer que ces paramètres sont peu influencés par la présence de plomb à 150 ppm. L'analyse statistique a mis en évidence qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre la modalité avec le plomb et les deux autres concernant le nombre de feuilles. On peut donc conclure que l'apport de 150 ppm de plomb semble limiter l'émission de nouvelles feuilles et que l'apport de fer en plus limite cet effet néfaste.

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative concernant les surfaces foliaires, on peut donc conclure que le plomb n'a pas d'effet sur la surface des feuilles.

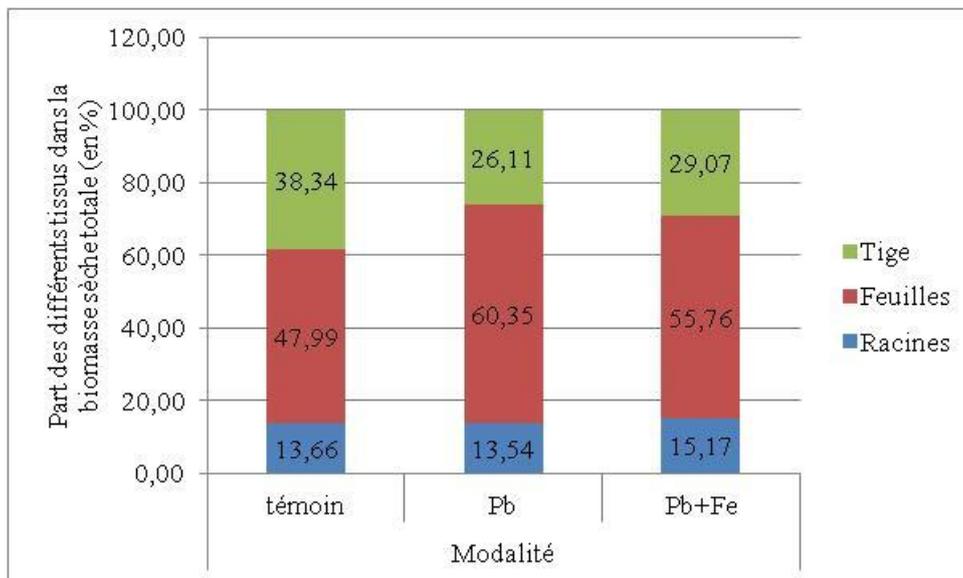
##### **3.1.1.3 Biomasse des différents tissus**

A la fin des essais, sur l'ensemble des plantes disponibles, les différents organes (racines, tige et feuilles) ont été séparés et séchés dans un four pendant un minimum de 72 h à 85°C. Les organes secs ont été pesés, la valeur relevée correspond au poids sec.

Graphique 3: Poids sec moyen des différents organes pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA



Graphique 4: Répartition de la biomasse sèche totale entre les différents organes



Le Graphique 3 présente la biomasse sèche des différents organes. Ce graphique montre qu'il n'y a pas de différence en terme de biomasse produite au niveau des racines mais que la biomasse produite au niveau des feuilles est plus importante pour les traitements avec plomb. Par contre, la biomasse des tiges est réduite pour le traitement avec le plomb. L'analyse de variance réalisée sur ces données n'a mis en évidence aucune différence significative entre les modalités pour les différents organes.

Le Graphique 4 présente la répartition de la biomasse sèche totale pour les différentes modalités. Le traitement n'a pas d'effets importants sur cette répartition. Les mêmes observations concernant les tiges et les feuilles peuvent être faites sur ce graphique que celles réalisées sur le graphique précédent. En effet, pour les traitements avec le plomb, les feuilles représentent la biomasse produite en majorité et le traitement avec le plomb seul semble limiter la production de tissus au niveau de la tige.

### **3.1.2 Prélèvement journalier de l'eau**

Le prélèvement journalier de l'eau a été suivi au cours de l'essai sur les plantes. Pour se faire, le poids avant et après apport d'eau a été déterminé, ce qui a permis de déterminer chaque jour le poids d'eau prélevé par la plante et évapo-transpiré. A partir de ces données, une cinétique qui représente l'évolution de ce paramètre au cours de l'essai a été déterminée. Le Graphique 5 qui représente cette cinétique met en évidence qu'il existe une différence en terme de prélèvement en eau à partir de J7 entre la modalité témoin et les deux autres. L'analyse de variance a démontré que cette différence observée est significative au seuil de 5%. Par contre, aucune différence significative entre le traitement "fer et plomb" et "plomb " n'a été démontré. On peut donc conclure que l'apport de plomb limite significativement le prélèvement en eau des plants de peuplier du génotype PTA et que le fer n'a pas d'effet bénéfique sur ce paramètre.

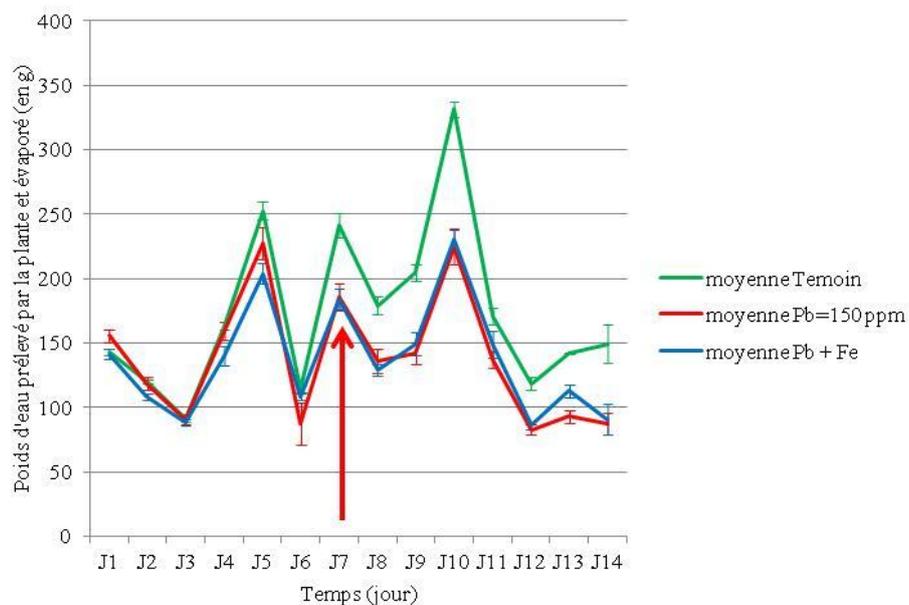
### **3.1.3 Courbes de saturation de la photosynthèse à la lumière**

Pour cet essai, des courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière ont été réalisées sur la feuille d'une plante pour chacune des modalités. Les courbes sont présentées sur le Graphique 6. Comme on peut le voir, ces courbes de réponse ont la même forme. La valeur de photosynthèse maximale (le plateau) diffère en fonction de chaque modalité, ceci traduit des capacités de photosynthèse maximales différentes. Le plateau le plus élevé correspond à la modalité témoin, l'intermédiaire à la modalité avec le fer et le plomb et le plus bas à la modalité avec le plomb seul (Tableau 18). On peut donc conclure de ces observations que le plomb limite significativement les capacités de photosynthèse des plantes et que l'ajout de fer limite cet effet néfaste. Par contre, comme on peut le voir dans le Tableau 18, les pentes des courbes pour les différentes modalités sont équivalentes, on peut donc conclure que les vitesses de réponse de la photosynthèse à la lumière le sont elles aussi. Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée sur ces données puisqu'une seule plante par modalité a été utilisée pour faire ces courbes.

### **3.1.4 Résultats associés au suivi des échanges gazeux au cours de l'essai**

Des mesures d'échange gazeux en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O ont été réalisées en cours d'essai à J3, J6 et J13 grâce à un analyseur (Licor 6400). Ces mesures ont permis de déterminer la photosynthèse, la conductance stomatique, le dioxyde de carbone intercellulaire et la transpiration des feuilles des plantes pilotes.

Graphique 5: Cinétique du prélèvement et de l'évapo-transpiration en eau au cours de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA pour les différentes modalités



Graphique 6: Courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière pour les différentes modalités de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA

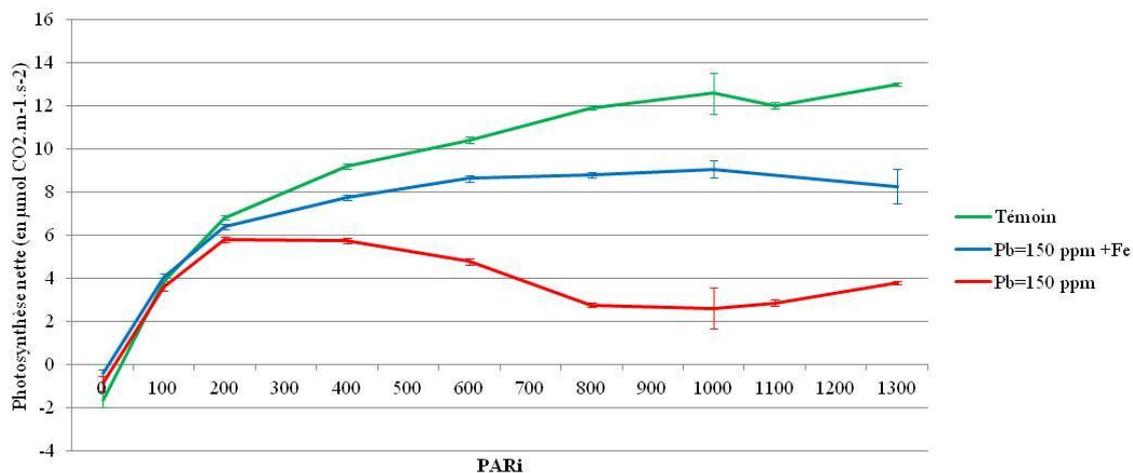


Tableau 18: Valeurs clés pour l'interprétation des courbes de réponse à la lumière réalisées dans le cadre de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA

|                                                                        | Témoin   | Pb+Fe    | Pb      |
|------------------------------------------------------------------------|----------|----------|---------|
| Pente                                                                  | 0,055054 | 0,044486 | 0,04471 |
| Photo max (en µmol CO <sub>2</sub> .m <sup>-1</sup> .s <sup>-2</sup> ) | 13,01    | 9,068    | 5,79    |

L'évolution au cours du temps de ces paramètres est présentée sur le Graphique 7, la conductance stomatique et la transpiration diminue au cours du temps pour les différentes modalités. Il est plus dur de conclure quand à l'évolution de la photosynthèse. Concernant le CO<sub>2</sub> intercellulaire, il reste stable au cours du temps. On peut donc supposer que les variations de la photosynthèse au cours du temps sont dues à une altération du fonctionnement de la RUBISCO.

Les analyses de variance réalisées ont mises en évidence qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre les différentes modalités pour ces différents paramètres. On peut donc conclure que l'apport de plomb limite significativement les capacités de photosynthèse, de conductance stomatique et de transpiration des plantes. De plus, on remarque que les échanges gazeux pour les plantes recevant un apport de fer en supplément du plomb sont intermédiaires entre ceux des plantes témoins et de celles recevant du plomb. On peut donc conclure que le fer limite l'effet néfaste du plomb sur les échanges gazeux des plantes.

### **3.1.5 Résultats associés aux mesures de conductivité hydraulique**

A la fin des essais, des mesures de conductivité hydraulique et la détermination des taux d'embolie ont été réalisées sur des segments de tige des plants du génotype PTA utilisés lors de l'essai en hydroponie. Les résultats moyens sont présentés sur le Graphique 8.

Ce graphique montre que les taux d'embolie moyens sont très faibles quelque soit la modalité.

L'analyse statistique (analyse de variance et test de Newman Keuls) a montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre les modalités.

Ces résultats montrent donc que l'apport de plomb et de fer n'a pas d'effet significatif sur la conductivité hydraulique des vaisseaux du xylème et sur l'embolie.

Le Tableau 19 présente une synthèse concernant les résultats associés aux analyses statistiques pour les différents paramètres.

## **3.2 Synthèse des résultats et discussion de l'essai en hydroponie avec le génotype PTA**

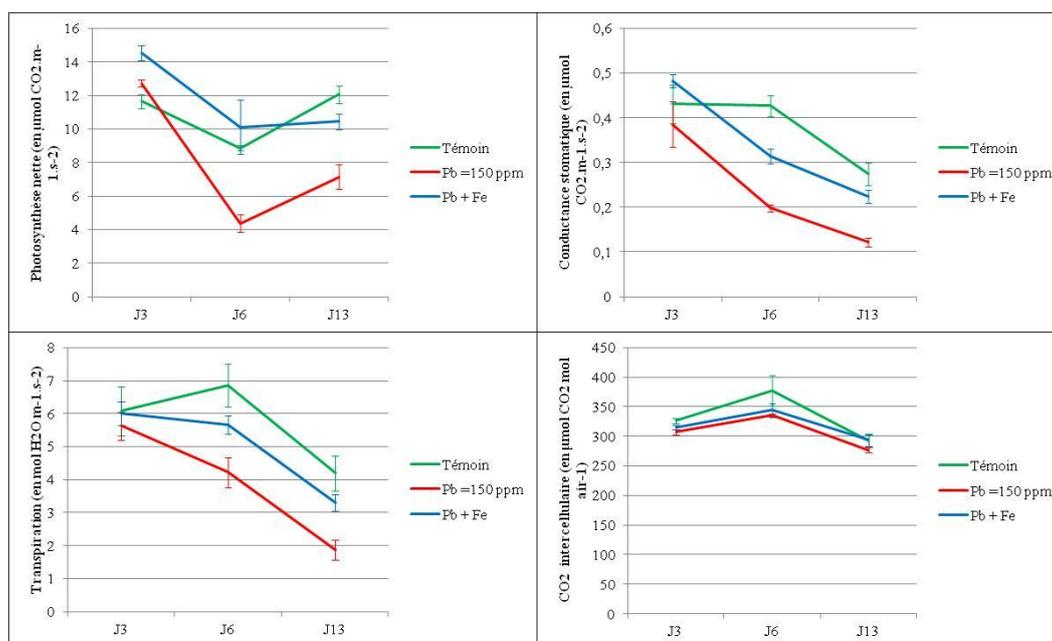
Cet essai a été réalisé dans le but de répondre à deux objectifs :

1. caractériser le comportement du génotype PTA face à une pollution par le plomb
2. déterminer si l'apport de fer en excès en plus du plomb limite les effets néfastes de celui-ci.

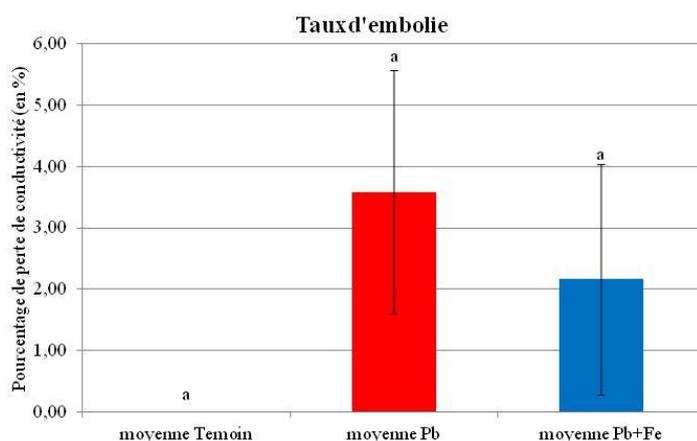
### **3.2.1 Caractérisation du comportement du génotype PTA face à une pollution par le plomb**

Les principales conclusions de l'essai par rapport à la caractérisation du génotype, sont que le nitrate de plomb a eu des effets négatifs sur l'ensemble des paramètres mesurés hormis pour la croissance des plantes et la conductance hydraulique.

Graphique 7: Evolution moyenne des échanges gazeux pour les différentes modalités de l'essai hydroponie avec le génotype PTA



Graphique 8: Taux d'embolie moyen pour les différentes modalités de l'essai hydroponie avec le génotype PTA



L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% selon le Test de Newman Keuls

Il est important de remarquer que ces différentes conséquences n'ont entraîné la mort d'aucune plante.

Les principaux effets négatifs du plomb sur la plante qui ont été observés sont : des capacités de prélèvement en eau réduite et des capacités de photosynthèse, de conductance stomatique et de transpiration réduites également. Concernant la croissance des plantes, le plomb a limité le nombre de feuilles final et la croissance en hauteur des plantes mais d'une manière non significative.

La réduction des capacités de prélèvement en eau peut être due à un changement de forme des aquaporines, protéines transmembranaires qui facilitent l'entrée de l'eau dans les racines. En effet, des études (Rucińska-Sobkowiak *et al.*, 2012) ont mis en évidence que les changements de forme de ces protéines induisent une réduction de la perméabilité membranaire des poils absorbants et donc de l'entrée d'eau. En effet, des études réalisées sur des cellules épidermiques d'oignon ont mis en évidence que certains métaux lourds dont le plomb pouvaient modifier la forme des aquaporines. Cette réduction peut aussi être due à des perturbations du transport de l'eau au sein des racines en présence de plomb. En effet, une étude réalisée sur des racines de lupin a mis en évidence que des dépôts de callose étaient observés dans les parois des cellules racinaires, ce qui limitait le passage de l'eau d'une cellule à une autre (Rucińska-Sobkowiak *et al.*, 2012).

Une autre cause possible de cette diminution de prélèvement est la diminution de la transpiration au niveau des feuilles, en effet c'est "l'appel d'eau" via la transpiration foliaire qui détermine la quantité d'eau prélevée par les racines. Cette hypothèse est validée au vu des résultats des mesures d'échange gazeux réalisées. En effet, la transpiration des plantes cultivées est inhibée en présence d'un excès de plomb. Cette réduction peut être due à une réduction de la taille des cellules de garde ou à une perturbation de la balance hormonale et notamment pour l'acide abscissique qui est la phytohormone qui régule la fermeture stomatique (Sharma&Dubey, 2005).

La réduction des capacités de photosynthèse peut être due à différentes causes. Une première explication peut être que le plomb limite la synthèse des chlorophylles, des plastoquinones et des caroténoïdes et perturbe le fonctionnement des transporteurs d'électrons (Sharma&Dubey, 2005, Pourrut *et al.*, 2011). L'ensemble des effets du plomb sur l'appareil photosynthétique est présentée sur la Figure 21. On peut également supposer au vu des résultats de l'essai que le plomb limite la conductance stomatique, ce qui limite la quantité de CO<sub>2</sub> absorbée par les feuilles et donc les étapes biochimiques du processus de photosynthèse. Les résultats associés aux mesures de la concentration intercellulaire de CO<sub>2</sub> ont mis en évidence que celle-ci restait stable au cours de l'essai. On peut donc supposer que les principales causes de la diminution de la photosynthèse sont : la diminution de l'absorption de CO<sub>2</sub> et à une inhibition de l'activité carboxylase de la RUBISCO.

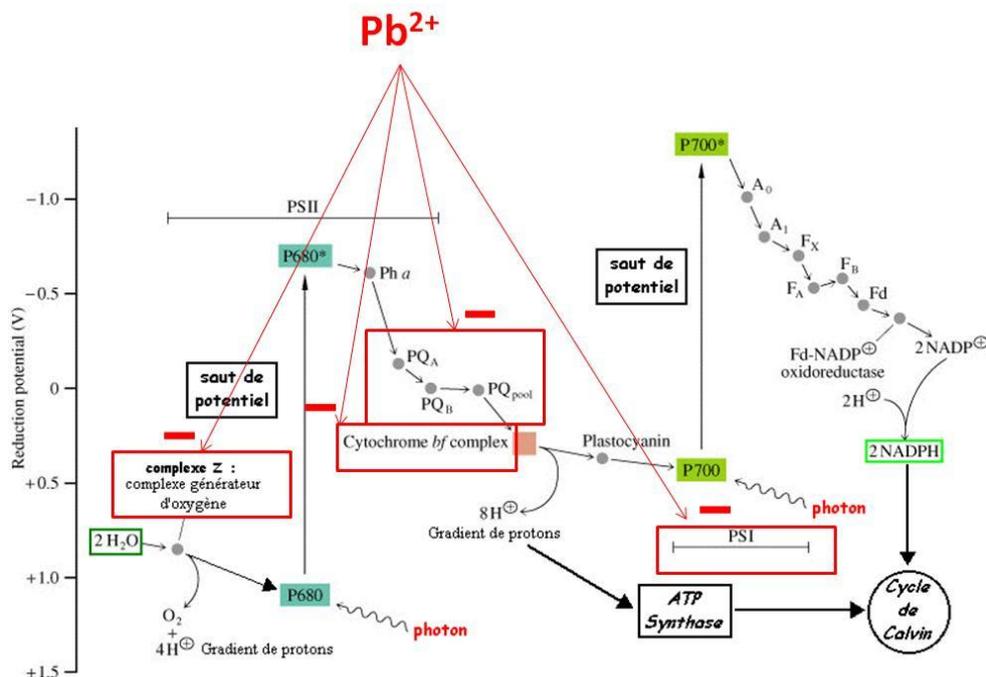
Le suivi de la croissance au cours de l'essai a mis en évidence que celle-ci n'a pas été impactée par la pollution au plomb. Différentes raisons peuvent expliquer ces résultats tels que la durée limitée des essais et les concentrations utilisées. En effet, des études réalisées sur le même génotype avec des concentrations de deux à quatre fois supérieures ont mis en évidence une réduction de la biomasse produite (Bojarczuk, 2004).

Concernant la conductivité hydraulique, aucun effet significatif n'a été mis en évidence.

Tableau 19: Synthèse des résultats concernant les analyses statistiques pour les différents paramètres

| Paramètres                   | Nombre d'individus par modalité                              | Synthèse statistique                                                                                 |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Croissance                   | Modalité Témoin : 4<br>Modalité Pb : 6<br>Modalité Pb+Fe : 6 | Seule différence significative au seuil de 5% pour J12                                               |
| Prélèvement en eau           |                                                              | Aucune différence significative                                                                      |
| Echanges gazeux              |                                                              | Différence significative au seuil de 1% pour les différentes modalités et pour les différentes dates |
| Surface foliaire totale      | Modalité Témoin : 4<br>Modalité Pb : 5<br>Modalité Pb+Fe : 5 | Aucune différence significative                                                                      |
| Surface foliaire par feuille |                                                              | Aucune différence significative                                                                      |
| Nombre de feuilles           |                                                              | Différence significative au seuil de 5% entre les modalités « témoin » / « Pb+Fe » et « Pb »         |
| Biomasse                     |                                                              | Aucune différence significative                                                                      |
| Conductivité hydraulique     |                                                              | Aucune différence significative                                                                      |

Figure 21: Effet du plomb sur les différentes composantes de la photosynthèse



Différentes raisons peuvent expliquer ce phénomène: comme la concentration en plomb est faible, la totalité du plomb est stockée au niveau des racines puisque c'est un élément trace métallique peu soluble (Sharma&Dubey, 2005), il n'est donc pas en contact avec les vaisseaux du xylème. Il est également possible qu'il ait circulé via les vaisseaux du xylème mais que l'hypothèse testée soit fautive et qu'il ne modifie pas les structures au niveau des ponctuations des vaisseaux du xylème.

### **3.2.2 Effet de l'excès de fer sur les effets néfastes du plomb**

Les résultats de cette étude montrent que l'excès de fer a permis de limiter les effets néfastes du plomb sur les échanges gazeux puisque les résultats pour cette modalité sont intermédiaires entre la condition témoin et celle avec le plomb. Ceci peut être expliqué par le fait que même si le plomb limite l'absorption du fer (Sharma&Dubey, 2005, Pourrut *et al.*, 2011), l'excès de fer à disposition permet à la plante d'avoir assez de fer pour limiter les effets négatifs. Des analyses sont en cours pour étudier les teneurs en éléments minéraux (Pb, Ca, K et Fe) dans les différents organes des plantes cultivées pour les différentes modalités pour vérifier cette hypothèse.

On peut supposer que l'excès de fer n'a été bénéfique que pour la photosynthèse, car c'est au niveau de l'appareil photosynthétique que les interactions entre le plomb et le fer sont les plus importantes. En effet, le fer est essentiel pour la synthèse des chlorophylles, des plastoquinones et des caroténoïdes et le rôle inhibiteur du plomb sur ces métabolismes essentiels pour le bon fonctionnement des processus photochimiques et métaboliques de la photosynthèse a été clairement établi. Une compétition entre ces 2 éléments pour les sites actifs de certaines enzymes tels que la chlorophyllase ou la chlorophylle synthétase sont donc à caractériser.

Le principal intérêt de cet essai est qu'il a permis de mettre en évidence qu'un excès de fer limite les effets néfastes du plomb. Des résultats similaires ont été mis en évidence concernant l'effet bénéfique du fer sur la photosynthèse pour des plantes cultivées dans un milieu riche en cadmium (Siedlecka&Krupa, 1999, Sárvári *et al.*, 2011).

### **3.2.3 Perspectives de l'essai**

Le principal intérêt des essais en hydroponie est qu'ils permettent un développement important de la plante ce qui permet de réaliser des essais intégrés à l'échelle de la plante entière par opposition aux essais *in vitro*. De plus, comme il a été précisé dans la partie sur la culture des peupliers, la culture en hydroponie permet de choisir la solution nutritive apportée ainsi que la forme et la concentration de l'élément polluant. Elle permet également de fixer un certain nombre de paramètres qui interviennent dans l'assimilation des métaux par les plantes comme par exemple le pH. Et enfin, elle permet par rapport aux essais sur sol pollué, de négliger l'ensemble des interactions entre la plante et le "milieu sol" (la microflore et la microfaune présents dans ce dernier par exemple). Cette simplification est particulièrement utile puisqu'à ce jour peu de données existent quand aux interactions entre les microorganismes du sol, les polluants et les plantes.

Cependant, il paraît difficile de mettre en place des processus de phytoremédiation à l'échelle du champ sans réaliser des essais *in situ*.

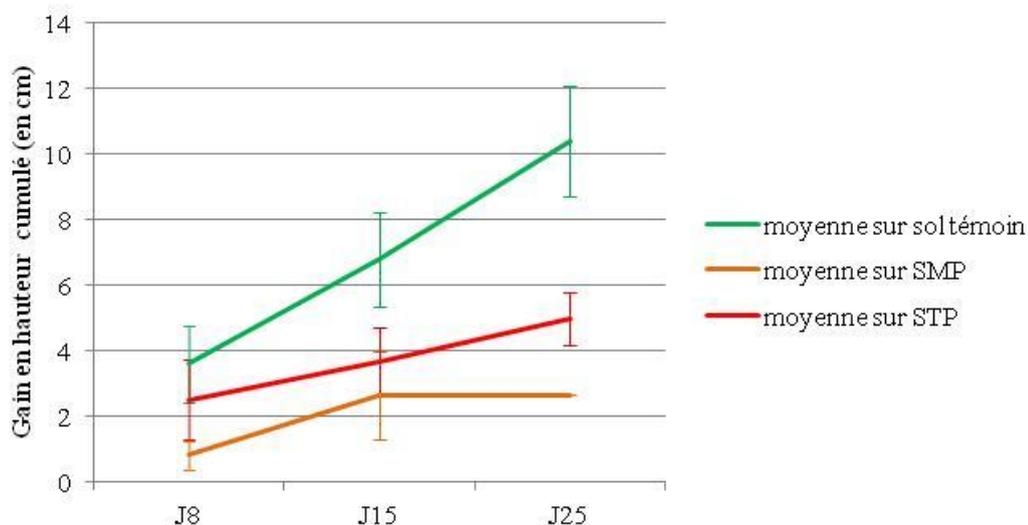


De plus, parmi les différentes techniques en hydroponie, celle utilisée dans le cadre de cette étude n'est pas la plus adaptée, c'est celle sur film NFT qui fournit les résultats les plus probants mais cette technique est plus compliquée à mettre en place techniquement (Pulford&Watson, 2003).

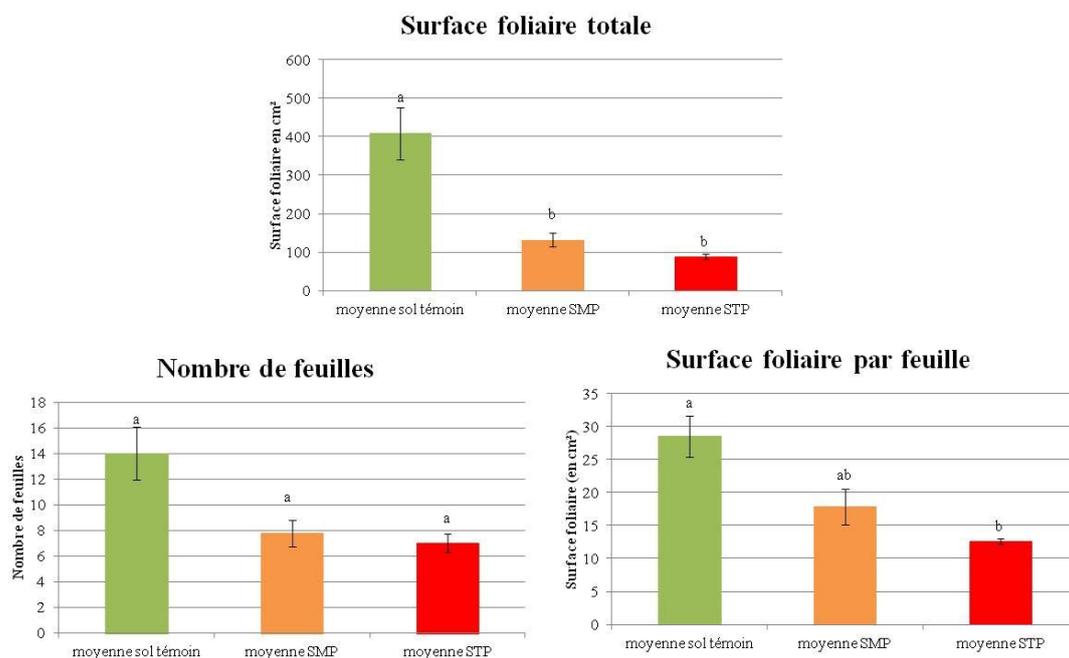
Au vu des conclusions et de la discussion, il paraît intéressant de réaliser de nouveau cet essai en testant plusieurs concentrations de plomb (supérieures à celles utilisées pour déterminer le seuil de toxicité pour ce génotype) et de fer sur les 2 génotypes de cette étude. En effet, le fer est un élément essentiel aux plantes mais devient toxique à très haute dose.

Il serait également intéressant de réaliser des essais en hydroponie avec différents éléments traces métalliques et des combinaisons de ces éléments pour développer les connaissances sur les effets des multicontaminations sur le développement des plantes.

Graphique 9: Evolution du gain en hauteur moyen en fonction des modalités au cours de l'essai sol avec le génotype Skado



Graphique 10: Surface foliaire moyenne et totale des feuille et nombre de feuilles moyen pour les différentes modalités de l'essai sol avec le génotype Skado



L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% selon le Test de Newman Keuls

### **3.3 Résultats des essais sur sol**

#### **3.3.1 Résultats associés au génotype Skado**

Les résultats de l'essai sur sol avec le génotype Skado et leurs interprétations vont être présentés dans cette partie.

##### **3.3.1.1 Croissance des plantes**

###### **3.3.1.1.1 Hauteur des plantes**

La croissance en hauteur des plantes a été suivie durant cet essai. Pour cela, une mesure de la taille de chaque plante était réalisée une fois par semaine. Ceci a permis de calculer le gain de croissance entre deux dates de relevés. Le Graphique 9 permet de mettre en évidence que le gain cumulé en hauteur pour les modalités sur sol pollué est inférieur à celui pour les plantes cultivés sur le sol non pollué. L'analyse statistique n'a mis en évidence aucune différence significative entre les modalités pour les différents jours de relevés.

Il est donc possible de conclure que la multicontamination aux ETM a tendance à limiter la croissance des plantes mais cet effet n'est pas significatif.

###### **3.3.1.1.2 Surface foliaire et nombre de feuilles**

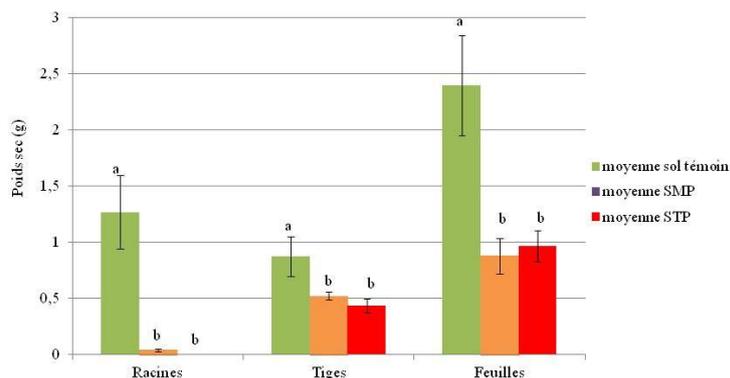
A la fin de l'essai, la surface foliaire totale des plantes disponibles a été déterminée grâce à un planimètre. Le nombre de feuilles a également été déterminé. Le rapport entre les deux donne une information sur la taille moyenne des feuilles des plantes. Le Graphique 10 présente les résultats moyens associés à ces paramètres. L'analyse statistique a permis de mettre en évidence qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre la modalité témoin et les deux modalités polluées pour la surface foliaire totale et pour celle par feuille. Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant le nombre de feuilles. La multi-contamination aux ETM limite donc significativement la surface des feuilles. Aucune différence n'a été détectée entre les deux modalités polluées, il semble donc que le développement foliaires des plantes soit limité significativement à partir du plus faible niveau de pollution.

###### **3.3.1.1.3 Biomasse des organes**

A la fin des essais, sur l'ensemble des plantes disponibles, les différents organes (racines, tige et feuilles) ont été séparés et pesés. Après séchage pendant un minimum de 72 h à 85°C, la masse sèche a été déterminée (MS) pour les différents organes.

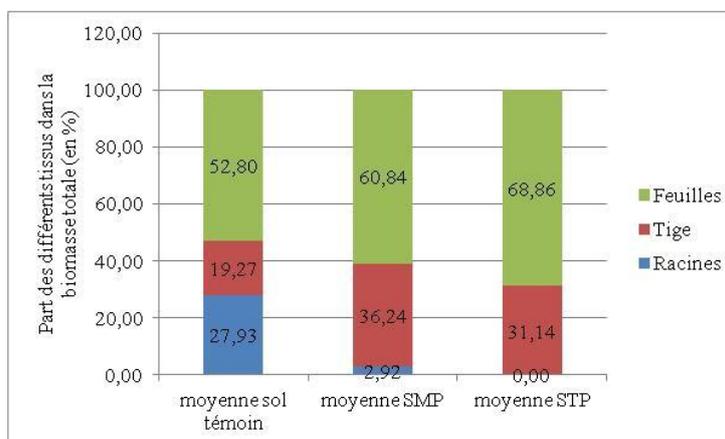
Le Graphique 11 présente les résultats associés aux poids secs des différents tissus. L'analyse de variance a mis en évidence que pour l'ensemble des organes, il existe une différence significative entre la modalité sur sol témoin et celles sur sol pollué. Aucune différence n'a été détectée entre les deux modalités sur sol pollué. La multicontamination aux ETM limite le développement des différents organes de manière homogène. De plus, le niveau de pollution apporté dans la modalité SMP suffit à avoir un effet significatif sur le développement des plantes.

Graphique 11: Poids sec moyen des différents organes pour les différentes modalités de l'essai sur sol avec le génotype Skado

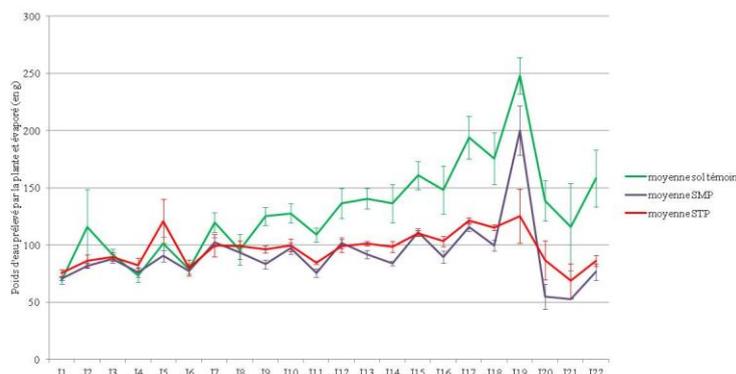


L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% selon le Test de Newman Keuls

Graphique 12: Répartition de la biomasse totale entre les différents organes pour les différentes modalités



Graphique 13: Evolution moyenne du poids d'eau prélevé par les plantes et évaporé au cours de l'essai sol avec le génotype Skado



Le Graphique 12 présente pour les différentes modalités la répartition de la biomasse sèche entre les différents organes (racines, tiges et feuilles). Ce graphique montre que cette répartition est différente puisque les racines représentent 27% de la biomasse totale pour la modalité témoin alors qu'elles représentent moins de 5% pour les deux modalités sur sol pollué. De ce fait, les tiges et les feuilles représentent des parts plus importantes pour ces deux modalités. On remarque également que les feuilles représentent la majorité de la biomasse récoltée.

### 3.3.1.2 Prélèvement journalier en eau

Le prélèvement journalier en eau a été suivi au cours de l'essai sur les plantes pilotes. Pour se faire, le poids avant et après apport d'eau a été déterminé, ce qui a permis de déterminer chaque jour le poids d'eau prélevé par la plante et évaporé. A partir de ces données, une cinétique qui représente l'évolution de ce paramètre au cours de l'essai a été déterminée. Le Graphique 13 met en évidence que pour la modalité témoin, le poids d'eau augmente au cours du temps tandis que pour les modalités sur sol pollué, ce prélèvement reste stable. Ceci est probablement corrélé à l'augmentation des surfaces des feuilles des plantes et donc à l'augmentation de la quantité d'eau perdue par transpiration pour la modalité témoin. Une analyse de variance a été réalisée sur les données relevées chaque jour pour déterminer si une différence significative était observée entre les modalités. Les résultats de cette étude statistique sont qu'à partir du J10, il existe une différence significative au seuil de 5% de prélèvement entre la modalité témoin et les deux modalités sur sol pollué. On peut donc conclure que la multicontamination aux ETM limite significativement après 9 jours d'essai le prélèvement en eau des plants de peuplier du génotype Skado.

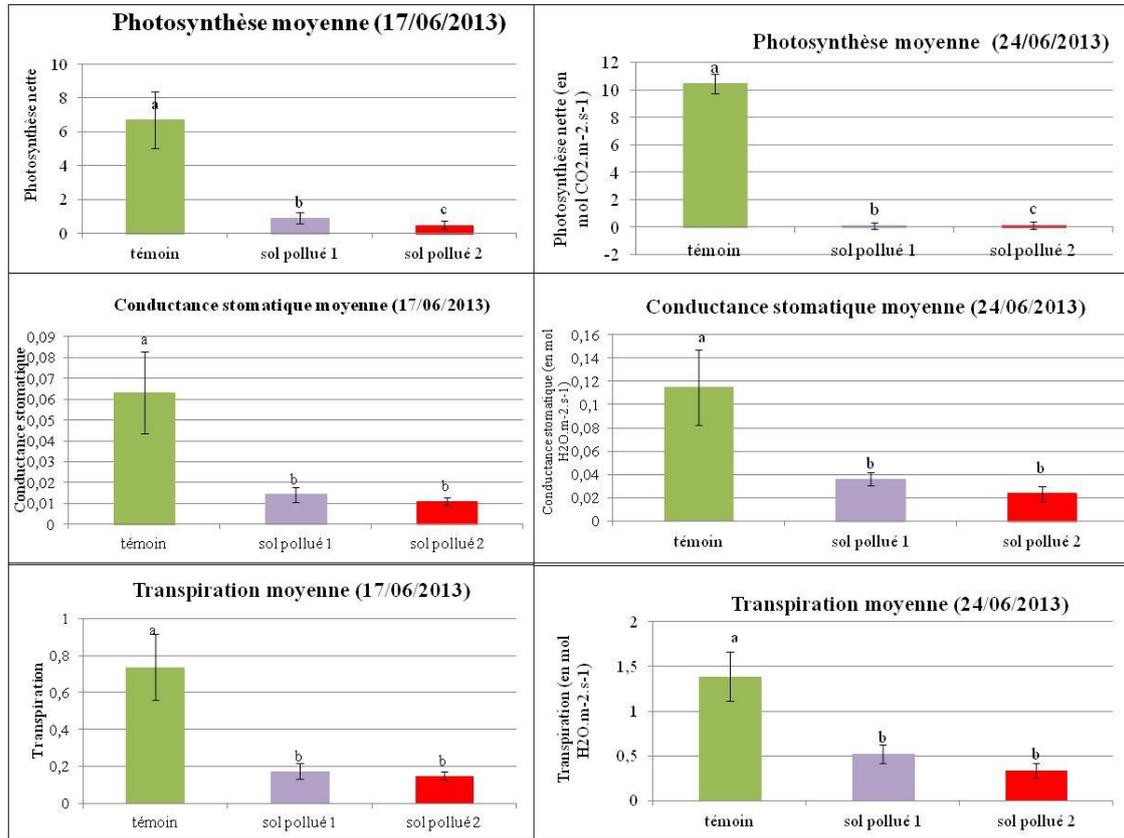
### 3.3.1.3 Mesures des échanges gazeux

Des mesures des échanges gazeux en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O ont été réalisées en cours d'essai grâce à un analyseur (Licor 6400). Ces mesures ont permis de déterminer la photosynthèse nette, la conductance stomatique et la transpiration de feuilles des plantes pilotes. Deux mesures ont été réalisées durant l'essai sur sol avec le génotype Skado (une par semaine). Les mesures moyennes pour ces deux dates sont présentées sur le Graphique 14.

Le traitement sur sol pollué limite la photosynthèse nette, la conductance stomatique et la transpiration. L'analyse statistique a mis en évidence les mêmes conclusions. Elle a également mis en évidence que pour la photosynthèse, il existe une différence significative au seuil de 5% entre les deux modalités sur sol pollué : les plantes cultivées sur le sol très pollué (STP) ont une photosynthèse nette réduite par rapport à celles cultivées sur le sol moyennement pollué (SMP).

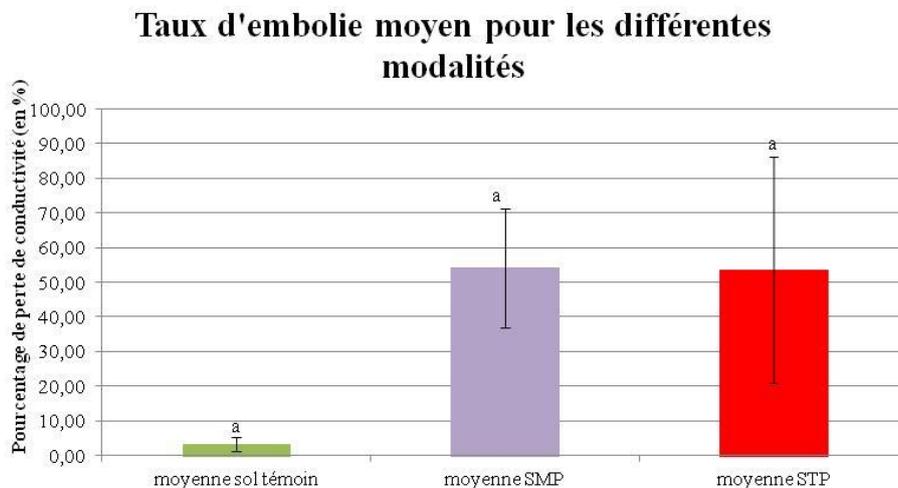
En conclusion, la multicontamination aux ETM limite significativement les capacités de photosynthèse, de conductance stomatique et de transpiration des plantes. De plus, plus la contamination est importante, plus les capacités de photosynthèse des plantes sont inhibées.

Graphique 14: Photosynthèse nette, conductance stomatique et transpiration moyenne pour les différentes modalités aux dates de relevé (J7 et J14) pour l'essai sol avec le génotype Skado



L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% d'après le Test de Newman Keuls .

Graphique 15: Taux d'embolie moyen pour les différentes modalités de l'essai sol sur le génotype Skado

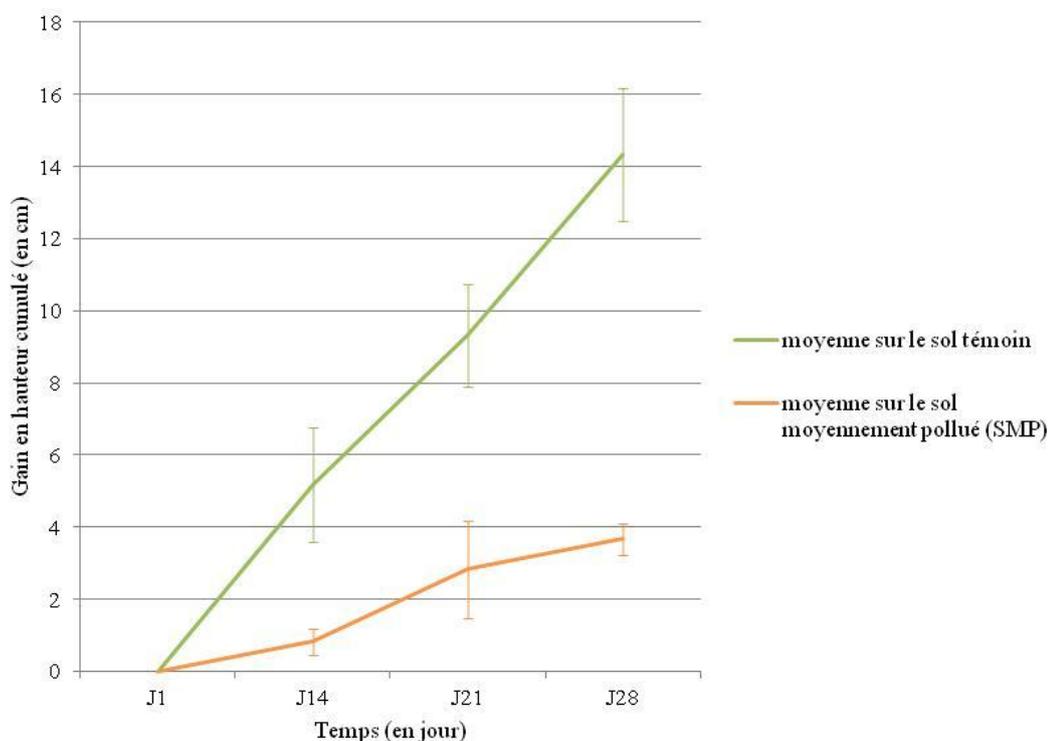


L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% selon le Test de Newman Keuls.

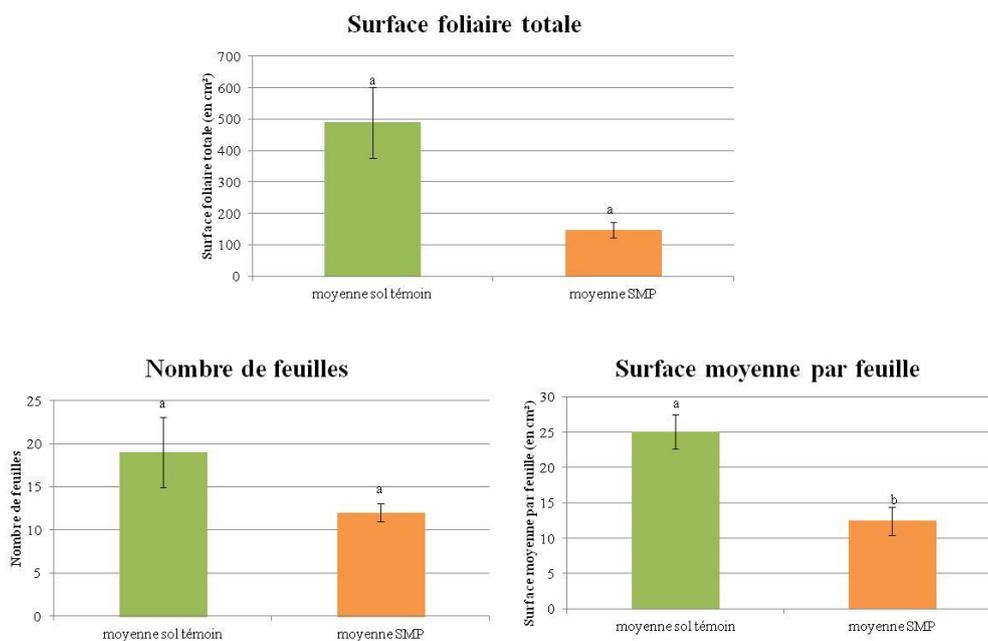
#### *3.3.1.4 Conductivité hydraulique*

A la fin des essais, des mesures de conductivité hydraulique ont été réalisées sur les segments de tige des plantes disponibles. Ces mesures ont permis de calculer le taux d'embolie de ces segments. Le Graphique 15 présente ces résultats et semble montrer que le traitement sur sol pollué induit une augmentation du taux d'embolie. Cet effet n'est pas appuyé statistiquement.

Graphique 16: Gain en hauteur cumulé moyen des plantes au cours de l'essai sur sol avec le génotype PTA pour les différentes modalités



Graphique 17: Surface foliaire totale et par feuille et nombre de feuilles final pour les différentes modalités pour l'essai sol avec le génotype PTA



L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% avec le Test de Newman Keuls

### **3.3.2 Résultats de l'essai sur sol avec le génotype PTA**

#### *3.3.2.1 Croissance des plantes*

##### 3.3.2.1.1 Hauteur des plantes

La croissance en hauteur des plantes a été suivie durant cet essai. Pour cela, une mesure de la taille de chaque plante était réalisée une fois par semaine. Ceci a permis de calculer le gain de croissance entre deux dates de relevés. Le Graphique 16 présente le gain en hauteur cumulé au cours de l'essai, il permet de mettre en évidence que le gain pour les plantes cultivées sur le SMP est réduit par rapport à celui pour les plantes cultivées sur le sol témoin. L'analyse statistique a montré que la seule différence significative entre les deux modalités est observée à J14 au seuil de 1%. Après cette date, les différences ne sont plus significatives. On peut donc conclure que la multicontamination aux ETM a tendance à limiter la croissance des plantes mais cet effet n'est pas significatif.

##### 3.3.2.1.2 Surface foliaire et nombre de feuilles

A la fin de l'essai, la surface foliaire totale des plantes disponibles a été déterminée grâce à un planimètre. Le nombre de feuilles a également été calculé. Le rapport entre les deux correspond à la surface foliaire par feuille et donne une information sur la taille moyenne des feuilles des plantes. Le Graphique 17 présente les résultats moyens associés à ces paramètres. L'analyse statistique a permis de mettre en évidence qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre les deux modalités pour la surface foliaire par feuille. La présence d'ETM à forte dose limite donc significativement la taille des feuilles.

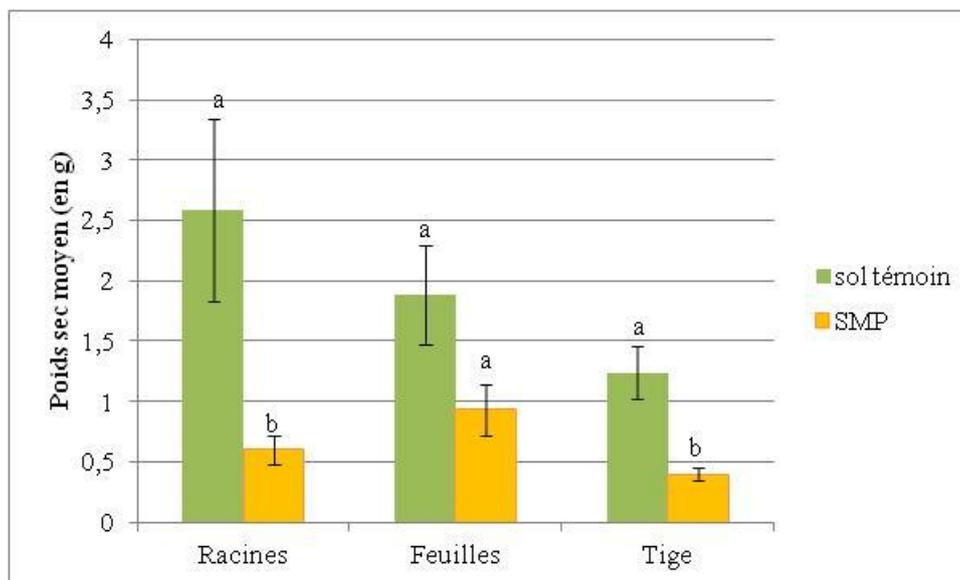
Le sol multicontaminé limite aussi la surface foliaire totale mais la différence entre les modalités n'est pas significative. Les mêmes observations ont été faites concernant le nombre de feuilles par plante à la fin des essais.

##### 3.3.2.1.3 Biomasse des différent organes

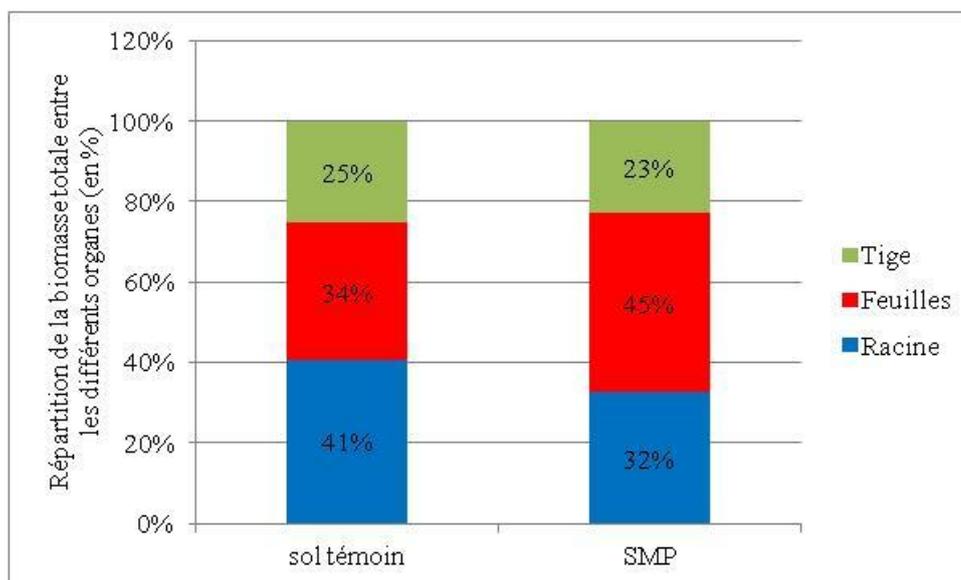
A la fin des essais, les différents organes ont été séchés pendant un minimum de 72h à 85°C. Puis ils ont été pesés. Le Graphique 18 présente les poids secs moyens des différents organes pour les deux modalités. Ce graphique met en évidence que la présence d'ETM à haute dose limite le développement racinaire et caulinaire significativement. Pour les racines, l'analyse statistique a mis en évidence une différence significative au seuil de 5%, pour les tiges, le seuil est de 1%. Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour la biomasse foliaire.

Le Graphique 19 qui présente la répartition de la biomasse totale entre les différents organes montre que pour les plantes cultivées sur sol pollué, l'organe majoritaire est les feuilles et la biomasse caulinaire et racinaire est réduite. On peut donc conclure que la multicontamination entraîne des modifications dans la répartition de la biomasse totale entre les différents organes.

Graphique 18: Poids sec moyen des différents organes des plantes selon les modalités de l'essai sol avec le géotype PTA



Graphique 19: Répartition de la biomasse totale entre les différents organes pour les modalités testées dans le cadre de l'essai sol avec le géotype PTA



### 3.3.2.2 Capacité de prélèvement journalier en eau

Le prélèvement journalier en eau a été suivi au cours de l'essai sur les plantes pilotes. Pour se faire, le poids avant et après apport d'eau a été déterminé, ce qui a permis de déterminer chaque jour le poids d'eau prélevé par la plante et évaporé. A partir de ces données, une cinétique qui représente l'évolution de ce paramètre au cours de l'essai a été déterminée (Graphique 20). Une analyse de variance a été réalisée chaque jour pour déterminer si une différence significative était observée entre les modalités. Les résultats de cette étude statistique sont qu'à partir du huitième jour, il existe une différence significative au seuil de 5% pour le paramètre "prélèvement de l'eau" entre les deux modalités. De plus, à partir de J17, la différence est significative au seuil de 1%. On peut donc conclure que la multicontamination aux ETM limite significativement les capacités de prélèvement en eau des plants de peuplier du génotype PTA.

### 3.3.2.3 Suivi des échanges gazeux au cours de l'essai

Des mesures d'échange gazeux en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O ont été réalisées en cours d'essai grâce à un analyseur (Licor 6400). Ces mesures ont permis de déterminer la photosynthèse nette, la conductance stomatique et la transpiration de feuilles des plantes pilotes. Quatre mesures ont été réalisées durant cet essai (une par semaine). L'évolution au cours du temps de ces paramètres est présentée sur le Graphique 21.

Comme le montre le Graphique 21, la photosynthèse nette est stable au cours du temps pour les deux modalités. Par contre, la conductance stomatique et la transpiration augmentent au cours du temps pour les deux modalités.

Les analyses de variance réalisées ont mis en évidence qu'il existe une différence significative entre les deux modalités pour ces différents paramètres. On peut donc conclure que la multicontamination aux ETM limite significativement les capacités de photosynthèse, de conductance stomatique et de transpiration des plantes.

### 3.3.2.4 Conductivité hydraulique et taux d'embolie

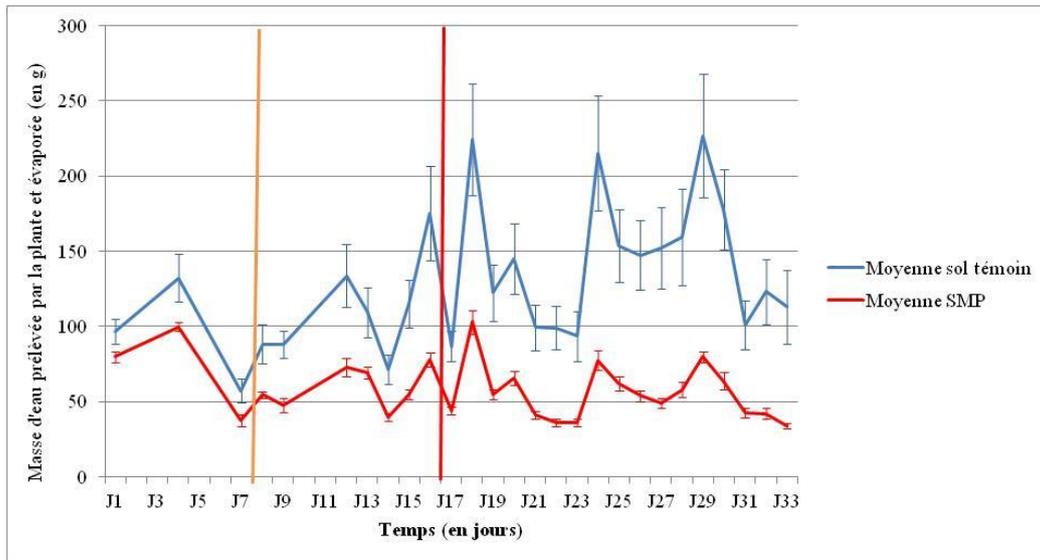
A la fin des essais, des mesures de conductivité hydraulique et la détermination des taux d'embolie ont été réalisées sur des segments de tige des plants du génotype PTA utilisés lors de l'essai sol. Les résultats moyens sont présentés sur le Graphique 22.

Ces graphiques mettent en évidence que pour l'ensemble des paramètres étudiés (taux d'embolie, conductance initiale et maximale), il existe une différence entre la modalité témoin et celle sur sol pollué.

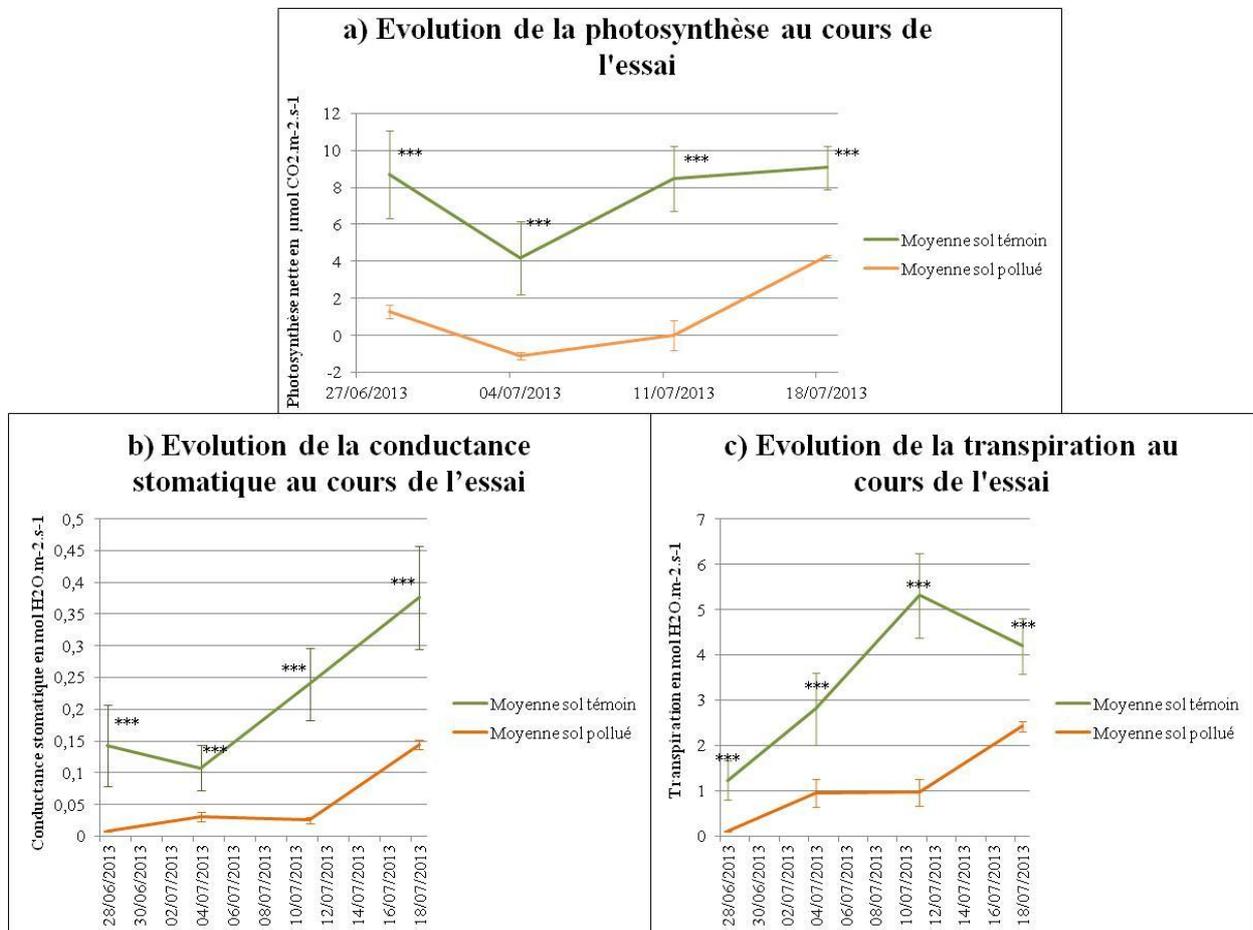
L'analyse statistique (analyse de variance et test de Newman Keuls) a montré que pour le taux d'embolie, la différence est significative au seuil de 5%. La différence est faiblement significative pour la conductivité initiale (p-value de l'ANOVA = 0,0496 ). Par contre, pour la conductivité maximale, la différence n'est pas significative (p-value = 0,0569 ).

Ces résultats semblent montrer que le développement sur sol pollué favorise l'embolie des vaisseaux et donc diminue la conductivité initiale, par contre la conductance maximale, elle n'est pas impactée.

Graphique 20: Cinétique du prélèvement et de l'évaporation en eau au cours de l'essai sur sol avec le génotype PTA pour les différentes modalités



Graphique 21: Evolution au cours de l'essai sol avec le génotype PTA de la photosynthèse nette (a), de la conductance stomatique (b) et de la transpiration (c)



### 3.3.3 Synthèse des résultats et discussion

Les essais sur sol avec les deux génotypes (PTA et Skado) ont permis de caractériser le comportement de ces génotypes face à une multicontamination aux éléments traces métalliques.

Les principales conclusions de ces essais sont que les polluants ont eu des effets néfastes sur l'ensemble des paramètres étudiés sauf sur la croissance en hauteur des plantes.

Il est important de remarquer que pour les mesures de conductivité hydraulique, les taux d'embolie observés ne peuvent pas expliquer la mort des plantes, en effet, il faut un taux d'embolie de 90% pour causer la mort de plants de peuplier (Barigah *et al.*, 2013).

Parmi les points particulièrement intéressants de l'essai avec le génotype PTA, une grande variabilité des comportements des plantes a été observée au sein d'une même modalité ce qui se traduit par une grande variabilité dans les réponses caractérisées en fonction des individus.

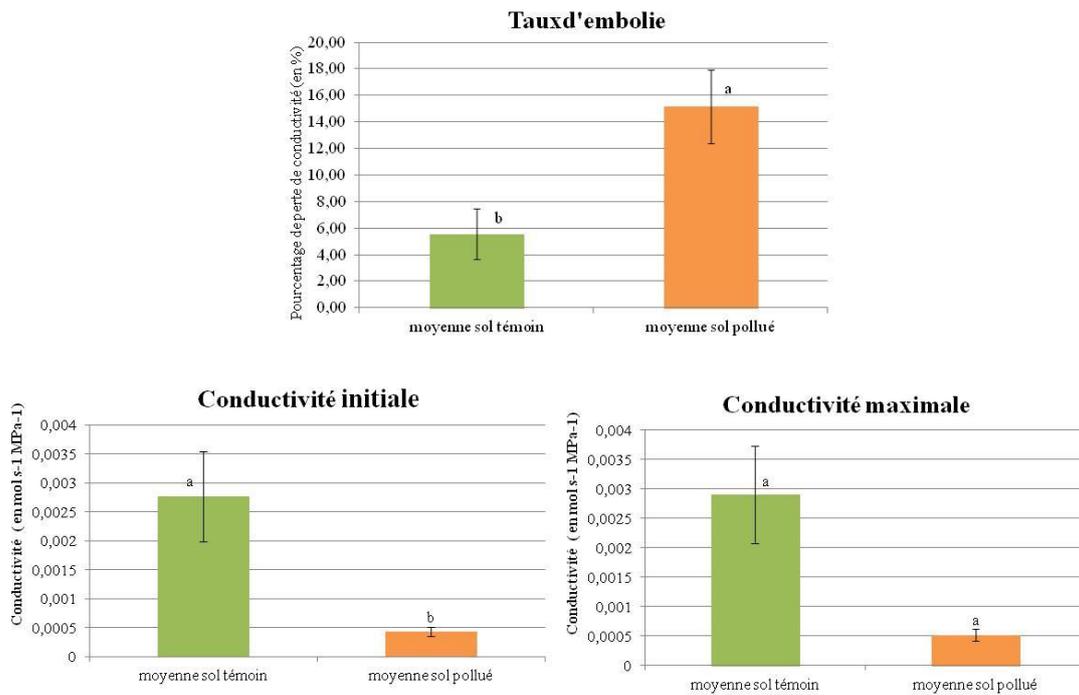
Cet effet intra modalité a également été mis en évidence lors de l'observation des plantes au cours de l'essai et notamment pour les plantes cultivées sur le sol pollué. En effet, différents comportements ont été observés.

Une partie des plantes est morte dans un intervalle de temps très court après le début des essais, par contre d'autres individus ont mis en place des stratégies de tolérance.

La première stratégie observée a été le développement de nouvelles pousses par le développement des bourgeons axillaires à l'aisselle des feuilles qui s'étaient développées au cours de la culture (Figure 22). Ceci traduit un arrêt de la dominance du bourgeon apical qui est à relier probablement avec l'arrêt de son activité. Il est également intéressant de remarquer que cette stratégie a également été adoptée par une plante cultivée sur le sol témoin qui a eu une inhibition de son développement au cours de l'essai. On peut donc conclure de cette observation que cette stratégie n'est pas spécifiquement mise en place pour lutter contre la contamination aux métaux lourds. On peut également supposer que cette stratégie a été mise en place dans le but de remplacer les feuilles mortes pour maintenir un niveau de photosynthèse suffisant. Cette stratégie a échoué sur les sols pollués, puisqu'une semaine plus tard les nouvelles pousses se sont également nécrosées.

La seconde stratégie a consisté à sauvegarder le plus de feuilles possibles (Figure 23). Ce sont les plantes qui ont adopté cette stratégie qui ont survécu durant tout l'essai et qui ont pu être utilisées pour les mesures finales. Des mesures de teneurs en éléments traces métalliques sont en cours de réalisation au laboratoire GENERIC de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne mais les résultats ne sont pas disponibles pour l'instant. Ces résultats permettront de déterminer qu'elle a été la stratégie adoptée par ces plantes pour survivre. En effet, différentes stratégies sont développées par les plantes face aux ETM (Salt *et al.*, 1998). En effet, des études ont mis en évidence que les plantes peuvent mettre en place différents mécanismes pour tolérer les ETM telles que la séquestration de ces éléments au niveau des racines ou dans les espaces intermembranaires. Ces deux stratégies permettent par exemple

Graphique 22: Taux d'embolie moyen, conductivités moyennes initiale et maximale pour les différentes modalités de l'essai sol avec le génotype PTA



L'utilisation de lettres différentes traduit une différence significative au seuil de 5% selon le Test de Newman Keuls

Figure 22: Photographie de la plante 1 cultivée sur le sol pollué de l'essai sol avec le génotype PTA et agrandissement du bas de la tige de la même plante



d'éviter que le polluant s'accumule dans les cellules et qu'il perturbe le fonctionnement des organites.

Concernant Skado, il est intéressant de remarquer qu'il existe une grande différence de comportement pour ce génotype en fonction du sol pollué sur lequel il est cultivé. En effet, lors des essais réalisés dans le cadre du projet PHYTOPOP (Migeon, 2009), ce génotype s'était développé correctement alors que pour l'essai réalisé dans le cadre de notre étude, la durée de l'essai a dû être raccourci puisque l'ensemble des plantes sur les sols pollués se nécrosaient. Le sol utilisé dans le cadre du projet PHYTOPOP contenait également des ETM (Pb et Cd), la différence principale avec le sol d'Auzon est la teneur importante de ce dernier en arsenic. On peut donc poser l'hypothèse que ce génotype est sensible à l'arsenic. Il serait donc intéressant de réaliser des essais supplémentaires pour valider cette hypothèse.

Au vu de ces différentes conclusions, il paraît intéressant de réaliser de nouveaux essais avec ces deux génotypes sur un nombre d'individus plus important pour faciliter la caractérisation de ces différents comportements (Pulford&Watson, 2003, Chalot *et al.*, 2012).

De plus dans le cadre de programme de recherche en phytoremédiation, des études (Chalot *et al.*, 2012) ont mis en évidence qu'il est intéressant de réaliser les études préliminaires *in situ* sur une parcelle de taille réduite puisque les résultats issus des essais en pots en conditions contrôlées ne sont pas représentatifs des comportements observés sur le terrain. Il serait donc intéressant de réaliser ce type d'étude sur ces génotypes pour déterminer si les comportements observés dans les conditions de cette étude sont également observables sur le terrain.

*Figure 23: Plante 17 de l'essai sol avec le génotype PTA cultivée sur sol pollué et ayant adoptée la stratégie 2*



## Conclusion

Dans le cadre de recherche pour développer de nouvelles solutions de dépollution des sols plus durables telles que les phytotechnologies, différentes études sont menées pour trouver des plantes aptes à se développer sur des sols pollués et à extraire les éléments traces métalliques de ces sols. Parmi les espèces végétales testées de nos jours, on trouve de plus en plus d'arbres et notamment ceux de la famille des Salicacées. Parmi ces arbres, on trouve les peupliers, leur principal intérêt est qu'ils produisent de la biomasse dans un délai court et que cette biomasse produite peut être valorisée notamment par les filières du bois-énergie.

Le but de ce stage de fin d'étude était de caractériser le comportement de deux génotypes de peupliers (Skado et PTA) face à un sol pollué aux éléments traces métalliques et notamment au plomb. Pour cela, deux types d'essais ont été réalisés : un essai sur un sol multicontaminé aux éléments traces métalliques (ETM) et un en hydroponie où seul du nitrate de plomb a été apporté. Un second objectif a été ajouté à l'essai hydroponie : celui de tester l'impact d'un excès de fer sur une pollution par le plomb. Afin de caractériser le comportement de ces génotypes différents paramètres ont été déterminés : la production de biomasse (avec le suivi de la croissance des plantes et la détermination de la masse sèche à la fin des essais), le transport de l'eau dans la plante (avec le suivi du prélèvement en eau et la mesure de la conductivité hydraulique à la fin des essais), les capacités de photosynthèse grâce à des mesures d'échanges gazeux au cours de l'essai et les teneurs en métaux dans la plante en fin d'essai.

Les principaux résultats de l'essai sol sont que la multicontamination aux ETM a un impact négatif sur l'ensemble des paramètres étudiés pour les deux génotypes. Le génotype PTA semble être plus apte à se développer sur ce sol car il a survécu plus longtemps (quatre semaines contre trois pour le génotype PTA) et des stratégies d'adaptation ont été observées sur les plantes. Concernant l'essai en hydroponie, le plomb a eu un impact négatif sur les échanges gazeux (photosynthèse, conductance stomatique et transpiration) et sur le prélèvement en eau. Aucun effet significatif n'a été mis en évidence sur la croissance et sur la conductivité hydraulique des plantes. L'excès de fer a permis de limiter cet impact négatif puisque les résultats pour cette modalité sont intermédiaires à ceux des deux autres modalités.

Il semble intéressant de développer dans les années à venir, des essais *in situ*, en effet ce sont ces essais qui fournissent les résultats les plus fiables. Ces essais semblent d'autant plus pertinent qu'au vu de la prise en compte du changement climatique à venir, les conditions climatiques vont avoir une influence significative sur le développement des plantes. Des études ont mis en évidence que le changement climatique pourrait avoir des conséquences favorables pour la dépollution des sols en favorisant l'activité microbienne grâce à l'augmentation des teneurs en dioxyde de carbone. Les conséquences négatives ont également été mises en avant tels que l'augmentation de la fréquence des sécheresses (une tous les cinq ans). En effet, la présence d'ETM dans les sols représentent un stress important pour la plante, l'ajout d'un stress hydrique supplémentaire pourrait donc fortement limité le développement des plantes sur ces milieux. Il parait donc particulièrement intéressant de développer ce type d'essai *in situ* et de développer également des essais en conditions contrôlées pour développer les connaissances fondamentales liées à ces thématiques.

## **Bibliographie**

- ADEME.** Traitabilité des sols pollués : guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation des performances - Document de référence. 2009. p.
- ADEME.** Sites et sols pollués : Techniques de traitement [en ligne]. s.d., [consulté le 12 mars 2013]. Disponible sur: <<http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=12745>>.
- AGENCE-DE-L'EAU-DE-SEINE-ET-NORMANDIE.PLOMB.**In: Guide pratique des substances toxiques dans les eaux douces et littorales du bassin Seine-Normandie. 2008. p. 48-52.
- ALI, H., et al.** Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*. 2013, **91** - 7, p. 869-881.
- AUGUY, F.** Identification de gènes impliqués dans la tolérance au plomb chez la brassicacée *Hirschfeldia incana*. Thèse de doctorat en Biologie Intégrative des Plante: Université Montpellier 2, 2012. p.
- AUSTRUY, A.** Aspects physiologiques et biochimiques de la tolérance à l'arsenic chez les plantes supérieures dans un contexte de phytostabilisation d'une friche industrielle. Thèse de doctorat: Université Blaise Pascal, 2012. 300 p.
- BARIGAH, T., et al.** Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of Botany, in press*. 2013, - p.
- BEAUCLAIR, P. and JACQUET, A.** Manuel simplifié d'utilisation de l'analyseur de photosynthèse Li-cor(R) Li-6400. *Cahier technique de l'INRA*. 2003, **49** - p. 43-59.
- BEN YOUSSEF, S.** Intoxications animales par les métaux et les métalloïdes. 2012, 191. Disponible sur: <<http://pharmatox.voila.net/cours/metauxlourds.pdf>>.
- BERT, V., et al.** Filières de valorisation de la biomasse végétale produite sur sols pollués: enjeux et perspectives.In: ADEME. Phytotechnologies appliquées aux sols pollués-Journée Technique Nationale - Paris 7°. 2012, p. 84-95.
- BERT, V., et al.** Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués : Etat de l'art et guide de mise en oeuvre. Paris: Edpsciences, 2012. 86 p.
- BOJARCZUK, K.** Effect of Toxic Metals on the Development of Poplar(*Populus tremula* L. x *P. alba* L.) Cultured in vitro. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2004, **13** - 2, p. 115-120.
- BOURDON.** Etude de la faisabilité technico-économique de la phytostabilisation aidée couplée à une valorisation de biomasse. INERIS, 2011. 69 p.
- BRADSHAW, H. D., et al.** Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2000, **19** - 3, p. 306-313.
- BRETIN, P., et al.** Saturnisme: quelles stratégies de dépistage chez l'enfant? : 2008. p.
- CHALOT, M., et al.** Stratégies d'implantation appliquées à la gestion des sites contaminés.In: ADEME. Phytotechnologies appliquées aux sols pollués-Journée Technique Nationale - Paris 7°. 2012, p. 62-72.
- CHALOT, M., et al.** Fate of trace elements during the combustion of phytoremediation wood. *Environmental Science and Technology*. 2012, **46** - 24, p. 13361-13369.
- COMMISSION-DES-COMMUNAUTES-EUROPÉENNES.** Communication de la commission au conseil, au parlement européen, au comité économique et social et au comité des régions : Vers une stratégie thématique pour la protection des sols Bruxelles: 2002. 39 p.
- CRPF-POITOU-CHARENTE.** Classification des peupliers [en ligne]. s.d., [consulté le 25 avril 2013]. Disponible sur: <<http://www.crfp-poitou-charentes.fr/Classification-des-peupliers.html>>.

- CRPF-RHÔNE-ALPES.** Le peuplier : un feuillu performant (*Populus sp.*) cultivé en Rhône-Alpes... 2000. 4 p.
- CRUIZIAT, P., et al.** L'embolie des arbres. *Pour la science*. 2003, **305** - p. 50-56.
- ECKENWALDER, J. E.** Chapter 1 Systematics and evolution of *Populus*. In: R. F. Stettler *et al.* Biology of *Populus* and its Implications for Management and Conservation. Ottawa: National Research Council of Canada Monograph Publishing Program, 1996. p. 7-34.
- ERNEST and YOUNG.** Taux d'utilisation et couts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France : synthèse des données 2010. Angers: ADEME, 2012. 114 p.
- GROUPEMENT-D'INTÉRÊT-SCIENTIFIQUE-SOL.** Etat des sols en France. 2011. 190 p.
- MARMIROLI, M., et al.** Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree physiology*. 2011, **31** - 12, p. 1319-1334.
- MATEOS-NARANJO, E., et al.** Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus* : Ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2013, **90** - p. 136-142.
- MIGEON, A.** Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux : bases physiologiques et exploitation en phytoremédiation. Thèse de doctorat en biologie forestière: Université Henri Poincaré, 2009. 358 p.
- MOREL, J. L.** Phytoremédiation des sols contaminés : des plantes pour guérir les sols. In: J. Amouroux *et al.* La chimie et la nature. Paris: Edpsciences, 2012. p. 154-184.
- POURRUT, B., et al.** Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, 2011. p. 113-136.
- PULFORD, I. and WATSON, C.** Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment international*. 2003, **29** - 4, p. 529-540.
- RAMADE, F.** 2.1. Perturbations du cycle du plomb. In: Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications. Paris: Editions-Tec&Doc, 2007. p. 309-318.
- ROBINET.** Calcul de la marge brute de la culture de miscanthus Valbiom absl, 2009. p.
- RUCIŃSKA-SOBKOWIAK, R., et al.** Water status and water diffusion transport in lupine roots exposed to lead. *Environmental and Experimental Botany*. 2012, - p.
- SALAZAR, M. J., et al.** Effects of heavy metal concentrations (Cd, Zn and Pb) in agricultural soils near different emission sources on quality, accumulation and food safety in soybean [*Glycine max*(L.) Merrill]. *Journal of hazardous materials*. 2012, - p.
- SALT, D. E., et al.** Phytoremediation. *Annual review of plant biology*. 1998, **49** - 1, p. 643-668.
- SÁRVÁRI, É., et al.** Impact of moderate Fe excess under Cd stress on the photosynthetic performance of poplar (< i> *Populus jacquemontiana* var. *glauca*</i> cv. *Kopeczkii*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011, **49** - 5, p. 499-505.
- SERVICE-DE-L'OBSERVATION-ET-DES-STATISTIQUES-COMMISSARIAT-GENERAL-AU-DEVELOPPEMENT-DURABLE.** La dépense de réhabilitation des sites et sols pollués en France. *Le point sur*. 2012, **142** - p. 4.
- SHARMA, P. and DUBEY, R. S.** Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005, **17** - 1, p. 35-52.
- SIEDLECKA, A. and KRUPA, Z.** Cd/Fe interaction in higher plants-its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*. 1999, **36** - 3, p. 321-331.
- STOBRAWA, K. and LORENC-PLUCIŃSKA, G.** Thresholds of heavy-metal toxicity in cuttings of European black poplar (< i> *Populus nigra*</i> L.) determined according to

antioxidant status of fine roots and morphometrical disorders. *Science of the total environment*. 2008, **390** - 1, p. 86-96.

## Annexe 1: Etat de l'art des essais de phytoextraction et phytostabilisation en plein champ

| Technique                                      | Polluant                                               | Amendement                                                      | Plantes                                                                           | Lieu                                                                     | Surface   | Projet                  |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------|
| phytostabilisation aidée                       | Cadmium<br>Nickel                                      | Cendres volantes                                                | Mais                                                                              | Louis Fragues (33)                                                       | Parcelles |                         |
| phytostabilisation aidée                       | Cuivre<br>Arsenic<br>Chrome                            | Compost<br>Dolomite                                             | Agrostis capillaris<br>A. gigantea<br>Peupliers<br>Saules<br>Miscanthus           | Biogeco (33)                                                             | Parcelles |                         |
| Phytostabilisation aidée                       | Arsenic                                                | Grenaille d'acier                                               | Mélange de poacées et d'herbacées dicotylédones                                   | La Combe du Sault (11)                                                   | 10 ha     | Difpolmine<br>Phytoperf |
| Phytostabilisation aidée                       | Cadmium<br>Zinc<br>Plomb<br>Cuivre<br>Arsenic          | Amendement minéral basique<br>Hydroxylapatite                   | Deschampsia cespitosa<br>Festuca rubra<br>végétation colonisatrice                | Lallaing (59)                                                            | Parcelles |                         |
| phytostabilisation aidée                       | Cadmium<br>Zinc<br>Plomb<br>Cuivre<br>Arsenic          | Amendement minéral basique                                      | Deschampsia cespitosa<br>Salix viminalis (var. Inger et Tordis)                   | Fresnes sur Escault (59)                                                 | 1 ha      | Phytosed                |
| phytostabilisation aidée                       | Arsenic<br>Mercure                                     | Amendement biologique                                           | Peupliers (var. I214 et Skado)<br>Aulne                                           | Tavaux (39)                                                              | 1 ha      | Biofiltree              |
| phytostabilisation aidée                       | Cadmium<br>Zinc<br>Plomb<br>Cuivre<br>Arsenic          | Amendement biologique                                           | Peupliers (var. I214 et Skado)<br>Aulne                                           | Pierrelaye (95)<br>Fresnes sur Escault (59)                              | 2 ha      | Biofiltree              |
| phytostabilisation aidée                       | Cadmium<br>Nickel                                      | Béringite<br>Grenaille d'acier                                  | Mais                                                                              | Couhins (33)                                                             | Parcelles |                         |
| phytostabilisation aidée                       | Cadmium<br>Chrome<br>Cuivre<br>Nickel<br>Plomb<br>Zinc | MIATE (déchets verts et boues de STEP)<br>Bois Raméal Fragmenté | Mélange de poacées et d'herbacées dicotylédones                                   | Châteaufort (42)                                                         | Parcelles | Physafinum              |
| phytostabilisation aidée<br>phytostabilisation | Cadmium<br>Plomb<br>Zinc                               | Cendres volantes                                                | Trèfle<br>Ray grass<br>Aulne<br>Acacia<br>Chêne<br>Erable<br>Saules<br>Miscanthus | Evin-Malmaison (62)<br>Courcelles lès Lens (62)<br>Noyelles-Godault (62) | 4ha       | Phytener                |
| Phytostabilisation et<br>phytoextraction       | Cadmium<br>Zinc                                        |                                                                 | Peupliers (14 cultivars)                                                          | Pierrelaye (95)                                                          | 5 ha      | Phytopop                |
| Phytoextraction                                | Cuivre                                                 |                                                                 | Tournesol                                                                         | Biogeco (33)                                                             | Parcelles |                         |
| Phytoextraction                                | Cadmium<br>Zinc                                        |                                                                 | Thlapsi caerulescens                                                              | La Bouzule (54)                                                          | Parcelles |                         |
| Phytoextraction                                | Plomb                                                  |                                                                 | Pelargonium                                                                       | Bazoches<br>Toulouse (31)                                                | Parcelle  |                         |
| Phytoextraction                                | Zinc<br>Cadmium<br>Titane                              |                                                                 | Thlapsi caerulescens<br>Anthyllis vulneraria<br>Iberis intermedia                 | Saint Laurent Le Minier (30)                                             | 2,5 ha    | Ingecotech              |

## Annexe 2 : Faisabilité technique et financière d'une réhabilitation de site pollué par phytoextraction ou phytostabilisation

Quelque soit la technique utilisée, les paramètres à prendre en compte pour faire une étude de faisabilité technique et financière sont :

- la nature de la pollution,
- l'espèce végétale à utiliser,
- les caractéristiques pédo-chimiques du sol qui permettent de définir les besoins en intrants organiques ou minérales.

Le coût de la mise en œuvre de ces techniques est fonction des paramètres suivants :

- les conditions initiales du site qui sont données par le diagnostic réalisé avant les travaux,
- la surface à traiter,
- la nécessité ou non d'utiliser des amendements et les quantités à apporter,
- l'entretien de la culture,
- les coûts liés à la récolte et à la valorisation ou non de la biomasse produite,
- le coût des analyses nécessaires pour surveiller et évaluer la performance de la technique.

Lors de la mise en place de phytoextraction, les principaux paramètres suivis sont la quantité d'éléments extraits, les facteurs de translocation (ratio de la concentration d'un ETM dans les parties aériennes sur celle dans les racines) et de bio-concentration (ratio entre la concentration d'un ETM dans les parties aériennes sur la concentration totale ou phytodisponible de cet ETM dans le sol). Des tests écotoxicologiques peuvent être réalisés en plus pour quantifier l'impact de la teneur résiduelle en ETM sur les plantes et sur la faune du sol.

Le Tableau ci-dessous présente un exemple de calcul des coûts associés à une phytoextraction assistée par des amendements biologiques de zinc et de cadmium sur une surface d'un hectare par des peupliers conduits en Taillis à Courte Rotation. Cette estimation permet de montrer l'intérêt économique de cette technologie.

| Description                            | Coût            |
|----------------------------------------|-----------------|
| Achat de peuplier                      | 4 500 €         |
| Labour et passage d'une herse rotative | 400 €           |
| Achat de l'inoculum                    | 600 €           |
| Produits phytosanitaires               | 150 €           |
| Plantation                             | 3 600 €         |
| Protection contre le gibier            | 900 €           |
| Entretien des parcelles                | 600 €           |
| <b>Total (sur un hectare)</b>          | <b>10 750 €</b> |

Pour la phytostabilisation, les mesures minimales qui permettent d'évaluer la performance du système sont :

- le taux de couverture végétale qui doit tendre vers 100%
- le transfert des ETM du sol vers les autres compartiments de l'écosystème qui doit être réduit significativement et même arrêter si possible.

Afin de s'assurer que l'effet fixateur se maintient dans le temps, des indicateurs sont analysés à une fréquence définie pour s'assurer que l'effet existe toujours. Des études ont mis en évidence que l'action stabilisatrice des plantes dure au moins dix ans. De même, des tests écotoxicologiques équivalents à ceux utilisés pour la phytoextraction peuvent être utilisés pour s'assurer de la part limitée d'ETM présent dans la solution du sol.

L'exemple donné dans le tableau ci dessous est issu de travaux de recherche, les coûts sont donc des ordres de grandeur et le coût du diagnostic préalable n'est pas pris en compte.

| Présentation rapide du contexte                        | Situation 1                       | Situation 2              | Situation 3                   |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Type de traitement                                     | Phytostabilisation aidée          | Phytostabilisation aidée | Phytostabilisation            |
| Etat initial du terrain                                | Terrain non végétalisé non nivelé | Terrain boisé non nivelé | Ex culture fourragère nivelée |
| Espèce végétale utilisée                               | Canche                            | Saule (TTCR)             | Miscanthus                    |
| Descriptif des tâches effectuées                       | Situation 1                       | Situation 2              | Situation 3                   |
| Enlèvement et élimination de la végétation existante   |                                   | 5 400 €                  |                               |
| Nivelage et décompactage du sol                        | 4 800 €                           | 4 800 €                  |                               |
| Labour et passage d'une herse rotative                 |                                   |                          | 400 €                         |
| Produits phytosanitaires                               |                                   |                          | 150 €                         |
| Achat de l'amendement                                  | 360 €                             | 360 €                    |                               |
| Epandage de l'amendement et incorporation au sol       | 600 €                             | 600 €                    |                               |
| Achat de graines de canche                             | 4 550 €                           | 4 550 €                  |                               |
| Semis des graines de canche                            | 380 €                             | 380 €                    |                               |
| Achat des rhizomes de miscanthus et plantation         |                                   |                          | 4 000 €                       |
| Roulage de la canche et du miscanthus                  | 350 €                             | 350 €                    | 350 €                         |
| Préparation du terrain et pose d'une bâche de paillage |                                   | 3 500 €                  |                               |
| Achat de boutures de saules et plantation              |                                   | 5 000 €                  |                               |
| <b>TOTAL</b>                                           | <b>11 040 €</b>                   | <b>29 240 €</b>          | <b>4 900 €</b>                |

### Annexe 3: Principe des différentes phytotechnologies

|                                    |                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phytoextraction                    | Utilisation d'espèces végétales hyperaccumulatrices capables de prélever les métaux toxiques situés dans les horizons de surface (jusqu'à 80 cm de profondeur) et de les <b>accumuler dans les parties aériennes</b>   |
| Phytostabilisation                 | <b>Immobilisation</b> du polluant <i>in situ</i> grâce à des plantes                                                                                                                                                   |
| Phyto/rhizo/blasto/caulofiltration | Utilisation de plantes entières (phyto-) ou d'une partie de la plante (racines (rhizo-) ou parties aérienne (caulo-)) ou de semis (blasto-) pour absorber ou adsorber les polluants dans <b>les milieux aquatiques</b> |
| Phytodégradation                   | Accélération de la dégradation des composés organiques polluants (hydrocarbures, pesticides ou explosifs) grâce à des végétaux (la dégradation a lieu <b>dans</b> la plante)                                           |
| Rhizodégradation                   | Dégradation de molécules organiques <b>au niveau de la rhizosphère</b> par des microorganismes ou des exsudats racinaires                                                                                              |
| Phytovolatilisation                | Utilisation de plantes pour absorber des composés organiques ou certains ETM (mercure et sélénium) du sol et les <b>transformer en forme gazeuse libérée dans l'atmosphère</b>                                         |
| Phytodésalinisation                | <b>Utilisation de halophytes</b> pour diminuer les teneurs en sels dans certains sols afin de les rendre fertiles pour les plantes non adaptées au stress salin                                                        |

## Annexe 4 : Synthèse des études de phytoremédiation appliquées au peuplier

| Type d'essai | Type de polluants | Espèces ou hybrides utilisés                                                                                                             | Résultats principaux                                                                                                                                                                                                                       | Référence                         |
|--------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Terrain      | ETM               | clones de <i>Populus</i>                                                                                                                 | Effet variable selon les clones sur les capacités d'accumulation, la répartition des ETM entre les organes et les effets sur la photosynthèse                                                                                              | Robinson et al. (2000)            |
|              | Pb, Cd, Ni et Zn  | <i>Populus nigra</i>                                                                                                                     | Accumulation de Cd et de Zn, mise en évidence d'une relation entre l'augmentation de l'activité de la peroxydase et la concentration foliaire en plomb                                                                                     | Baycu et al. (2006)               |
|              | ETM               | <i>Populus tremula</i>                                                                                                                   | Effet négatif des ETM sur la photosynthèse et la transpiration mais pas sur la respiration                                                                                                                                                 | Hermle et al. (2007)              |
|              | Zn et Cd          | <i>Populus tremula</i>                                                                                                                   | Espèce capable d'accumuler du Zn et du Cd                                                                                                                                                                                                  | Unterbrunner et al. (2007)        |
|              | Cd, Zn et Pb      | <i>P. deltoides x P. nigra</i> , <i>P. tremula x P. alba</i> , <i>P. tremula x P. tremuloides</i> , <i>P. trichocarpa x P. deltoides</i> | Meilleurs résultats obtenus par <i>P. tremula x P. tremuloides</i> pour l'accumulation de Zn et de Cd. Corrélation entre la teneur en Zn et en Cd dans les feuilles et dans les tiges. Teneurs en plomb faibles et dépendantes des espèces | Migeon et al. (2009)              |
|              | Cu, Cd, Pb et Zn  | <i>Populus x generosa</i>                                                                                                                | Accumulation de Zn et Pb au niveau des feuilles et stockage de Pb et Cu au niveau des racines. Utilisation de mycorhize sans effet significatif sur les capacités des arbres                                                               | Bissonnette et al. (2010)         |
|              | Cd, Zn et Pb      | <i>P. deltoides x P. nigra</i>                                                                                                           | Accumulation du Cd variable selon le type de sol                                                                                                                                                                                           | Wu et al. (2010)                  |
| In vitro     | Al, Cu et Pb      | <i>P. tremula x P. alba</i>                                                                                                              | Pas d'effet toxique de Cu pour de faibles concentrations, effet toxique de Cu et Pb à de fortes concentrations sur le développement de la plante, la mise en culture avec de l'Al favorise la tolérance au Cu                              | Bojarczuk (2004)                  |
|              | As, Cd, Cu et Zn  | clones de <i>Populus alba</i>                                                                                                            | Réponse variable selon les clones                                                                                                                                                                                                          | Di Lonardo et al. (2010)          |
| In vitro     | Pb et Ni          | <i>P. tremula x P. tremuloides</i>                                                                                                       | Accumulation du Pb et pas d'effets toxiques sur les plantes                                                                                                                                                                                | Kališová-Špirochová et al. (2003) |
| Laboratoire  | Zn                | <i>P. deltoides x P. nigra</i>                                                                                                           | Variation de la répartition de Zn dans les organes au cours du temps et en fonction de la concentration en Zn de la solution, mise en évidence de mécanismes de tolérance pour de hautes teneurs en Zn                                     | Di Baccio et al. (2009)           |
| Laboratoire  | Zn, Cu, Cr et Cd  | <i>P. deltoides x P. maximowitzi</i> , <i>P. deltoides x P. nigra</i>                                                                    | Pas d'effet toxique des ETM testés, teneur élevée en Cu, Zn et Cr dans les plantes cultivées sur les sols pollués                                                                                                                          | Sebastiani et al. (2004)          |
| Laboratoire  | Cd                | <i>P. nigra x P. maximowitzi x P. nigra</i>                                                                                              | Effet négatif de Cd sur le développement de la plante et sur la photosynthèse, stockage du Cd au niveau des racines                                                                                                                        | Nikolic et al. (2008)             |
| Hydroponie   | Cd                | clones de <i>Populus</i>                                                                                                                 | Pas d'effet toxique du Cd                                                                                                                                                                                                                  | Pilipovic et al. (2005)           |
| Hydroponie   | Cd                | espèces du genre <i>Populus</i>                                                                                                          | Effet négatif de Cd sur la plante au bout de 7 jours et accumulation dans les feuilles                                                                                                                                                     | Kieffer et al. (2008)             |
| Hydroponie   | Cd                | <i>Populus nigra</i>                                                                                                                     | Stockage de Cd dans les racines et effet sur les teneurs en composés organiques dans la plante                                                                                                                                             | Zacchini et al. (2009)            |
| Serre        | Cu et Zn          | <i>Populus alba</i>                                                                                                                      | Maintien de la quantité de biomasse produite pour un taux d'accumulation des ETM supérieur grâce à la symbiose mycorhizienne                                                                                                               | Cicatelli et al. (2010)           |

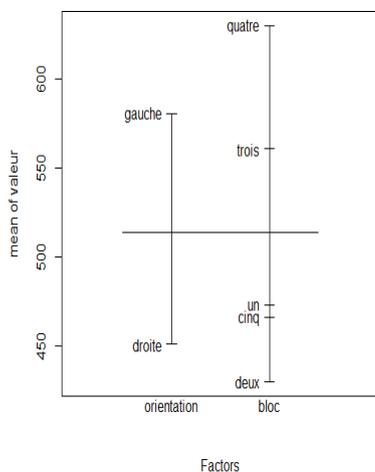


Figure 24: Exemple d'organisation des données sur Excel pour la carte d'intensité lumineuse réalisée dans le phytotron 4 le 16 mai 2013

| orientation | bloc   | valeur | orientation | bloc | valeur |
|-------------|--------|--------|-------------|------|--------|
| gauche      | quatre | 608    | droite      | cinq | 466    |
| gauche      | quatre | 651    | droite      | cinq | 450    |
| gauche      | quatre | 630    | droite      | deux | 366    |
| gauche      | quatre | 642    | droite      | deux | 355    |
| gauche      | quatre | 611    | droite      | deux | 460    |
| gauche      | quatre | 618    | droite      | deux | 472    |
| gauche      | quatre | 650    | droite      | deux | 458    |
| gauche      | trois  | 653    | droite      | deux | 510    |
| gauche      | trois  | 622    | droite      | deux | 430    |
| gauche      | trois  | 560    | droite      | deux | 390    |
| gauche      | trois  | 557    | droite      | un   | 470    |
| gauche      | trois  | 553    | droite      | un   | 474    |
| gauche      | trois  | 490    | droite      | un   | 560    |
| gauche      | trois  | 492    | droite      | un   | 473    |
| gauche      | cinq   | 482    | droite      | un   | 520    |
| gauche      | cinq   | 467    | droite      | un   | 435    |
|             |        |        | droite      | un   | 380    |

|                     |             |                        |            |
|---------------------|-------------|------------------------|------------|
| moyenne côté droite | 451,1176471 | ecart type côté droit  | 53,2440357 |
| moyenne côté gauche | 580,375     | ecart type côté gauche | 64,4397732 |
| moyenne B1          | 473,1428571 | ecart type B1          | 53,2927992 |
| moyenne B2          | 430,125     | ecart type B2          | 51,4403477 |
| moyenne B3          | 561         | ecart type B3          | 56,1477642 |
| moyenne B4          | 630         | ecart type B4          | 16,7928556 |
| moyenne B5          | 474,5       | ecart type B5          | 7,5        |
| <b>MOYENNE</b>      | 513,7878788 | <b>ECART TYPE</b>      | 87,44583   |

Figure 25 : Exemple de figure issue de l'analyse statistique réalisée sous R des données issues de la carte d'intensité lumineuse du 16 mai 2013



### **Annexe 6 : Protocole de minéralisation**

1. Séchez les échantillons végétaux dans une étuve à 85 °C pendant au moins 72 h jusqu'à ce que la perte de masse soit inférieure à 5 % en 24 h
2. Broyez manuellement les échantillons secs à température ambiante jusqu'à obtenir des particules de diamètre inférieur à 2 mm
3. Pesez le matériel végétal broyé (la minéralisation est réalisée sur au moins 0,2 g de matière sèche)
4. Introduisez le matériel végétal dans un matras avec 5 ml d'acide nitrique à 68 % et 5 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 %
5. Chauffez l'échantillon à 95 °C pendant 1 h puis à 150 °C pendant 2 h
6. Après refroidissement, filtrez l'échantillon sur papier Whatman (filtre papier Whatman 50 plat, 110 mm)
7. Puis transférez le filtrat dans une fiole jaugée de 50 ml complétée au trait de jauge à température ambiante avec de l'eau ultra pure
8. Transvasez la solution dans un tube de 50 ml et conservée à 4 °C.



MENNESSON, Marie, 2013, Comparaison de la réponse de deux génotypes de peuplier utilisés en phytoremédiation d'un sol pollué par le plomb, 49 pages, mémoire de fin d'études, VetAgro Sup Campus Agronomique de Clermont Ferrand, 2013

#### **STRUCTURE D'ACCUEIL ET INSTITUTIONS ASSOCIEES:**

- ♦ Université d'Auvergne (UDA)
- ♦ Unité mixte de recherche Physique et physiologie intégratives de l'arbre fruitier et forestier (UMR PIAF)

#### **ENCADRANTS :**

- ♦ Maître de stage : ADNANE, Hitmi (Université d'Auvergne) et COCHARD Hervé (UMR PIAF)
- ♦ Tuteur pédagogique : ALVAREZ, Gaël

- ♦ **OPTION : Agronomie, Productions Végétales et Environnement**

#### **RESUMÉ**

La contamination des sols par des éléments toxiques par les activités anthropiques présentes et passées est une problématique importante en Europe. Les Etats membres ont décidé de mettre en place différentes réglementations pour identifier et traiter les sites pollués. Différentes filières ont été développées pour réhabiliter ces sols. Actuellement, la phytoremédiation est en plein essor. Cette technique est basée sur l'utilisation de plantes adaptées et des amendements pour réhabiliter les sols pollués. Parmi les espèces végétales, les peupliers sont proposés car ils ont un grand potentiel. Le principal intérêt de ces arbres est qu'ils produisent, dans un délai court, une biomasse importante valorisable en bois énergie. Parmi les polluants traitables par cette technique, les éléments traces métalliques sont les plus étudiés. Le sujet de ce stage s'inscrit dans ce contexte. Le but étant de comparer la réponse de deux génotypes de peuplier, skado et PTA, à un stress métallique au plomb. Deux essais ont été mis en place, un en hydroponie et un sur sol contaminé majoritairement par de l'arsenic et du plomb. Les conclusions de l'essai sur sol sont que la contamination limite l'ensemble des paramètres suivis (biomasse produite, prélèvement en eau, photosynthèse, conductance stomatique et transpiration). La conductivité hydraulique à travers la tige n'est pas inhibée par les polluants. L'essai en hydroponie a mis en évidence que les seuls paramètres impactés négativement sont les échanges gazeux et la capacité de prélèvement en eau.

The soils contamination by toxic elements due to past and recent anthropics activities are an essential issue for European Union. The Member States decided to develop different regulations in order to identify and treat contaminated sites. Different sectors have been developed in order to restore these soils. Nowadays, the phytoremediation is in development. This technique is based on the use of plants and enrichment products to restore the contaminated areas. Among plant species, poplars are used because of their potential. In fact, the main interest of these trees is that they can produce in a short delay a huge biomass recoverable in wood energy sector. Trace metals are the most studied contaminants treated by this technique. In this contexte, the training period aim is to compare the response of two poplar genotypes, Skado and PTA, to a lead stress. Two experiments were realized, one in hydroponic conditions and one on a mostly arsenic and lead contaminate soil. The results of soil experiments were that the contamination reduce all the parameters followed (production of biomass, water uptake, photosynthetic capacity, stomatal conductance and transpiration rate). The hydraulic conductivity through the stem was not inhibited by contaminants. The hydroponic experiment showed that the only parameters negatively affected by lead were gas exchange and water uptake capacity.

---

Mots clés : Phytoremédiation, plomb, fer, peuplier, éléments traces métalliques, hydroponie, essai en pots, échanges gazeux, transport de l'eau, développement (croissance)