

Utilisation du chanvre (*Cannabis sativa* L.) dans une optique de phytoremédiation de sols contaminés aux éléments traces métalliques et valorisation des sous-produits

Isenborghs Arnaud

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteurs : Lutts Stanley (UCL)
Luyckx Marie (UCL)

Année académique 2019 – 2020

Remerciements

« We don't make mistakes, we have happy accidents » Bob Ross.

En préambules de ce mémoire, je tiens à remercier l'ensemble des personnes ayant contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce projet.

Je remercie mon promoteur, Monsieur Lutts, et ma co-promotrice Marie Luyckx, pour leur aide, leurs conseils et l'encadrement dans la réalisation de ce travail.

J'adresse mes sincères salutations à l'ensemble des membres du laboratoire GRPV pour leur accueil et leur bonne humeur.

Je souhaite marquer une intention à Brigitte Vanpee pour son aide précieuse sur le terrain ainsi qu'à Anne Iserentant pour les nombreuses analyses réalisées.

Un grand merci à Chantal Vandermeirein d'avoir relu avec tant de rigueur mon mémoire.

Finalement, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille, mes parents et Emeline de m'avoir soutenu jusqu'au bout dans la réalisation de mon rêve.

Utilisation du chanvre (*Cannabis sativa* L.) dans une optique de phytoremédiation de sols contaminés aux éléments traces métalliques et valorisation des sous-produits

Résumé

La gestion de la pollution de l'environnement par les éléments traces métalliques (ETM) est l'un des objectifs majeurs du 21^{ème} siècle. Pour ce faire, de nombreuses techniques physico-chimiques sont utilisées. Cependant, ces dernières souffrent de nombreuses limitations. Dans une optique de changements globaux, une méthode de gestion plus douce et plus raisonnée de l'environnement a vu le jour : la phytoremédiation. Celle-ci consiste en l'utilisation de plantes pour extraire, dégrader ou immobiliser un contaminant. Ainsi, le chanvre industriel (*Cannabis sativa* L.) est considéré comme un candidat potentiel grâce à ses nombreuses qualités (résistance à l'encontre de certains métaux, production de biomasse importante, etc.). Qui plus est, la biomasse produite pourrait être utilisée dans une optique de valorisation des fibres. Néanmoins, de par sa contamination métallique, le chanvre industriel ne pourrait être utilisé qu'à des fins strictement non alimentaires.

Dans le cadre de ce mémoire, il s'agit de déterminer dans quelle mesure le cadmium, le plomb et le zinc influencent morphologiquement et physiologiquement le chanvre industriel cultivé *in situ*. Il vise aussi à déterminer s'il est possible d'améliorer le comportement des plantes via un apport de biochar, compost ou silicium, ainsi qu'à préciser si l'exposition du chanvre à une pollution métallique (cadmium et zinc), en conditions contrôlées, influence la qualité des fibres en vue d'une utilisation dans des processus industriels.

Ainsi, l'étude de terrain a mis en avant la capacité du chanvre à croître sur un sol faiblement contaminé. En effet, ce dernier a montré un comportement physiologique normal, voire même légèrement supérieure sur la parcelle polluée. De plus, l'ajout d'amendements (biochar, compost, silicium) n'a pas semblé affecter l'activité photosynthétique, ainsi que l'accumulation des ETM au sein des tissus. Il faut néanmoins considérer que les plantes ont connu des conditions microclimatiques exceptionnelles ainsi qu'une biodisponibilité relativement faible. Toutefois, l'analyse de l'influence des ETM (Cd et Zn) en conditions contrôlées a montré qu'à des niveaux élevés de concentration la formation des fibres est altérée. Cependant, pour la culture de terrain, le chanvre n'a pas présenté de diminution de taille, ni d'effet sur le titre des fibres lié à la contamination de la parcelle.

Mots clés : *Cannabis sativa*, éléments traces métalliques, fibres, biochar, phytoremédiation

The use of hemp (*Cannabis sativa* L.) for the phytoremediation of soils contaminated with metallic trace elements and valorization of by-products

Abstract

The management of environmental pollution by metallic trace elements is one of the major objectives of the 21st century. To achieve this, many physico-chemical techniques are used. However, they suffer from many limitations. With a view to global changes, a gentler and more reasoned environmental management method has emerged: phytoremediation. This consists of using plants to extract, degrade or immobilize a contaminant. Thus, industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) is considered as a potential candidate thanks to its many qualities i.e. resistance to certain metals, high biomass production, etc. Moreover, the biomass produced could be used for fiber valorization. Nevertheless, due to its metallic contamination, industrial hemp could only be used for strictly non-food purposes.

The aim of this master thesis is to determine to which extent cadmium, lead and zinc influence morphologically and physiologically the industrial hemp grown *in situ*. It also aims to determine whether it is possible to improve plant behavior by adding biochar, compost or silicon, as well as whether exposure of hemp to metal pollution (cadmium and zinc), under controlled conditions, influences the quality of the fibers for use in industrial processes.

Thus, the field study highlighted the ability of hemp to grow on poor contaminated soil. Indeed, the hemp showed a normal physiological behavior, even slightly superior on the polluted plot. Moreover, the addition of amendments (biochar, compost, silicon) did not seem to affect the photosynthetic activity, nor the accumulation of metallic trace elements within the tissues. Nevertheless, it must be considered that the plants experienced exceptional microclimatic conditions and relatively low bioavailability. However, the analysis of the influence of metallic trace elements (Cd and Zn) under controlled conditions showed that, at high levels of concentration, fiber formation is impaired. However, for the field crop, hemp did not show a decrease in size or an effect on the fiber linear density due to the contamination.

Keywords: *Cannabis sativa*, metallic trace elements, fibers, biochar, phytoremediation

Table des matières

INTRODUCTION.....	12
--------------------------	-----------

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 LA PROBLEMATIQUE DES ETM A TRAVERS LE MONDE, EN EUROPE ET EN BELGIQUE	14
1.1 DEFINITION ET CARACTERISTIQUES.....	14
1.2 EFFETS SUR LA SANTÉ.....	15
1.3 NORMES EN VIGUEUR	16
1.4 METAUX LOURDS LIES AU SUJET D'ETUDE	17
1.4.1 Le zinc.....	17
1.4.2 Le cadmium.....	18
1.4.3 Le plomb.....	19
2 LES PLANTES FACE AUX ETM.....	20
3 LA PHYTOREMEDIATION.....	23
3.1 LA PHYTOEXTRACTION.....	26
3.2 LA PHYTOSTABILISATION	26
3.3 NOUVEAUX CONCEPTS	27
3.3.1 Augmenter la biodisponibilité des ETM et la résistance des plantes dans une perspective de phytoextraction	27
3.3.2 Diminuer la biodisponibilité des ETM en vue de phytostabiliser le sol	28
4 LE CHANVRE INDUSTRIEL.....	29
4.1 UTILISATIONS.....	31
4.2 LE CHANVRE EN PHYTOREMEDIATION	32
5 OBJECTIFS	34

MATERIEL ET METHODES

6 VOLET TERRAIN	36
6.1 DESCRIPTION DES PARCELLES	36
6.2 PRÉPARATION DES SOLS, SEMIS ET APPLICATION DE SILICIUM.....	37
6.3 TENEUR, BIODISPONIBILITÉ DES MÉTAUX ET PARAMÈTRES AGRONOMIQUES DES SOLS.....	38
6.4 MESURES ET RÉCOLTES DU MATÉRIEL FRAIS	41
6.5 MESURE DES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES	41
6.5.1 Conductance stomatique	41
6.5.2 Échanges gazeux.....	41
6.5.3 Fluorescence de la chlorophylle	42
6.6 TENEUR VOLUMÉTRIQUE EN EAU DU SOL ET CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES	43
6.7 MINÉRALISATIONS	43
6.7.1 Dosage du Cd, Pb et Zn	43
6.7.2 Dosage silicium	44
6.8 MESURES DES PROPRIÉTÉS DES FIBRES.....	44
7 VOLET MICROSCOPIE.....	44
7.1 PRÉPARATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL ET APPLICATION DU STRESS MÉTALLIQUE.....	45
7.2 FIXATION, INCLUSION ET OBTENTION DES COUPES SÉRIÉES.....	45
7.3 IMMUNOHISTOCHEMIE	46
7.3.1 Marquage du xylane	46
7.3.2 Marquage de la cellulose	47
8 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	48

RESULTATS

9	EXPERIENCES DE TERRAIN	50
9.1	SUIVI DES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES DES PLANTES	50
9.1.1	<i>Phase claire de la photosynthèse.....</i>	<i>50</i>
9.1.2	<i>Phase sombre de la photosynthèse.....</i>	<i>53</i>
9.2	DETERMINATION DES TENEURS EN CADMIUM, PLOMB, ZINC DANS LE CHANVRE	56
9.2.1	<i>Concentration foliaire en Cd, Pb, Zn.....</i>	<i>56</i>
9.2.2	<i>Concentration au sein de la tige en Cd, Pb, Zn.....</i>	<i>59</i>
9.2.3	<i>Dosage des teneurs en potassium, magnésium et soufre dans le chanvre.....</i>	<i>62</i>
9.3	DETERMINATION DE L'INFLUENCE DU SILICIUM SUR LE CHANVRE.....	63
9.4	MESURE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX DE TERRAIN.....	66
9.5	ANALYSE DU TITRE DES FIBRES	68
10	ANALYSE DE CERTAINS COMPOSANTS DES PAROIS CELLULAIRES.....	69

DISCUSSION

11	DISCUSSION	77
-----------	-------------------------	-----------

CONCLUSION

12	CONCLUSION.....	93
-----------	------------------------	-----------

REFERENCES

13	BIBLIOGRAPHIE	96
-----------	----------------------------	-----------

Liste des figures

FIGURE 1 : COURBE DOSE-REPONSE EN FONCTION DE LA NATURE DU METAL (« ALLOWAY, 1995 » DANS LIN, 2014)	21
FIGURE 2 : INDUCTION DE LA SYNTHÈSE DE PHYTOCHELATINES EN PRÉSENCE D'ETM. UNE FOIS PRODUITES, LES PCs PEUVENT CHELATER LE METAL POUR FORMER UN COMPLEXE QUI SERA STOCKÉ DANS LA VACUOLE (COBBETT, 2000).	22
FIGURE 3 : LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE PHYTOREMEDIATION POSSIBLES POUR UN SUBSTRAT POLLUÉ (TANGAHU ET AL., 2011).25	
FIGURE 4 : INFLORESCENCE MÂLE EN BAS ET FEMELLE EN HAUT (SABLONS D. DANS LAROUSSE.FR).	30
FIGURE 5 : LOCALISATION DES 3 SITES AUTOUR DE L'ANCIENNE FONDERIE	36
FIGURE 6 : DISPOSITION DES BLOCS AU SEIN DE CHAQUE PARCELLE, AMENDEMENTS, ET ROTATION DES CULTURES	37
FIGURE 7 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE L'ÉVOLUTION DES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PHASE CLAIRE DE LA PHOTOSYNTHESE EN FONCTION DES DIFFÉRENTES DATES DE MESURES. BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS ; NA : NON AMENDE ; BIO : BIOCHAR ; COMP : COMPOST ; B+C : BIOCHAR + COMPOST.	50
FIGURE 8 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE L'ÉVOLUTION DES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PHASE SOMBRE DE LA PHOTOSYNTHESE EN FONCTION DES DIFFÉRENTES DATES DE MESURES. BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS ; NA : NON AMENDE ; BIO : BIOCHAR ; COMP : COMPOST ; B+C : BIOCHAR + COMPOST.	53
FIGURE 9 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE L'ÉVOLUTION DES TENEURS EN CADMIUM, PLOMB ET ZINC EN MG/KG DE MATIÈRE SÈCHE DANS LES FEUILLES EN FONCTION DES DIFFÉRENTES DATES DE MESURES. BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS ; NA : NON AMENDE ; BIO : BIOCHAR ; COMP : COMPOST ; B+C : BIOCHAR + COMPOST.	56
FIGURE 10 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE L'ÉVOLUTION DES TENEURS EN CADMIUM, PLOMB ET ZINC EN MG/KG DE MATIÈRE SÈCHE DANS LES TIGES EN FONCTION DES DIFFÉRENTES DATES DE MESURES. BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS ; NA : NON AMENDE ; BIO : BIOCHAR ; COMP : COMPOST ; B+C : BIOCHAR + COMPOST	59
FIGURE 11 : CONTENU VOLUMÉTRIQUE EN EAU (VOLUME EAU/VOLUME SOL). BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS ; NA : NON AMENDE ; BIO : BIOCHAR ; COMP : COMPOST ; B+C : BIOCHAR + COMPOST. LE TABLEAU INDIQUE LE RÉSULTAT DU TEST DE TUKEY : LES DIFFÉRENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDICENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFÉRENTES ($P<0,05$) ; $n=5$. LA COULEUR VERTE INDIQUE UN EFFET SIGNIFICATIF DE L'AMENDEMENT ET LA COULEUR ORANGE UN EFFET DE LA DATE. L'ASTERISQUE INDIQUE UNE DIFFÉRENCE SIGNIFICATIVE LORS DE LA COMPARAISON POUR UNE DATE SPÉCIFIQUE.	66
FIGURE 12 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE L'ÉVOLUTION DE L'HUMIDITÉ RELATIVE (PRESSION VAPEUR/PRESSION SATURANTE) SUIVANT LES DIFFÉRENTES DATES DE MESURES. BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS. LES BARRES VERTICALES REPRÉSENTENT LES ERREURS STANDARDS. LES DIFFÉRENTES LETTRES INDICENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFÉRENTES ($P<0,05$).	67
FIGURE 13 : TITRE DES FIBRES (MG/M) (MOYENNE $\pm$ SD). BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS. LES BARRES VERTICALES REPRÉSENTENT LES ERREURS STANDARDS. LES DIFFÉRENTES LETTRES INDICENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFÉRENTES ($P<0,05$) ; $n=3$	68
FIGURE 14 : DÉTECTION PAR IMMUNOFLOUORESCENCE DE L'ÉPITOPE LM10. COUPE TRANSVERSALE AU NIVEAU « SNAP POINT » DE LA TIGE, CHEZ UNE PLANTE ÂGÉE DE 4 SEMAINES MONTRANT L'ÉPIDERME (E), LE COLLENCYME (C), LES FIBRES PRIMAIRES (FP) ET LE XYLEME (X). T : TÉMOIN ; TSi : TÉMOIN + SILICIUM (2MM H_2SiO_3) ; Cd : EXPOSITION A 20 μ M $CdCl_2$; CdSi : CADMIUM (20 μ M $CdCl_2$) + SILICIUM (2MM H_2SiO_3) ; Zn : EXPOSITION A 100 μ M $ZnCl_2$; ZnSi : ZINC (100 μ M $ZnCl_2$) + SILICIUM (2MM H_2SiO_3) ; $n=3$	69
FIGURE 15 : DÉTECTION PAR IMMUNOFLOUORESCENCE DE L'ÉPITOPE CMB3A. COUPE TRANSVERSALE AU NIVEAU « SNAP POINT » DE LA TIGE, CHEZ UNE PLANTE ÂGÉE DE 4 SEMAINES MONTRANT L'ÉPIDERME (E), LE COLLENCYME (C), LES FIBRES PRIMAIRES (FP), LES FIBRES SECONDAIRES (FS) ET LE XYLEME (X). T : TÉMOIN ; TSi : TÉMOIN + SILICIUM (2MM H_2SiO_3) ; Cd : EXPOSITION A 20 μ M $CdCl_2$; CdSi : CADMIUM (20 μ M $CdCl_2$) + SILICIUM (2MM H_2SiO_3) ; Zn : EXPOSITION A 100 μ M $ZnCl_2$; ZnSi : ZINC (100 μ M $ZnCl_2$) + SILICIUM (2MM H_2SiO_3) ; $n=3$	70
FIGURE 16 : DIAMÈTRE MOYEN DES FIBRES PHLOÉMIENNES (PRIMAIRES ET SECONDAIRES) TOUS MARQUEURS CONFONDUS (LM10 ET CBM3A). T : TÉMOIN ; TSi : TÉMOIN + SILICIUM ; Cd : CADMIUM ; CdSi : CADMIUM + SILICIUM ; Zn : ZINC ; ZnSi : ZINC + SILICIUM. LES BARRES VERTICALES REPRÉSENTENT LES ERREURS STANDARDS. LES DIFFÉRENTES LETTRES INDICENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFÉRENTES ($P<0,05$) ; $n=3$	73
FIGURE 17 : ÉPAISSEUR MOYENNE DE LA PAROI DES FIBRES PHLOÉMIENNES (PRIMAIRES ET SECONDAIRES). T : TÉMOIN ; TSi : TÉMOIN + SILICIUM ; Cd : CADMIUM ; CdSi : CADMIUM + SILICIUM ; Zn : ZINC ; ZnSi : ZINC + SILICIUM. LES BARRES VERTICALES REPRÉSENTENT LES ERREURS STANDARDS. LES DIFFÉRENTES LETTRES INDICENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFÉRENTES ($P<0,05$) ; $n=3$	74

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : VALEURS SEUILS ET INDICATIVES DES METAUX DANS LE SOL EN MG/KG. LES DIFFERENTES LETTRES CORRESPONDENT AU TYPE DE RISQUE : ECOLOGIQUE (E), POUR LA SANTE (T), CONTAMINATION DES EAUX SOUTERRAINES (P) (TOTH ET AL., 2016.B).	16
TABLEAU 2 : NORMES EN VIGUEUR EN WALLONIE EN FONCTION DU TYPE D'AFFECTATION DU SOL, ET POUR LES EAUX SOUTERRAINES. VS : VALEUR SEUIL. (MONITEUR BELGE, 2018).	17
TABLEAU 3 : CONCENTRATION ET DISPONIBILITES ENVIRONNEMENTALES DU Cd, Cu, Pb, Zn AINSI QUE LES PARAMETRES AGRONOMIQUES DES 3 PARCELLES.	40
TABLEAU 4 : VALEURS DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PHASE CLAIRE DE LA PHOTOSYNTHESE (MOYENNE $\pm$ SD) SUIVANT LES DIFFERENTES DATES DE MESURES. Fv/Fm : EFFICIENCE POTENTIELLE DE PHOTOSYSTEME LL ; Φ PS2 : EFFICIENCE DU PHOTOSYSTEME LL ; qP : PHOTOCHEMICAL QUENCHING ; NQP : NON PHOTOCHEMICAL QUENCHING. LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$). LA COULEUR BLEUE INDIQUE UN EFFET SIGNIFICATIF DE LA PARCELLE, LA COULEUR VERTE UN EFFET DE L'AMENDEMENT ET LA COULEUR ORANGE UN EFFET DE LA DATE. L'ASTERISQUE INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE LORS DE LA COMPARAISON POUR UNE DATE SPECIFIQUE ; N=5.	52
TABLEAU 5 : VALEURS DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PHASE SOMBRE DE LA PHOTOSYNTHESE (MOYENNE $\pm$ SD) SUIVANT LES DIFFERENTES DATES DE MESURES. Ci : CONCENTRATION EN CO ₂ INTERCELLULAIRE ; E : EVAPOTRANSPIRATION INSTANTANEE ; A : PHOTOSYNTHESE NETTE ; CS : CONDUCTANCE STOMATIQUE. LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$). LA COULEUR BLEUE INDIQUE UN EFFET SIGNIFICATIF DE LA PARCELLE, LA COULEUR VERTE UN EFFET DE L'AMENDEMENT ET LA COULEUR ORANGE UN EFFET DE LA DATE. L'ASTERISQUE INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE LORS DE LA COMPARAISON POUR UNE DATE SPECIFIQUE ; N=5.	55
TABLEAU 6 : VALEURS DES TENEURS EN CADMIUM (Cd), PLOMB (Pb) ET ZINC (Zn) (MOYENNE $\pm$ SD) EN MG/KG DE MATIERE SECHE DANS LES FEUILLES SUIVANT LES DIFFERENTES DATES DE MESURES. LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$). LA COULEUR BLEUE INDIQUE UN EFFET SIGNIFICATIF DE LA PARCELLE, LA COULEUR VERTE UN EFFET DE L'AMENDEMENT ET LA COULEUR ORANGE UN EFFET DE LA DATE. L'ASTERISQUE INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE LORS DE LA COMPARAISON POUR UNE DATE SPECIFIQUE ; N=3.	58
TABLEAU 7 : VALEURS DES TENEURS EN CADMIUM (Cd), PLOMB (Pb) ET ZINC (Zn) (MOYENNE $\pm$ SD) EN MG/KG DE MATIERE SECHE DANS LES TIGES SUIVANT LES DIFFERENTES DATES DE MESURES. LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$). LA COULEUR BLEUE INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE DE LA PARCELLE, LA COULEUR VERTE UN EFFET DE L'AMENDEMENT ET LA COULEUR ORANGE UN EFFET DE LA DATE. L'ASTERISQUE INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE LORS DE LA COMPARAISON POUR UNE DATE SPECIFIQUE ; N=3.	61
TABLEAU 8 : VALEURS DES TENEURS EN POTASSIUM (K), MAGNESIUM (Mg) ET SOUFRE (S) (MOYENNE $\pm$ SD) EN MG/KG DE MATIERE SECHE DANS LES FEUILLES (A) ET DANS LES TIGES (B) LORS DE LA DERNIERE DATE DE MESURES (17 AOUT). LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE (PAR ORGANE) INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$) ; N=3.	62
TABLEAU 9 : TENEURS EN SILICIUM (MOYENNE $\pm$ SD) EN MG/KG DE MATIERE SECHE DANS LES FEUILLES, POUR LES DEUX ANNEES DE CULTURE. BB : BOIS-BERNARD ; CLL : COURCELLES-LES-LENS ; Si : SILICIUM APPLIQUE PAR PULVERISATION ; NA : NON APPLICABLE PAR MANQUE DE REPLICAS. LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$) ; N=5.	64
TABLEAU 10 : VALEURS DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PHASE CLAIRE DE LA PHOTOSYNTHESE (MOYENNE $\pm$ SD) LORS DE LA DERNIERE SERIE DE MESURES (17 SEPTEMBRE). Fv/Fm : EFFICIENCE POTENTIELLE DE PHOTOSYSTEME LL ; Ψ PS2 : EFFICIENCE DU PHOTOSYSTEME LL ; qP : PHOTOCHEMICAL QUENCHING ; NQP : NON PHOTOCHEMICAL QUENCHING ; Si : SILICIUM APPLIQUE PAR PULVERISATION (2mM H ₂ SiO ₃). LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$) ; N=5.	65
TABLEAU 11 : VALEURS DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PHASE SOMBRE DE LA PHOTOSYNTHESE (MOYENNE $\pm$ SD) LORS DE LA DERNIERE SERIE DE MESURES (17 AOUT). Ci : CONCENTRATION EN CO ₂ INTERCELLULAIRE ; E : EVAPOTRANSPIRATION INSTANTANEE ; A : PHOTOSYNTHESE NETTE ; CS : CONDUCTANCE STOMATIQUE ; Si : SILICIUM APPLIQUE PAR PULVERISATION (2mM H ₂ SiO ₃). LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$) ; N=5.	65
TABLEAU 12 : VALEURS DES TENEURS EN CADMIUM (Cd), PLOMB (Pb) ET ZINC (Zn) (MOYENNE $\pm$ SD) EN MG/KG DE MATIERE SECHE DANS LES FEUILLES SUIVANT LES DIFFERENTES DATES DE MESURES. Si : SILICIUM APPLIQUE PAR PULVERISATION (2mM H ₂ SiO ₃). LES DIFFERENTES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES ($P < 0,05$) ; N=5.	66

TABLEAU 13 : INTENSITE DU SIGNAL DE FLUORESCENCE TISSULAIRE (MOYENNE $\pm$ SD) POUR LE MARQUEUR LM10. T : TEMOIN ; TSi : TEMOIN + SILICIUM ; Cd : CADMIUM ; CdSi : CADMIUM + SILICIUM ; Zn ; ZINC ; ZnSi : ZINC + SILICIUM. LES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT STATISTIQUEMENT DIFFERENTES ($p < 0.05$) ; N=3.....	71
TABLEAU 14 : INTENSITE DU SIGNAL DE FLUORESCENCE TISSULAIRE (MOYENNE $\pm$ SD) POUR LE MARQUEUR CBM3A. T : TEMOIN ; TSi : TEMOIN + SILICIUM ; Cd : CADMIUM ; CdSi : CADMIUM + SILICIUM ; Zn ; ZINC ; ZnSi : ZINC + SILICIUM. LES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT STATISTIQUEMENT DIFFERENTES ($p < 0.05$) ; N=3.....	73
TABLEAU 15 : DIAMETRE (MOYENNE $\pm$ SD) DES FIBRES PHLOEMIENNES (PRIMAIRES ET SECONDAIRES) TOUS MARQUEURS CONFONDUS (LM10 ET CBM3A). T : TEMOIN ; TSi : TEMOIN + SILICIUM ; Cd : CADMIUM ; CdSi : CADMIUM + SILICIUM ; Zn ; ZINC ; ZnSi : ZINC + SILICIUM. LES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT STATISTIQUEMENT DIFFERENTES ($p < 0.05$) ; N=3.	74
TABLEAU 16 : EPAISSEUR (MOYENNE $\pm$ SD) DE LA PAROI DES FIBRES PHLOEMIENNES (PRIMAIRES ET SECONDAIRES). T : TEMOIN ; TSi : TEMOIN + SILICIUM ; Cd : CADMIUM ; CdSi : CADMIUM + SILICIUM ; Zn ; ZINC ; ZnSi : ZINC + SILICIUM. LES LETTRES AU SEIN D'UNE COLONNE INDIQUENT QUE LES VALEURS SONT STATISTIQUEMENT DIFFERENTES ($p < 0.05$) ; N=3.....	75

Liste des abréviations

A : photosynthèse nette
BB : Bois-Bernard
CBM3a : carbohydrate binding module 3a
Cd : cadmium
CEC : capacité d'échange cationique
Ci : concentration en CO₂ intercellulaire
CLL : Courcelles-lès-Lens
CS : conductance stomatique
E : évapotranspiration instantanée
ETM : éléments traces métalliques
F₀ : fluorescence minimale
F_m : fluorescence maximale
F_v : fluorescence variable
F_v / F_m : efficacité potentielle du photosystème II
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
LM10 : monoclonal antibody (xylan)
MT : métallothionéine
NQP : non photochemical quenching
Pb : plomb
PC : phytochélatine
PSII : photosystème II
Φ_{PSII} : efficacité du photosystème II
O₂^{•-} : ion superoxyde
OH[•] : radical hydroxyle
qP : photochemical quenching
ROS : espèces réactives de l'oxygène
Si : silicium
VS : valeur seuil
VWC : volumetric water content
Zn : zinc

INTRODUCTION

Introduction

La contamination de l'environnement par des éléments traces métalliques (ETM) est de nos jours une problématique particulièrement préoccupante pour l'environnement. Pour pallier à cela, plusieurs techniques physico-chimiques de réhabilitation des sols existent. Ces dernières souffrent cependant d'un certain nombre de limitations : coûts élevés, changement irréversible des propriétés du sol, etc. (Ali et al., 2013 ; Tangahu et al., 2011). Pour tenter de suppléer à une partie de ces problèmes, et dans l'optique d'une gestion plus responsable de notre environnement, une technique nouvelle a vu le jour : la phytoremédiation. Celle-ci consiste en l'utilisation de plantes pour extraire, dégrader ou immobiliser une grande diversité de contaminants (Alkorta et Garbisu, 2001). Cette alternative est peu coûteuse, facile à mettre en place et écoresponsable. Cependant, la durée d'immobilisation du sol est plus longue (plusieurs années), le degré de contamination du sol tolérée par la plante est généralement faible à modéré et la biomasse produite n'est pas toujours valorisable.

Ainsi, le choix de l'espèce végétale à planter sur les sols contaminés est crucial. A cet égard, le chanvre industriel (*Cannabis sativa* L.) apparaît comme un candidat intéressant : ce dernier présente par exemple une production de biomasse importante ou encore une capacité d'absorption et d'accumulation de divers ETM (Ahmad et al., 2016a). Le chanvre peut également être valorisé de nombreuses manières : plastiques à base de chanvre, béton de chaux-chanvre ou encore utilisation pour le paillage (Chanvre wallon.be, 2014). La possibilité de valoriser les sous-produits issus de la phytoremédiation, à des fins non alimentaires, permettrait de pallier l'inconvénient dû à la durée d'immobilisation du sol.

Si *Cannabis sativa* présente à la fois de nombreux atouts pour la phytoremédiation, le comportement de l'espèce en réponse aux ETM demeure mal connu. Pour remédier à cela, ce mémoire s'inscrit dans une étude réalisée sur une période de 2 ans, ayant pour objet le suivi d'une culture de chanvre industriel sur sol multi-contaminé. Les objectifs visés sont (i) de déterminer dans quelle mesure la contamination influence morphologiquement et physiologiquement le chanvre industriel ; (ii) de déterminer s'il est possible d'améliorer le comportement des plantes via un apport d'amendements (biochar, compost, ou silicium), (iii) d'analyser les conséquences des ETM sur les produits valorisables du chanvre. Afin de compléter ce dernier objectif, des plantes issues d'une culture en conditions contrôlées ont été utilisées pour préciser l'influence de la présence d'ETM sur la qualité des fibres.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 La problématique des ETM à travers le monde, en Europe et en Belgique

Plusieurs des grandes problématiques environnementales mondiales actuelles sont liées à l'utilisation des ETM (agriculture, métallurgie, ...) : chaque année dans le monde, ce sont des milliers voire des millions de tonnes d'ETM qui sont relarguées dans l'environnement (Nriagu et Pacyna, 1988). Rien qu'en Europe, on estime en 2016 à 1,2 million de km², soit 28,3 % du territoire, la superficie des terres polluées par un ou plusieurs ETM (Tóth et al., 2016a). En Belgique, de nombreux sites dépassent les normes en vigueur en matière de teneur en ETM (Gentile et al., 2009). Ces sites sont particulièrement concentrés sur la Wallonie en raison de ses activités de transformation de minerais riches en métaux ayant favorisé la retombée de poussières chargées en ETM (Liénard et al., 2011). Ainsi, la Campine, le bassin industriel de Liège ou encore celui de Charleroi en sont de bons exemples.

1.1 Définition et caractéristiques

Le terme « métaux lourds » regroupe de manière générale les éléments métalliques (lourds) ayant une densité supérieure à 5 g/cm³ et les métalloïdes (apparences et propriétés d'un métal, mais se comportant chimiquement comme un non-métal) (Duruibe et al., 2007). Les métaux lourds et métalloïdes sont aussi qualifiés « d'éléments traces métalliques (ETM) » dus à leur faible concentration dans l'environnement (Marcovecchio et al., 2007). La terminologie « éléments traces métalliques » est préférée à l'utilisation du terme « métaux lourds ». Les ETM sont des éléments naturels de la croûte terrestre. Cependant, la plupart des contaminations environnementales et humaines résultent d'activités anthropiques : activités industrielles, agricoles, pharmaceutiques, atmosphériques et domestiques (Gill, 2014). Néanmoins, les phénomènes naturels ne sont pas à négliger : l'érosion, les éruptions volcaniques, les feux de forêts, etc. contribuent de façon significative à la libération d'ETM (Nagajyoti, Lee et Sreekanth, 2010).

Certains éléments tels que le cuivre (Cu), le fer (Fe), le magnésium (Mg), le zinc (Zn), etc. sont des nutriments essentiels pour le bon fonctionnement du métabolisme, qu'il soit animal ou végétal. D'autres n'ont pas de fonction biologique et sont catégorisés comme non essentiels ; Ex : l'aluminium (Al), l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le plomb (Pb), etc. Ainsi, la grande

diversité d'ETM couplée aux nombreux types de rejets, que ce soit dans l'atmosphère, l'eau ou le sol, les rend de plus en plus ubiquistes dans notre environnement. Néanmoins, la biodisponibilité conditionne l'accès aux ETM présents dans le sol. Plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent moduler au cours du temps cette disponibilité et donc leurs potentiels effets néfastes. Ainsi, les propriétés physiques (structure, résistance du sol, adsorption, etc.), les processus chimiques tels que la spéciation, les conditions chimiques (concentration, pH, état d'oxydation du milieu, potentiel d'oxydoréduction, capacité d'échange cationique) ou encore l'activité biologique (qui modifie les conditions physiques et chimiques) sont autant de facteurs influençant la biodisponibilité (Ernst, 1996 ; Tchounwou et al., 2012).

1.2 Effets sur la santé

L'omniprésence des ETM dans les différents compartiments de la matrice environnementale présente des risques majeurs en matière de santé humaine. En effet, une des principales voies d'entrée de ces composés toxiques concerne la chaîne alimentaire (Khan et al., 2008). D'autres voies d'entrée sont également possibles telles qu'un contact cutané, l'inhalation de poussières chargées en ETM, etc. (Su et al., 2014). Il apparaît que les systèmes biologiques peuvent être fortement impactés par une toxicité induite aux ETM. En effet, ceux-ci sont connus pour agir à différents niveaux : cellulaire, tissulaire et développemental. Ces ions métalliques induisent 3 grandes perturbations prédominantes : (1) une interférence avec le système de régulation du potentiel redox cellulaire et l'induction d'un stress oxydatif, pouvant entre autres causer des dégâts oxydatifs à l'ADN via des espèces réactives d'oxygène (ROS) ; (2) une inhibition des principaux systèmes de réparation de l'ADN entraînant l'accumulation de mutations délétères ; (3) une dérégulation de la prolifération cellulaire (Beyersmann et Hartwig, 2008 ; Wang et Shi, 2001 ; Yadav, 2010). De manière plus globale, les ETM affectent les organites et d'autres composants cellulaires (membranes, noyau, mitochondries, enzymes, etc.). En réponse à ces nombreuses perturbations, l'organisme est souvent confronté à des maladies incluant des problèmes cardiovasculaires, des anomalies développementales, des troubles neurologiques – hématologiques – immunologiques et divers types de cancers. Finalement, l'impact sur la santé humaine inclut divers aspects des ETM tels que la spéciation, la durée et la dose d'exposition, la poly-exposition, etc. De plus, chaque métal est connu pour

posséder ses propres caractéristiques et propriétés physico-chimiques qui lui confèrent des mécanismes toxicologiques spécifiques (Tchounwou et al., 2012).

1.3 Normes en vigueur

En matière de législation, quasiment chaque pays européen possède sa propre approche pour tenter de définir des valeurs seuils de concentration en ETM dans un sol. Selon Tóth et al. (2016b), les valeurs standards issues de la législation finlandaise représentent une bonne approximation des valeurs moyennes que l'on va retrouver au sein de l'Union européenne. Ces dernières sont reprises dans le tableau 1, la « valeur seuil » (« threshold value ») indique la concentration à partir de laquelle une évaluation plus approfondie du site est requise, quelle que soit l'utilisation du sol (agricole, industrielle, urbaine, etc.). Quant à la « valeur indicative » (« guideline value »), elle exprime la concentration limite au-delà de laquelle on observe des risques écologiques et sanitaires (Tóth et al., 2016b).

Tableau 1 : valeurs seuils et indicatives des métaux dans le sol en mg/kg. Les différentes lettres correspondent au type de risque : écologique (e), pour la santé (t), contamination des eaux souterraines (p) (Tóth et al., 2016.B).

Substance (symbol)	Threshold value mg/kg	Lower guideline value mg/kg	Higher guideline value mg/kg
Antimony (Sb) (p)	2	10 (t)	50 (e)
Arsenic (As) (p)	5	50 (e)	100 (e)
Mercury (Hg)	0.5	2 (e)	5 (e)
Cadmium (Cd)	1	10 (e)	20 (e)
Cobalt (Co) (p)	20	100 (e)	250 (e)
Chrome (Cr)	100	200 (e)	300 (e)
Copper (Cu)	100	150 (e)	200 (e)
Lead (Pb)	60	200 (t)	750 (e)
Nickel (Ni)	50	100 (e)	150 (e)
Zinc (Zn)	200	250 (e)	400 (e)
Vanadium (V)	100	150 (e)	250 (e)

En Wallonie, le nouveau décret sol relatif à la gestion et l'assainissement a été adopté par le parlement le 28 février 2018 et est entré pleinement en vigueur le 1^{er} janvier 2019. « Ce dernier vise à préserver et à améliorer la qualité du sol, à prévenir son appauvrissement ainsi que l'apparition de pollutions, à identifier les sources potentielles de pollution, à organiser les investigations et à déterminer les modalités d'assainissement des sols pollués » (Cappellin, 2018). Les normes de ce décret sont reprises dans le tableau 2 et permettent d'identifier, en fonction de la concentration en ETM, si un sol est pollué ou non. Ainsi, une valeur seuil (VS) indique la teneur, pour un ou plusieurs polluant(s), au-delà de laquelle des démarches sont nécessaires pour le sol ou les eaux souterraines. Cependant, pour un même métal, la valeur

seuil varie en fonction du type d'affectation du sol (naturelle, agricole, résidentielle, récréative/commerciale et industrielle).

Tableau 2 : normes en vigueur en Wallonie en fonction du type d'affectation du sol, et pour les eaux souterraines. VS : valeur seuil. (Moniteur belge, 2018)

Type d'usage		Sol (mg/kg _{matière sèche})					Eaux souterraines (µg/L)
		I	II	III	IV	V	
		naturel	agricole	résidentiel	récréatif ou commercial	industriel	
Métaux/métalloïdes							
arsenic	VS	30	30	40	40	65	10
cadmium	VS	1.8	1.8	3	10	20	5
chrome total ⁽¹⁾	VS	57	57	78	140	288	50
chrome VI ⁽²⁾	VS	4	4	4	13	13	9
cuivre	VS	53	53	156	490	600	100
mercure	VS	1.1	1.1	1.75	5	5	1
nickel	VS	87	87	146	350	350	20
plomb	VS	120	200	200	390	1840	10
zinc	VS	196	196	415	3000	3000	200

1.4 Métaux lourds liés au sujet d'étude

1.4.1 Le zinc

Le zinc est un micronutriment essentiel qui intervient dans une multitude de fonctions métaboliques, aussi bien dans le monde animal que végétal. Chez les plantes plus particulièrement, son rôle est multiple. Il est indispensable pour l'activation d'enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres, le maintien de l'intégrité des membranes, la synthèse de protéines, la régulation de la synthèse d'auxine ou encore la formation du pollen (Hafeez et al., 2013). Il a également un effet protecteur contre des dégâts oxydatifs, la perte d'intégrité et l'altération de la perméabilité des membranes biologiques. Pour maintenir son homéostasie, la plante régule l'expression de gènes codants pour des transporteurs de zinc (ZnT) (Rout et Das, 2009). Néanmoins, un excès de ce composé peut mener à l'apparition d'une toxicité minérale au niveau de la plante entière. Celle-ci peut se traduire par un déséquilibre dans l'absorption d'éléments minéraux, une inhibition de la croissance, des chloroses et une perturbation photosynthétique, l'induction de stress oxydatifs (liés à la production d'espèces réactives d'oxygène), etc. (Li et al., 2013 ; Tsonev et Lidon, 2012).

Au niveau des tissus de la plante, les besoins en zinc sont de l'ordre de 5 à 100 mg/kg de matière sèche. Néanmoins, au-delà de 300 mg/kg de matière sèche il y a généralement une toxicité pour les végétaux. Ainsi, dans un sol « sain » exempt de fertilisation ou contamination, on estime la concentration moyenne en zinc à environ 50 mg/kg de sol sec. Cependant, les teneurs peuvent varier entre 10 et 300 mg/kg de sol sec suivant les caractéristiques physico-chimiques du sol. En Europe, les concentrations en zinc retrouvées dans les sols varient entre 7 et 150 mg/kg de sol sec et dépendent fortement de leur texture (sableuse, argileuse, limoneuse, etc.) (Alloway, 2008 ; Noulas et al., 2018 ; White et Brown, 2010). Ces teneurs sont globalement en dessous des valeurs indicatives inférieures reprises dans le tableau 1. On peut dès lors sous-tendre que la pollution au zinc dans les sols au sein de l'Union européenne concerne principalement des cas isolés (Tóth et al., 2016.B). En Wallonie, la SPAQuE relève que les teneurs en zinc attendues dans les sols de surface sont en moyenne de 78 mg/kg de sol sec en zone rurale tandis qu'en zones de pollution atmosphérique de proximité, elles sont en moyenne de 253 mg/kg à 1202 mg/kg de sol sec selon la commune.

1.4.2 Le cadmium

Pour la très grande majorité du monde vivant, le cadmium est un élément non-essentiel toxique. Néanmoins, dans de rares cas, il est utilisé comme micronutriment par exemple chez une algue marine, *Thalassiosira weissflogii*, mais cette situation reste anecdotique (Lane et al., 2000). Ce métal est présent dans l'environnement via diverses sources naturelles, mais les activités anthropiques sont des sources de rejets atmosphériques 7 à 10 fois plus importantes (Patra et al., 2011). L'exposition au cadmium chez l'humain est principalement due à des phénomènes d'ingestion ou d'inhalation. Selon le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), le cadmium est classé dans le groupe 1 en tant qu'agent cancérigène pour l'homme. Le premier organe touché par le cadmium est le rein où il s'accumule. Les dégâts occasionnés sont multiples, avec bien sûr des problèmes rénaux, mais aussi des modifications au niveau de l'ADN, des stress oxydatifs, des perturbations dans le métabolisme du calcium (phénomène de substitution), etc. (Bernhoft, 2013).

Chez les plantes, la toxicité induit une diminution de la croissance, une inhibition de la photosynthèse et de la synthèse des protéines, une modification de l'activité enzymatique, un stress oxydatif, etc. (Hasan et al., 2009). Étant donné qu'il n'est pas essentiel, il entre dans la

plante via des transporteurs impliqués dans l'absorption du Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} (Gallego et al., 2012). Le Cd est nocif à de faibles teneurs : des concentrations foliaires supérieures à 5 à 10 mg/kg de matière sèche sont toxiques pour la plupart des plantes non-tolérantes (White et Brown, 2010). Le cadmium n'est pas très abondant dans la croûte terrestre de sorte que dans un sol non pollué, on le retrouve à des concentrations de l'ordre de 0,1 à 2 mg/kg de sol sec (Clemens, 2006). Selon Tóth et al. (2016b), la plupart des sols agricoles européens ne sont pas contaminés en Cd. En Wallonie, les teneurs attendues dans les sols de surface sont en moyenne de 0,47 mg/kg de sol sec en zone rurale, et de 0,8 mg/kg à 9,1 mg/kg de sol sec en zones de pollution atmosphérique de proximité (SPAQuE).

1.4.3 Le plomb

Le plomb est un élément ubiquiste au sein de notre environnement. Ses différentes propriétés telles que sa malléabilité, sa résistance à la corrosion, son faible point de fusion, etc. font que son utilisation s'est généralisée dans divers processus industriels : automobile, peinture, sidérurgie, etc. (Flora et al., 2012). Par conséquent, les activités anthropiques ont grandement augmenté sa présence dans les différents compartiments environnementaux. L'exposition chez l'homme affecte le système nerveux, provoque de l'hypertension ainsi qu'un dysfonctionnement rénal, affaiblit le système immunitaire, perturbe le système endocrinien et hématopoïétique, etc. (Gidlow, 2015). Selon le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), le plomb est classé dans le groupe 2B en tant qu'agent « peut-être » cancérigène pour l'homme ; les composés inorganiques du plomb dans le groupe 2A en tant qu'agent probablement cancérigène pour l'homme ; et les composés organiques du plomb en tant qu'agents inclassables quant à leur cancérigénicité pour l'homme. Chez les plantes, il diminue le taux de germination et la croissance, perturbe la nutrition minérale, réduit les divisions cellulaires, inhibe la photosynthèse, engendre un stress oxydatif, etc. (Malar et al., 2014 ; Pourrut et al., 2011). Les mécanismes par lesquels le plomb est absorbé par les racines ne sont pas totalement élucidés. Il s'avère qu'il pourrait employer des canaux et/ou transporteurs non sélectifs. Mais aussi des canaux spécifiques à différents ions, et particulièrement les canaux calciques (Pourrut et al., 2013). Le plomb étant naturellement présent dans la couche terrestre, on le retrouve dans des sols non contaminés à des concentrations généralement inférieures à 50 mg/kg de sol sec (Pourrut et al., 2011). On notera que des concentrations foliaires dépassant les 10 à 20 mg/kg de matière sèche sont

toxiques pour la plupart des plantes non-tolérantes (White et Brown, 2010). En Wallonie, les teneurs en Pb dans les sols de surface sont d'environ 46,2 mg/kg de sol sec en zone rurale et de 125 mg/kg à 426 mg/kg de sol sec en zones de pollution atmosphérique de proximité (SPAQuE).

2 Les plantes face aux ETM

Comme il a été mentionné précédemment, l'entièreté du monde vivant est impactée par une exposition aux ETM. Les plantes ne font pas exception à la règle et sont sujettes à diverses perturbations. Celles-ci concernent généralement des perturbations dans l'alimentation minérale, dans le statut hydrique, au niveau de la croissance et l'apparition d'un stress oxydatif. Cependant, certaines espèces végétales montrent un comportement de tolérance parfois même extrême face aux ETM. Il s'agira dans cette partie de préciser dans les grandes lignes quels sont les mécanismes de défense adoptés par la plante lors d'une exposition aux ETM.

Chez les espèces végétales, la sensibilité à l'exposition aux ETM varie considérablement. En général, elles ont développé deux grandes stratégies leur permettant de résister à cette exposition. La première est une stratégie d'évitement, qui a pour objectif de minimiser l'entrée racinaire en réduisant la biodisponibilité des ETM au sein de la rhizosphère et/ou en diminuant la perméabilité membranaire, via une modification de l'expression des gènes impliqués dans l'absorption racinaire (Ghosh et Singh, 2005). Pour influencer la disponibilité des ETM et tenter de la diminuer, la plante peut jouer sur différents facteurs (modification du pH, agents chélateurs, activité microbienne, etc.) (Raynaud et al., 2008). La deuxième stratégie vise à la tolérance de la plante. Il s'agira ici de détoxifier les ETM par chélation dans le cytosol, par séquestration vacuolaire ou encore par confinement apoplastique. Différents tissus métaboliquement peu actifs peuvent aussi avoir un rôle de stockage d'ETM, comme par exemple les trichomes et les feuilles âgées (Lin, 2014 ; Küpper et al., 2000). Cette stratégie permet à la plante de résister au stress voire d'accumuler les ions toxiques à des concentrations élevées. On notera que lors d'un stress métallique, la réponse de la plante dépend de la nature (essentielle ou non) et de la dose ainsi que de la durée d'exposition des ETM (figure 1).

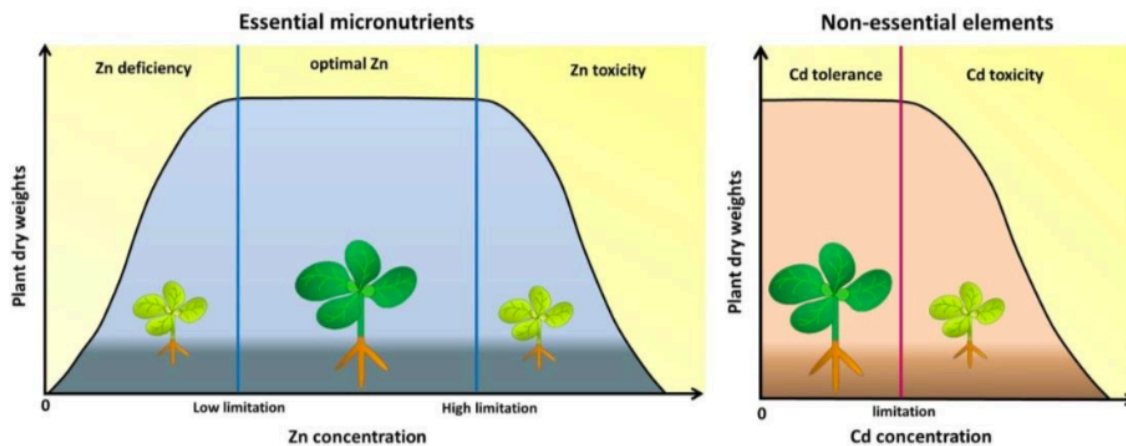


Figure 1 : Courbe dose-réponse en fonction de la nature du métal (« Alloway, 1995 » dans Lin, 2014)

Les stratégies de résistance des végétaux contre les ETM sont multiples et peuvent être additives. Au niveau cellulaire, les plantes sont capables de répondre de diverses manières (Lin, 2014). Premièrement, elles ont la capacité de réduire la biodisponibilité des métaux en jouant sur les propriétés de ceux-ci. En effet, elles sont capables de libérer des exsudats racinaires au sein de la rhizosphère. Ceux-ci sont de natures diverses telles que des protons, des acides aminés, des glucides, des enzymes, etc. Ces exsudats peuvent alors modifier la biodisponibilité des ETM par échange cationique, par phénomène de désorption, par complexation, par altération chimique, par dissolution minérale, etc. (Raynaud et al., 2007). Deuxièmement, il s'agit de contrôler l'influx de métaux en modifiant la perméabilité membranaire, par des stratégies transcriptionnelles ou post transcriptionnelles. L'entrée au sein du symplasme peut se faire de différentes manières, par simple diffusion, par transport passif au travers de canaux ou encore par transport actif via des transporteurs. Ces différents moyens d'entrée peuvent avoir un certain degré discriminant entre des métaux essentiels et non essentiels. (Lin, 2014 ; Reid et Hayes, 2003).

Troisièmement, la chélation des métaux permet de réduire leurs effets néfastes sur les composants cellulaires. Ils permettent de diminuer leurs interactions potentielles, et de favoriser leur entrée/sortie ainsi que leur accumulation.

Quatrièmement, l'efflux de métaux vers la solution du sol ou le milieu extracellulaire permet de réduire les perturbations engendrées par les ETM. Il peut s'agir de pompes ATPases ou encore de transporteurs capables de modifier le flux de métaux pour y favoriser leur sortie vers des lieux présentant de faibles impacts au niveau cellulaire (Hall, 2002).

Cinquièmement, la compartimentation et la séquestration des métaux permettent l'accumulation de ces derniers dans des compartiments cellulaires faiblement actifs. La

vacuole, la paroi, les trichomes, les feuilles âgées sont autant de sites choisis par la plante pour y accumuler les ETM et permettre un maintien de l'homéostasie sous contrainte métallique (Rascio et Navari-Izzo, 2011).

Sixièmement, la détoxification des espèces réactives d'oxygène (ROS) d'origine métallique est une voie métabolique indispensable pour le maintien de l'intégrité du végétal (Cfr ci-dessous).

La production d'espèces réactives d'oxygène ($\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, H_2O_2) se produit naturellement chez les plantes (Mittler, 2002 ; Van Breusegem et Dat, 2006). Cependant, lorsque les plantes sont exposées à une contrainte telle que la présence en excès de cadmium, de zinc ou de plomb, la production de ROS augmente : on parle alors de stress oxydatif. Les plantes ont la capacité de faire face à ce stress via la mise en place de mécanismes de défense impliquant un système enzymatique (catalases, peroxydases et superoxydes dismutases) et non enzymatique (glutathion, ascorbate, caroténoïdes et anthocyanes (Finnegan et Chen, 2012)).

La chélation des ETM passe notamment par la synthèse de phytochélatines (PCs), de métallothionéines (MTs), d'acides organiques, et d'acides aminés (Clemens, 2001). Les PCs sont des peptides non-protéiques possédant une structure de type $(\gamma\text{-Glu-L-Cys})_n\text{-Gly}$ où $n = 2$ à 11. Elles sont synthétisées à partir du glutathion sous l'action d'une enzyme, la phytochélatine synthase, lorsqu'elle est en présence d'ions métalliques (figure 2) (Hall, 2002 ; Clemens, 2006 ; Cobbett, 2000). Les groupements thiols de la cystéine permettent la chélation des métaux pour former un complexe phytochélatine-ETM. Les PCs sont synthétisées dans le cytosol et transportées en tant que complexe dans la vacuole pour y être stockées (Manara, 2012).

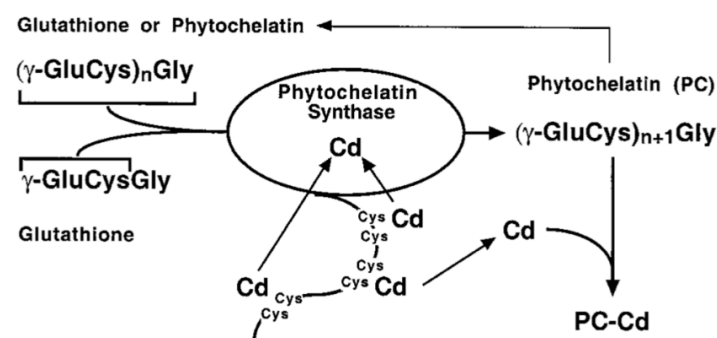


Figure 2 : Induction de la synthèse de phytochélatines en présence d'ETM. Une fois produites, les PCs peuvent chélater le métal pour former un complexe qui sera stocké dans la vacuole (Cobbett, 2000).

Les métallothionéines, contrairement aux PCs, sont des protéines qui résultent de l'expression de gènes, mais assurent la séquestration des ions toxiques selon le même principe que les phytochélatines, à savoir une fixation sur des fonctions thiols de la cystéine (Cobbett et Goldsbrough, 2002). Enfin, les acides organiques et acides aminés, de par leur réactivité avec les ions métalliques ont été identifiés comme des ligands potentiels. Ainsi, le citrate, le malate et l'oxalate sont impliqués dans la tolérance des métaux, le transport du métal par le xylème et la séquestration vacuolaire (Clemens, 2001).

3 La phytoremédiation

La gestion de la pollution est un problème mondial qui requiert une attention particulière. Diverses techniques physiques, chimiques et biologiques sont déjà employées pour gérer les sites concernés. Le choix de la méthode est fonction des propriétés physico-chimiques des ETM en présence. Il s'agit en général de techniques classiques réalisées soit *in-situ* ou *ex-situ*. Les pratiques les plus couramment utilisées sont la vitrification, l'incinération, le lavage, la solidification et la stabilisation du sol (Sheoran et al., 2011 ; Wuana et Okieimen, 2011). Cependant, ces techniques souffrent de limitations liées à leurs coûts, à la quantité de travail nécessaire, aux changements irréversibles des propriétés du sol, aux perturbations de la vie du sol, etc. De plus, les méthodes chimiques peuvent être dans certains cas la source d'une pollution secondaire (utilisation d'acide pour modifier le pH par exemple) (Ali et al., 2013 ; Tangahu et al., 2011).

Une approche récente fait référence à l'utilisation de plantes et de microorganismes associés pour tenter de dépolluer les sols. Il s'agit de la phytoremédiation. Le point de départ de cette pratique, a été la découverte de plantes dites « hyperaccumulatrices » d'ETM. Cependant, la plupart ont une croissance faible, sont de petite taille et sont peu ou pas résistantes aux conditions hivernales, ce qui limite leur utilisation potentielle (Chaney et al., 2005 ; Marques et al., 2009). Par ailleurs, de nombreuses plantes non-hyperaccumulatrices présentent les capacités nécessaires à l'utilisation de la phytoremédiation en condition optimale.

La phytoremédiation peut être utilisée aussi bien pour des ETM que pour des composés organiques. Comme toute technique, elle présente des avantages et des limitations. Ce qui la

rend attractive est qu'il s'agit d'une technique facile à mettre en œuvre, écoresponsable et peu coûteuse, bien qu'il soit relativement difficile de chiffrer le coût de phytoremédiation vu la diversité des paramètres à prendre en compte (Alkorta et Garbisu, 2001). Wan et al. (2016) ont tenté de calculer le coût-bénéfice lié à l'utilisation de la phytoremédiation (As-Pb *Pteris vitatta* ; Cd *Sedum alfredii*) sur un site multi-contaminé (As, Cd, Pb) sur une période de deux ans. Leur conclusion est que la technique est efficace, la concentration en ETM disponibles a été réduite (As -55,3 % ; Cd -85,8 % ; Pb -30,4 %). De plus, ils estiment leur coût à 37,7 \$US par mètre cube de sol et ils avancent que cette dépense est beaucoup plus faible que pour la plupart des technologies de remédiation classiques. Cependant, bien que novatrice, la phytoremédiation souffre de diverses limitations. Un des principaux freins concerne la durée de remédiation qui prend généralement plusieurs années. En effet, un certain nombre de cas de contamination peuvent nécessiter une action rapide rendant alors cette technique non-optimale. La productivité du végétal (biomasse) influence le degré de décontamination possible. D'autres facteurs en rapport avec les caractéristiques propres de la plante influencent l'efficacité du processus, à commencer par la profondeur du système racinaire, l'âge de la plante et sa tolérance aux conditions climatiques. Les propriétés du sol influencent la biodisponibilité des ETM et la spéciation de ceux-ci, jouant sur la capacité de mobilisation par la plante. Le niveau de contamination influence son utilisation, permettant principalement la décontamination de sols faiblement à moyennement pollués. Finalement, un dernier point concerne le fait qu'une plante remédiatrice est généralement résistante à un seul métal alors que les sites sont souvent multi-contaminés. À noter que lors d'une gestion inappropriée, les risques de contamination de la chaîne alimentaire sont en plus possibles (Ali et al., 2013 ; Mahar et al., 2016 ; Marques et al., 2009 ; Nouri et Haddioui, 2016 ; Tangahu et al., 2011).

Les plantes recherchées pour la gestion de sites contaminés sont donc des plantes combinant plusieurs caractéristiques : une production de biomasse élevée, un système racinaire profond, une grande tolérance aux ETM visés, une bonne adaptation aux conditions environnementales et faciles à cultiver (Ali et al., 2013). On notera aussi une préférence pour les espèces pérennes, car la décontamination nécessite généralement plusieurs années. Un élément supplémentaire qui pourrait rendre la phytoremédiation encore plus attrayante concerne les différentes voies de valorisation (bioénergie, processus industriels, engrais, etc.) possibles des végétaux collectés après traitement adéquat (Tangahu et al., 2011).

La phytoremédiation dans son application regroupe diverses techniques qui sont employées en fonction du type de milieu à remédier et du végétal à disposition. Ainsi, on retrouve la phytoextraction, la phytostabilisation, la phytovolatilisation, la phytodégradation la rhizodégradation et la rhizofiltration qui sont en partie reprises dans la figure 3.

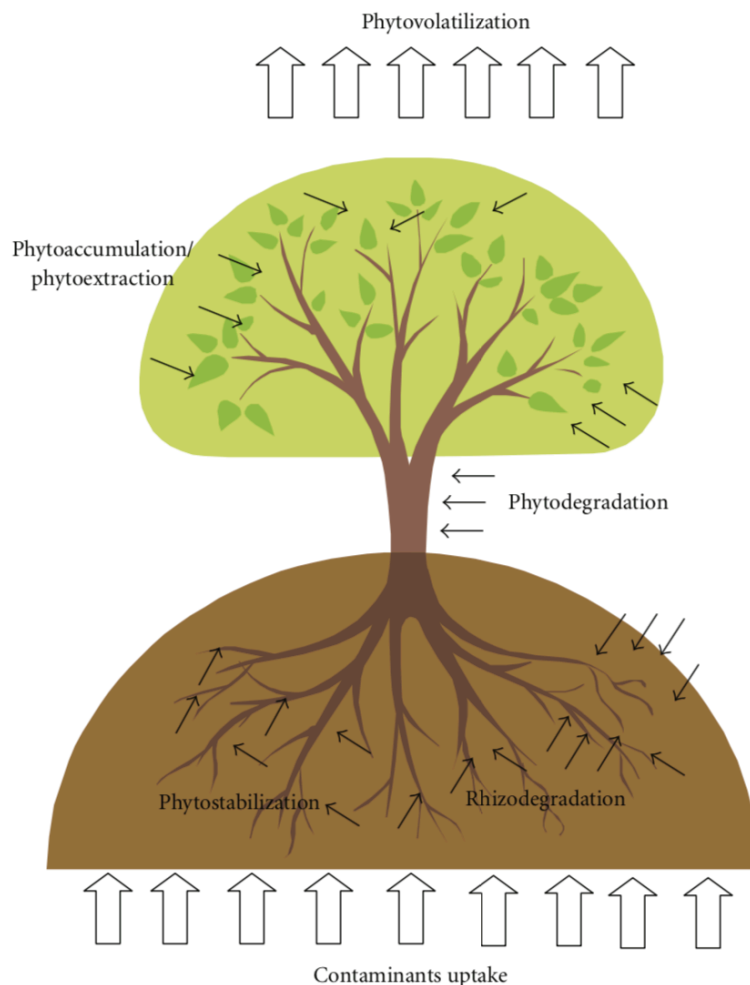


Figure 3 : les différentes techniques de phytoremédiation possibles pour un substrat pollué (Tangahu et al., 2011).

La phytovolatilisation consiste en la conversion d'un polluant en une forme volatile, suivie de sa libération dans l'atmosphère par le flux transpiratoire (Marques et al., 2009 ; Vithanage et al., 2012 ; Wang et al., 2012). Pour les ETM, elle implique surtout le sélénium intégré dans des molécules organiques volatiles et, dans une moindre mesure, le mercure. La phytodégradation permet de transformer un polluant organique en sous-produits non-toxiques à l'aide d'enzymes (Ali et al., 2013 ; Meagher, 2000). La rhizodégradation est la libération d'une large gamme d'exsudats par la plante qui stimulent la prolifération et la transformation de composés organiques par l'activité microbienne de la rhizosphère (Dzantor,

2007). La rhizofiltration est la filtration des eaux de surface, des eaux souterraines et même des eaux usées par le système racinaire, pour en diminuer la charge en polluants (Karkhanis et al., 2006). *In fine*, dans le cadre de ce mémoire, deux de ces techniques seront abordées et détaillées. Il s'agit de la phytoextraction et de la phytostabilisation

3.1 La phytoextraction

Cette technique concerne l'absorption des contaminants du sol via le système racinaire et sa translocation dans les parties aériennes. Elle repose sur l'efficacité du végétal à absorber, transférer et accumuler ces polluants dans les organes susceptibles d'être récoltés (Marques et al., 2009). L'utilisation de plantes hyperaccumulatrices ou du moins accumulatrices avec une production élevée de biomasse prend tout son sens pour cette stratégie. Une pratique dérivée de la phytoextraction est le « phytomining », qui lie à la fois une amélioration environnementale et une rentrée financière, via la récupération et le recyclage des métaux accumulés dans les parties aériennes. Néanmoins, bien que techniquement réalisable pour de nombreux métaux, cela ne semble économiquement viable que pour le nickel, le thallium et le cobalt (Anderson et al., 1999 ; Sheoran et al., 2009).

3.2 La phytostabilisation

Il ne s'agit pas d'une stratégie de décontamination à proprement parler, mais elle permet de limiter les mouvements des contaminants. En effet, les plantes employées ont ici pour rôle de réduire la mobilité et la biodisponibilité des polluants dans l'environnement (Ghosh et Singh, 2005). Ceci empêche leur migration vers les eaux de surface et souterraines, ainsi que l'entrée au sein de la chaîne alimentaire (Erakhrumen, 2007). L'immobilisation est possible par un phénomène de sorption racinaire, de précipitation, de complexion et/ou de modification de l'étage d'oxydation du contaminant (Ghosh et Singh, 2005). La phytostabilisation permet ainsi une stabilisation à long terme et le confinement du toxique. De plus, elle minimise les chances de lixiviation et de contamination des nappes phréatiques (Mendez et Maier, 2007)

3.3 Nouveaux concepts

3.3.1 Augmenter la biodisponibilité des ETM et la résistance des plantes dans une perspective de phytoextraction

Comme il a déjà été mentionné précédemment, les approches traditionnelles de la phytoremédiation souffrent d'un certain nombre de contraintes (longue période de remédiation, limitation de croissance des plantes hyperaccumulatrices, influence de la biodisponibilité, etc.). Cependant, l'acquisition de connaissances dans ce domaine a permis d'améliorer l'efficacité des méthodes classiques. La phytoremédiation assistée chimiquement est une de ces innovations. Il s'agit entre autres d'augmenter la biodisponibilité des ETM par l'ajout d'agents chélateurs (Sarwar et al., 2017). Ces derniers peuvent être d'origine synthétique dont les plus connus sont l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et l'éthylènediamine disuccinate (EDDS) (Evangelou et al., 2007 ; Meers et al. 2005). Les composés chélatants ont la particularité de former des complexes hydrosolubles avec les ETM favorisant leur désorption des particules du sol. De plus, l'ajout de ces agents abaissant le pH permet la formation de sels métalliques qui sont plus solubles dans les milieux acides que basiques (Alkorta et al., 2004 ; Saifullah et al., 2009). Néanmoins, il faut tenir compte que la présence d'agents chélateurs peut aussi favoriser à la fois la lixiviation des métaux ainsi que l'augmentation de l'importance de la zone contaminée. Il est aussi possible de booster chimiquement le développement de la plante cultivée en présence d'ETM, en ajoutant de l'acide salicylique qui est une molécule signal importante en cas de stress biotique et abiotique (Sarwar et al., 2017), ou par l'application de silicium, un élément non essentiel, mais qui s'avère bénéfique en conditions de stress et dont l'utilisation suscite de plus en plus d'intérêt (Adrees et al., 2015). Ainsi, lors d'une toxicité métallique le silicium améliorerait la tolérance de la plante. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer ce phénomène, en commençant par une réduction du prélèvement et de l'accumulation des ETM, la stimulation du métabolisme antioxydant, la réduction de l'inhibition de la photosynthèse et la formation de complexes entre le silicium et les ETM (Liu et al., 2013b ; Luyckx et al., 2017). Finalement, l'application d'un pré-traitement (acide salicylique et/ou silicium) permettrait d'améliorer les capacités de résistance ultérieure de la plante lors de l'exposition au toxique (Metwally et al., 2003).

3.3.2 Diminuer la biodisponibilité des ETM en vue de phytostabiliser le sol

Le biochar est un amendement dont l'utilisation en phytomanagement des sols est de plus en plus envisagée. Il s'agit d'un produit poreux issu de la pyrolyse de matières organiques. Les matières premières employées sont variées (bois, boues, matières végétales ou encore le fumier (Paz-Ferreiro et al., 2014)). Le biochar possède un certain nombre de caractéristiques qui le rendent intéressant pour une application sur sol contaminé. En effet, grâce à sa grande surface spécifique, il est capable de former de nombreux complexes avec des composés organiques et inorganiques par échange cationique ou par phénomène de sorption (Lu et al., 2012 ; Lucchini et al., 2014). Son alcalinité lui permet de diminuer la biodisponibilité des métaux et de favoriser la précipitation de ceux-ci. De plus, il est souvent mentionné que le biochar améliore la production de biomasse en moyenne de 10 % grâce à ses propriétés (capacité de rétention des éléments nutritifs et de l'eau, pH, capacité d'échange cationique importante, etc.) (Jeffery et al., 2011 ; Liu et al., 2013). En outre, il est rapporté qu'il pourrait aussi influencer positivement la population microbienne bénéfique du sol bien que les mécanismes ne soient pas encore très bien compris (Elad et al., 2011). D'autres amendements semblent eux aussi avoir un effet positif sur les plantes, améliorant leur potentiel de phytoremédiation. Ainsi, l'ajout de compost dans le sol peut favoriser la croissance des végétaux et augmenter l'activité microbienne. Il a pour effet de stabiliser les ETM, facilitant la germination et le développement des plantes (Chirakkara et Reddy, 2015). Les composés humiques qu'apporte le compost ont la capacité de former des complexes avec les métaux, favorisant leur absorption (Fiorentino et al., 2013). Finalement, l'ensemble des caractéristiques amélioratrices propres aux amendements permettraient l'utilisation de plantes légèrement moins résistantes aux ETM mais dont le comportement serait amélioré du fait d'une gestion phytotechnique adaptée.

Comme il a déjà été mentionné à plusieurs reprises, l'activité des microorganismes libres et/ou associés aux racines peut avoir un rôle primordial dans les processus de remédiation. Les mycorhizes en sont un bon exemple, car elles sont connues pour être largement présentes en association avec les plantes vasculaires. Ainsi, elles améliorent grandement l'absorption d'eau, d'éléments nutritifs, favorisent la résistance du végétal et peuvent moduler la composition des exsudats racinaires ainsi que modifier les caractéristiques physico-chimiques

du sol (Gaur et Adholeya, 2004). Néanmoins, il faut prendre en considération qu'une contamination trop importante affectera négativement les mycorhizes. Finalement, grâce aux bienfaits qu'apportent les macrobiotes, l'application d'inoculum microbien pourrait favoriser l'efficacité d'élimination des polluants par les espèces végétales, si le niveau de pollution permet une activité normale de ces organismes (Sarwar et al., 2017).

Pour finir, l'ingénierie génétique pourrait être une voie d'amélioration des aptitudes de la plante quant à la détoxification et/ou l'accumulation du toxique présent dans l'environnement. Il peut s'agir de la surexpression d'un ou plusieurs gène(s) impliqué(s) dans l'absorption, la translocation, la séquestration et la tolérance à l'encontre du polluant. Ou alors, il est question d'introduire un gène en provenance de microorganismes, de plantes ou d'animaux dans le patrimoine génétique de l'hôte, pour y accroître ses capacités de résistance envers le contaminant (Van Aken, 2008 ; Sarwar et al., 2017). Ainsi, Rugh et al. (1996) ont produit une plante transgénique d'*Arabidopsis thaliana* capable d'exprimer un gène bactérien codant pour une enzyme réductase de l'ion mercure, améliorant sa tolérance face à cet élément particulièrement toxique. Misra et Gedamu (1989) quant à eux, ont modifié des plantes de *Nicotiana tabacum* pouvant exprimer un gène de levure producteur de métallothionéines augmentant alors sa tolérance envers le cadmium.

4 Le chanvre industriel

Le chanvre industriel (*Cannabis sativa* L.) est une plante herbacée dicotylédone d'origine chinoise, de la famille des Cannabacées, considérée comme la seule espèce du genre *Cannabis*. Il est possible de distinguer deux variétés issues du chanvre, à savoir : la variété textile (*Cannabis sativa sativa*) et la variété « indienne » (*Cannabis sativa indica*) employée pour ses propriétés psychotropes (Piomelli et Russo, 2016).

Le chanvre est une plante annuelle dont la tige peut atteindre 1 à 4 mètres de hauteur et 1 à 3 cm de diamètre. Les ramifications sont peu présentes, mais les semis à densité faible favorisent l'obtention de tiges plus ramifiées tandis qu'une densité élevée produit majoritairement des tiges de grande taille (Bouloc, 2006). Le système racinaire est pivotant et profond, pouvant atteindre 2 mètres de profondeur. Les feuilles quant à elles, sont composées

d'un pétiole surmonté de 7 à 10 folioles lancéolées de taille inégale et s'insèrent sur la tige de façon opposée lors de la phase végétative. Un changement phyllotaxique s'opère vers une disposition alterne des feuilles en début de floraison. Le chanvre est une espèce naturellement dioïque avec un sex-ratio avoisinant les 50/50. Les inflorescences mâles sont agencées en grappes à l'extrémité de la tige sous forme de panicule, ne présentant que rarement des feuilles. Les inflorescences femelles forment à l'apex de la tige une cyme dense qui regroupe plusieurs épis à l'embranchement des nombreuses feuilles. Les fleurs mâles possèdent 5 sépales de couleur jaune, blanche ou verte entourant 5 étamines déhiscentes. Les fleurs femelles sont facilement différenciables des mâles. Elles sont dépourvues de pétales, mais possèdent 2 pistils (3 à 8 mm) qui ne renferment qu'un seul ovule dans l'ovaire. Les fleurs apparaissent par paires à l'aisselle des feuilles et sont supportées par des bractées, qui présentent de nombreux trichomes glandulaires, qui pour certaines variétés sont riches en cannabinoïdes. Cependant, il n'est possible de différencier le sexe de la plante qu'en début de floraison. Les fruits indéhiscents produits sont des akènes de forme plutôt sphérique (3 à 5 mm) (Boulloc, 2006 ; Paczesny, 2014 ; Botineau, 2010). On notera que les individus mâles étant souvent chétifs et donc moins intéressants pour la production, les sélectionneurs ont créé des variétés monoïques principalement à caractère femelle (Boulloc, 2006).



Figure 4 : inflorescence mâle en bas et femelle en haut (Sablons D. dans larousse.fr).

La tige de chanvre présente un ensemble de tissus concentriques spécifiques qui ont suscité une attention particulière depuis maintenant plusieurs siècles. En partant de la périphérie, on retrouve l'épiderme, le collenchyme, le phloème (primaire et secondaire) contenant des fibres (« bast fibers »), le cambium, le xylème (primaire puis secondaire) et la moelle. Les fibres primaires se différencient au départ du phloème primaire tandis que les fibres secondaires à partir du phloème secondaire. Chez le chanvre coexistent plusieurs types de fibres : les fibres xylémiennes riches en lignine, et les fibres phloémiennes riches en cellulose (aux alentours de 72 %) (Shahzad, 2012 ; Blake et al., 2008).

4.1 Utilisations

Les traces d'exploitation les plus anciennes du chanvre remontent à plus de 5000 ans au niveau de l'Asie (Li, 1974). Ses possibilités d'utilisation sont nombreuses et variées, mais un intérêt tout particulier a été porté à son application textile et médicale. Néanmoins, la culture du chanvre industriel a longtemps été limitée, car il pouvait être facilement confondu avec des variétés à haute teneur en Δ -9-tétrahydrocannabinol (THC), à savoir la marijuana (Nissen et al., 2010). En Europe, le règlement (CE) N° 206/2004 de la commission définit un cadre législatif autour de la culture du chanvre (Journal officiel de l'Union européenne, 2004). De plus, le règlement (CE) N° 1124/2008 de la Commission européenne stipule que les variétés de chanvre employées doivent avoir une teneur égale ou inférieure à 0,2% de THC (Journal officiel de l'Union européenne, 2008). Ainsi, la mise en place d'une réglementation a permis de faciliter la production de chanvre. La surface cultivée de chanvre au sein de l'Union européenne est passée de 8000 hectares à 33000 hectares entre 1994 et 2016 (Carus, 2017).

De nos jours, il existe de nombreuses valorisations des différents produits du chanvre industriel. Le chanvre peut notamment être utilisé dans le domaine du textile, des biocomposites, de la fabrication du papier, de l'automobile, de la construction, des biocarburants, de l'alimentation, des cosmétiques et soins personnels ainsi que de l'industrie pharmaceutique. Il est estimé que plus de 25000 produits seraient issus du chanvre (Chanvre wallon.be, 2014). On distingue trois grandes parties de la plante qui sont exploitées. La première concerne les tissus à l'extérieur du cambium correspondant entre autres au liber, avec les fibres phloémiennes « bast fibers ». Les fibres primaires sont relativement longues, de l'ordre de 20 à 50 mm tandis que les fibres secondaires sont plus courtes,

approximativement 2 mm. La deuxième est la zone intérieure au cambium, correspondant au noyau ligneux « woody core » aussi appelé chènevotte. Les tissus xylémiens y présentent des fibres lignifiées d'une longueur de 0,5 à 0,6 mm. Finalement, la troisième partie se rapporte aux graines de chanvre ou chènevis (Salentijn et al., 2015). Elles possèdent une valeur nutritionnelle importante, contenant aux alentours de 250–350 g/kg de lipides, 20–25 g/kg de protéines et 20–30 g/kg de glucides. De plus, elles sont particulièrement riches en acides gras essentiels pour l'organisme, l'acide linoléique (omega-3) et l'acide α -linoléique (omega-6) (Vonapartis et al., 2015).

Lors de la récolte du chanvre, les plantes subissent un processus de rouissage en étant soit laissées sur le champ ou immergées dans des bassins d'eau durant 2 à 3 semaines. L'eau et les microorganismes naturels vont alors décomposer la pectine, la lignine, la cire et d'autres composés mineurs pour faciliter le défibrage et obtenir une fibre textile de meilleure qualité (Paridah et al., 2011 ; Fike, 2016 ; Pickering et al., 2007). Concernant les rendements, Struik et al. (2000) rapportent que le chanvre pourrait produire jusqu'à 25 t/ha de biomasse sèche aérienne, qui contiendrait 12 t/ha de cellulose, mais cela étant fonction des conditions agronomiques et environnementales. Dans la réalité des faits, il semble que les tonnages soient plus faibles. En général, le chanvre produit 7 à 10 t/ha de cellulose, 1 à 3 t/ha de fibres (phloémiennes) et 0,7 à 1,8 t/ha de graines (Salentijn et al., 2015).

4.2 Le chanvre en phytoremédiation

Le chanvre industriel présente une série de caractéristiques qui le rendent prometteur pour une application en phytoremédiation. En effet, la production de biomasse est importante, son système racinaire est profond, il possède un cycle de vie court (180 jours) et il supporte une large gamme de conditions agroécologiques. De plus, il présente une grande capacité d'absorption et d'accumulation des ETM tels que le plomb, nickel, cadmium, zinc et chrome (Ahmad et al., 2016a).

Le comportement du chanvre lors d'une exposition métallique peut varier suivant le type de métaux considérés. Shi et Cai (2009) de même que Shi et al. (2009 et 2012) rapportent que le chanvre semble adopter un statut « d'excluser » lorsqu'il est en contact avec du Cd. La majorité de ce métal est en effet accumulée dans le système racinaire et le facteur de

translocation n'est, suivant les variétés, que de 3,15 à 12,7 %. Citterio et al. (2003) soulignent cette même tendance pour le Cd ainsi que pour le Ni. Une étude similaire, de Angelova et al. (2004), montre que la distribution des ETM chez le chanvre décroît selon cet ordre, racines > tiges > feuilles > graines. A contrario, Linger et al. (2002) rapportent que les plus grandes concentrations en ETM (Pb, Ni, Cd) se situent au niveau des feuilles. Ces auteurs estiment que le potentiel de phytoremédiation du Cd pourrait être de 126 g/ha sur la période de végétation complète. Concernant le Zn, *Cannabis sativa* aurait un taux de translocation élevé de sorte qu'il accumulerait en grande partie cet élément dans les parties aériennes (Malik et al., 2010 ; Kumar et al., 2017). Il ne semble donc pas y avoir de consensus au sein de la communauté scientifique sur l'organe majeur d'accumulation des ETM. Cette variabilité dans la distribution des ETM pourrait être fonction du métal lui-même, de la variété de chanvre employée, mais aussi des conditions agroécologiques propres à chaque site.

Meers et al. (2005) ont montré que le potentiel de phytoextraction du chanvre pourrait être amélioré par l'ajout d'agents chélateurs. Ainsi, l'EDTA permettrait une plus grande accumulation du Pb et du Cd alors que l'EDDS favoriserait l'absorption du Cu et du Ni (Kumar et al., 2017). Quant à la valorisation des différents tissus, leur utilisation commerciale semble en partie limitée par la présence d'ETM. Bien que le potentiel de translocation des ETM par la plante soit controversé suivant les auteurs, il semblerait que lorsque le chanvre se développe sous contrainte métallique, tous les organes sont affectés. Néanmoins, Linger et al. (2002) ont montré que la qualité des fibres n'est pas altérée par une exposition métallique et leur utilisation dans divers matériaux semble possible (Kumar et al., 2017).

5 Objectifs

Il s'agit dans le cadre de ce mémoire, d'étudier l'impact des ETM sur le chanvre industriel (*Cannabis sativa* L.) cultivé *in situ*, dans le but de préciser son intérêt en phytoremédiation de sites contaminés au cadmium, zinc et plomb.

Les objectifs spécifiques de l'étude sont :

- Déterminer dans quelle mesure une contamination multiple aux ETM influence morphologiquement et physiologiquement le chanvre industriel (racines, tiges, feuilles, graines) via une approche de terrain sur des parcelles expérimentales (en sachant que l'étude en conditions contrôlées a déjà été réalisée antérieurement).
- Préciser si l'exposition du chanvre à une pollution métallique (cadmium et zinc) en conditions contrôlées influence la qualité des fibres en vue d'une utilisation dans des processus industriels.
- De déterminer s'il est possible d'améliorer le comportement des plantes via un apport de biochar, de compost, ou de silicium.

Ce mémoire s'inscrit dans l'initiative MisChar soutenue dans le cadre du projet GESIPOL 2015 de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME) (ADEME, 2015). Celui-ci s'étend sur une période de 48 mois (2015-2020). Il est question d'étudier la culture de chanvre industriel comme culture alternative sur des sols contaminés et amendés de biochar de miscanthus avec l'ajout ou non de compost issu de déchets verts (ADEME, 2017)

Trois parcelles expérimentales situées dans le Nord-Pas de Calais, ont été sélectionnées pour réaliser les études *in situ*, il s'agit d'Evin-Malmaison (le plus contaminé), Courcelles-lès-Lens (moyennement contaminé) et Bois-Bernard (témoin non contaminé). Elles sont toutes les trois situées à proximité de l'ancienne fonderie de plomb et de zinc Métaleurop Nord, ayant totalement arrêté ses activités en 2003. Ainsi, les terres agricoles à proximité du site de production présentent des teneurs en éléments traces métalliques bien au-delà des normes fixées pour l'alimentation humaine et animale. L'idée sous-jacente à ce projet, serait la remédiation des sols multi-contaminés basée sur la réduction de la disponibilité environnementale et sanitaire des polluants. Il s'agirait donc de renforcer les compétences de gestion des sols contaminés par le développement d'une filière agricole basée sur la culture du chanvre industriel et la valorisation de cette biomasse pour la production de matériaux biosourcés. (Projets lauréats de l'Appel à Projets de Recherche GRAINE, 2017).

MATERIEL ET METHODES

Pour rappel, ce mémoire est composé de deux volets : un volet terrain et un volet microscopie portant sur des plantes cultivées en conditions contrôlées

6 Volet terrain

Dans le cadre du projet MisChar, une expérience de terrain a été mise en place sur une période de 2 ans (2018 – 2019). Ce mémoire porte en partie sur la continuité des suivis de culture réalisés durant l'année 2018 (cfr mémoire de Mathilde Blanquet (2018)).

6.1 Description des parcelles

Pour ce faire, 3 parcelles expérimentales ont été sélectionnées dans le nord de la France. Leur intérêt porte sur la proximité avec l'ancienne fonderie MetalEurop Nord, dont l'activité a cessé en 2003. Sur base de leur degré de contamination, Bois-Bernard (BB ; 50°22'50.7"N 2°55'10.8"E) est suffisamment éloignée pour constituer la parcelle témoin, Courcelles-lès-Lens (CLL ; 50°24'58.1"N 3°01'39.9"E) est la parcelle moyennement contaminée et Évin-Malmaison (EM ; 50°26'18.4"N 3°00'49.9"E) est celle dont la contamination est la plus importante (figure 5). Cependant, la parcelle d'Évin-Malmaison ne pourra pas être prise en considération dans le cadre de cette étude car, pour des raisons indépendantes de notre volonté, les plantations de chanvre n'ont pas pu être installées correctement.



Figure 5 : localisation des 3 sites autour de l'ancienne fonderie

L'exploitation de ces parcelles expérimentales a débuté en 2018 et s'est poursuivie en 2019. Chacune d'entre elles comporte 4 blocs distincts de 90 m² (9*10 m) associés à 4 modalités d'amendement à savoir : aucun amendement, biochar, compost, biochar + compost (figure 6). De plus, au sein de chaque bloc, un carré d'approximativement 1 m² a été délimité pour l'application foliaire de silicium. Les blocs sont séparés les uns des autres par une bande d'un mètre de large. Chaque bloc comporte une placette jointive de même surface sur laquelle du blé a été semé. Étant donné que les cultures expérimentales s'étalent sur une période de 2 ans, l'intérêt des placettes jointives est d'y instaurer une rotation entre les 2 années. Néanmoins, la culture de blé ne concerne pas le présent mémoire.

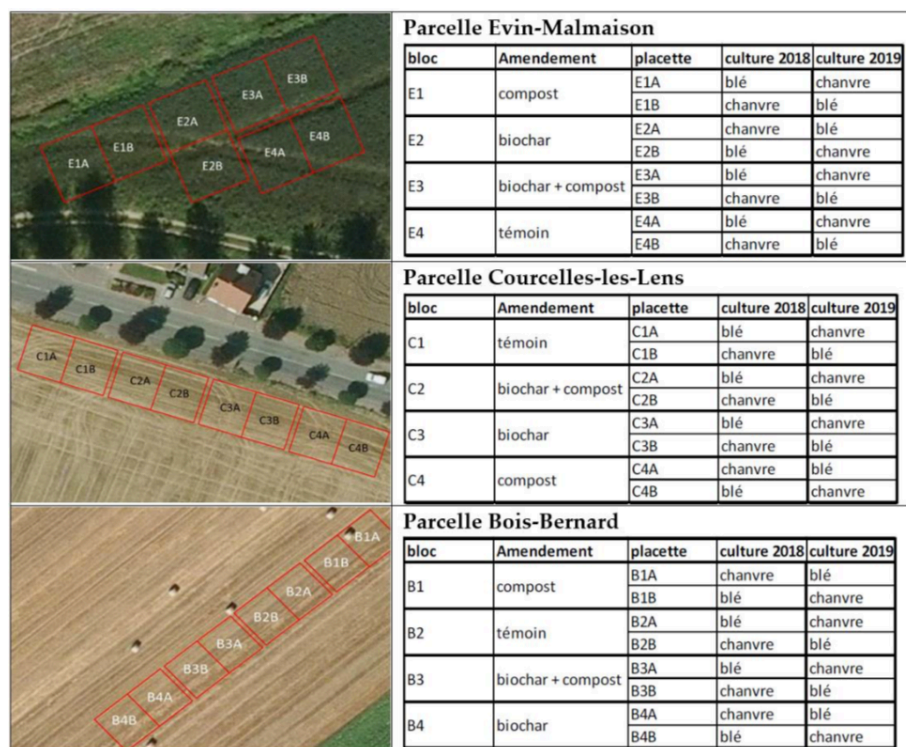


Figure 6 : disposition des blocs au sein de chaque parcelle, amendements, et rotation des cultures

6.2 Préparation des sols, semis et application de silicium

Avant le semis, les différents amendements sont appliqués sur les parcelles associées en vue d'améliorer le comportement des plantes cultivées. Pour le biochar, celui-ci provient de biomasse de miscanthus. Cette technique consiste en la pyrolyse du miscanthus à 500 °C durant 15 minutes. Le matériel utilisé provient à la fois d'une récolte effectuée en 2015 sur le site de MetalEurop Nord et d'une récolte de 2017 sur d'autres sites. Le compost quant à lui, provient de la plateforme Cucq gérée par Agriopale. Ce dernier est composé uniquement de

déchets verts récoltés par les collectivités locales, en provenance de déchetteries ou encore de professionnels. L'obtention de ce compost nécessite dans un premier temps un broyage suivi d'une mise en tas durant une période minimale de 6 mois, pour permettre une fermentation optimale. Durant ce laps de temps, les tas seront régulièrement retournés pour aérer et homogénéiser le substrat en formation. Ensuite, les tas sont tamisés pour séparer la fraction fine (le compost) des fractions intermédiaires et grossières.

L'épandage des amendements a été effectué en 2018 sur des sols préalablement labourés au moyen d'un épandeur agricole. Les doses, appliquées seules ou en mélange, sont de 5,2 kg/m² de biochar de miscanthus (soit 2 % m/m, poids sec) et de 2 kg/m² de compost (soit 20 tonnes par hectare).

Dans le cadre de cette expérience, la variété de chanvre Futura 75 est utilisée. Elle est la plus communément utilisée dans le nord de la France depuis 3 ans et son intégration dans le projet MisChar fait partie du cahier des charges. En 2018, le semis a été réalisé mi-avril (moins d'un mois après l'incorporation des différents amendements), tandis qu'en 2019 il a été réalisé mi-mai.

La première application du silicium (2 mM) a été réalisée 1 mois et demi après le semis. Pour ce faire, un carré d'approximativement 1 m² a été délimité dans chaque bloc des différentes parcelles au moyen d'une banderole de couleur. L'application du silicium a été réalisée chaque semaine au pulvérisateur à main. La solution a été appliquée de haut en bas sur chaque feuille en veillant bien à l'apparition de microgouttelettes, ce qui représente une utilisation de 0,75 L par carré.

6.3 Teneur, biodisponibilité des métaux et paramètres agronomiques des sols

Dans le cadre du partenariat avec l'université de Lille pour le projet MisChar, nous avons pu obtenir les informations de teneur et de biodisponibilité des éléments dans le sol avant la mise en place des cultures de la première année (2018), ainsi que les paramètres agronomiques (tableau 3).

L'analyse des teneurs en métaux porte sur les 20 premiers centimètres du sol. Celle-ci confirme que Bois-Bernard constitue la parcelle témoin, car les concentrations ne dépassent pas les valeurs considérées comme polluées. Néanmoins, une légère contamination au plomb est présente, et pourrait être due à des éclats d'obus datant de la Première Guerre mondiale. De plus, l'analyse met bien en évidence le gradient de contamination avec Courcelles-lès-Lens

qui est la parcelle moyennement contaminée et Évin-Malmaison la plus contaminée. La biodisponibilité des métaux est toutefois relativement faible. On peut dès lors considérer que le Cd, Cu, Pb et Zn sont peu disponibles pour la plante.

Le pH et la CEC quant à eux, ont été mesurés de la même manière, à savoir dans les 20 premiers centimètres du sol par l'équipe du projet MisChar. Les résultats montrent que le pH est proche de la neutralité pour la parcelle Bois-Bernard (témoin) tandis que les parcelles Courcelles-lès-Lens et Évin-Malmaison sont plutôt à tendance alcaline. La capacité d'échange cationique (CEC) est relativement similaire entre les 3 parcelles. Pour ce qui est du K^+ , Mg^{2+} , Na^+ les concentrations sont identiques sauf pour le Ca^{2+} , où elles sont plus importantes.

Tableau 3 : concentration et disponibilités environnementales du Cd, Cu, Pb, Zn ainsi que les paramètres agronomiques des 3 parcelles

			Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn	pH eau	Calcaire total	P ₂ O ₅	CEC	Ca	K	Mg	Na
			Concentrations pseudo-totales				Concentrations extraites CaCl ₂ 0,01M				Disponibilité environnementale				NF ISO 10390	NF 50 10693	NF X31-161	NF X31-130				
			mg kg ⁻¹ PS				mg kg ⁻¹ PS				%					g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	cmol kg ⁻¹				
Bois-Bernard	Témoin	B2A-3-TO	1,14	15,6	156,1	79,2	0,04	0,61	0,64	0,03	3,52	3,92	0,41	0,04	72	0,61	0,16	18,7	11,65	0,54	0,89	<LD
		B2B-3-TO	0,99	15,6	256,9	78,5	0,04	0,61	0,64	0,28	4,03	3,92	0,24	0,36	7,1	0,55	0,13	17,3	11,37	0,88	0,94	<LD
	Compost	B1A-1-TO	1,14	14,9	74,1	82,1	0,05	0,61	0,64	0,04	4,39	4,09	0,86	0,05	7	0,12	0,15	17,07	11,98	0,52	0,73	<LD
		B1B-3-TO	1,08	15,2	169,5	81,8	0,05	0,61	0,64	0,17	4,64	4	0,38	0,2	7,1	0,3	0,11	17,53	11,94	0,46	0,83	<LD
	Biochar	B4A-1-TO	1,13	14,9	308,8	84,6	0,05	0,61	0,64	0,05	4,43	4,09	0,21	0,06	6,9	0,79	0,14	17,81	10,61	1,05	0,88	0,01
		B4B-3-TO	1,09	13,5	384,6	73,2	0,05	0,61	0,64	0,11	4,59	4,53	0,17	0,15	6,6	0,22	0,11	17,11	10,14	0,47	0,83	<LD
	Biochar et compost	B3A-3-TO	1,11	15,4	316,2	85,6	0,05	0,61	0,64	0,04	4,52	3,97	0,2	0,05	7,3	0,65	0,2	16,89	10,88	0,76	0,88	0,01
		B3B-2-TO	1,21	15	395,3	82,3	0,05	0,61	0,64	0,02	4,14	4,08	0,16	0,02	7,1	0,69	0,16	17,63	12,21	0,88	0,84	0,04
Courcelles les Lens	Témoin	C1A-3-TO	5,34	22,5	291,3	373,9	0,05	0,61	0,64	0,26	0,94	2,71	0,22	0,07	7,8	3,51	0,27	19,82	16,31	1,23	0,73	<LD
		C1B-2-TO	5,53	27,3	306,4	410,5	0,05	0,61	0,64	0,25	0,9	2,24	0,21	0,06	7,8	2,68	0,27	19,12	16,91	0,8	0,55	<LD
	Compost	C4A-1-TO	5,82	24,6	309,9	427,7	0,05	0,61	0,64	0,21	0,86	2,48	0,21	0,05	8	5,88	0,27	16,1	16,78	0,84	0,43	<LD
		C4B-3-TO	5,06	21,1	252,5	337,2	0,05	0,61	0,64	0,04	0,99	2,89	0,25	0,01	8,1	8,69	0,29	15,45	22,03	0,49	0,69	<LD
	Biochar	C3A-3-TO	5,65	22,1	292,2	382,4	0,05	0,61	0,64	0,14	0,89	2,76	0,22	0,04	7,9	3,94	0,37	15,24	14,8	0,82	0,56	<LD
		C3B-2-TO	5,81	27	324,1	434,1	0,05	0,61	0,64	0,27	0,96	2,26	0,2	0,06	8	6,73	0,33	14,77	17,7	0,75	0,42	<LD
	Biochar et compost	C2A-2-TO	5,52	26,4	307,4	412,5	0,05	0,61	0,64	0,12	0,91	2,31	0,21	0,03	7,9	5,67	0,27	17,89	15,84	1,76	0,53	<LD
		C2B-1-TO	5,61	23,8	302,6	393,1	0,05	0,61	0,64	0,14	0,89	2,56	0,21	0,03	7,8	5,56	0,31	17,57	15,92	1,81	0,61	<LD
Evin-Ma Inaï bon	Témoin	E4A-1-TO	8,89	19,4	440,2	596,6	0,06	0,61	0,64	0,12	0,63	3,14	0,15	0,02	8,2	0,33	0,24	15,03	25,79	0,53	0,84	<LD
		E4B-2-TO	8,65	20,7	448,2	605,6	0,06	0,61	0,64	0,39	0,65	2,95	0,14	0,07	8,3	0,38	0,16	18,8	25,45	0,54	0,84	<LD
	Compost	E1A-2-TO	9,57	24,3	481,5	679,8	0,07	0,61	0,64	0,21	0,73	2,51	0,13	0,03	8,1	0,35	0,13	16,98	21,48	0,59	1,04	<LD
		E1B-1-TO	9,43	23,2	493	683,6	0,05	0,61	0,64	0,38	0,53	2,62	0,13	0,06	8,3	0,58	0,44	17,54	53,47	0,63	1,92	<LD
	Biochar	E2A-1-TO	9,99	23,3	521,3	714,8	0,05	0,61	0,64	0,12	0,5	2,62	0,12	0,02	8,2	0,48	0,33	19,21	28,28	0,59	1,09	<LD
		E2B-3-TO	9,17	20,4	474,8	633,3	0,07	0,61	0,64	0,14	0,75	2,99	0,13	0,02	8,2	0,23	0,21	16,7	17,97	0,71	0,56	<LD
	Biochar et compost	E3A-1-TO	9,63	22,4	504	622,7	0,08	0,61	0,64	0,17	0,83	2,72	0,13	0,03	8,1	0,52	0,17	18,46	18,58	0,65	0,72	<LD
		E3B-1-TO	10,03	22,5	506,8	692,4	0,06	0,61	0,64	0,34	0,6	2,71	0,13	0,05	8,2	0,48	0,14	18,93	22,57	0,88	0,46	<LD

6.4 Mesures et récoltes du matériel frais

Trois séries de mesures et de récoltes ont été réalisées sur le terrain : le 1 août, le 2 septembre et le 17 septembre 2019. À chaque reprise, la conductance stomatique, les échanges gazeux, la fluorescence de la chlorophylle, la teneur volumétrique en eau du sol et les conditions météorologiques (température et humidité de l'air) ont été mesurés. De plus, 5 plantes par bloc et par parcelle ont été récoltées pour un total de 40 plantes pour les 2 premières séries de mesures (5 plantes * 4 blocs * 2 parcelles) tandis que pour la dernière série de mesures, 80 plantes ont été récoltées (5 plantes non traitées au silicium + 5 plantes traitées au silicium * 4 blocs * 2 parcelles). Pour chaque bloc, les feuilles ont été rassemblées dans une enveloppe en fonction des amendements et de l'exposition ou non au silicium. Ces dernières ont été placées à l'étuve à 60 C durant 48 h. Le même procédé a été appliqué pour les tiges, mais au vu de leur taille importante, ces dernières ont été rassemblées par fagot et séchées en dehors de l'étuve.

6.5 Mesure des paramètres physiologiques

Les paramètres physiologiques ont été mesurés sur la troisième paire de feuilles entièrement développées en partant du haut de la plante. Ceci permet de prendre en considération un âge physiologique similaire des feuilles de chaque traitement.

6.5.1 Conductance stomatique

Un poromètre à diffusion Delta-T, de type AP₄ a permis d'estimer la conductance stomatique qui est un indicateur de l'état physiologique de la plante, permettant d'appréhender son statut hydrique et de stress potentiel. L'appareil ne mesure pas directement la transpiration, mais la résistance des stomates aux échanges gazeux. Pour ce faire, une portion de la feuille est placée dans une chambre où de l'air sec est introduit. L'appareil mesure sur une durée de temps l'augmentation d'humidité relative émise par la plante par effet de transpiration et diffusion.

6.5.2 Échanges gazeux

L'« infrared gas analyser » (IRGA) permet de mesurer la photosynthèse nette (A), la transpiration instantanée (E) et la concentration en CO₂ intercellulaire (Ci). Pour cela, une

portion du limbe est placée dans une pince prévue à cet effet, possédant une chambre de mesure. La différence de concentration en CO₂ entre l'air entrant et sortant de la chambre est alors mesurée.

6.5.3 Fluorescence de la chlorophylle

Le fluorimètre (Fluorescence monitoring system ; Hansatech Instruments) permet de mesurer l'efficacité potentielle du photosystème II. Pour réaliser ces mesures, il est nécessaire qu'une partie du limbe soit placée à l'obscurité durant au minimum 30 minutes, et ce, au moyen d'une pince possédant un disque d'obturation. Après l'acclimatation, l'appareil est relié à la pince et mesure la fluorescence minimale de la chlorophylle (F_0). Ensuite, un flash lumineux d'une seconde de lumière saturante de 18 000 $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$ est appliqué pour saturer les centres réactionnels et la fluorescence maximale (F_m) est mesurée. Avec ces données, l'appareil calcule la fluorescence variable ($F_v = F_m - F_0$). Par après, une lumière constante est envoyée durant 2 minutes (« Actinic light » : AL 660 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$). Un nouveau flash d'une intensité de 18 000 $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$ est appliqué, permettant de mesurer la fluorescence maximale du photosystème adapté à l'obscurité (F_m') ainsi que la fluorescence de base en présence d'une lumière constante (F' ou F_s).

Les paramètres pris en compte sont :

- l'efficacité potentielle du photosystème II donne une quantification de la stabilité du PSII, particulièrement au niveau de la structure de ses membranes

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

- l'efficacité du photosystème II (ϕ_{PSII}), qui donne la proportion de la lumière absorbée par la chlorophylle du PSII qui est utilisée pour les réactions de la photosynthèse,

$$\phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'}$$

- le « photochemical quenching » (qP) qui donne la proportion de centres réactionnels du PSII qui sont ouverts,

$$qP = \frac{F_m' - F_s}{F_m' - F_0}$$

- le « non-photochemical quenching » (NPQ) qui quantifie la dissipation de la lumière absorbée sous forme de chaleur.

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

Les paramètres ont été estimés par les équations de Maxwell et Johnson, 2000.

6.6 Teneur volumétrique en eau du sol et conditions météorologiques

La teneur volumétrique en eau du sol a été mesurée au moyen d'une sonde de type ... Les conditions météorologiques ont été mesurées via un enregistreur de température et d'humidité relative « Tinytag View 2 ».

6.7 Minéralisations

Les minéralisations ont été réalisées sur les tiges et les feuilles récoltées les 1 août, 2 et 17 septembre 2019. Les tiges ont été préalablement coupées en trois sections de 10 cm, correspondant au sommet, au centre et à l'extrémité inférieure de la tige. Les 3 sections de l'ensemble des plantes d'un même traitement ont été poolées avant d'être minéralisées.

6.7.1 Dosage du Cd, Pb et Zn

Le dosage du Cd, Pb et Zn est réalisé sur les tiges et feuilles de chanvre, préalablement séchées à l'étuve à 60°C puis broyées à l'aide d'un mixeur pour les tiges et au moyen d'un mortier-pilon pour les feuilles. 500 mg de matière sèche sont pesés et transférés dans un creuset en porcelaine. Ces derniers sont placés au four avec une montée progressive de la température par paliers de 50°C jusque 500°C, et passent 24 heures à 500°C. Les résidus sont ensuite récupérés et transférés dans un erlenmeyer de 50 ml. 1 ml d'acide nitrique concentré (HNO₃ 35 %) est ajouté dans le creuset ayant contenu les cendres et transféré dans l'erlenmeyer. L'opération est répétée une seconde fois pour s'assurer de récupérer un maximum de cendres. Le contenu de l'erlenmeyer est ensuite évaporé sur plaque chauffante à 150 °C. Les résidus sont ensuite repris par dissolution à l'eau régale (1,5 ml d'acide chlorhydrique concentré (37%) et 0,5 ml d'acide nitrique concentré (35%)) dans chaque erlenmeyer sur plaque chauffante (quelques minutes avec une soucoupe par-dessus, pour éviter de perdre

du liquide. La solution est alors transférée dans un ballon jaugé de 25 ml et portée au trait avec de l'eau déminéralisée. Le contenu est ensuite filtré sur papier-filtre Whatman et récupéré dans un tube Falcon de 15 ml. Le blanc est réalisé de la même manière sans échantillon. Pour le dosage, les échantillons doivent être à température ambiante et sont dosés au moyen d'un spectrophotomètre d'émission plasma à couplage inductif (ICP- AES).

6.7.2 Dosage silicium

Le dosage du silicium est réalisé sur du matériel sec (feuilles et tiges), préalablement séché à l'étuve à 60 C puis broyé. Entre 0,7 g et 1,0 g de matière sèche sont pesés et transférés dans un creuset en porcelaine. Ces derniers sont placés au four à 500 C durant 24 heures. Les résidus sont ensuite récupérés, en veillant bien à les homogénéiser avec une spatule, avant d'y ajouter 0,4 g de tétraborate et 1,6 g de métaborate. Ce mélange est transféré, pour chaque échantillon, dans un creuset en graphite et placé dans un four durant 5 minutes à 1000°C. Une fois l'échantillon sorti du four, il est laissé à refroidir avant d'être transféré dans un erlenmeyer de 100 ml ; 50 ml d'acide nitrique dilué sont ajoutés en prenant soin de placer l'erlenmeyer sur plaque chauffante à 100 C jusqu'à dissolution complète. La solution est transférée dans un ballon jaugé de 100 ml, l'erlenmeyer est rincé avec de l'acide nitrique dilué et la solution de rinçage est transférée dans le ballon jaugé contenant l'échantillon. Le ballon jaugé est porté au trait de jauge avec de l'acide nitrique dilué et la solution finale est transférée dans un récipient en plastique. Le silicium est dosé au moyen d'un spectrophotomètre d'émission plasma à couplage inductif (ICP- AES).

6.8 Mesures des propriétés des fibres

En vue d'évaluer la qualité des fibres formées, 3 fois 1 mètre carré de plantes de chaque parcelle et de chaque bloc ont été récoltées et soumises au processus de rouissage afin d'en extraire les fibres. Le paramètre suivant a été évalué : l'analyse du titre (masse linéique).

7 Volet microscopie

Afin de compléter l'évaluation de la qualité des fibres formées au sein de plantes cultivées sur sites contaminés, une analyse en microscopie confocale de certains composants des parois cellulaires a été réalisée par immunohistochimie.

7.1 Préparation du matériel végétal et application du stress métallique

Les plantes utilisées sont issues d'une culture réalisée avant le présent mémoire par Marie Luyckx. Afin de cibler l'effet spécifique de certains ETM (Cd et Zn) sur les fibres, les plantes ont été cultivées en hydroponie en phytotron (conditions contrôlées). Pour ce faire, des graines de chanvre ont été mises en germination dans du terreau. 42 des plantules ont été transférées individuellement 7 jours plus tard en solution hydroponique (Hoagland) dans des pots de 5L. Un système d'aération des solutions a été mis en place afin d'assurer un apport en oxygène dissous. Après un temps d'acclimatation d'une semaine, une solution d' H_2SiO_3 2 mM est ajoutée à 21 des 42 plantes, de manière à obtenir une concentration finale de 2mM. Le stress métallique a été appliqué la semaine suivante, par l'ajout d'une solution de CdCl_2 pour 14 plantes dont 7 ayant reçu le traitement silicium et d'une solution de ZnCl_2 pour 14 plantes dont 7 ayant reçu le traitement silicium, de manière à obtenir une concentration finale de 20 μM de CdCl_2 et de 100 μM de ZnCl_2 . Il y a donc 6 lots de plantes ayant reçu des traitements différents, et dénommés comme suit : témoin (T), témoin + silicium (TSi), cadmium (Cd), cadmium + silicium (CdSi), zinc (Zn), zinc + silicium (ZnSi). Les plantes sont exposées au stress métallique pendant 7 jours avant d'être récoltées. L'ensemble de la culture a été réalisée en conditions contrôlées (phytotron) : $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en moyenne, de jour comme de nuit, 65% d'humidité relative et photopériode de 16h avec une intensité lumineuse minimale de 230 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

7.2 Fixation, inclusion et obtention des coupes sériées

La première étape consiste en la fixation du matériel frais préalablement récolté, à savoir la section de tiges de chanvre prélevée au niveau du « snap point ». Le « snap point » constitue une zone où la tige est encore suffisamment souple pour permettre de réaliser des coupes sériées sans endommager les tissus. De plus, en cet endroit, les fibres phloémiennes primaires et secondaires sont généralement visibles. Ces dernières sont fixées dans un fixateur formol – acide acétique – éthanol (FAA) et les objets sont conservés dans une solution de FAA. L'inclusion est réalisée dans de la paraffine. Pour ce faire, les objets sont progressivement déshydratés via une série de bains : 2 h dans de l'éthanol 70 %, puis 2 h dans de l'éthanol 96 %, suivi de 2 h dans un mélange éthanol 96 % : butanol (2/3 : 1/3) ensuite, 2 h dans un mélange éthanol 96 % : butanol (1/3: 2/3) après, les objets sont laissés 12 h dans une solution de

butanol contenant quelques gouttes d'érythrosine et finalement, sont rincés au butanol durant 5 minutes. Pour l'étape d'infiltration, les objets sont placés en contact avec une solution de butanol ainsi que quelques pastilles de paraffine et sont placés à l'étuve durant 12h à 37 C puis déplacés à 60°C durant 12 h. Pour chaque période de 12 h, la paraffine sera changée 2 fois. L'enrobage est réalisé dans des récipients en porcelaine préalablement enduits de glycérine. La paraffine fondue y est versée et les échantillons sont prélevés et orientés à l'aide d'une pince chauffée à la flamme. Une fois la solidification partielle de la paraffine, le récipient est plongé rapidement dans de l'eau froide. Pour la réalisation d'une série de coupes, chaque objet est isolé à l'aide d'une lame de scalpel et fixé sur un support à microtome au moyen de paraffine fondue. Les objets ont été coupés à une épaisseur de 10 µM et montés sur une lame préalablement enduite d'une goutte de solution Haupt. Les rubans de sections sériées sectionnées sont déposés dans un bain-marie à 40°C et les objets sont finalement incorporés en les repêchant via la lame porte-objet. L'excès de liquide est éliminé et les lames sont séchées durant 24 h à température ambiante avant utilisation.

7.3 Immunohistochimie

L'immunohistochimie à proprement parler nécessite une étape de préparation des échantillons. Il est tout d'abord nécessaire d'enlever la paraffine de ceux-ci via une série de bains (repris dans le tableau ci-dessous), en veillant préalablement à passer très rapidement les lames à la flamme afin d'accélérer la dissolution.

Histoclear I	30 minutes
Histoclear II	10 minutes
Histoclear / butanol	5 minutes
Butanol	5 minutes
Butanol / ethanol 96 %	5 minutes
Éthanol 96 %	5 minutes
Éthanol 70 %	5 minutes
Éthanol 50 %	5 minutes
Éthanol 30 %	5 minutes
Eau distillée	5 minutes

7.3.1 Marquage du xylane

L'anticorps primaire à préparer est le LM10 xylan qui sera dilué 10 fois dans une solution de protéines de lait (MP) elle-même préparée avec un tampon phosphate salin 5 % (PBS). Il faut

compter 400 µl de solution d'anticorps dilué 10 fois par lame contenant 3 coupes d'objets. Avant l'incubation des échantillons avec l'anticorps, ces derniers sont recouverts d'un tampon MP/PBS 5 % durant 5 minutes. Ensuite, 400 µl de solution LM10 xylan dilué 10 fois par lame seront étalés et l'ensemble sera incubé 1h30 dans une boîte fermée pour éviter l'évaporation. Après, 3 rinçages de 5 minutes chacun sont réalisés avec du PBS dilué 20 fois en veillant bien à éponger l'excédent de liquide au moyen d'un papier absorbant. L'anticorps secondaire anti-rat IgG couplé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) est alors dilué 100 fois dans le tampon MP/PBS 5 %, en comptant toujours 400 µl par lame. Après une nouvelle incubation 1h30 avec l'anticorps secondaire sur glace à l'obscurité, 3 rinçages de 5 minutes chacun sont à nouveau réalisés avec du PBS dilué 20 fois en épongeant l'excédent de liquide. Les échantillons peuvent alors être passés au microscope confocal à la valeur d'excitation de 488 nm, filtre HFT 488/594 et à la valeur d'émission enregistrée avec LP 505.

7.3.2 Marquage de la cellulose

L'anticorps primaire carbohydrate binding module (CBM3a Crystalline cellulose-directed CBM) est préparé dans le tampon MP/PBS 5 % de manière à obtenir une concentration de 10 µg/ml en tenant compte qu'il faut 400 µl de solution d'anticorps par lame. Avant l'incubation des échantillons avec l'anticorps, ces derniers sont recouverts de tampon MP/PBS 5 % durant 5 minutes puis 400 µl de solution CBM3 à 10 µg/ml par lame sont étalés et laissés incuber 1h30 dans une boîte fermée pour éviter l'évaporation. Après, 3 rinçages de 5 minutes chacun sont réalisés avec du PBS dilué 20 fois en veillant bien à éponger l'excédent de liquide au moyen d'un papier absorbant. L'anticorps secondaire monoclonal anti-His de souris est dilué 100 fois dans le tampon MP/PBS 5 %, en comptant toujours 400 µl par lame. L'ensemble est incubé 1h30 avec l'anticorps secondaire à l'obscurité puis 3 rinçages de 5 minutes chacun sont à nouveau réalisés avec du PBS dilué 20 fois en épongeant l'excédent de liquide. L'anticorps tertiaire anti-souris IgG couplé à FITC (isothiocyanate de fluorescéine) est dilué 50 fois dans le tampon MP/PBS 5 %, en comptant toujours 400 µl par lame avant une nouvelle incubation durant 1h30 avec l'anticorps tertiaire à l'obscurité. Encore une fois, 3 rinçages de 5 minutes chacun sont réalisés avec du PBS dilué 20 fois en épongeant l'excédent de liquide. Les échantillons peuvent alors être passés au microscope confocal à la valeur d'excitation de 488 nm, filtre HFT 488/594 et à la valeur d'émission enregistrée avec LP 505.

8 Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été traités avec le logiciel R studio (*The R Project for Statistical Computing*, version 1.1.456). Les données ont été analysées au moyen de l'analyse de la variance (ANOVA) à plusieurs facteurs. Lorsque les conditions d'application de l'ANOVA sont respectées, le test de Tukey (p valeur <0.05) a été employé. En cas de non-respect des conditions d'application, nous avons réalisé les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis, et de Willcoxon en fonction de la situation

RESULTATS

9 Expériences de terrain

9.1 Suivi des paramètres physiologiques des plantes

Les résultats des expériences de terrain sont présentés de manière cinétique, en fonction des différentes dates de mesures (1 août, 2 et 17 septembre), ainsi que leur implication dans les deux phases de la photosynthèse. Pour rappel, la phase claire concerne la production d'ATP et de NADPH par conversion de l'énergie lumineuse, tandis que la phase sombre, permet la fixation du CO₂ atmosphérique et sa transformation en carbohydrates.

9.1.1 Phase claire de la photosynthèse

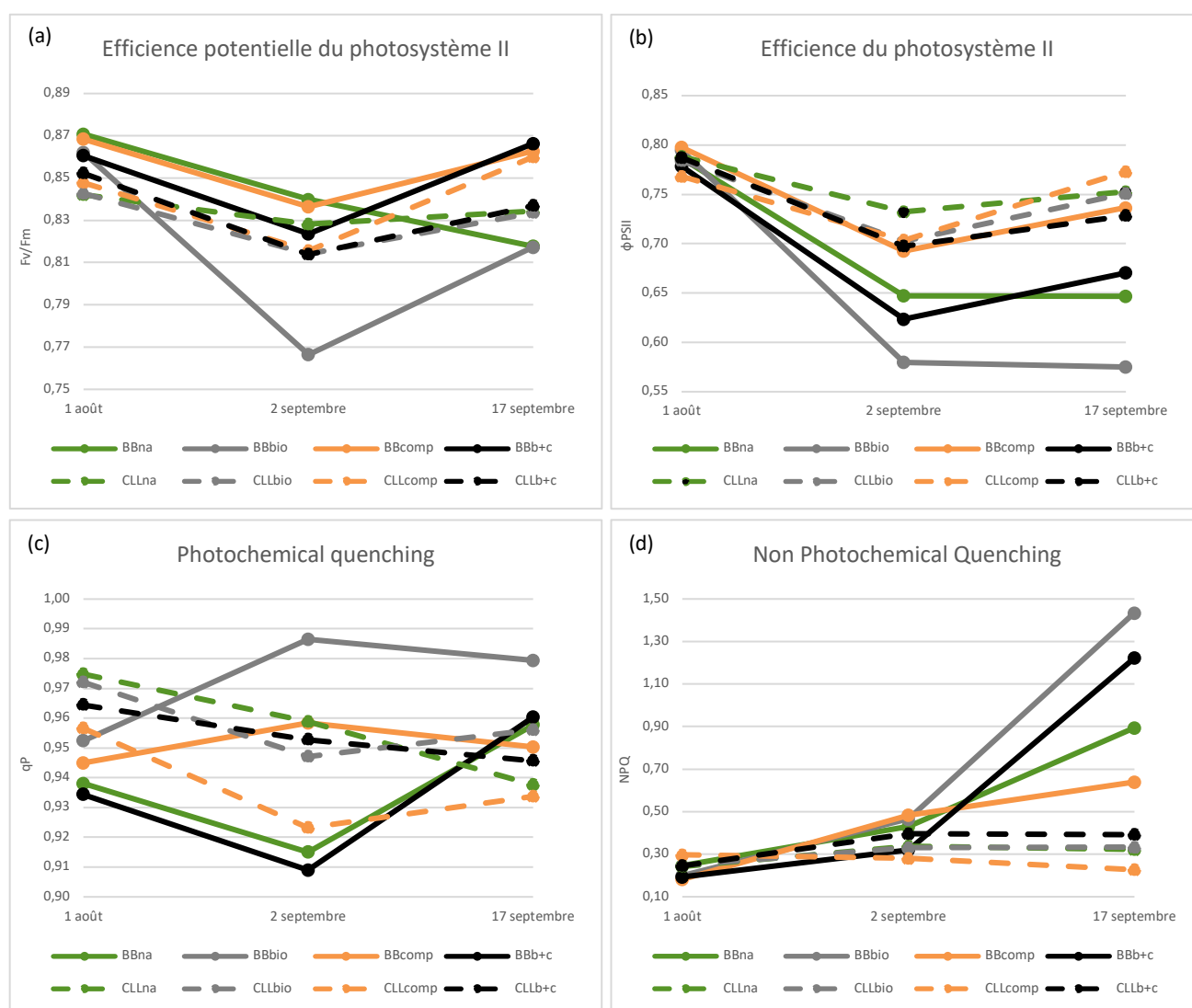


Figure 7 : représentation graphique de l'évolution des paramètres physiologiques de la phase claire de la photosynthèse en fonction des différentes dates de mesures. BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens ; na : non amendé ; bio : biochar ; comp : compost ; b+c : biochar + compost.

Tout d'abord, il apparaît que les paramètres de la phase claire de la photosynthèse varient peu entre les plantes cultivées dans les différentes conditions. En effet, lors de la première série de mesures (le 1er août), l'efficacité du photosystème II (figure 7b), le photochemical quenching (figure 7c) et le non photochemical quenching (figure 7d) des plantes sont statistiquement similaires quels que soient la parcelle ou l'amendement considérés. Quant à l'efficacité potentielle du photosystème II (figure 7a), elle est significativement plus élevée pour les plantes du bloc non amendé de la parcelle BB par rapport à celui des plantes de CLL. Concernant la deuxième prise de mesures (le 2 septembre), il ressort à nouveau que l'efficacité du photosystème II (figure 7b) et le non photochemical quenching (figure 7d) ne sont pas significativement différents d'une parcelle à l'autre, et d'un amendement à l'autre. Il en va de même pour l'efficacité potentielle du photosystème II, ce qui n'était pas le cas lors de la première série de mesures.

Finalement, pour ce qui est de la dernière série de mesures, aucun des paramètres de la phase claire de la photosynthèse n'est significativement différent, en dehors du non photochemical quenching (figure 7d) qui présente une augmentation importante des valeurs pour le biochar et le biochar + compost au niveau de BB.

Par ailleurs, lorsque l'on s'intéresse à l'ensemble de la période de prise de données (tableau 4), pour l'efficacité potentielle du photosystème II, les valeurs restent relativement stables sur l'ensemble de la période, mis à part une diminution le 2 septembre pour les plantes du traitement BB biochar. Les valeurs d'efficacité du photosystème II, quant à elles, diminuent le 2 septembre avant de se stabiliser ou de remonter le 17 septembre. Pour le photochemical quenching, les valeurs oscillent d'une date à l'autre. Quant au non photochemical quenching, les valeurs tendent à croître au cours du temps mais cette augmentation n'est significative que pour le 17 septembre pour les amendements biochar et biochar + compost de la parcelle BB. En cette date du 17 septembre, il peut à priori sembler paradoxal de constater que les valeurs de Φ_{PSII} soient plus élevées pour les plantes cultivées sur le site contaminé de CLL que pour celles cultivées sur le site témoin de BB alors que la situation s'inverse pour le paramètre NPQ.

Tableau 4 : valeurs des paramètres physiologiques de la phase claire de la photosynthèse (moyenne $\pm$ SD) suivant les différentes dates de mesures. Fv/Fm : efficacité potentielle de photosystème II ; Φ PS2 : efficacité du photosystème II ; qP : Photochemical Quenching ; NPQ : Non Photochemical Quenching. Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$). La couleur bleue indique un effet significatif de la parcelle, la couleur verte un effet de l'amendement et la couleur orange un effet de la date. L'astérisque indique une différence significative lors de la comparaison pour une date spécifique ; $n=5$.

Parcelle	Amendement	Date	Fv/Fm	Ψ PS2	qP	NPQ
Bois-Bernard	Non amendé	1	0,87 $\pm$ 0,01 ^b	0,79 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,94 $\pm$ 0,04 ^a	0,25 $\pm$ 0,07 ^a
		2	0,84 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,65 $\pm$ 0,13 ^{ab}	0,92 $\pm$ 0,02 ^a	0,43 $\pm$ 0,05 ^a
		3	0,82 $\pm$ 0,07 ^{ab}	0,65 $\pm$ 0,17 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,04 ^a	0,89 $\pm$ 0,94 ^{ab}
	Biochar	1	0,86 $\pm$ 0,01 ^b	0,79 $\pm$ 0,02 ^b	0,95 $\pm$ 0,04 ^a	0,20 $\pm$ 0,08 ^a
		2	0,77 $\pm$ 0,06 ^a	0,58 $\pm$ 0,16 ^a	0,99 $\pm$ 0,01 ^a	0,47 $\pm$ 0,15 ^a
		3	0,82 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,58 $\pm$ 0,14 ^{ab}	0,98 $\pm$ 0,04 ^a	1,44 $\pm$ 0,62 ^b
	Compost	1	0,87 $\pm$ 0,01 ^b	0,80 $\pm$ 0,02 ^b	0,95 $\pm$ 0,02 ^a	0,18 $\pm$ 0,05 ^a
		2	0,84 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,69 $\pm$ 0,12 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,03 ^a	0,48 $\pm$ 0,26 ^a
		3	0,86 $\pm$ 0,01 ^b	0,74 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,03 ^a	0,64 $\pm$ 0,07 ^{ab}
	Bioch + Comp	1	0,86 $\pm$ 0,01 ^b	0,78 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,93 $\pm$ 0,01 ^a	0,19 $\pm$ 0,13 ^a
		2	0,82 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,62 $\pm$ 0,16 ^{ab}	0,91 $\pm$ 0,01 ^a	0,32 $\pm$ 0,16 ^a
		3	0,87 $\pm$ 0,02 ^b	0,67 $\pm$ 0,10 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,04 ^a	1,22 $\pm$ 0,82 ^b
Courcelle-le-Lens	Non amendé	1	0,84 $\pm$ 0,02 ^{b*}	0,79 $\pm$ 0,02 ^b	0,97 $\pm$ 0,03 ^a	0,24 $\pm$ 0,07 ^a
		2	0,83 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,73 $\pm$ 0,08 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,03 ^a	0,34 $\pm$ 0,22 ^a
		3	0,83 $\pm$ 0,07 ^{ab}	0,75 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,94 $\pm$ 0,06 ^a	0,32 $\pm$ 0,12 ^a
	Biochar	1	0,84 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,78 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,97 $\pm$ 0,03 ^a	0,25 $\pm$ 0,08 ^a
		2	0,81 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,70 $\pm$ 0,09 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,04 ^a	0,33 $\pm$ 0,18 ^a
		3	0,83 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,75 $\pm$ 0,10 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,04 ^a	0,33 $\pm$ 0,21 ^a
	Compost	1	0,85 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,77 $\pm$ 0,03 ^b	0,96 $\pm$ 0,03 ^a	0,30 $\pm$ 0,24 ^a
		2	0,82 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,70 $\pm$ 0,07 ^{ab}	0,92 $\pm$ 0,06 ^a	0,28 $\pm$ 0,16 ^a
		3	0,86 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,77 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,93 $\pm$ 0,01 ^a	0,23 $\pm$ 0,05 ^a
	Bioch + Comp	1	0,85 $\pm$ 0,01 ^b	0,79 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,96 $\pm$ 0,03 ^a	0,25 $\pm$ 0,08 ^a
		2	0,81 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,70 $\pm$ 0,07 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,05 ^a	0,40 $\pm$ 0,19 ^a
		3	0,84 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,73 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,02 ^a	0,39 $\pm$ 0,21 ^a

9.1.2 Phase sombre de la photosynthèse

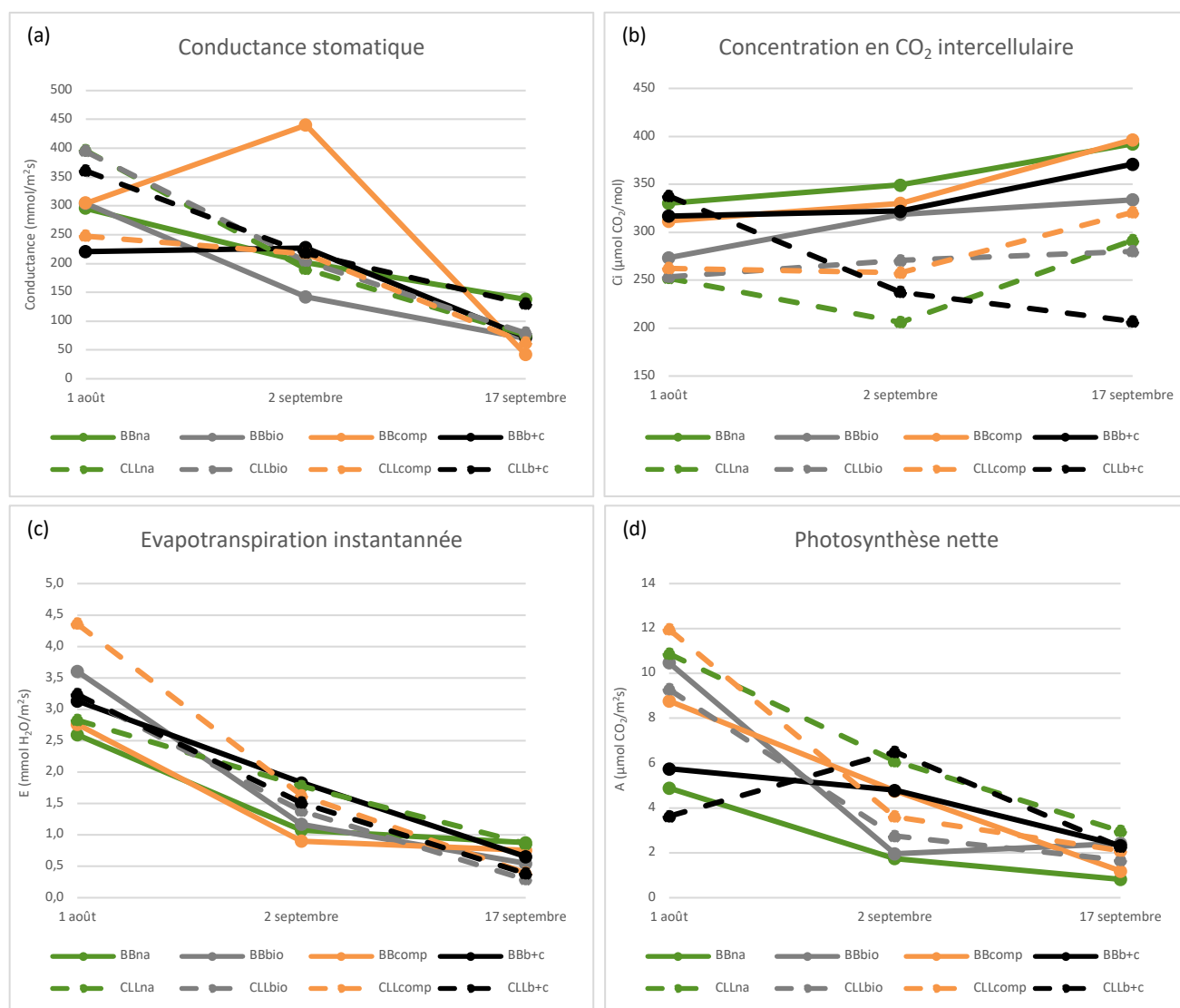


Figure 8 : représentation graphique de l'évolution des paramètres physiologiques de la phase sombre de la photosynthèse en fonction des différentes dates de mesures. BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens ; na : non amendé ; bio : biochar ; comp : compost ; b+c : biochar + compost.

Lors de la première prise de mesures, nous ne constatons aucune différence significative entre les plantes des deux sites, tout amendement confondu pour les paramètres suivants : la conductance stomatique (figure 8a), la concentration en CO_2 intercellulaire (figure 8b), et la photosynthèse nette (figure 8d). La conductance stomatique et la photosynthèse nette tendent cependant, à être plus élevées pour les plantes du site de CLL, tandis que la concentration en CO_2 intercellulaire y est plus faible que pour les plantes de BB. Concernant la transpiration instantanée (figure 8c), le degré de contamination du sol ne semble pas avoir d'effet, mais l'application de biochar + compost engendre une augmentation des valeurs pour les plantes cultivées sur la parcelle de BB par rapport au bloc non amendé du même site tandis

que sur la parcelle de CLL, l'application de compost engendre une augmentation des valeurs par rapport au bloc non amendé du même site.

Lors de la prise de mesures suivante (2 septembre), la photosynthèse nette (figure 8d) ne varie toujours pas entre les différentes conditions. Il en va de même cette fois pour la transpiration instantanée (figure 8c). L'ajout de compost sur la parcelle BB induit par contre une augmentation marquée de la conductance stomatique (figure 8a) par rapport au témoin et aux autres amendements. Pour ce qui est de la concentration en CO₂ intercellulaire (figure 8b), celle-ci tend à diminuer de manière significative sur le bloc non amendé de la parcelle contaminée CLL par rapport au bloc non amendé de BB.

Enfin, lors de la dernière prise de mesure (17 septembre), les paramètres de conductance stomatique (figure 8a), de concentration en CO₂ intercellulaire (figure 8b) et d'évapotranspiration instantanée (figure 8c) ne varient pas entre les plantes, quels que soient la parcelle ou l'amendement considérés. Cette observation rejoint globalement celles des deux premières dates de mesures

Finalement, lorsque l'on s'intéresse à l'évolution des paramètres au cours du temps (tableau 5), on constate que les valeurs de la conductance stomatique, de l'évapotranspiration instantanée et de la photosynthèse nette tendent à diminuer, et ce, de manière relativement marquée entre la première et la dernière prise de mesures. On observe un phénomène à peu près similaire pour la conductance stomatique, sauf pour la parcelle de BB non amendée et ainsi que pour l'amendement compost de CLL. Quant à la concentration en CO₂ intercellulaire, celle-ci tend légèrement à augmenter au cours du temps pour la plupart des amendements des deux parcelles. Néanmoins, aucune différence significative dans le temps n'est observée.

Tableau 5 : valeurs des paramètres physiologiques de la phase sombre de la photosynthèse (moyenne $\pm$ SD) suivant les différentes dates de mesures. Ci : concentration en CO₂ intercellulaire ; E : évapotranspiration instantanée ; A : photosynthèse nette ; CS : conductance stomatique. Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes (P<0,05). La couleur bleue indique un effet significatif de la parcelle, la couleur verte un effet de l'amendement et la couleur orange un effet de la date. L'astérisque indique une différence significative lors de la comparaison pour une date spécifique ; n=5.

Parcelle	Amendement	Date	Ci	E	A	CS
Bois-Bernard	Non amendé	1	330,20 $\pm$ 34,90 ^{ae}	2,59 $\pm$ 0,36 ^{dh}	4,89 $\pm$ 2,38 ^{ad}	295,40 $\pm$ 98,76 ^{cdf}
		2	349,20 $\pm$ 34,52 ^{ce}	1,08 $\pm$ 0,37 ^{ac}	1,75 $\pm$ 0,93 ^a	201,80 $\pm$ 87,72 ^{ad}
		3	392,25 $\pm$ 25,99 ^{de}	0,88 $\pm$ 0,63 ^{ac}	0,82 $\pm$ 0,73 ^a	137,70 $\pm$ 121,33 ^{abc}
	Biochar	1	273,40 $\pm$ 66,89 ^{ae}	3,60 $\pm$ 0,61 ^{hi}	10,47 $\pm$ 7,34 ^{bd}	304,00 $\pm$ 78,29 ^{cdf}
		2	318,80 $\pm$ 50,19 ^{ae}	1,17 $\pm$ 0,55 ^{ac}	1,96 $\pm$ 0,79 ^{ab}	141,80 $\pm$ 33,97 ^{abc}
		3	333,75 $\pm$ 49,54 ^{ae}	0,55 $\pm$ 0,22 ^{ac}	2,42 $\pm$ 1,60 ^{abc}	70,00 $\pm$ 9,85 ^{ab}
	Compost	1	311,80 $\pm$ 67,51 ^{ae}	2,76 $\pm$ 0,73 ^{efh}	8,77 $\pm$ 7,90 ^{ad}	304,40 $\pm$ 75,21 ^{cdf}
		2	330,40 $\pm$ 63,57 ^{ae}	0,90 $\pm$ 0,18 ^{ac}	4,76 $\pm$ 3,75 ^{ad}	440,00 $\pm$ 69,91 ^f
		3	396,50 $\pm$ 44,78 ^e	0,76 $\pm$ 0,30 ^{ac}	1,19 $\pm$ 0,81 ^a	42,08 $\pm$ 13,71 ^a
	Bioch + Comp	1	316,80 $\pm$ 70,01 ^{ae}	3,13 $\pm$ 0,39 ^{gfi}	5,75 $\pm$ 4,91 ^{ad}	220,60 $\pm$ 39,16 ^{abd}
		2	322,20 $\pm$ 55,99 ^{ae}	1,83 $\pm$ 0,53 ^{cdfg}	4,79 $\pm$ 3,61 ^{ad}	226,80 $\pm$ 75,50 ^{abd}
		3	371,00 $\pm$ 39,44 ^{ce}	0,66 $\pm$ 0,47 ^{ac}	2,33 $\pm$ 3,70 ^{abc}	72,50 $\pm$ 44,24 ^{ab}
Courcelle-le-Lens	Non amendé	1	252,20 $\pm$ 39,89 ^{ac}	2,83 $\pm$ 0,43 ^{fh}	10,87 $\pm$ 3,76 ^{cd}	395,60 $\pm$ 156,26 ^{ef}
		2	206,00 $\pm$ 66,77 ^a	1,78 $\pm$ 0,90 ^{bcd}	6,08 $\pm$ 3,65 ^{ac}	190,40 $\pm$ 32,11 ^{ad}
		3	291,50 $\pm$ 75,85 ^{ae}	0,86 $\pm$ 0,67 ^{ac}	2,97 $\pm$ 4,25 ^{ad}	76,10 $\pm$ 58,75 ^{ab}
	Biochar	1	253,40 $\pm$ 11,78 ^{ac}	3,24 $\pm$ 0,69 ^{hi}	9,28 $\pm$ 2,79 ^{ad}	394,00 $\pm$ 83,55 ^{ef}
		2	270,60 $\pm$ 79,42 ^{ae}	1,38 $\pm$ 0,39 ^{ad}	2,74 $\pm$ 2,62 ^{abc}	203,60 $\pm$ 38,38 ^{ad}
		3	280,00 $\pm$ 98,93 ^{ae}	0,29 $\pm$ 0,12 ^a	1,67 $\pm$ 1,51 ^{ab}	79,20 $\pm$ 24,08 ^{ab}
	Compost	1	262,40 $\pm$ 33,76 ^{ae}	4,36 $\pm$ 0,83 ⁱ	11,96 $\pm$ 2,94 ^d	247,40 $\pm$ 82,35 ^{bde}
		2	257,80 $\pm$ 51,82 ^{acd}	1,63 $\pm$ 0,59 ^{acdf}	3,62 $\pm$ 2,35 ^{ad}	217,00 $\pm$ 56,53 ^{abd}
		3	320,75 $\pm$ 42,43 ^{ae}	0,40 $\pm$ 0,09 ^{ab}	2,10 $\pm$ 0,95 ^{abc}	62,00 $\pm$ 20,91 ^{ab}
	Bioch + Comp	1	337,80 $\pm$ 14,55 ^{bce}	3,23 $\pm$ 0,98 ^{hi}	3,63 $\pm$ 0,73 ^{ad}	360,60 $\pm$ 113,52 ^{df}
		2	237,40 $\pm$ 68,16 ^{acd}	1,51 $\pm$ 0,51 ^{acde}	6,50 $\pm$ 5,50 ^{ad}	217,80 $\pm$ 34,83 ^{abd}
		3	207,00 $\pm$ 25,39 ^{ab}	0,39 $\pm$ 0,23 ^{ab}	2,27 $\pm$ 1,42 ^{abc}	129,74 $\pm$ 158,81 ^{abc}

9.2 Détermination des teneurs en cadmium, plomb, zinc dans le chanvre

9.2.1 Concentration foliaire en Cd, Pb, Zn

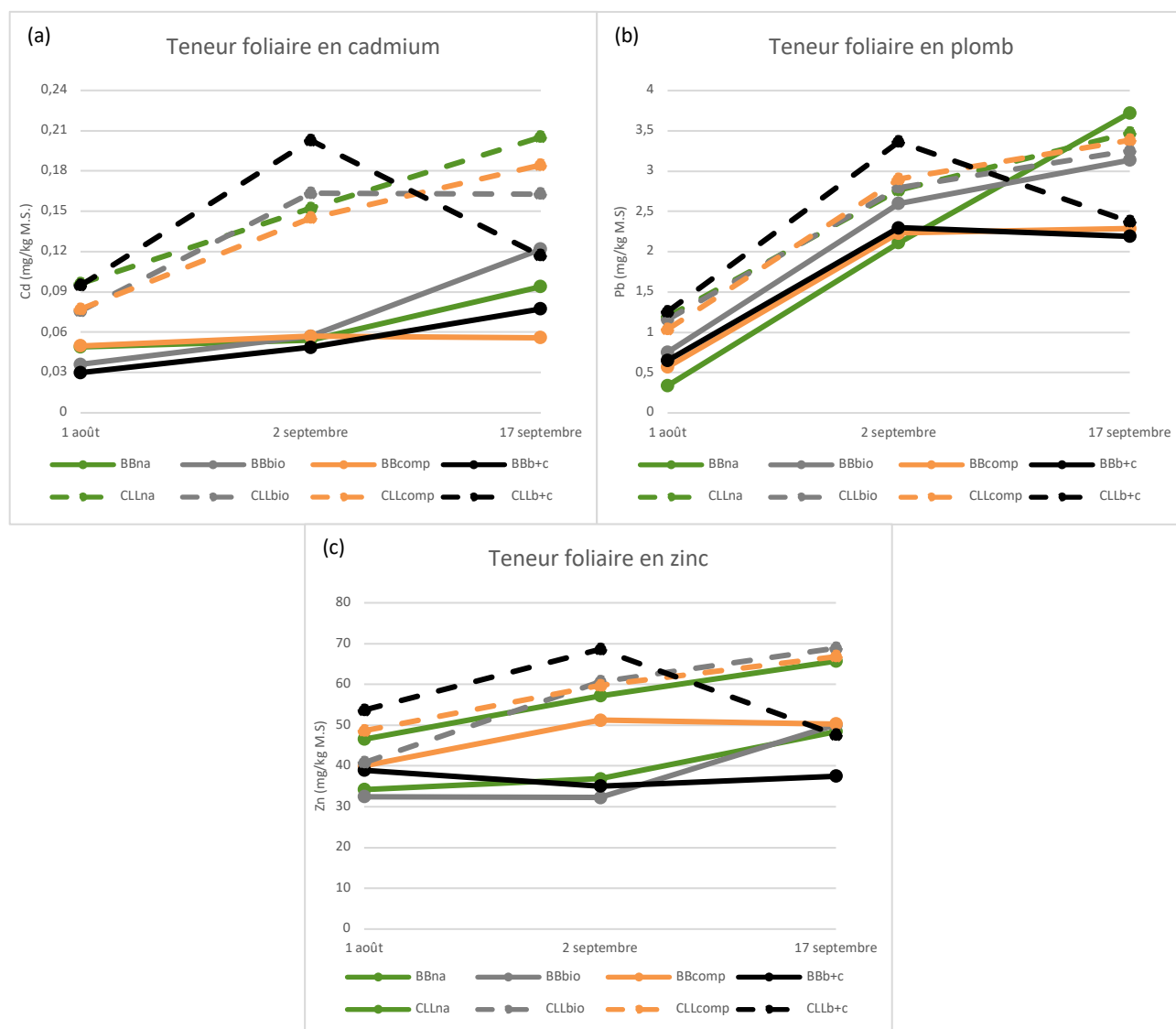


Figure 9 : représentation graphique de l'évolution des teneurs en cadmium, plomb et zinc en mg/kg de matière sèche dans les feuilles en fonction des différentes dates de mesures. BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens ; na : non amendé ; bio : biochar ; comp : compost ; b+c : biochar + compost.

Pour ce qui est de la première date (1er août), on remarque que les plantes de la parcelle contaminée de CLL ont tendance à accumuler plus d'éléments traces que celles de la parcelle témoin de BB, tous amendements confondus. Concernant la teneur foliaire en cadmium (figure 9a), aucun effet de l'apport d'amendements n'est à noter que ce soit pour les plantes de BB ou celles de CLL. Pour ce qui est du plomb (figure 9b), nous constatons un effet significatif des amendements uniquement sur la parcelle de BB pour le biochar ainsi que le biochar + compost, ayant pour corollaire une augmentation de l'accumulation de plomb au sein des feuilles. Quant au zinc (figure 9c), aucun effet significatif ne se manifeste sur la

parcelle non contaminée de BB. Néanmoins, en présence d'un certain degré de contamination, l'ajout de biochar + compost mène à une augmentation significative de l'accumulation foliaire comparativement au bloc non amendé du même site.

Lors de la deuxième date (le 2 septembre), la tendance observée durant la première série de mesures à savoir « l'effet site », se maintient et devient significative pour les 3 éléments. Il ressort que l'ajout de compost pour le plomb (figure 9) et de biochar pour le zinc (figure 9c) augmente la teneur foliaire sur la parcelle de BB, alors qu'à CLL, il s'agit du mélange biochar + compost qui favorise l'accumulation des 3 éléments traces.

Lors de la troisième prise de mesures, « l'effet site » reste marqué significativement uniquement pour le cadmium (figure 9a) et le plomb (figure 9b). De plus, il ressort une diminution de l'accumulation foliaire en présence de biochar + compost pour le cadmium et le zinc (figure 9b) à CLL ainsi que pour le plomb à BB.

Globalement, les concentrations foliaires en éléments traces des plantes sur sol non amendés de BB et CLL ont augmenté significativement entre la première et dernière prise de mesure (sauf pour le Cd à BB) (tableau 6). Concernant le cadmium et le zinc, l'accumulation foliaire sur la parcelle de BB présente peu d'évolution significative dans le temps pour les amendements contrairement à CLL, où il ressort une augmentation significative pour les dates 2 et/ou 3. Néanmoins, pour le zinc, il s'agit des deux parcelles pour lesquelles les dates 2 et/ou 3 se démarquent.

Par contre, il faut noter que l'amendement biochar + compost de la parcelle CLL induit une diminution significative entre les dates 2 et 3 pour les teneurs dans les 3 éléments étudiés.

Tableau 6 : valeurs des teneurs en cadmium (Cd), plomb (Pb) et zinc (Zn) (moyenne $\pm$ SD) en mg/kg de matière sèche dans les feuilles suivant les différentes dates de mesures. Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$). La couleur bleue indique un effet significatif de la parcelle, la couleur verte un effet de l'amendement et la couleur orange un effet de la date. L'astérisque indique une différence significative lors de la comparaison pour une date spécifique ; $n=3$.

			Feuilles (mg/kg MS)		
Parcelle	Amendement	Date	Cd	Pb	Zn
Bois Bernard	Non amendé	1	0,049 $\pm$ 0,030 ^{ab}	0,338 $\pm$ 0,003 ^a	34,200 $\pm$ 0,069 ^{ab}
		2	0,054 $\pm$ 0,005 ^{bd}	2,110 $\pm$ 0,009 ^g	36,857 $\pm$ 1,765 ^{ad}
		3	0,094 $\pm$ 0,048 ^{ab}	3,722 $\pm$ 0,416 ^c	48,412 $\pm$ 3,027 ^{cdh}
	Biochar	1	0,036 $\pm$ 0,011 ^{ab}	0,753 $\pm$ 0,074 ^b	32,450 $\pm$ 0,315 ^a
		2	0,057 $\pm$ 0,004 ^{cde}	2,599 $\pm$ 0,074 ^{ef}	32,285 $\pm$ 0,045 ^a
		3	0,122 $\pm$ 0,001 ^{ab}	3,136 $\pm$ 0,055 ^{cde}	50,106 $\pm$ 0,150 ^{dh}
	Compost	1	0,050 $\pm$ 0,017 ^{ab}	0,570 $\pm$ 0,042 ^{ab}	40,020 $\pm$ 0,279 ^{adf}
		2	0,057 $\pm$ 0,001 ^{ab}	2,232 $\pm$ 0,017 ^{cd}	51,253 $\pm$ 6,228 ^{efh}
		3	0,056 $\pm$ 0,005 ^{abc}	2,288 $\pm$ 0,376 ^{cd*}	50,330 $\pm$ 0,893 ^{dh}
	Bioch + Comp	1	0,030 $\pm$ 0,000 ^a	0,650 $\pm$ 0,065 ^b	38,930 $\pm$ 0,228 ^{ade}
		2	0,049 $\pm$ 0,005 ^{abc}	2,299 $\pm$ 0,119 ^{cd}	35,036 $\pm$ 0,239 ^{ac}
		3	0,077 $\pm$ 0,003 ^{ab}	2,193 $\pm$ 0,084 ^{cd*}	37,483 $\pm$ 0,546 ^{ad}
Courcelle les Lens	Non amendé	1	0,096 $\pm$ 0,013 ^{abc}	1,195 $\pm$ 0,038 ^b	46,550 $\pm$ 0,155 ^{bcdfg}
		2	0,152 $\pm$ 0,000 ^f	2,765 $\pm$ 0,095 ^{fg}	57,202 $\pm$ 2,063 ^{ghj}
		3	0,205 $\pm$ 0,030 ^{df}	3,476 $\pm$ 0,532 ^{df}	65,712 $\pm$ 8,403 ^{ij}
	Biochar	1	0,076 $\pm$ 0,002 ^{abc}	1,158 $\pm$ 0,036 ^b	40,810 $\pm$ 0,058 ^{adf}
		2	0,163 $\pm$ 0,002 ^{ef}	2,797 $\pm$ 0,051 ^{efg}	60,639 $\pm$ 2,760 ^{hj}
		3	0,163 $\pm$ 0,008 ^{ef}	3,255 $\pm$ 0,284 ^{cf}	68,890 $\pm$ 2,814 ^j
	Compost	1	0,077 $\pm$ 0,001 ^{abc}	1,037 $\pm$ 0,090 ^{ab}	48,630 $\pm$ 0,442 ^{cdh}
		2	0,145 $\pm$ 0,003 ^f	2,901 $\pm$ 0,096 ^{fg}	59,742 $\pm$ 1,123 ^{ghj}
		3	0,184 $\pm$ 0,002 ^{df}	3,383 $\pm$ 0,077 ^{df}	66,795 $\pm$ 6,622 ^{ij}
	Bioch + Comp	1	0,095 $\pm$ 0,002 ^{bd}	1,258 $\pm$ 0,097 ^b	53,700 $\pm$ 0,549 ^{fhi}
		2	0,203 $\pm$ 0,002 ^{cde}	3,364 $\pm$ 0,062 ^{cd}	68,596 $\pm$ 0,874 ^{j*}
		3	0,117 $\pm$ 0,013 ^{f*}	2,374 $\pm$ 0,082 ^{fg}	47,655 $\pm$ 2,660 ^{bcdh}

9.2.2 Concentration au sein de la tige en Cd, Pb, Zn

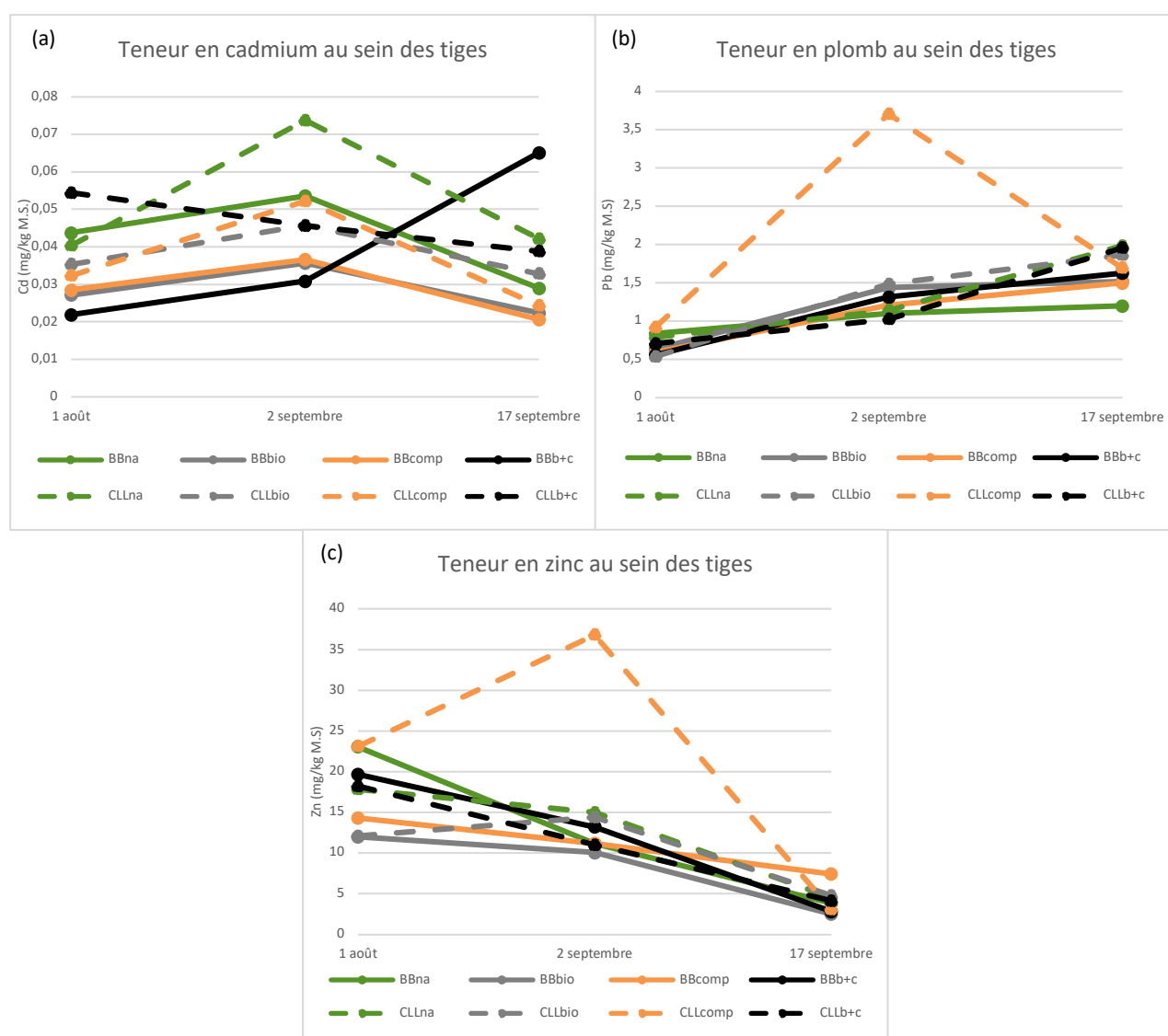


Figure 10 : représentation graphique de l'évolution des teneurs en cadmium, plomb et zinc en mg/kg de matière sèche dans les tiges en fonction des différentes dates de mesures. BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens ; na : non amendé ; bio : biochar ; comp : compost ; b+c : biochar + compost.

Concernant la première série de mesures, aucun effet du « site » ne se manifeste. La présence d'amendements, en particulier le biochar, tend à diminuer l'accumulation de Cd, Pb, Zn dans la tige (tableau 7).

L'effet du site ne se marque pas non plus lors de la deuxième série de mesures. L'application de compost a toutefois un effet significatif : nous constatons une augmentation de l'accumulation de plomb et zinc au sein de la tige pour les plantes de CLL. Cette augmentation est particulièrement marquée pour les plantes CLL + compost.

Ce n'est que lors de la dernière prise de mesures que l'effet du site se marque significativement : nous observons une augmentation de l'accumulation en Pb pour les tiges de chanvre de CLL. Quant à l'effet de l'amendement, il est significatif principalement pour le cadmium : l'association de biochar et compost sur la parcelle BB a permis de doubler l'accumulation.

Si l'on s'intéresse à l'évolution globale des teneurs en métaux au cours du temps (figures 10 a-b-c), on remarque que l'accumulation de cadmium progresse peu. De plus, les teneurs ont tendance à être inférieures pour les plantes cultivées en présence d'un amendement comparativement aux plantes des parcelles non amendées. La teneur en plomb quant à elle augmente de manière continue entre la première et dernière série de mesures (à BB et CLL). Pour ce qui est du zinc, celui-ci présente une diminution significative de l'accumulation dans la tige entre la première et la troisième date, pour la plupart des amendements des deux parcelles.

Tableau 7 : valeurs des teneurs en cadmium (Cd), plomb (Pb) et zinc (Zn) (moyenne $\pm$ SD) en mg/kg de matière sèche dans les tiges suivant les différentes dates de mesures. Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$). La couleur bleue indique une différence significative de la parcelle, la couleur verte un effet de l'amendement et la couleur orange un effet de la date. L'astérisque indique une différence significative lors de la comparaison pour une date spécifique ; $n=3$.

			Tiges (mg/kg MS)		
Parcelle	Amendement	Date	Cd	Pb	Zn
Bois Bernard	Non amendé	1	0,044 $\pm$ 0,009 <i>ae</i>	0,838 $\pm$ 0,012 <i>abcde</i>	23,04 $\pm$ 13,04 <i>d</i>
		2	0,054 $\pm$ 0,013 <i>be</i>	1,100 $\pm$ 0,160 <i>ah</i>	11,15 $\pm$ 1,19 <i>ad</i>
		3	0,029 $\pm$ 0,011 <i>ab</i>	1,200 $\pm$ 0,295 <i>bfbh</i>	3,857 $\pm$ 1,678 <i>ab</i>
	Biochar	1	0,027 $\pm$ 0,000 <i>ab</i>	0,633 $\pm$ 0,010 <i>abc*</i>	12,01 $\pm$ 1,23 <i>ad</i>
		2	0,036 $\pm$ 0,003 <i>abd</i>	1,437 $\pm$ 0,224 <i>dfeh</i>	10,07 $\pm$ 0,45 <i>ad</i>
		3	0,022 $\pm$ 0,002 <i>ac</i>	1,518 $\pm$ 0,174 <i>fhj</i>	2,532 $\pm$ 0,760 <i>a</i>
	Compost	1	0,028 $\pm$ 0,001 <i>ab</i>	0,592 $\pm$ 0,020 <i>ab*</i>	14,32 $\pm$ 1,22 <i>ad</i>
		2	0,037 $\pm$ 0,003 <i>abd</i>	1,207 $\pm$ 0,099 <i>ah</i>	11,19 $\pm$ 2,65 <i>ad</i>
		3	0,021 $\pm$ 0,009 <i>a</i>	1,500 $\pm$ 0,385 <i>fhj</i>	7,440 $\pm$ 4,487 <i>abc</i>
	Bioch + Comp	1	0,022 $\pm$ 0,002 <i>ab*</i>	0,558 $\pm$ 0,056 <i>a*</i>	19,67 $\pm$ 1,74 <i>d</i>
		2	0,031 $\pm$ 0,006 <i>ab</i>	1,316 $\pm$ 0,029 <i>cghi</i>	13,23 $\pm$ 7,09 <i>ad</i>
		3	0,065 $\pm$ 0,002 <i>de</i>	1,627 $\pm$ 0,256 <i>ghj</i>	2,857 $\pm$ 1,304 <i>ab</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	1	0,040 $\pm$ 0,001 <i>ae</i>	0,788 $\pm$ 0,057 <i>abcd</i>	17,83 $\pm$ 1,75 <i>cd</i>
		2	0,074 $\pm$ 0,034 <i>e</i>	1,141 $\pm$ 0,152 <i>ah</i>	14,99 $\pm$ 1,70 <i>bd</i>
		3	0,042 $\pm$ 0,002 <i>abd</i>	1,986 $\pm$ 0,185 <i>j</i>	4,543 $\pm$ 0,716 <i>ab</i>
	Biochar	1	0,035 $\pm$ 0,000 <i>abd</i>	0,537 $\pm$ 0,040 <i>a*</i>	12,10 $\pm$ 0,38 <i>ad</i>
		2	0,046 $\pm$ 0,007 <i>ae</i>	1,485 $\pm$ 0,030 <i>efhj</i>	14,42 $\pm$ 4,65 <i>ad</i>
		3	0,033 $\pm$ 0,003 <i>ab</i>	1,863 $\pm$ 0,166 <i>ij</i>	4,807 $\pm$ 2,772 <i>ab</i>
	Compost	1	0,032 $\pm$ 0,002 <i>ab</i>	0,921 $\pm$ 0,026 <i>af</i>	23,13 $\pm$ 1,14 <i>d</i>
		2	0,052 $\pm$ 0,002 <i>bce</i>	3,705 $\pm$ 0,161 <i>k</i>	36,78 $\pm$ 0,46 <i>e</i>
		3	0,024 $\pm$ 0,009 <i>ab</i>	1,695 $\pm$ 0,154 <i>hj</i>	3,119 $\pm$ 1,361 <i>ab</i>
	Bioch + Comp	1	0,054 $\pm$ 0,007 <i>be</i>	0,708 $\pm$ 0,078 <i>abc</i>	18,24 $\pm$ 4,71 <i>cd</i>
		2	0,046 $\pm$ 0,004 <i>ae</i>	1,025 $\pm$ 0,040 <i>afg</i>	11,02 $\pm$ 0,98 <i>ad</i>
		3	0,039 $\pm$ 0,008 <i>abd</i>	1,957 $\pm$ 0,033 <i>j</i>	4,162 $\pm$ 2,028 <i>ab</i>

9.2.3 Dosage des teneurs en potassium, magnésium et soufre dans le chanvre

Les données (tableau 8) relatives aux teneurs en potassium montrent qu'il ne semble pas y avoir un effet du « site » que ce soit pour les feuilles ou pour les tiges. Par contre, la présence de biochar et de compost a engendré une augmentation significative de la teneur en potassium à la fois dans les feuilles et les tiges des plantes cultivées sur la parcelle de CLL. Un effet significatif du « site » est aussi observé pour les teneurs en magnésium qui sont systématiquement plus faibles à CLL que BB, aussi bien pour les feuilles que pour les tiges. Finalement, pour ce qui est du soufre, il n'y a aucun effet notable du site ou de l'amendement.

Tableau 8 : valeurs des teneurs en potassium (K), magnésium (Mg) et soufre (S) (moyenne $\pm$ SD) en mg/kg de matière sèche dans les feuilles (A) et dans les tiges (B) lors de la dernière date de mesures (17 août). Les différentes lettres au sein d'une colonne (par organe) indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) ; $n=3$.

(A)		Feuilles (mg/kg MS)			
Parcelle	Amendement	K		Mg	S
Bois Bernard	Non amendé	13461,66 ± 2071,27 <i>ab</i>		6154,14 ± 270,16 <i>b</i>	1854,89 ± 99,10 <i>a</i>
	Biochar	9729,38 ± 3156,75 <i>a</i>		5861,04 ± 625,64 <i>b</i>	1526,12 ± 405,43 <i>a</i>
	Compost	11806,04 ± 2396,34 <i>ab</i>		5915,06 ± 220,58 <i>b</i>	1501,64 ± 88,44 <i>a</i>
	Bioch + Comp	14089,05 ± 476,69 <i>ab</i>		6083,66 ± 583,38 <i>b</i>	1887,58 ± 179,06 <i>a</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	9567,24 ± 1580,77 <i>a</i>		4636,52 ± 96,80 <i>a</i>	1442,78 ± 87,25 <i>a</i>
	Biochar	16047,96 ± 1648,23 <i>c</i>		4369,18 ± 31,64 <i>a</i>	1893,01 ± 350,78 <i>a</i>
	Compost	21110,40 ± 2939,11 <i>bc</i>		4173,31 ± 179,02 <i>a</i>	2044,49 ± 495,46 <i>a</i>
	Bioch + Comp	14511,28 ± 1567,45 <i>ab</i>		4526,13 ± 97,28 <i>a</i>	1759,69 ± 138,69 <i>a</i>
(B)		Tiges (mg/kg MS)			
Parcelle	Amendement	K		Mg	S
Bois Bernard	Non amendé	4718,42 ± 932,38 <i>ab</i>		727,55 ± 135,16 <i>b</i>	201,12 ± 6,93 <i>a</i>
	Biochar	3946,16 ± 1358,69 <i>a</i>		709,86 ± 140,79 <i>b</i>	176,12 ± 32,05 <i>a</i>
	Compost	5478,08 ± 473,64 <i>ab</i>		678,14 ± 128,33 <i>b</i>	204,29 ± 25,04 <i>a</i>
	Bioch + Comp	4041,57 ± 293,22 <i>a</i>		519,49 ± 53,57 <i>ab</i>	164,67 ± 29,19 <i>a</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	5310,58 ± 560,00 <i>ab</i>		416,77 ± 72,91 <i>a</i>	130,33 ± 0,68 <i>a</i>
	Biochar	8781,86 ± 1262,03 <i>c</i>		354,91 ± 22,43 <i>a</i>	205,86 ± 66,39 <i>a</i>
	Compost	8871,70 ± 1253,81 <i>c</i>		310,63 ± 25,70 <i>a</i>	171,86 ± 36,58 <i>a</i>
	Bioch + Comp	6767,31 ± 418,88 <i>bc</i>		332,99 ± 32,20 <i>a</i>	140,83 ± 26,34 <i>a</i>

9.3 Détermination de l'influence du silicium sur le chanvre

Pour l'estimation des teneurs en Si au niveau des plantes cultivées sur les deux sites, nous disposons d'un matériel récolté dans le cadre de ce mémoire (2019) et d'un matériel récolté en 2018 dans le cadre du mémoire de Mathilde Blanquet (2018).

Tout d'abord, en 2019 (tableau 9), il ressort que les plantes cultivées sur des parcelles de BB non amendées ou amendées avec du biochar ne présentent pas d'accumulation foliaire significativement différente des plantes ayant été pulvérisées par une solution de silicium et ayant reçu les amendements correspondants. Quant aux plantes cultivées à CLL, les plantes non amendées et non pulvérisées ont accumulé moins de silicium que celles pulvérisées avec du Si et inversement dans le cas de plantes amendées avec du biochar.

Pour le site BB, seules les plantes exposées aux amendements biochar + Si et biochar + compost + Si ont accumulé significativement plus de Si que les plantes non amendées + Si. A CLL, par contre, toutes les plantes pulvérisées sur parcelle amendée ont accumulé moins de Si que les plantes non amendées + Si.

Concernant l'année 2018 (tableau 9), les plantes non amendées et biochar sans pulvérisation ne présentent pas d'erreur standard ni de valeur statistique, car aucune répétition n'a pu être réalisée par manque de matériel végétal. Ainsi, en 2018, il semblerait que les plantes non amendées ou cultivées avec biochar et non pulvérisées par du Si ont eu tendance à accumuler moins de cet élément que les plantes équivalentes pulvérisées avec une solution de Si. Il ressort aussi que l'ensemble des amendements + Si ont engendré une accumulation significativement supérieure sur les deux parcelles, en dehors du biochar + Si à BB, comparativement aux plantes non amendées + Si respectives.

Tableau 9 : teneurs en silicium (moyenne $\pm$ SD) en mg/kg de matière sèche dans les feuilles, pour les deux années de culture. BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens ; Si : silicium appliqué par pulvérisation ; na : non applicable par manque de réplicas. Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) ; $n=5$.

Parcelle	Amendement	Feuilles (mg/kg MS)	
		Si 2018	Si 2019
Bois Bernard	Non amendé	6452,10 $\pm$ NA <i>na</i>	7013,33 $\pm$ 235,38 <i>cd</i>
	Biochar	6075,85 $\pm$ NA <i>na</i>	9086,64 $\pm$ 198,80 <i>e</i>
	Non amendé + Si	4420,3 $\pm$ 19,742 <i>a</i>	6661,29 $\pm$ 231,04 <i>bc</i>
	Biochar + Si	4934,1 $\pm$ 225,53 <i>ab</i>	8479,08 $\pm$ 69,63 <i>e</i>
	Compost + Si	7374,9 $\pm$ 588,23 <i>c</i>	6995,38 $\pm$ 695,06 <i>cd</i>
	Bioch + Comp + Si	6787,3 $\pm$ 73,279 <i>cd</i>	8213,10 $\pm$ 538,65 <i>de</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	5968,35 $\pm$ NA <i>na</i>	5514,73 $\pm$ 359,48 <i>ab</i>
	Biochar	6046,63 $\pm$ NA <i>na</i>	7025,65 $\pm$ 67,07 <i>cd</i>
	Non amendé + Si	5646,1 $\pm$ 52,115 <i>b</i>	6975,13 $\pm$ 120,63 <i>cd</i>
	Biochar + Si	7085,1 $\pm$ 155,74 <i>cd</i>	4972,05 $\pm$ 55,01 <i>a</i>
	Compost + Si	7987,8 $\pm$ 371,44 <i>d</i>	5786,39 $\pm$ 24,98 <i>ac</i>
	Bioch + Comp + Si	7172,1 $\pm$ 95,873 <i>cd</i>	5314,36 $\pm$ 352,78 <i>a</i>

Pour rappel, le silicium a été appliqué par pulvérisation foliaire 1 fois par semaine entre le 2 août et le 17 septembre 2019 à une concentration de 2 mM H_2SiO_3 . L'influence du Si sur les paramètres physiologiques n'a été mesurée que lors de la dernière date de mesure, le 17 septembre 2019. L'ensemble des résultats obtenus pour les amendements biochar, compost, biochar + compost et non amendé sont statistiquement identiques à ceux présentés dans les tableaux 4 et 5. On remarque, que ce soit pour la phase claire ou sombre de la photosynthèse, qu'il n'y a aucun effet significatif de l'ajout de silicium sur les paramètres physiologiques du chanvre (tableaux 10 - 11).

Tableau 10 : valeurs des paramètres physiologiques de la phase claire de la photosynthèse (moyenne $\pm$ SD) lors de la dernière série de mesures (17 septembre). Fv/Fm : efficacité potentielle de photosystème II ; Ψ PS2 : efficacité du photosystème II ; qP : Photochemical Quenching ; NQP : Non Photochemical Quenching ; Si : silicium appliqué par pulvérisation (2mM H₂SiO₃). Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes (P<0,05) ; n=5.

Parcelle	Amendement	Fv/Fm	Ψ PS2	qP	NQP
Bois Bernard	Non amendé	0,82 $\pm$ 0,07 <i>a</i>	0,65 $\pm$ 0,17 <i>a</i>	0,96 $\pm$ 0,04 <i>a</i>	0,89 $\pm$ 0,94 <i>a</i>
	Biochar	0,82 $\pm$ 0,05 <i>a</i>	0,58 $\pm$ 0,14 <i>a</i>	0,98 $\pm$ 0,04 <i>a</i>	1,44 $\pm$ 0,62 <i>a</i>
	Compost	0,86 $\pm$ 0,01 <i>a</i>	0,74 $\pm$ 0,03 <i>a</i>	0,95 $\pm$ 0,03 <i>a</i>	0,64 $\pm$ 0,07 <i>a</i>
	Bioch + Comp	0,87 $\pm$ 0,02 <i>a</i>	0,67 $\pm$ 0,10 <i>a</i>	0,96 $\pm$ 0,04 <i>a</i>	1,22 $\pm$ 0,82 <i>a</i>
	Si (non amendé)	0,88 $\pm$ 0,01 <i>a</i>	0,74 $\pm$ 0,04 <i>a</i>	0,93 $\pm$ 0,04 <i>a</i>	0,66 $\pm$ 0,55 <i>a</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	0,83 $\pm$ 0,07 <i>a</i>	0,75 $\pm$ 0,02 <i>a</i>	0,94 $\pm$ 0,06 <i>a</i>	0,32 $\pm$ 0,12 <i>a</i>
	Biochar	0,83 $\pm$ 0,03 <i>a</i>	0,75 $\pm$ 0,10 <i>a</i>	0,96 $\pm$ 0,04 <i>a</i>	0,33 $\pm$ 0,21 <i>a</i>
	Compost	0,86 $\pm$ 0,02 <i>a</i>	0,77 $\pm$ 0,03 <i>a</i>	0,93 $\pm$ 0,01 <i>a</i>	0,23 $\pm$ 0,05 <i>a</i>
	Bioch + Comp	0,84 $\pm$ 0,03 <i>a</i>	0,73 $\pm$ 0,05 <i>a</i>	0,95 $\pm$ 0,02 <i>a</i>	0,39 $\pm$ 0,21 <i>a</i>
	Si (non amendé)	0,81 $\pm$ 0,00 <i>a</i>	0,67 $\pm$ 0,03 <i>a</i>	0,96 $\pm$ 0,05 <i>a</i>	0,70 $\pm$ 0,49 <i>a</i>

Tableau 11 : valeurs des paramètres physiologiques de la phase sombre de la photosynthèse (moyenne $\pm$ SD) lors de la dernière série de mesures (17 août). Ci : concentration en CO₂ intercellulaire ; E : évapotranspiration instantanée ; A : photosynthèse nette ; CS : conductance stomatique ; Si : silicium appliqué par pulvérisation (2mM H₂SiO₃). Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes (P<0,05) ; n=5.

Parcelle	Amendement	CS	Ci	E	A
Bois Bernard	Non amendé	137,70 $\pm$ 121,33 <i>a</i>	392,25 $\pm$ 25,99 <i>b</i>	0,88 $\pm$ 0,63 <i>a</i>	0,82 $\pm$ 0,73 <i>a</i>
	Biochar	70,00 $\pm$ 9,85 <i>a</i>	333,75 $\pm$ 49,54 <i>b</i>	0,55 $\pm$ 0,22 <i>a</i>	2,42 $\pm$ 1,60 <i>a</i>
	Compost	42,08 $\pm$ 13,71 <i>a</i>	396,50 $\pm$ 44,78 <i>b</i>	0,76 $\pm$ 0,30 <i>a</i>	1,19 $\pm$ 0,81 <i>a</i>
	Bioch + Comp	72,50 $\pm$ 44,24 <i>a</i>	371,00 $\pm$ 39,44 <i>b</i>	0,66 $\pm$ 0,47 <i>a</i>	2,33 $\pm$ 3,70 <i>a</i>
	Si (non amendé)	134,38 $\pm$ 89,45 <i>a</i>	389,00 $\pm$ 32,92 <i>ab</i>	0,69 $\pm$ 0,29 <i>a</i>	0,61 $\pm$ 0,71 <i>a</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	76,10 $\pm$ 58,75 <i>a</i>	291,50 $\pm$ 75,85 <i>ab</i>	0,86 $\pm$ 0,67 <i>a</i>	2,97 $\pm$ 4,25 <i>a</i>
	Biochar	79,20 $\pm$ 24,08 <i>a</i>	280,00 $\pm$ 98,93 <i>ab</i>	0,29 $\pm$ 0,12 <i>a</i>	1,67 $\pm$ 1,51 <i>a</i>
	Compost	62,00 $\pm$ 20,91 <i>a</i>	320,75 $\pm$ 42,43 <i>ab</i>	0,40 $\pm$ 0,09 <i>a</i>	2,10 $\pm$ 0,95 <i>a</i>
	Bioch + Comp	129,74 $\pm$ 158,81 <i>a</i>	207,00 $\pm$ 25,39 <i>a</i>	0,39 $\pm$ 0,23 <i>a</i>	2,27 $\pm$ 1,42 <i>a</i>
	Si (non amendé)	58,13 $\pm$ 30,31 <i>a</i>	284,67 $\pm$ 42,44 <i>ab</i>	0,88 $\pm$ 0,21 <i>a</i>	1,64 $\pm$ 1,29 <i>a</i>

Tout comme les paramètres physiologiques, l'étude de l'influence du silicium sur l'accumulation du Cd, Pb et Zn n'a été réalisée que lors de la dernière série de mesures (tableau 12). L'ensemble des résultats obtenus pour les plantes cultivées en présence des amendements biochar, compost, biochar + compost et non amendé sont identiques à ceux présentés dans le tableau 6. Il en ressort une accumulation du cadmium et du zinc plus importante pour les plantes cultivées à CLL qu'à BB suite à l'ajout de silicium. Cependant, aucun des ETM n'a présenté une accumulation foliaire significativement différente comparativement aux plantes non amendées, mais aussi par rapport à l'ensemble des autres amendements sur les deux parcelles, en dehors de CLL biochar + compost.

Tableau 12 : valeurs des teneurs en cadmium (Cd), plomb (Pb) et zinc (Zn) (moyenne $\pm$ SD) en mg/kg de matière sèche dans les feuilles suivant les différentes dates de mesures. Si : silicium appliqué par pulvérisation (2mM H₂SiO₃). Les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes (P<0,05) ; n=5.

Parcelle	Amendement	Feuilles (mg/kg MS)		
		Cd	Pb	Zn
Bois Bernard	Non amendé	0,09 $\pm$ 0,05 <i>ab</i>	3,72 $\pm$ 0,42 <i>d</i>	48,41 $\pm$ 3,03 <i>a</i>
	Biochar	0,12 $\pm$ 0,00 <i>ac</i>	3,14 $\pm$ 0,06 <i>ad</i>	50,11 $\pm$ 0,15 <i>a</i>
	Compost	0,06 $\pm$ 0,01 <i>a</i>	2,29 $\pm$ 0,38 <i>ab</i>	50,33 $\pm$ 0,89 <i>ab</i>
	Bioch + Comp	0,08 $\pm$ 0,00 <i>ab</i>	2,19 $\pm$ 0,08 <i>a</i>	37,48 $\pm$ 0,55 <i>a</i>
	Si (non amendé)	0,08 $\pm$ 0,01 <i>ab</i>	2,94 $\pm$ 0,20 <i>ad</i>	39,30 $\pm$ 2,45 <i>a</i>
Courcelle les Lens	Non amendé	0,21 $\pm$ 0,03 <i>c</i>	3,48 $\pm$ 0,53 <i>cd</i>	65,71 $\pm$ 8,40 <i>c</i>
	Biochar	0,16 $\pm$ 0,01 <i>bc</i>	3,25 $\pm$ 0,28 <i>ad</i>	68,89 $\pm$ 2,81 <i>c</i>
	Compost	0,18 $\pm$ 0,00 <i>c</i>	3,38 $\pm$ 0,08 <i>bcd</i>	66,80 $\pm$ 6,62 <i>c</i>
	Bioch + Comp	0,12 $\pm$ 0,01 <i>ac</i>	2,37 $\pm$ 0,08 <i>ac</i>	47,66 $\pm$ 2,66 <i>a</i>
	Si (non amendé)	0,20 $\pm$ 0,02 <i>c</i>	2,91 $\pm$ 0,22 <i>ad</i>	65,60 $\pm$ 1,17 <i>bc</i>

9.4 Mesure des paramètres environnementaux de terrain

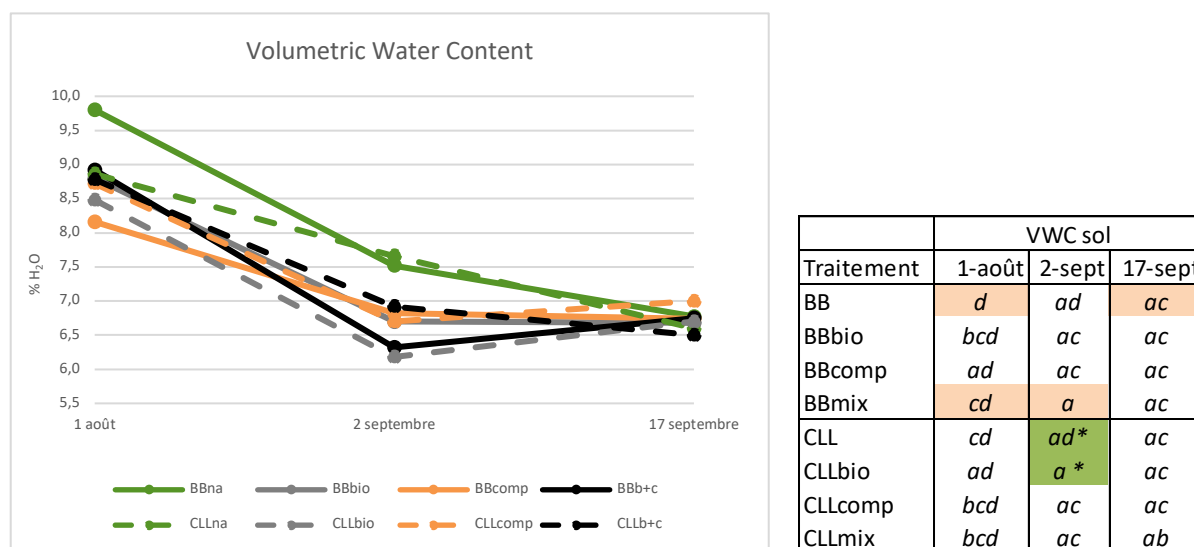


Figure 11 : contenu volumétrique en eau (volume eau/volume sol). BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens ; na : non amendé ; bio : biochar ; comp : compost ; b+c : biochar + compost. Le tableau indique le résultat du test de Tukey : les différentes lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes (P<0,05) ; n=5. La couleur verte indique un effet significatif de l'amendement et la couleur orange un effet de la date. L'astérisque indique une différence significative lors de la comparaison pour une date spécifique.

Les données issues de l'estimation contenu volumétrique en eau du sol (figure 11) indiquent une diminution du contenu en eau du sol tout au long de la période de mesure. On peut aussi remarquer que les parcelles non amendées de BB et CLL ont une légère tendance à présenter

une quantité d'eau supérieure comparativement aux autres amendements, sans pour autant se distinguer significativement.

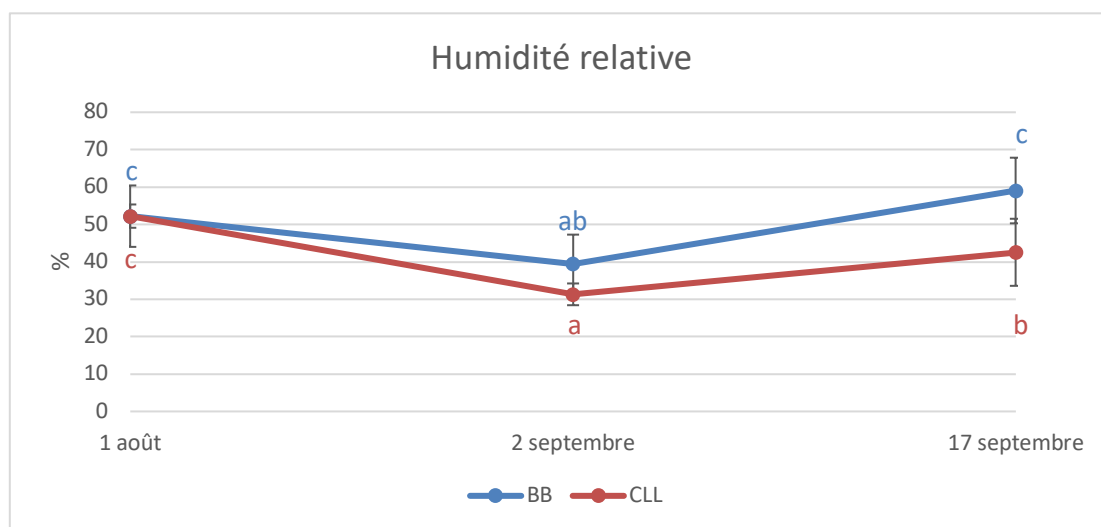


Figure 12 : représentation graphique de l'évolution de l'humidité relative (pression vapeur/pression saturante) suivant les différentes dates de mesures. BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les différentes lettres indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$).

L'humidité relative (figure 12) présente une diminution entre les dates 1 et 2 suivie d'une augmentation entre les dates 2 et 3 sur les deux parcelles. On notera que seule la date 3 présente une différence significative entre BB et CLL.

9.5 Analyse du titre des fibres

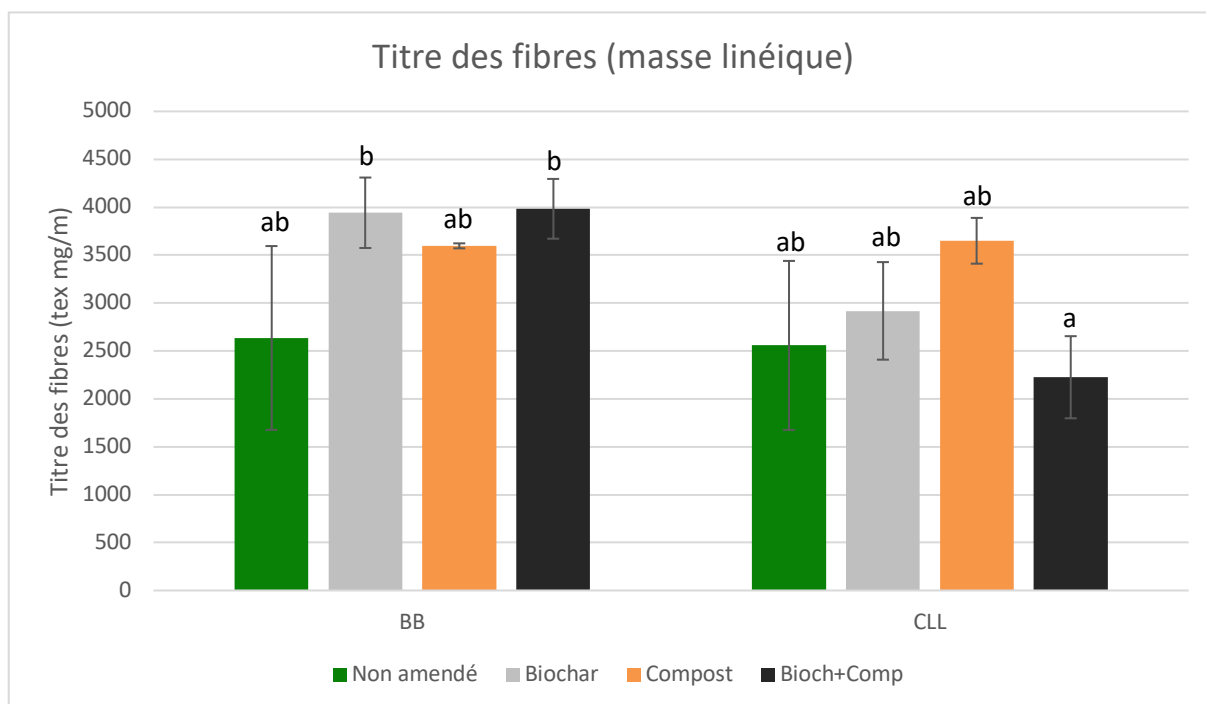


Figure 13 : titre des fibres (mg/m) (moyenne $\pm$ SD). BB : Bois-Bernard ; CLL : Courcelles-lès-Lens. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les différentes lettres indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) ; $n=3$.

Le titre des fibres (figure 13) n'indique aucune différence significative que ce soit pour « l'effet site » ou pour l'ajout d'amendements.

10 Analyse de certains composants des parois cellulaires

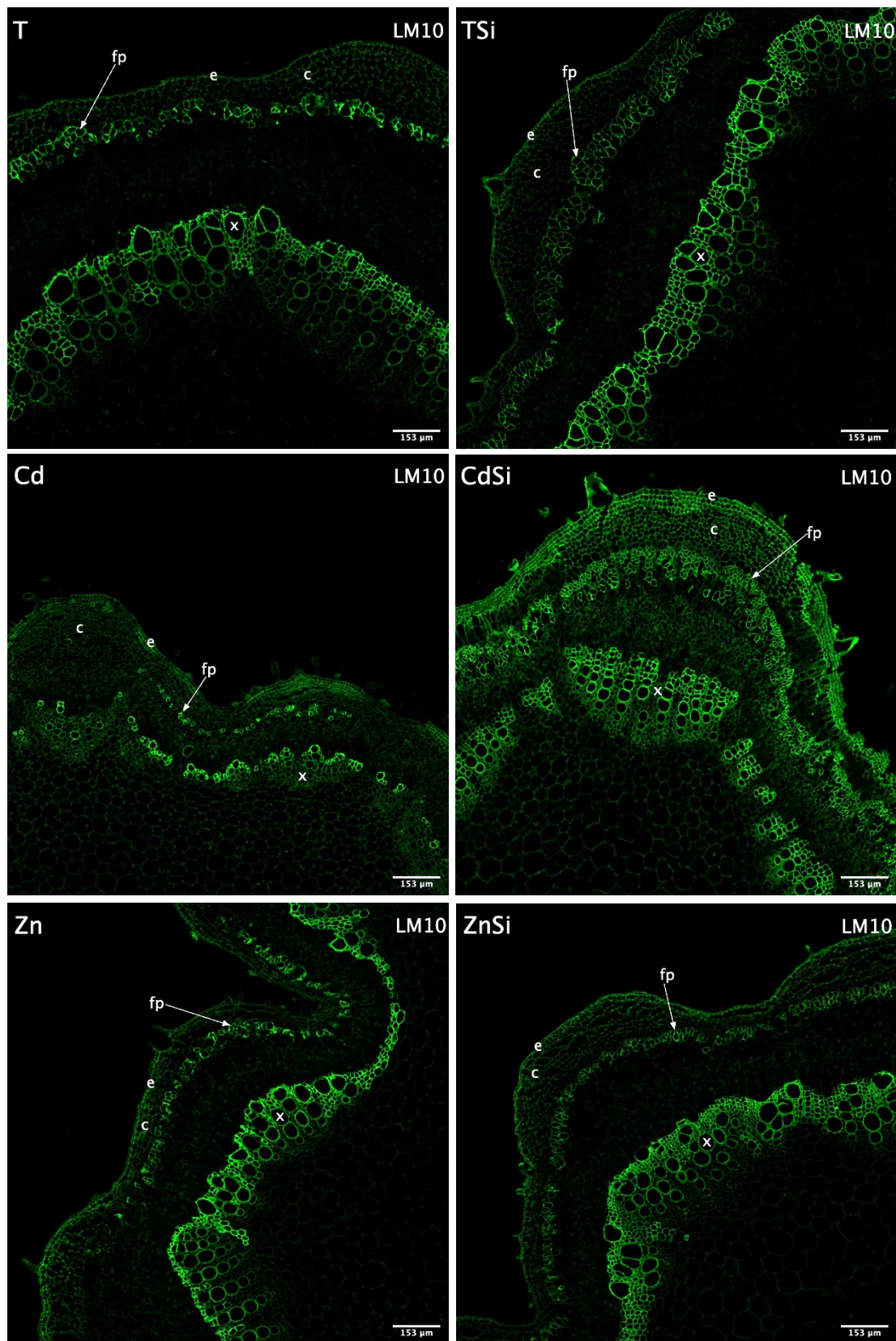


Figure 14 : détection par immunofluorescence de l'épitope LM10. Coupe transversale au niveau « snap point » de la tige, chez une plante âgée de 4 semaines montrant l'épiderme (e), le collenchyme (c), les fibres primaires (fp) et le xylème (x). T : témoin ; TSi : témoin + silicium (2mM H_2SiO_3) ; Cd : exposition à 20µM $CdCl_2$; CdSi : cadmium (20µM $CdCl_2$) + silicium (2mM H_2SiO_3) ; Zn : exposition à 100µM $ZnCl_2$; ZnSi : zinc (100µM $ZnCl_2$) + silicium (2mM H_2SiO_3) ; n=3.

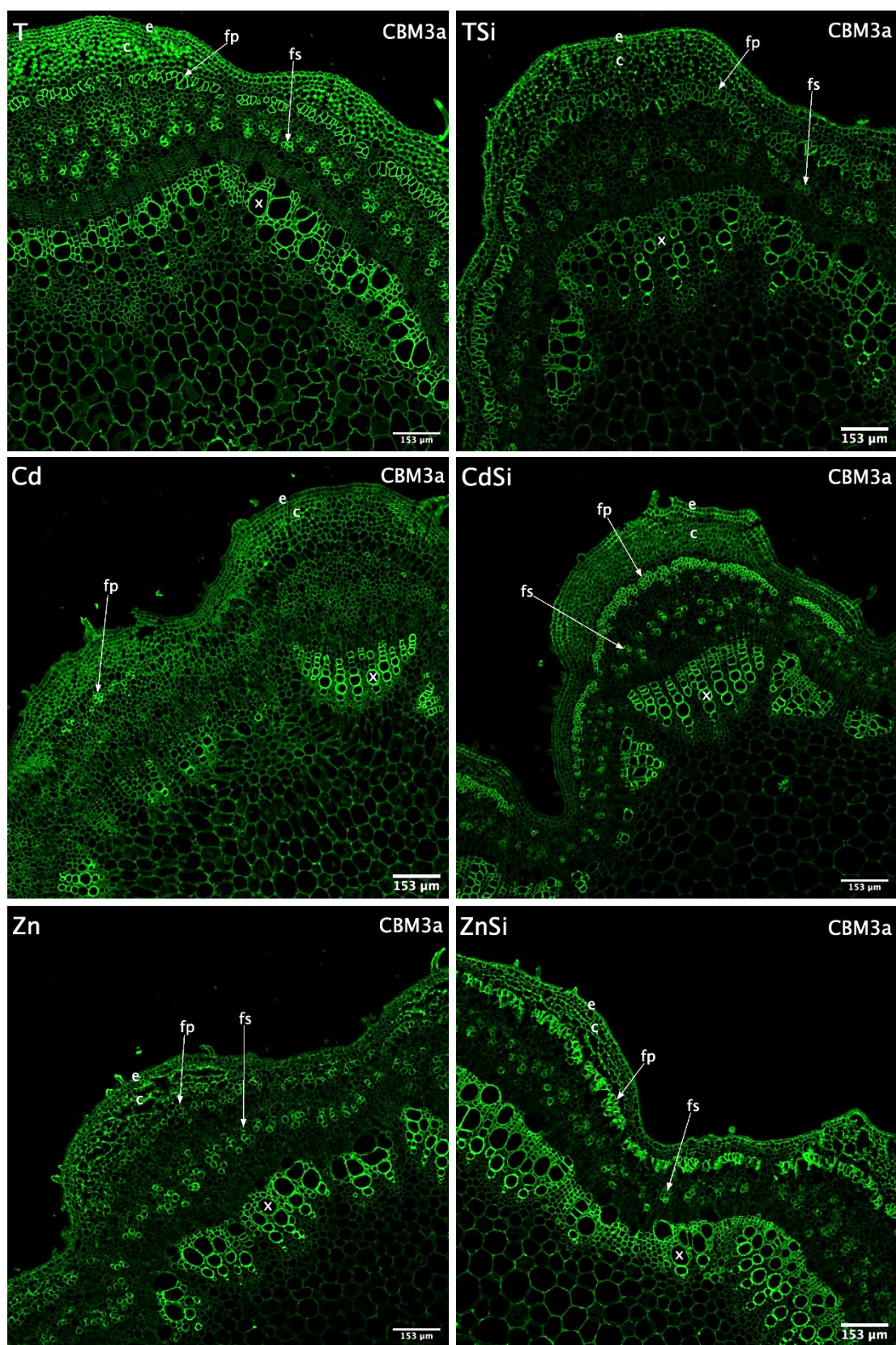


Figure 15 : détection par immunofluorescence de l'épitope CBM3a. Coupe transversale au niveau « snap point » de la tige, chez une plante âgée de 4 semaines montrant l'épiderme (e), le collenchyme (c), les fibres primaires (fp), les fibres secondaires (fs) et le xylème (x). T : témoin ; TSi : témoin + silicium (2mM H_2SiO_3) ; Cd : exposition à 20μM $CdCl_2$; CdSi : cadmium (20μM $CdCl_2$) + silicium (2mM H_2SiO_3) ; Zn : exposition à 100μM $ZnCl_2$; ZnSi : zinc (100μM $ZnCl_2$) + silicium (2mM H_2SiO_3) ; n=3.

Le tableau 13 présentant l'intensité du signal de fluorescence tissulaire est à mettre en lien avec les images issues de la détection du xylane par immunofluorescence (figure 14). On observe tout d'abord que pour la plupart des tissus, les traitements cadmium (Cd) et cadmium + silicium (CdSi) ont tendance à induire une intensité de fluorescence plus importante que les autres traitements.

Concernant l'influence du silicium, on note que la fluorescence est systématiquement plus élevée lors d'une exposition au cadmium (CdSi) par opposition au témoin (TSi) (significatif sauf pour le xylème). Quant au zinc (ZnSi), le signal est significativement différent du témoin (TSi) pour l'épiderme et le collenchyme mais ne l'est pas pour les fibres primaires, secondaires et le xylème.

Pour ce qui est des fibres primaires, les valeurs de fluorescence mesurées au sein des traitements Cd et CdSi sont significativement supérieures à celles mesurées pour les plantes des autres traitements. Bien que les fibres secondaires ne soient pas visibles pour un marquage de type LM10 (figure X), une prise de mesure a été réalisée dans la zone où elles devraient être normalement présentes. Tout comme les fibres primaires, l'exposition au cadmium des fibres secondaires indiquent des résultats identiques à savoir : les traitements Cd et CdSi induisent une fluorescence significativement supérieure aux autres traitements. De plus, on constate qu'une exposition métallique (Cd et Zn) engendre des valeurs significativement supérieures par comparaison au témoin (T). Par contre, pour ce qui est de l'ajout de silicium, les valeurs mesurées sont plus faibles pour les traitements cadmium silicium (CdSi) et zinc silicium (ZnSi) comparativement aux traitements sans silicium (Cd et Zn). Néanmoins, seul le traitement CdSi est significativement supérieur du témoin (TSi).

Tableau 13 : intensité du signal de fluorescence tissulaire (moyenne $\pm$ SD) pour le marqueur LM10. T : témoin ; TSi : témoin + silicium ; Cd : cadmium ; CdSi : cadmium + silicium ; Zn : zinc ; ZnSi : zinc + silicium. Les lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont statistiquement différentes ($p < 0.05$) ; $n=3$.

LM10 : intensité du signal																				
Traitement	Épiderme				Collenchyme				Fibres primaires				Fibres secondaires				Xylème			
T	195,44	±	57,09	a	123,17	±	41,23	ab	411,39	±	168,69	a	67,78	±	15,20	a	400,94	±	82,30	a
TSi	409,94	±	93,29	b	171,61	±	72,98	bc	312,89	±	56,23	a	90,22	±	16,05	ab	475,00	±	122,77	ab
Cd	489,94	±	159,18	bc	441,83	±	180,79	d	717,17	±	211,72	b	248,67	±	111,29	c	479,67	±	154,49	ab
CdSi	665,67	±	183,30	c	490,06	±	191,99	d	715,33	±	106,50	b	280,39	±	161,57	c	564,44	±	167,96	b
Zn	593,67	±	258,06	bc	242,00	±	75,75	c	410,94	±	150,24	a	122,66	±	33,40	b	539,28	±	97,08	b
ZnSi	258,06	±	181,85	a	100,39	±	70,64	a	344,94	±	84,55	a	64,22	±	24,10	a	518,39	±	170,61	ab

Le tableau 14 est en lien avec les images issues de la détection de la cellulose par immunofluorescence (figure 15). Le marquage CBM3a montre une intensité maximale de fluorescence plus importante que le marquage de type LM10. Néanmoins, la tendance observée pour LM10 à savoir une intensité plus élevée pour le Cd et CdSi que pour les autres traitements, n'est plus très prononcée.

L'épiderme présente une fluorescence semblable, quels que soient les traitements. Pour le collenchyme, seule l'exposition au zinc induit une valeur de fluorescence significativement plus faible que le témoin. A l'inverse, en présence de silicium, seule l'exposition au cadmium induit une valeur de fluorescence significativement plus élevée. En présence de cadmium, l'intensité de fluorescence au niveau du xylème est significativement plus importante et ce, même en présence de silicium comparativement à leur témoin respectif. Par contre, l'exposition au zinc n'induit pas de fluorescence significativement supérieure au témoin qu'en présence de silicium.

Au niveau des fibres primaires, la fluorescence est significativement supérieure pour les plantes exposées au cadmium (Cd) par comparaison au témoin (T), mais ne l'est pas entre le traitement zinc (Zn) et le témoin (T). Cependant, en présence de silicium, les traitements cadmium (CdSi) et zinc (ZnSi) induisent une fluorescence plus élevée par rapport au traitement témoin silicium (TSi). Par contre, que ce soit avec ou sans silicium, les expositions au cadmium et au zinc n'induisent pas de fluorescences différentes les unes des autres.

Pour ce qui est des fibres secondaires, la fluorescence est similaire entre les traitements sans silicium T-Cd-Zn, mais elle est significativement différente entre le traitement TSi par comparaison aux traitements métalliques (CdSi ; ZnSi).

On remarquera que pour l'ensemble des fibres phloémiennes (primaires et secondaires) on observe qu'il n'existe aucune différence significative entre la présence et l'absence de silicium pour chaque type de métal (Cd – CdSi et Zn – ZnSi). Cependant, l'inverse est observé pour le traitement témoin à savoir, une différence significative avec et sans de silicium (T – TSi).

Tableau 14 : intensité du signal de fluorescence tissulaire (moyenne $\pm$ SD) pour le marqueur CBM3a. T : témoin ; TSi : témoin + silicium ; Cd : cadmium ; CdSi : cadmium + silicium ; Zn : zinc ; ZnSi : zinc + silicium. Les lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont statistiquement différentes ($p < 0.05$) ; $n=3$.

CBM3a : intensité du signal																				
Traitement	Épiderme				Collenchyme				Fibres primaires				Fibres secondaires				Xylème			
T	1008,72	±	326,27	a	872,78	±	370,06	bc	845,83	±	280,17	b	861,94	±	288,49	b	631,78	±	135,95	b
TSi	778,06	±	145,43	a	507,56	±	71,54	a	507,11	±	118,11	a	521,11	±	96,49	c	449,22	±	53,99	a
Cd	752,67	±	174,12	a	937,89	±	148,52	c	1088,33	±	263,34	c	712,83	±	299,78	ab	772,72	±	131,77	c
CdSi	800,22	±	195,85	a	859,00	±	221,71	bc	1140,83	±	196,30	c	668,72	±	137,54	a	789,94	±	149,78	c
Zn	786,00	±	177,55	a	642,44	±	152,71	a	915,11	±	264,65	bc	719,56	±	147,60	ab	653,11	±	62,46	b
ZnSi	848,50	±	129,77	a	678,00	±	114,04	ab	1135,17	±	266,87	c	723,67	±	236,51	ab	716,61	±	80,01	bc

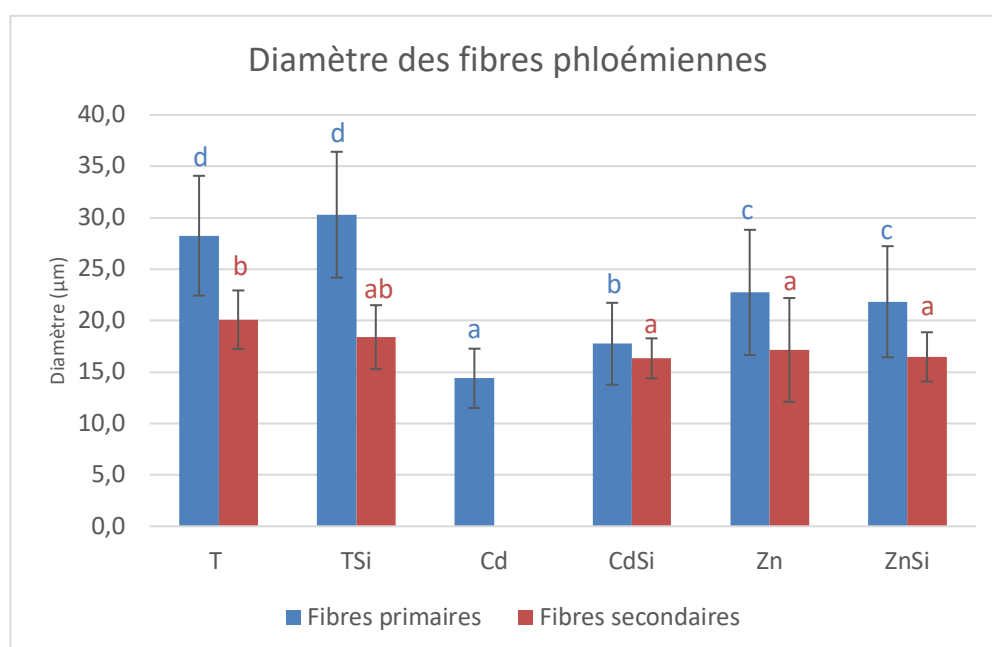


Figure 16 : diamètre moyen des fibres phloémiennes (primaires et secondaires) tous marqueurs confondus (LM10 et CBM3a). T : témoin ; TSi : témoin + silicium ; Cd : cadmium ; CdSi : cadmium + silicium ; Zn : zinc ; ZnSi : zinc + silicium. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les différentes lettres indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) ; $n=3$.

Comme le montrent la figure 16 et le tableau 15, le diamètre des fibres primaires est maximal pour les plantes du traitement témoin (T ; TSi), intermédiaire pour le zinc (Zn ; ZnSi) et minimal pour le cadmium (Cd ; CdSi). On constate que les traitements sans silicium (Cd ; Zn) et avec silicium (CdSi ; ZnSi) induisent un diamètre significativement plus faible que leurs témoins respectifs (T ; TSi).

Concernant les fibres secondaires, leur diamètre est relativement similaire, quelle que soit l'exposition aux métaux considérée. Néanmoins, seul le témoin (T) est significativement

différent des autres traitements métalliques (avec et sans silicium). Aucune influence notable du silicium n'est présente.

Finalement, on notera que les fibres primaires ont une légère tendance à avoir un diamètre supérieur par rapport aux fibres secondaires.

Tableau 15 : diamètre (moyenne $\pm$ SD) des fibres phloémiennes (primaires et secondaires) tous marqueurs confondus (LM10 et CBM3aT : témoin ; TSi : témoin + silicium ; Cd : cadmium ; CdSi : cadmium + silicium ; Zn : zinc ; ZnSi : zinc + silicium. Les lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont statistiquement différentes ($p < 0.05$) ; $n = 3$).

Traitement	Diamètre des fibres phloémiennes (μm)					
	Fibres primaires			Fibres secondaires		
T	28,26 $\pm$	5,82	d	20,09 $\pm$	2,85	b
TSi	30,30 $\pm$	6,12	d	18,40 $\pm$	3,11	ab
Cd	14,39 $\pm$	2,88	a	nd		
CdSi	17,75 $\pm$	3,99	b	16,33 $\pm$	1,94	a
Zn	22,74 $\pm$	6,09	c	17,15 $\pm$	5,05	a
ZnSi	21,84 $\pm$	5,40	c	16,47 $\pm$	2,40	a

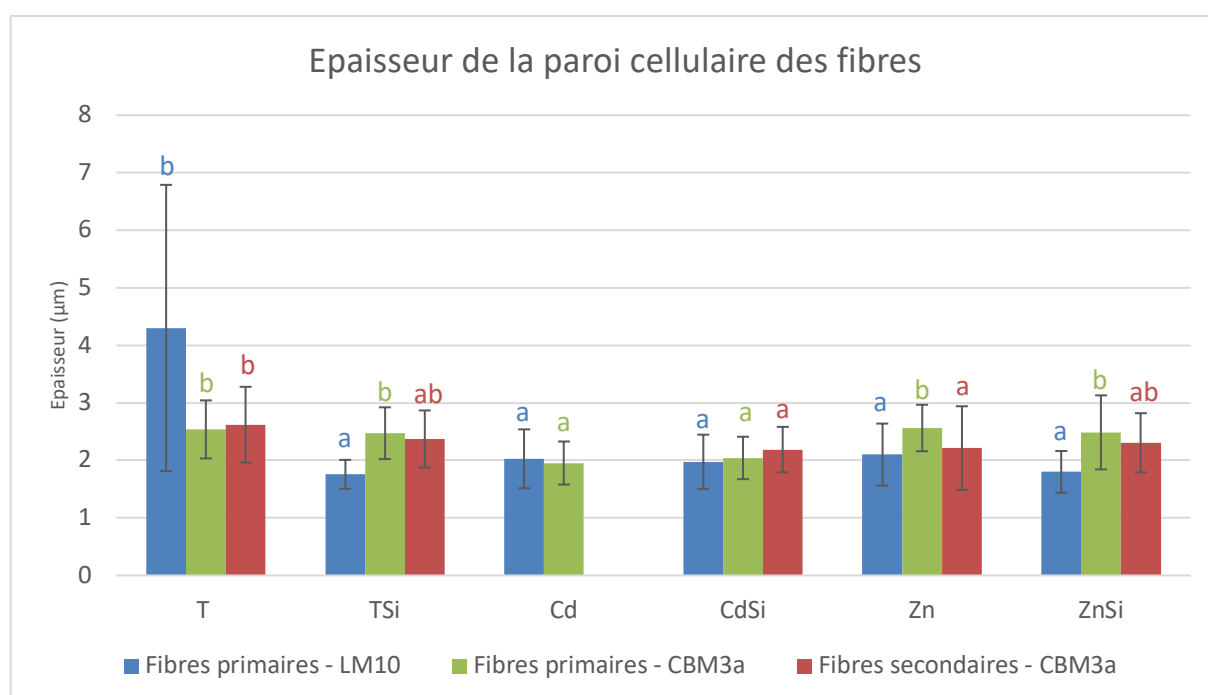


Figure 17 : épaisseur moyenne de la paroi des fibres phloémiennes (primaires et secondaires). T : témoin ; TSi : témoin + silicium ; Cd : cadmium ; CdSi : cadmium + silicium ; Zn : zinc ; ZnSi : zinc + silicium. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les différentes lettres indiquent que les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) ; $n = 3$.

De manière globale, quel que soit le marqueur considéré (LM10 – CBM3a), on remarque que l'épaisseur des fibres primaires et même secondaires est relativement semblable (figure 17 ; tableau 16). Si l'on regarde le marqueur LM10, seul le témoin (T) possède une épaisseur significativement plus importante. Pour ce qui est du marqueur CBM3a, on constate un effet

similaire par comparaison au diamètre des fibres primaires à savoir, les fibres des plantes exposées au cadmium (Cd ; CdSi) qui est significativement plus faible que pour les autres traitements (T ; TSi et Zn ; ZnSi).

Pour ce qui est du silicium, aucun effet notable n'est observé pour les deux marqueurs au sein d'un même traitement, en dehors du traitement témoin avec et sans silicium (T – TSi) pour le marqueur LM10. Concernant le marqueur CBM3a, comme il a déjà été souligné, seul le traitement CdSi est significativement plus faible par comparaison aux traitements TSi et ZnSi.

Tableau 16 : épaisseur (moyenne $\pm$ SD) de la paroi des fibres phloémiennes (primaires et secondaires). T : témoin ; TSi : témoin + silicium ; Cd : cadmium ; CdSi : cadmium + silicium ; Zn : zinc ; ZnSi : zinc + silicium. Les lettres au sein d'une colonne indiquent que les valeurs sont statistiquement différentes ($p < 0.05$) ; $n=3$.

	LM10					CBM3a							
Traitement	Fibres primaires				Fibres secondaires	Fibres primaires				Fibres secondaires			
T	4,30	$\pm$	2,49	b	nd	2,54	$\pm$	0,51	b	2,62	$\pm$	0,66	b
TSi	1,76	$\pm$	0,25	a	nd	2,47	$\pm$	0,45	b	2,37	$\pm$	0,50	ab
Cd	2,03	$\pm$	0,51	a	nd	1,95	$\pm$	0,37	a	nd			
CdSi	1,97	$\pm$	0,47	a	nd	2,04	$\pm$	0,37	a	2,19	$\pm$	0,40	a
Zn	2,10	$\pm$	0,54	a	nd	2,56	$\pm$	0,40	b	2,21	$\pm$	0,73	a
ZnSi	1,80	$\pm$	0,36	a	nd	2,49	$\pm$	0,64	b	2,31	$\pm$	0,51	ab

DISCUSSION

11 Discussion

Influence d'une contamination multiple aux ETM sur la morphologie et physiologie du chanvre industriel

L'étude de la physiologie du chanvre industriel en condition de terrain s'est axée, entre autres, sur les deux phases de la photosynthèse. Il en ressort qu'en 2019 plusieurs aspects de la phase claire de la photosynthèse (efficacité de photosystème II (figure 7b), photochemical quenching (figure 7c) et non photochemical quenching (figure 7d)) semblent être légèrement plus efficaces pour les plantes de la parcelle de CLL par rapport à celles de BB. L'efficacité potentielle du photosystème II (figure 7a) ne diffère quant à elle que lors de la première série de mesures, se traduisant par une efficacité du photosystème II plus grande au niveau de la parcelle BB. Néanmoins, les valeurs des deux parcelles non amendées oscillent autour de 0.85, ce qui est considéré comme un état « physiologiquement sain » de la plante (Denden et al., 2005). En 2018, Mathilde Blanquet a obtenu des résultats similaires à ceux observés durant l'année 2019 à savoir : un effet « site » inexistant. Il apparaît donc que dans ce cas précis, la phase claire de la photosynthèse n'a pas été impactée par la contamination aux ETM. Ces observations corroborent celles de Linger et al. (2005) qui ont montré que pour des niveaux de Cd modérés, le PSII du chanvre présente un bon niveau d'adaptation et que l'utilisation de l'énergie lumineuse demeure optimale, même pour des taux d'accumulation de Cd supérieurs à ceux observés dans notre étude. De même, Shi et al. (2012) constatent que pour des pollutions de 25 mg Cd.Kg⁻¹ de sol, il n'y a que peu de réduction des teneurs en pigments photosynthétiques et peu d'effets significatifs sur les paramètres de fluorescence.

Les valeurs de plusieurs autres paramètres (conductance stomatique (figure 8a), transpiration instantanée (figure 8c) et photosynthèse nette (figure 8d)) mesurés sur les plantes de la parcelle CLL semblent à nouveau légèrement plus élevées à celles mesurées à BB. Néanmoins, il est troublant de constater que la concentration en CO₂ intercellulaire (figure 8b) est plus faible pour CLL comparativement à BB, alors que la photosynthèse nette y est supérieure. Cependant, si la conversion du CO₂ en sucres est plus efficace sur CLL, le CO₂ aura moins tendance à s'accumuler dans les espaces intercellulaires, surtout si une fermeture partielle des stomates limite la diffusion de CO₂. Même si le chanvre présente une bonne réponse à l'ABA susceptible d'être produit en conditions de toxicité métallique (Shi et al., 2009 ; Xin et

al., 2016), il importe de souligner ici que la conductance stomatique n'est pas plus faible pour les plantes des parcelles CLL que pour celles de BB. Les résultats sont en outre plus contrastés entre les deux années de culture. En effet, en 2018, les valeurs de photosynthèse nette semblaient sensiblement plus faibles sur la parcelle contaminée de CLL. En 2019, les différences sont moins marquées pour les paramètres étudiés, en dehors de la concentration en CO₂ intercellulaire. On constate donc que suivant l'année d'étude, les paramètres liés la phase sombre tendent à s'inverser.

Ces observations tendent à suggérer que les différences de comportement des plantes entre les deux sites seraient liées à des facteurs microclimatiques plutôt qu'aux effets d'une contamination car l'on ne voit pas très bien comment une accumulation foliaire d'ETM pourrait être à l'origine d'une stimulation de la photosynthèse (sauf si l'on considère un phénomène d'hormèse envisagé par Poschenrieder et al. (2013), mais qu'il apparaît bien difficile de mettre en évidence dans des conditions fluctuantes de terrain). Bien qu'apparemment non affectés par le degré de contamination du sol, certains paramètres de la photosynthèse ont varié d'une date à l'autre (tableau 4-5) et d'une année de culture à l'autre. Plusieurs pistes d'explication ont été envisagées. Premièrement, le chanvre en 2019 a été semé un mois plus tard qu'en 2018. Il en a résulté qu'en 2019, lors de la 3^e série de mesures le chanvre était à un état de sénescence relativement avancé. Ainsi, certains paramètres physiologiques, et en particulier, le non photochemical quenching (figure 7d), ont évolué de façon surprenante entre les dates 2 et 3. Néanmoins, pour la plupart des paramètres de photosynthèse, la diminution des valeurs au cours du temps pourrait refléter une réduction normale de l'activité photosynthétique due à l'âge de la plante (Guinn et Brummett, 1993 ; Richardson, 1957).

Que ce soit en 2018 ou en 2019, les plantes ont connu des conditions climatiques relativement exceptionnelles : durant toute la période estivale de 2018 et 2019, les températures étaient au-dessus des normales de saison (entre 1 et 2 degrés). Celles-ci ont atteint la valeur maximale record de 41,5°C le 25 juillet 2019 (météofrance.com). Outre la température, l'humidité relative a oscillé entre 30 et 60 % (figure 12) durant la saison de culture de 2019. Or proche des 30 %, il s'agit de conditions asséchantes pour le végétal (Grange et Hand, 1987) pouvant altérer de nombreux processus physiologiques (conductance stomatique, assimilation du

carbone, transport d'eau et d'ions, etc) (Grantz, 1990 ; Meinzer, 2003). Les informations issues du contenu volumétrique en eau (figure 11) indiquent un sol pauvre en eau, du moins en surface. Les données n'ont pu être recueillies que pour les premiers centimètres de sol, ce qui ne permet pas de connaître l'état de la colonne d'eau du sol. Cependant, elles indiquent des valeurs bien inférieures (moins de 10 %) au pourcentage optimal de croissance du végétal préconisé pour un sol limoneux (35 %) (Shortt et al., 2011). On peut donc penser que le chanvre a connu un ou plusieurs épisodes de stress hydrique durant son développement, que ce soit en 2018 ou en 2019, raison pour laquelle certains paramètres ont pu varier d'une année à l'autre et qui pourraient ne pas avoir été de la même ampleur sur les deux sites pour des raisons de texture de substrat indépendante des niveaux de contamination. Il est possible que ce stress hydrique périodique ait impacté le métabolisme du chanvre à travers l'activité de la RuBisCO (Tezara et al., 1999 ; Parry et al., 2002). Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la concentration en CO₂ intercellulaire. Afin de pouvoir évaluer l'importance de ces conditions climatiques sur les résultats obtenus, une culture de chanvre a été réalisée en serres en 2018 par Blanquet, 2018. Il s'agit de plantes cultivées sur du sol issu des deux parcelles étudiées (BB et CLL). Cette expérience a permis de mettre en évidence que la contamination en ETM n'a pas eu d'effet majeur sur l'activité photosynthétique des plantes, et de confirmer que seuls les paramètres environnementaux peuvent expliquer les différences observées entre les sites et les deux années de culture. D'autres considérations phytotechniques qui n'ont pas été prises directement en compte peuvent aussi avoir eu un effet sur la réponse des plantes au niveau des deux sites. Landi et al. (2019) ont récemment insisté sur l'importance de la nutrition azotée sur la réponse de la plante à la sécheresse. Cittero et al. (2005) ont mis en évidence l'importance de la mycorrhization, notamment sur des sites contaminés aux ETM, cette mycorrhization pouvant contribuer à améliorer le comportement de la plante.

En matière d'absorption des ETM, plusieurs études ont déjà démontré la capacité du chanvre, exposé à un stress métallique, à absorber et transloquer le Cd, Pb et Zn, que ce soit pour des plantes cultivées en solution nutritive ou sur sol (Blanquet, 2018 ; Ahmad et al., 2016a ; Di Candito et al., 2004 ; Kumar et al., 2017 ; Shi et al., 2012, Linger et al., 2002 ; Angelova et al., 2004). Les résultats issus du dosage de ces 3 éléments (figures 9 a-b-c et tableau 6) sur les parcelles de BB et CLL appuient les informations préexistantes : les plantes de la parcelle contaminée de CLL présentent une accumulation foliaire supérieure à celles de BB. Cette

accumulation foliaire n'a, comme nous l'avons vu, pas affecté l'activité photosynthétique, qui plus est, était légèrement supérieure pour les plantes cultivées sur CLL.

Concernant la tige, le taux d'accumulation d'ETM entre les deux parcelles est relativement semblable. Nous constatons également que les valeurs d'accumulation mesurées en 2019 sont supérieures à celles de 2018. Ceci peut s'expliquer de plusieurs manières. Tout d'abord, la technique de dosage employée durant les deux années n'est pas absolument identique. Celle utilisée en 2019 (spectroscopie à plasma à couplage inductif : ICP) présente un seuil de détection plus bas que celle de 2018 (spectroscopie d'absorption atomique : AAS) d'où le fait que le cadmium n'ait pas été détecté dans les plantes issues du terrain en 2018 alors qu'il l'a été en 2019. Ensuite, il s'agit de la deuxième année de culture du chanvre sur ces deux parcelles. Il pourrait donc être envisageable que les plantes aient quelque peu favorisé la biodisponibilité des ETM via une modification des conditions rhizosphériques, ou encore via un échange cationique plus conséquent (Sarwar et al., 2017 ; Violante et al., 2010). Rappelons toutefois que le dispositif expérimental mis en place implique une rotation et que les parcelles cultivées en chanvre en 2019 ont été cultivées en blé en 2018.

Par ailleurs, les concentrations observées au sein des plantes restent relativement faibles, contrairement à celles pouvant être obtenues en solution hydroponique (Blanquet, 2018 ; Huang et al., 2019) ou des cultures établies sur d'anciens sites miniers avec des niveaux de pollution bien supérieurs à ceux qui caractérisent nos substrats (Kos et Lestan, 2004 ; Hussain et al., 2019). Comme le montre l'étude des paramètres agronomiques du sol (tableau 3), celui-ci présente naturellement une faible biodisponibilité pour les ETM étudiés. Pour autant, d'autres études réalisées *in situ* (Varun et al., 2012 ; Mayerová et al., 2017) montrent une capacité d'accumulation de Cd, Pb Zn au sein du système aérien plus importante pour des plantes de chanvre cultivées sur des sols de gammes de concentration plus ou moins similaires à celles de notre étude. Dans ces études, la biodisponibilité des éléments est plus élevée que celle que nous avons relevée. Il apparaît donc que la capacité phytoextractrice du chanvre augmente lorsque les conditions de biodisponibilité le permettent. La biodisponibilité est, pour des raisons pratiques, estimée une fois en début d'expérience mais il convient ne pas oublier qu'il s'agit en fait d'une propriété dynamique qui évolue selon une certaine cinétique en fonction des interactions inhérentes au fonctionnement de la rhizosphère.

Quant au zinc, la concentration observée est semblable entre les différents cas d'études. Il pourrait s'agir d'une conséquence provenant du caractère essentiel du zinc comparativement au Cd et Pb. La plante est clairement considérée par certains auteurs comme une accumulatrice de zinc (voir Kumar et al., 2017 pour revue), témoignant d'un comportement particulier du chanvre à l'égard de ce contaminant potentiel, comportement qui pourrait être la conséquence du fait que le Zn est un élément essentiel (et que des systèmes de transports spécifiques existent donc), ce qui n'est pas le cas pour le Cd et le Pb.

Au sein du chanvre, la distribution des ETM en fonction des organes se fait généralement de la manière suivante : racines > tiges > feuilles > graines. Cependant, dans le cadre de cette étude, les feuilles présentaient une teneur supérieure en ETM par rapport aux tiges (figures 10 a-b-c; tableau 7). Au sein des tiges, une partie des métaux présents pourrait se situer au niveau des fibres. En effet, plusieurs études montrent que les fibres ligno-cellulosiques du chanvre ont la capacité de fixer divers ETM via des phénomènes de biosorption (Pejic et al., 2009 ; Pejic et al., 2011 ; Vukcevic et al., 2014a ; Vukcevic et al., 2014b). Ces dernières sont même employées dans un nouveau domaine de filtration de fluides contaminés en divers métaux. Dans le cadre de cette utilisation, il apparaît que leur capacité de sorption peut être renouvelée via un processus de régénération des fibres (Tofan et al., 2015). Il pourrait y avoir à cet égard des applications possibles pour des sous-produits ne pouvant être commercialisés comme fibres de qualité (Westerhuis et al., 2019) mais qui ont démontré récemment d'excellentes propriétés de biosorption (aussi dans le cas d'une toxicité polymétallique) (Loiacono et al., 2018 ; 2019). Des approches récentes ont également permis de cibler l'intérêt du chanvre pour la fixation de polluants organiques (per- et polyfluoroalkyl) (Turner et al., 2019)

Il est donc pertinent de se demander si ce processus de fixation influence la formation des fibres et *in fine* leur qualité. Pour tenter de répondre à cette question, une approche immunohistologique a été réalisée. Des sections de tiges de plantes cultivées en solution nutritive ont été marquées à l'aide de l'épitope LM10 (xylane) (figure 14) ou CBM3a (cellulose cristalline) (figure 15). L'emploi de chanvre ayant poussé en conditions hydroponiques permet d'appréhender plus efficacement l'impact des ETM sur les fibres, en s'assurant une

translocation élevée vers les tiges. A noter qu'il n'a pas été possible de réaliser directement l'analyse de microscopie confocale sur le chanvre issu de la culture de terrain vu la rigidité de la tige.

Il ressort de cette étude que l'intensité de fluorescence des tissus est supérieure pour le marquage CBM3a (tableau 14) comparativement au LM10 (tableau 13). Ceci peut s'expliquer par l'abondance de la cellulose dans les parois par rapport à l'hémicellulose (Held et al., 2014), et en particulier dans les fibres phloémiennes (+/- 72 % cellulose – 14 % xylan) (Shahzad, 2012). En effet, une quantité plus importante du composé permet une liaison plus élevée du marqueur et donc, une réponse supérieure. Il est généralement admis que l'exposition aux éléments traces métalliques engendre une réponse cellulaire. Au niveau des fibres, il peut s'agir d'un remodelage de la paroi permettant un épaissement en divers composés (pectine, hémicellulose, lipides, etc.), réduisant la perméabilité pariétale et donc la quantité d'éléments traces métalliques entrant dans le symplase (Petit et al., 2019). Cette réponse induit aussi la synthèse de divers composés polysaccharidiques, qui augmentent la capacité de rétention de ces éléments métalliques au niveau de la paroi (Krzyszowska, 2011 ; Krzyszowska et al., 2009). L'ensemble de ces modifications ont, entre autres, pour effet d'augmenter l'épaisseur de la paroi. Pourtant, dans le cas de cette expérience, l'épaisseur de la paroi des fibres primaires diminue suite à l'exposition métallique (Cd et Zn)(figure 17; tableau 16). Cette observation se réitère pour les fibres secondaires en présence de zinc. Nous n'avons pas obtenu de résultats pour les plantes exposées au cadmium puisque les fibres secondaires ne semblaient pas ou peu développées (absence de signal). On peut toutefois supposer que l'effet du Cd est similaire sur les fibres primaires et secondaires. Nos résultats sont donc contradictoires à ceux issus d'autres études portant sur l'influence des métaux sur le système vasculaire. Bouazizi et al. (2010) indique que chez le haricot, l'épaississement pariétal tend à augmenter en fonction de la concentration en cuivre, jusque dans une certaine limite. Si cette tendance n'est pas observée, il se pourrait que cela soit dû à la concentration employée. Luyckx et al. (2017) et Blanquet (2018) ont montré qu'à une concentration de 20 μM Cd, la croissance du chanvre est altérée. Il est donc possible que le développement des fibres soit impacté par la présence élevée de cadmium, et ce, bien avant que les fibres ne déposent leur paroi secondaire. Nous avons en effet constaté l'absence de fibres secondaires en présence de Cd (figure 15). On peut supposer que la toxicité de l'élément a eu pour conséquence de ralentir la formation des fibres. Le mécanisme de réponse du chanvre face au

cadmium ou au zinc peut être différent étant donné leur caractère non essentiel et essentiel pour le métabolisme. Ainsi, une série de transporteurs impliqués dans la régulation du zinc au niveau cellulaire pourrait expliquer que ce dernier induit une réponse pariétale moins marquée que celle du cadmium.

Un second élément associé à la nature de la paroi secondaire du chanvre peut être évoqué et tient à sa composition plus qu'à son épaisseur : contrairement à la paroi cellulaire secondaire des fibres xylémiennes constituée des couches S1, S2 et S3, les fibres phloémiennes possèdent les couches S1, S2 et G (Guerriero et al., 2016). La composition des couches S est faite principalement de cellulose, de xylane, de lignine et d'un peu de pectine (Gorshkova et al., 2012 ; Morin-Crini et al., 2019) alors que la couche G contient majoritairement de la cellulose et est exempte de xylane et de lignine (Behr, 2018). La lignine présente un rôle important dans l'inactivation des ETM par leur fixation au niveau de la paroi via ses différents groupes fonctionnels (hydroxyle, carboxyle, méthoxyle, etc.) (Liu et al., 2018). Dès lors, on pourrait imaginer qu'il existe chez le chanvre une forme de remodelage pariétal entraînant la réduction de la synthèse de cellulose au profit de la lignine. Taylor (2008), appuie l'idée que l'inhibition de la synthèse de cellulose par divers composés chimiques peut mener à une accumulation de lignine. Ces modifications pariétales pourraient alors se traduire par une diminution de l'épaisseur de la paroi au profit de la synthèse de lignine, dans le but d'accentuer la fixation d'ETM. La présence d'ETM peut aussi stimuler la synthèse de composés phénoliques intervenant dans la fabrication de la lignine (Liu et al., 2018). Selon Zimniewska et al. (2018), la synthèse de composés phénoliques peut avoir pour objectif de renforcer les capacités antioxydantes des tissus dans leur ensemble, alors même que les ETM activent la synthèse de ROS. Finger-Teixeira et al. (2010) ont toutefois montré que l'exposition au cadmium chez le soja avait pour effet d'accroître la synthèse de monolignols (qui est un précurseur de la lignine), entraînant une augmentation de la lignine au niveau des racines. Valentovičová et al. (2009) ont quant à eux observé un phénomène similaire chez l'orge, à savoir une élévation de la quantité de lignine dans les vaisseaux du xylème suite à une exposition à divers ETM.

Nous constatons par ailleurs que la pollution métallique n'influence pas que l'épaississement des parois. En effet, le diamètre des fibres primaires a été réduit de moitié lors d'une exposition au cadmium et d'un cinquième dans le cas du zinc. Pour les fibres secondaires, on

observe aussi une diminution du diamètre, mais moins importante (figure 16; tableau 15). De nouveau, nous n'avons pas pu obtenir de valeur concernant le diamètre des fibres secondaires du traitement Cd, mais pour celles du traitement Cd+Si nous observons également une diminution du diamètre.

Si l'on transpose ce qui a été observé en conditions contrôlées à notre expérience de terrain, on peut imaginer que dans le cas de la parcelle de CLL, la formation des fibres n'est pas altérée par la contamination. En effet, comme il a déjà été mentionné précédemment, la contamination induite sur la parcelle de CLL reste relativement limitée étant donné le caractère peu biodisponible des ETM. Nous n'avons d'ailleurs pas constaté de diminution de la taille des plants sur CLL, contrairement aux plantes en hydroponie sur lesquelles nous avons réalisé l'étude microscopique.

De plus, si l'on s'en réfère au titre des fibres qui est défini comme la masse par unité de longueur et qui est principalement utilisé comme un des paramètres de qualité de celle-ci dans l'industrie, sous la dénomination de « finesse des fibres » (Khan et al., 2011). Toutefois, selon le domaine d'utilisation des fibres, les facteurs de qualité peuvent varier suivant les caractéristiques recherchées (Meshram et Palit., 2013). Alors, il ressort que le développement du chanvre sur le sol contaminé de CLL n'a pas eu d'influence négative sur le titre des fibres (figure 13). Cet élément appuie en faveur du chanvre dans l'utilisation de celui-ci sur sol faiblement contaminé, dans une optique de production à des fins non alimentaires. NB : d'autres propriétés mécaniques des fibres sont en cours d'analyse, mais ne sauront pas être ajoutées dans le présent mémoire.

Enfin, certains auteurs concluent que sur des sites peu contaminés, le chanvre peut être utilisé à des fins de valorisation de terres marginales impropres à des productions alimentaires, et présente une bonne stabilité de productions de fibres, tant en termes quantitatifs que qualitatifs. En outre, l'un des avantages de l'espèce est de pouvoir être utilisée à de multiples fins, en ce compris la production de cannabinoïdes et d'huile pour des applications médicales et cosmétique. Même si la graine peut accumuler de faibles quantités de Cd (Mihoc et al., 2012), la production de cannabinoïdes peut être stimulée en conditions de stress hydrique ou

de toxicité ionique et la culture de chanvre pour cette finalité n'est donc pas non plus à exclure, même sur des terrains marginaux (Husain et al., 2019 ; García-Tejero et al., 2019)

Influence des amendements sur le chanvre industriel

Le biochar est un amendement connu pour sa capacité à limiter la biodisponibilité des ETM, et favoriser les propriétés bio-physico-chimiques du sol (activité microbienne, rétention d'eau, pH, éléments nutritifs, etc.) ce qui, à son tour, permettrait d'améliorer le comportement des plantes sur sol contaminé (Jeffery et al., 2011 ; Liu et al., 2013 ; Lu et al., 2012 ; Lucchini et al., 2014). Le biochar de *Miscanthus* présente les mêmes effets bénéfiques que d'autres biochars produits au départ de matières premières différentes (Janus et al., 2015). Houben et al. (2014) précisent que le *Miscanthus* peut être considéré comme une source potentielle de silicium biodisponible, qui peut modérer l'effet néfaste d'un stress métallique (Luyckx et al., 2019). Le compost, quant à lui, est également considéré comme positif lors de stress environnementaux. Il partage de nombreuses caractéristiques sur les modifications bio-physico-chimiques du sol avec le biochar, et contribue à un apport d'éléments nutritifs conséquent (Sung et al., 2011). L'association de biochar et de compost pourrait permettre un effet équivalent voire supérieur à l'amendement biochar ou compost seul (Wu et al., 2017). En effet, le fort pouvoir adsorbant des cations par le biochar pourrait être compensé par l'apport de minéraux du compost.

Lors de l'essai de terrain, ni le biochar, ni le compost et ni le biochar + compost n'ont eu d'effet significatif sur la photosynthèse des plantes, quels que soient le site considéré et l'année de culture considérée (figures 7 et 8; tableaux 4 et 5). Cependant, quelques tendances ont été observées : en 2019, sur la parcelle BB, l'ajout de compost s'est accompagné d'une augmentation des valeurs pour certains des paramètres mesurés comparativement au bloc non amendé. Cependant, cette observation ne s'est pas répétée sur la parcelle de CLL.

De toute évidence, il est difficile de lier une implication directe des amendements, car leurs effets sont contrastés en fonction du paramètre étudié et de la date de mesure. Encore une fois, le cas est similaire pour l'année 2018 où aucun des amendements ne se démarque.

Ainsi, l'étude portant sur l'ajout d'amendements n'a pas montré de résultats probants. Il est possible que les plantes possèdent un comportement physiologique relativement normal, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de l'ajout d'un amendement.

Ensuite, il est nécessaire de garder à l'esprit que, bien que BB soit considéré comme la parcelle témoin, celle-ci présente tout de même un certain degré de contamination, bien que plus faible que celui de CLL. La majorité de la pollution engendrée est d'origine atmosphérique et le niveau de contamination du sol provient de l'orientation des vents dominants. Ainsi, suivant la situation des vents, la parcelle de BB a pu être touchée par les rejets produits. On peut aussi ajouter qu'une partie du biochar utilisé provient de miscanthus cultivés sur le site de MetalEurop Nord. Enfin, la présence de munitions datant de la Première Guerre mondiale a été évoquée pour expliquer la présence de plomb dans la parcelle BB (Douay, communication personnelle).

Concernant l'apport d'amendements sur l'influence d'absorption des ETM par le chanvre à BB et CLL, il a été observé que de manière générale, la présence de biochar; de compost ou de biochar + compost induit une accumulation de métaux sensiblement identique, voire supérieure aux plantes non amendées (figure 9; tableau 6). À première vue, cela peut sembler quelque peu déroutant étant donné les propriétés des deux amendements mentionnés ci-dessus. Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour expliquer cette tendance : (i) les amendements appliqués au sol sont capables d'améliorer les conditions bio-physicochimiques du sol, pouvant accroître le potentiel d'accumulation du végétal ; (ii) la capacité de rétention des métaux par le biochar est un phénomène réversible dépendant du pH, qui peut varier au cours du temps (Houben et al., 2013) ; (iii) enfin, les conditions climatiques exceptionnelles ont pu avoir pour conséquence une évapotranspiration élevée, favorisant l'entrée des métaux au sein du système vasculaire. En effet, il se pourrait que les amendements aient permis, via leurs propriétés physicochimiques, d'accroître les teneurs en eau du sol comparativement aux blocs non amendés. Il aurait été dès lors possible pour ces plantes, de maintenir un flux transpiratoire malgré les conditions de chaleur élevée.

Globalement, on observe entre les dates 2 et 3 (tableau 6) une stabilisation voire une chute de l'accumulation foliaire, en particulier dans le cas du biochar + compost sur la parcelle CLL.

Ceci pourrait être dû à l'état de sénescence avancé lors de la date 3. En effet, il a été constaté qu'à ce moment précis, peu de feuilles âgées étaient encore présentes, ne laissant place qu'à de jeunes feuilles à l'apex de la tige. Il s'avère que dans le cas d'une contamination métallique, les feuilles âgées constituent un site de dépôt préférentiel étant donné leur activité métabolique réduite (Lin, 2014). Toutefois, on notera qu'en 2018, le chanvre présentait tout comme en 2019, une teneur équivalente ou supérieure en zinc tous amendements confondus par rapport au sol non amendé. Ensuite, les résultats issus du dosage au sein de la tige (tableau 7) ont montré des variations moins importantes que pour les feuilles (tableau 6). Il en ressort que pour le cadmium, les amendements ont eu tendance à légèrement diminuer l'accumulation de ce dernier. Mais concernant le plomb et le zinc, les valeurs mesurées sont semblables à celles obtenues sans ajout d'amendement. Par ailleurs, si l'on s'attarde à la troisième date de mesure du zinc, on constate une chute importante de la concentration comparativement aux deux autres dates (figure x). Deux éléments peuvent expliquer ce phénomène (i) la section de tige utilisée n'est pas identique entre les dates 1 - 2 (3 sections 10 centimètres) et 3 (section totale de la tige) ; (ii) les constituants des papiers filtres employés lors du dosage présentent une certaine quantité en zinc, entraînant une possible contamination lors du processus de filtration.

D'autres éléments essentiels ont été mesurés (tableau 8) sur les plantes issues de la dernière série de mesures, dans l'optique de pouvoir caractériser le comportement du chanvre sur les parcelles de BB et CLL. Il est ainsi apparu que l'assimilation du potassium dans les feuilles et dans les tiges a été beaucoup plus importante en présence de compost et de biochar sur la parcelle de CLL. Le rôle de ce dernier dans le métabolisme de la plante est extrêmement varié, mais il apparaît comme étant indispensable lors de stress abiotiques. Il intervient par exemple dans la régulation de l'ouverture des stomates et donc, dans la gestion du stress hydrique (Hasanuzzaman et al., 2018). Ainsi, le chanvre ayant été potentiellement exposé à un déficit hydrique couplé à la présence d'ETM, il se pourrait que les amendements aient favorisé l'assimilation du potassium dans le but de renforcer le métabolisme à l'encontre du stress. Il est vrai que si l'on se réfère aux paramètres physiologiques étudiés, le chanvre semblait se comporter légèrement mieux sur CLL que sur BB alors que cette augmentation d'assimilation ne se manifeste que pour CLL. Il pourrait toutefois s'agir d'un phénomène de précaution chez la plante, induit par la contamination du sol.

Concernant le magnésium, il s'agit de l'élément central de la chlorophylle (Hermans et al., 2011). Il a été observé que sa teneur était moindre sur la parcelle de CLL par rapport à BB, aussi bien dans les feuilles que dans la tige. On pourrait lier ce phénomène au degré de contamination du sol qui induirait une compétition entre l'assimilation du magnésium et les ETM (Breckle et Kahle, 1992). Mais cette disparité de concentration entre les deux parcelles, pourrait aussi être due à un niveau de sénescence plus avancé sur CLL que sur BB. De plus, si l'on s'en réfère à la photosynthèse nette lors de la date 3 (figure 8d), les plantes de CLL présentaient une activité photosynthétique tout aussi déclinante que sur BB. Ces variations dans les teneurs de magnésium pourraient être le reflet de niveaux différents de remobilisation de ce dernier vers les graines. Finalement, les données issues du soufre n'ont pas montré de différence marquante entre les deux parcelles. Elles sont le reflet, entre autres, de la présence de phytochélatines. Néanmoins, comme il a déjà été évoqué à plusieurs reprises, la biodisponibilité sur les parcelles est faible et l'état de sénescence était avancé, ne nécessitant potentiellement plus une intervention d'un mécanisme de défense métaboliquement coûteux à l'encontre des ETM.

Influence de la pulvérisation de silicium sur le chanvre lors d'une contamination métallique

Rappelons que le silicium est un métalloïde non essentiel chez les plantes. Cependant, pour un certain nombre de végétaux, il est considéré comme bénéfique. Il permet d'améliorer la croissance, la productivité, réguler le prélèvement de minéraux ou encore la résistance aux stress environnementaux (Luyckx et al., 2019 ; Ma et Yamaji, 2006). Dans le sol, le Si est prélevé par le système racinaire sous forme d'acide silicique (SiOH_4) (Richmond et Sussman, 2003). L'utilité du silicium dans la résistance à l'encontre des ETM est un phénomène observé chez bon nombre de plantes supérieures (Imtiaz et al., 2016). Il semblerait qu'il puisse influencer la production de fibres (Luyckx et al., 2017). Le silicium diminuerait notamment la biodisponibilité des ETM au niveau du sol, et permettrait au sein de la plante une coprécipitation, une compartimentation, des modifications structurales, un changement dans l'expression de gènes, etc. (Ahmad et al., 2016b). Le silicium au niveau racinaire peut précipiter au niveau de l'endoderme et suppléer au cadre de Caspary pour limiter le flux de by-pass entraînant avec lui des éléments potentiellement toxiques (Lutts, communication personnelle).

Dans le cadre de cette étude, le silicium a été appliqué par pulvérisation foliaire : comme démontré par Blanquet, 2018, une absorption racinaire est plus efficace en termes d'accumulation, mais reste peu réalisable en conditions agricoles. Ainsi, le dosage des teneurs en silicium dans les feuilles (tableau 9) montre que, globalement, les concentrations observées sont similaires entre les deux années de culture. Nous nous attendions à ce que l'accumulation de silicium soit plus importante chez les plantes pulvérisées, mais ça n'a pas été le cas. Le biochar de miscanthus, présenté comme source potentielle de silicium (Houben et al., 2014), semble par contre apporter sensiblement plus de silicium biodisponible pour le chanvre, étant donné que les concentrations observées sont généralement supérieures à celles des plantes non amendées. Ceci pose inévitablement la question de savoir si le silicium peut effectivement être absorbé par la plante s'il est apporté sous forme de pulvérisation foliaire et la réponse à cette question est d'importance générale, compte tenu du grand nombre de produits commerciaux réputés contenir du Si bénéfique et qui sont utilisés selon ces modalités.

En 2019, les valeurs maximales d'absorption de silicium sont obtenues par l'amendement biochar sans ajout de silicium à BB et CLL. Alors qu'en 2018, il s'agissait de l'amendement compost avec ajout de silicium. À noter que le compost peut être aussi une source de silicium disponible suivant les matières premières employées. En 2019, contrairement à l'année 2018, le degré de contamination n'a pas semblé impacter l'accumulation de silicium. Cependant, les résultats obtenus en 2019 sont discutables étant donné l'état de sénescence avancé du chanvre. Comme évoqué précédemment, seules les jeunes feuilles étaient encore présentes. On peut aisément imaginer qu'une partie du silicium absorbé ait été éliminé avec les feuilles sénescentes. Toutefois, il reste tout de même difficile de trancher sur la meilleure combinaison permettant une accumulation maximale de silicium, au vu de la grande variabilité entre les résultats.

À propos des paramètres physiologiques, il a été constaté que la pulvérisation foliaire n'a pas eu d'influence sur la phase claire ou sombre de la photosynthèse, toutes parcelles et amendements confondus (tableaux 10 - 11). Tout comme les amendements, le silicium avait pour objectif final d'induire une meilleure efficacité du comportement du chanvre sur un sol contaminé. Ainsi, de la même manière que ces derniers, l'ajout de silicium ne semble pas être

nécessaire dans le cadre de cette culture pour les mêmes raisons qu'évoquées précédemment à savoir : un état physiologique « bon » et une faible biodisponibilité des ETM. De la même manière, suite à la pulvérisation foliaire de silicium, il a été montré que ce dernier n'avait pas d'influence significative sur l'accumulation foliaire des ETM (tableau 12). On peut évoquer des raisons similaires aux autres amendements, comme une faible biodisponibilité des métaux, un état de sénescence avancé, ou encore, une faible translocation vers les feuilles.

Étant donné l'intérêt porté au silicium dans le cadre de cette étude, il a été décidé d'analyser l'influence potentielle de celui-ci en solution hydroponique, sur la formation des fibres lors d'un stress métallique. Globalement, il a été observé des résultats relativement similaires à ceux obtenus sans l'ajout de silicium (figures 14 et 15). La présence de cadmium ou de zinc induit de la même manière une intensité de fluorescence plus importante pour le marqueur CBM3a (tableau 14) que le LM10 (tableau 13), dans le cas des fibres phloémiennes. Quant au diamètre des fibres primaires, celui-ci est aussi en baisse, dans les mêmes proportions que sans silicium, lors de l'exposition aux métaux (figure 16; tableau 15). Pour les fibres secondaires, il y a aussi une tendance à la diminution du diamètre de celles-ci. Ensuite, pour l'épaisseur des parois, seules les fibres primaires du marquage CBM3a présentent une diminution lors de l'exposition au cadmium (figure 17; tableau 16). Il semblerait donc que l'ajout de silicium n'ait pas eu l'effet escompté, si l'on s'en réfère à la littérature. En effet, selon Luyckx et al. (2017 ; 2019), la présence de silicium pourrait accroître la production des fibres phloémiennes. Luyckx et al. (2017) ont ainsi émis l'hypothèse que l'augmentation de croissance engendrée par le silicium pourrait être, entre autres, due à l'action de ce dernier sur la biosynthèse des phytohormones. Bon nombre de ces hormones, auxines, cytokinines, acide jasmonique, acide abscissique, gibbérellines ont un rôle essentiel dans la formation et la différenciation des cellules du (pro)cambium, en fibres primaires et secondaires. Ainsi, le silicium pourrait agir (en partie) en affectant la synthèse de ces composés.

On peut évoquer l'absence d'effets marqués pour les mêmes raisons que pour le traitement sans apport de silicium, à savoir l'influence d'une concentration élevée en Cd et en Zn. Il se peut que le degré important de contamination masque les effets bénéfiques apportés par le silicium. Il est aussi envisageable qu'à ces niveaux de concentration en Cd et Zn, l'absorption d'éléments minéraux soit quelque peu perturbée, limitant l'absorption du silicium, ainsi que

sa translocation vers la tige. De plus, Blanquet, 2018 a montré que le chanvre cultivé en solution hydroponique (dans les mêmes conditions que celles réalisées pour l'étude des fibres) ne présentait qu'un peu plus de 0,4 % de Si en matière sèche. Ce pourcentage est en adéquation avec la littérature considérant qu'à moins de 1 % de Si en matière sèche, il s'agit d'espèces de type « excluders » ou non accumulatrices (Imtiaz et al., 2016). De la même manière, les plantes cultivées à BB et CLL ne présentaient pas plus de 1 % de Si en matière sèche que ce soit en 2018 ou 2019 (tableau 9). Pour autant, cela n'empêche de considérer le silicium comme bénéfique pour le chanvre. On peut par exemple observer pour le marqueur CBM3a, que les fibres secondaires phloémiennes ne sont pas présentes pour le traitement cadmium alors qu'en présence de cadmium et silicium (figure 15) celles-ci ont tendance à être visibles. Toutefois, ce faible pourcentage en Si, couplé à une toxicité élevée en Cd et Zn, pourrait expliquer son absence d'influence marquée dans la formation des fibres dans le cas de cette expérience en conditions contrôlées. En outre, il n'est pas inutile de rappeler que des composés de silanes (contenant du Si sous différentes formulations) sont utilisés par les industriels sur les fibres après récolte de ces dernières (Panaitescu et al., 2016 ; Jiang et al., 2018 ; Moonart et Utara, 2019) : il semble donc clair que le Si doit avoir un impact sur la qualité de la fibre, à tout le moins sur ses propriétés mécaniques, même lorsque la fibre finale est obtenue. Les effets du Si sur les fibres en cours de développement in situ seraient alors dépendants des doses de Si utilisées, et de l'accessibilité des fibres au sein de la tige pour du Si qui a été apporté soit par voie racinaire, soit par voie foliaire.

CONCLUSION

12 Conclusion

L'expérience de terrain qui s'est étalée sur une période de deux ans a eu pour but de préciser l'intérêt du chanvre industriel (*Cannabis sativa*) dans la phytoremédiation des sols contaminés aux éléments traces métalliques. Il a été aussi question d'appréhender la possibilité de valorisation des sous-produits issus de cette culture.

Tout d'abord, il a été constaté que l'état physiologique général de la plante ne semble pas avoir été impacté par la présence de Cd, Pb et Zn. Il même été observé qu'en 2019 plusieurs paramètres physiologiques avaient tendance à être légèrement meilleurs sur la parcelle de CLL. Toutefois, entre les deux années de culture, certains facteurs présentaient un comportement totalement différent. Il faut dès lors considérer qu'en 2018 et 2019, le chanvre a connu des conditions microclimatiques exceptionnelles. Il est donc probable que ces dernières aient masqué l'effet des ETM par le biais de stress hydriques et thermiques. De plus, les niveaux d'accumulation de ces métaux restent relativement bas, en regard au faible niveau de biodisponibilité de ceux-ci.

Ensuite, l'ajout d'amendements (biochar, compost, biochar+compost et silicium) n'a pas eu l'effet escompté. Ceux-ci n'ont pas affecté l'activité photosynthétique du chanvre sur les deux années de culture. Les effets n'étant potentiellement pas visibles étant donné que le chanvre semblait avoir un comportement physiologiquement sain. Concernant l'accumulation des ETM, ces derniers ne l'ont pas influencé. Il est vraisemblable que l'absence d'effets soit, entre autres, liée au degré de biodisponibilité.

Enfin, l'analyse de l'influence des ETM, en l'occurrence le Cd et Zn, en conditions contrôlées, a montré qu'à des niveaux élevés de concentration la formation des fibres est altérée. Il est possible que le chanvre réponde à cette contamination par un remodelage pariétal via une réduction de la synthèse de cellulose au profit de la lignine. En effet, cette dernière présente un rôle important dans l'inactivation des ETM au niveau des parois. Néanmoins, pour la culture de terrain, il n'a pas été constaté de diminution de la taille du chanvre sur la parcelle

de CLL. De plus, l'information issue du titre des fibres indique clairement l'absence d'effet de la contamination du sol sur celles-ci.

Finalement, le chanvre industriel semble être un candidat potentiel dans une optique de phytoremédiation et de valorisation des sous-produits à des fins non alimentaires. En effet, dans une situation où le sol est faiblement contaminé, empêchant la production de denrées, le chanvre se développe particulièrement bien. Il pourrait ainsi permettre de valoriser des sols ne pouvant plus accueillir une agriculture à vocation alimentaire.

Par ailleurs, on peut ajouter qu'un certain nombre d'informations additionnelles permettraient d'éclaircir plusieurs points sur le comportement et l'utilisation du chanvre. Ainsi, il serait intéressant de déterminer les teneurs en cellulose et lignine au sein des fibres pour identifier s'il y a bien un remodelage pariétal lors d'une contamination élevée. Concernant les fibres, d'autres mesures de caractérisation des propriétés physiques sont en cours de réalisation. Elles pourront permettre d'appréhender plus précisément dans quelle mesure elles sont utilisables dans des processus industriels.

REFERENCES

13 Bibliographie

- ADEME. (2015). *Appel à projets de recherche GESIPOL*.
- ADEME. (2017). *Quelles innovations pour les outils et méthodes de diagnostic, synthèse des projets financés*.
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-Ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., ... Irshad, M. K. (2015). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 186–197.
- Ahmad, R., Tehsin, Z., Malik, S. T., Asad, S. A., Shahzad, M., Bilal, M., ... Khan, S. A. (2016a). Phytoremediation Potential of Hemp (*Cannabis sativa* L.): Identification and Characterization of Heavy Metals Responsive Genes. *Clean - Soil, Air, Water*, 44(2), 195–201.
- Ahmad, R., Ali, S., Rizwan, M., Hannan, F., Adrees, M., & Khan, D. (2016b). Silicon and Chromium Toxicity. In *Plants: An Overview* (pp. 1–14).
- Alberola, C., Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., & Souchère, V. (2002). Seasonal groundwater nitrate dynamics in a riparian buffer zone. *Agronomie*, 22, 747–753.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J. M., Amezaga, I., Albizu, I., Onaindia, M., & Garbisu, C. (2004). Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3, 55–70.
- Alkorta, I., & Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*, 79(3), 273–276.
- Alloway, B. J. (2008). *Zinc in soils and crop nutrition* (International Zinc Association, Ed.). Brussels and Paris.
- Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., & Ivanov, K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19(3), 197–205.
- Bernhoft, R. A. (2013). Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–7.
- Blake, A. W., Marcus, S. E., Copeland, J. E., Blackburn, R. S., & Knox, J. P. (2008). In situ analysis of cell wall polymers associated with phloem fibre cells in stems of hemp, *Cannabis sativa* L. *Planta*, 228(1), 1–13.

- Blanquet, M. (2018). *Utilisation du chanvre (Cannabis sativa L.) pour le phytomanagement de sols contaminés aux métaux lourds et impact du silicium*. Université catholique de Louvain.
- Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. LAVOISIER.
- Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., & Ferjani, E. El. (2010). Structural changes of cell wall and lignifying enzymes modulations in bean roots in response to copper stress. *Biological Trace Element Research*, 136(2), 232–240.
- Breckle, S. W., & Kahle, H. (1992). Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Vegetatio*, 101, 43–53.
- Brooks, R. R., Chiarucci, A., Lacoste, C. J., Leblanc, M., Robinson, B. H., Simcock, R., & Stewart, R. B. (1999). Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration*, 67, 407–415.
- Cappellin, O. (2018). Le nouveau décret sols wallon quelles incidences pour votre entreprise ?
- Carus, M., Karst, S., Hobson, J., & Bertucelli, S. (2013). The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs and seeds. *European Industrial Hemp Association*, 1994(2016–05), 1–9.
- Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (2017). Cannabis sativa L. - botany and biotechnology. In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*.
- Chaney, R. L., Angle, J. S., McIntosh, M. S., Reeves, R. D., Li, Y. M., Brewer, E. P., ... Bakers, A. J. M. (2005). Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 60(3–4), 190–198.
- Chanvre Wallon.Be. (2014). Chanvre Wallon. En ligne : <http://www.chanvrewallon.be/>.
- Chirakkara, R. A., & Reddy, K. R. (2015). Biomass and chemical amendments for enhanced phytoremediation of mixed contaminated soils. *Ecological Engineering*, 85, 265–274.
- Citterio, S., Santagostino, A., Fumagalli, P., Prato, N., Ranalli, P., & Sgorbati, S. (2003). Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by Cannabis sativa L. *Plant and Soil*, 256(2), 243–252.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707–1719.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475–486.
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 319–332.
- Cobbett, C. S. (2002). Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology*, 123(3), 825–832.

- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159–182.
- Di Candilo, M., Ranalli, P., & Dal Re, L. (2004). Heavy metal tolerance and uptake of Cd, Pb and Tl by hemp. *Advances in Horticultural Science*, 18(3), 138–144.
- Douchiche, O., Driouich, A., & Morvan, C. (2011). Impact of cadmium on early stages of flax fibre differentiation: Ultrastructural aspects and pectic features of cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(6), 592–599.
- Du, H., Huang, M., Zhang, Z., & Cheng, S. (2014). Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in maize waterlogging stress response. *Euphytica*, 198(1), 115–126.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., & Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.*, 2(5), 112–118.
- Dzantor, E. K. (2007). Phytoremediation: the state of rhizosphere ‘engineering’ for accelerated rhizodegradation of xenobiotic contaminants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82, 228–232.
- Elad, Y., Cytryn, E., Meller Harel, Y., Lew, B., & Graber, E. R. (2011). The biochar effect: Plant resistance to biotic stresses. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(3), 335–349.
- Eraknumen, A. A. (2007). Phytoremediation : an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. *Educational Research and Review*, 2(July), 151–156.
- Ernst, W. H. O. (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry*, 11, 163–167.
- Evangelou, M. W. H., Ebel, M., & Schaeffer, A. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68(6), 989–1003.
- Fike, J. (2016). Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(5–6), 406–424.
- Finger-Teixeira, A., Lucio Ferrarese, M. de L., Ricardo Soares, A., da Silva, D., & Ferrarese-Filho Osvaldo, O. (2010). Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1959–1964.
- Finnegan, P. M., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3, 1–18.
- Fiorentino, N., Fagnano, M., Adamo, P., Impagliazzo, A., Mori, M., Pepe, O., ... Zoina, A. (2013). Assisted phytoextraction of heavy metals: Compost and Trichoderma effects on giant reed (*Arundo donax* L.) uptake and soil N-cycle microflora. *Italian Journal of Agronomy*, 8(4), 244–254.

- Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47–58.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P., ... Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33–46.
- García-Tejero, I. F., Durán Zuazo, V. H., Sánchez-Carnenero, C., Hernández, A., Ferreiro-Vera, C., & Casano, S. (2019). Seeking suitable agronomical practices for industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivation for biomedical applications. *Industrial Crops and Products*, 139(February), 111524.
- Gaur, A., & Adholeya, A. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86(4), 528–534.
- Gentile, A. R., Barceló-Cordón, S., & van Liedekerke, M. (2009). *Soil Country Analyses - Belgium* (Office for Official Publications of the European Communities, Ed.). Luxembourg.
- Gidlow, D. A. (2015). Lead toxicity. *Occupational Medicine*, 65(5), 348–356.
- Gill, M. (2014). Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research*, 2(6), 1043–1055.
- Gorshkova, T., Brutch, N., Chabbert, B., Deyholos, M., Hayashi, T., Lev-Yadun, S., ... Pilate, G. (2012). Plant Fiber Formation: State of the Art, Recent and Expected Progress, and Open Questions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 201–228.
- Grange, R. I., & Hand, D. W. (1987). A review of the effects of atmospheric humidity on the growth of horticultural crops. *Journal of Horticultural Science*, 62(2), 125–134.
- Grantz, D. A. (1990). Plant response to atmospheric humidity. *Plant, Cell & Environment*, 13(7), 667–679.
- Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., & Siddiqui, K. S. (2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, 16(1), 1–16.
- Guinn, G., & Brummett, D. L. (1993). Leaf age, decline in photosynthesis, and changes in abscisic acid, indole-3-acetic acid, and cytokinin in cotton leaves. *Field Crops Research*, 32(3–4), 269–275.
- Hafeez, B. (2014). Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2), 374–391.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11.
- Hasan, S. A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., & Ahmad, A. (2009). Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology*, 30(2), 165–174.

- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Nahar, K., Hossain, M. S., Al Mahmud, J., Hossen, M. S., ... Fujita, M. (2018). Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, 8(3).
- Held, M. A., Jiang, N., Basu, D., Showalter, A. M., & Faik, A. (2014). Plant Cell Wall Polysaccharides: Structure and Biosynthesis. In *Polysaccharides* (pp. 1–47). Cham: Springer International Publishing.
- Houben, D., Evrard, L., & Sonnet, P. (2013). Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. *Chemosphere*, 92(11), 1450–1457.
- Houben, D., Sonnet, P., & Cornelis, J. T. (2014). Biochar from Miscanthus: A potential silicon fertilizer. *Plant and Soil*, 374(1–2), 871–882.
- Huang, Y., Li, D., Zhao, L., Chen, A., Li, J., Tang, H., ... Huang, S. (2019). Comparative transcriptome combined with physiological analyses revealed key factors for differential cadmium tolerance in two contrasting hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 140(July), 111638.
- Husain, R., Weeden, H., Bogush, D., Deguchi, M., Soliman, M., Potlakayala, S., ... Rudrabhatla, S. (2019). Enhanced tolerance of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) plants on abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids. *PLoS ONE*, 14(8), 1–14.
- Imtiaz, M., Rizwan, M. S., Mushtaq, M. A., Ashraf, M., Shahzad, S. M., Yousaf, B., ... Tu, S. (2016). Silicon occurrence, uptake, transport and mechanisms of heavy metals, minerals and salinity enhanced tolerance in plants with future prospects: A review. *Journal of Environmental Management*, 183, 521–529.
- J.J., B., S.S., L., & X., S. (2005). Conference overview: Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279(1–2), 3–15.
- Janus, A., Pelfrène, A., Heymans, S., Deboffe, C., Douay, F., & Waterlot, C. (2015). Elaboration, characteristics and advantages of biochars for the management of contaminated soils with a specific overview on Miscanthus biochars. *Journal of Environmental Management*, 162, 275–289.
- Jeffery, S., Verheijen, F. G. A., van der Velde, M., & Bastos, A. C. (2011). A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 144(1), 175–187.
- Jiang, Y., Bourebrab, M. A., Sid, N., Taylor, A., Collet, F., Pretot, S., ... Lawrence, M. (2018). Improvement of Water Resistance of Hemp Woody Substrates through Deposition of Functionalized Silica Hydrophobic Coating, while Retaining Excellent Moisture Buffering Properties. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(8), 10151–10161.
- Journal officiel de l'Union européenne. (2008). *Règlement (CE) N° 1124/2008* (pp. 7–9). pp. 7–9.

- Journal officiel de l'Union européenne. (2004). *Règlement (CE) N° 206/2004* (pp. 33–36). pp. 33–36.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., & Zhu, Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152(3), 686–692.
- Kos, B., Grčman, H., & Leštan, D. (2003). Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant, Soil and Environment*, 49(12), 548–553.
- Kos, B., & Leštan, D. (2004). Soil washing of Pb, Zn and Cd using biodegradable chelator and permeable barriers and induced phytoextraction by *Cannabis sativa*. *Plant and Soil*, 263(1–2), 43–51.
- Krzesłowska, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 35–51.
- Krzesłowska, M., Lenartowska, M., Mellerowicz, E. J., Samardakiewicz, S., & Woźny, A. (2009). Pectinous cell wall thickenings formation-A response of moss protonemata cells to lead. *Environmental and Experimental Botany*, 65(1), 119–131.
- Kumar, S., Singh, R., Kumar, V., Rani, A., & Jain, R. (2017). *Cannabis sativa*: A Plant Suitable for Phytoremediation and Bioenergy Production. In *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants* (pp. 269–285). Singapore: Springer Singapore.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F. J., & McGrath, S. P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212(1), 75–84.
- Landi, S., Berni, R., Capasso, G., Hausman, J.-F., Guerriero, G., & Esposito, S. (2019). Impact of Nitrogen Nutrition on *Cannabis sativa*: An Update on the Current Knowledge and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5803.
- Lane Todd W. and Francois M. M. Morel, Lane, T. W., & Morel, F. M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4627–4631.
- Li, H.-L. (1974). The origin and use of *Cannabis* in Eastern Asia. *Economic Botany*, 28, 293–301.
- Li, X., Yang, Y., Jia, L., Chen, H., & Wei, X. (2013). Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 150–157.
- Liang, Y. (2008). Silicon uptake and transport in higher plants. *Plant Membrane and Vacuolar Transporters*, 11(8), 205–212.
- Liénard, A., Bock, L., & Colinet, G. (2011). Intérêt des cartes des sols pour l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage en sols contaminés par retombées atmosphériques: Application

- à l'étude de l'effet sol sur le devenir des éléments traces métalliques. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 15(S2), 669–682.
- Lin, Y.-F. (2014). *An evolutionary perspective on differential regulation of zinc and cadmium homeostasis genes in Arabidopsis thaliana and Noccaea caerulea*. Wageningen University, Wageningen, NL.
- Linger, P., Müssig, J., Fischer, H., & Kobert, J. (2002). Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: Fibre quality and phytoremediation potential. *Industrial Crops and Products*, 16(1), 33–42.
- Linger, P., Ostwald, A., & Haensler, J. (2005). *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: Growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum*, 49(4), 567–576.
- Liu, J., Zhang, H., Zhang, Y., & Chai, T. (2013b). Silicon attenuates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. by reducing cadmium uptake and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 68, 1–7.
- Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018). Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 335.
- Liu, X., Zhang, A., Ji, C., Joseph, S., Bian, R., Li, L., ... Paz-Ferreiro, J. (2013a). Biochar's effect on crop productivity and the dependence on experimental conditions-a meta-analysis of literature data. *Plant and Soil*, 373(1–2), 583–594.
- Loiacono, S., Crini, G., Chanet, G., Raschetti, M., Placet, V., & Morin-Crini, N. (2018). Metals in aqueous solutions and real effluents: biosorption behavior of a hemp-based felt. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(9), 2592–2601.
- Loiacono, S., Morin-Crini, N., Cosentino, C., Torri, G., Chanet, G., Winterton, P., & Crini, G. (2017). Simultaneous removal of Cd, Co, Cu, Mn, Ni and Zn from synthetic solutions on a hemp-based felt: Experimental design. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(5), 1–10.
- Lu, H., Zhang, W., Yang, Y., Huang, X., Wang, S., & Qiu, R. (2012). Relative distribution of Pb 2+ sorption mechanisms by sludge-derived biochar. *Water Research*, 46(3), 854–862.
- Lucchini, P., Quilliam, R. S., Deluca, T. H., Vamerali, T., & Jones, D. L. (2014). Agriculture , Ecosystems and Environment Does biochar application alter heavy metal dynamics in agricultural soil ? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 184, 149–157.
- Luyckx, M., Berni, R., Cai, G., & Lutts, S. (2019). Plant Metallomics and Functional Omics. *Plant Metallomics and Functional Omics*, 303–321.
- Luyckx, M., Hausman, J.-F., Lutts, S., & Guerriero, G. (2017). Impact of Silicon in Plant Biomass Production: Focus on Bast Fibres, Hypotheses, and Perspectives. *Plants*, 6(4), 37.

- Luyckx, M., Hausman, J.-F., Lutts, S., & Guerriero, G. (2017). Silicon and Plants: Current Knowledge and Technological Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8(March), 1–8.
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., ... Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 111–121.
- Malar, S., Shivendra Vikram, S., JC Favas, P., & Perumal, V. (2014). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies*, 55(1), 1–11.
- Malik, R. N., Husain, S. Z., & Nazir, I. (2010). Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 42(1), 291–301.
- Manara, A. (2012). Plants and Heavy Metals. In A. Furini (Ed.), *Plants and Heavy Metals* (pp. 27–54). SpringerBriefs in Biometals.
- Manousaki, E., Kalogerakis, N., Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., ... Valko, M. (2012). The Rice Aquaporin Lsi1 Mediates Uptake of Methylated Arsenic Species. *Science of the Total Environment*, 2(3), 2071–2080.
- Marcovecchio, J. E., Botté, S. E., Domini, C. E., & Freije, R. H. (2007). Heavy metals, major metals, trace elements. In L. M. L. Nollet & L. S. P. De Gelder (Eds.), *Handbook of Water Analysis* (pp. 275–311). CRC Press.
- Marine Paczesny. (2014). *Cannabis sativa L. : étude botanique et chimique: propriétés médicales et état des lieux sur la réglementation*. 111.
- Marques, A. P. G. C., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2009). Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils: Phytoremediation as a Potentially Promising Clean-Up Technology. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 39).
- Mathlouthi, M., Sahli, A., Bettaieb, T., & Denden, M. (2005). Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales. *Tropicultura*, 23(4), 220–225.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668.
- Mayerová, M., Petrová, Š., Madaras, M., Lipavský, J., Šimon, T., & Vaněk, T. (2017). Non-enhanced phytoextraction of cadmium, zinc, and lead by high-yielding crops. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(17), 14706–14716.
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 153–162.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M. J., Samson, D., & Tack, F. M. G. (2005). Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, 58(8), 1011–1022.

- Meinzer, F. C. (2003). Functional convergence in plant responses to the environment. *Oecologia*, 134(1), 1–11.
- Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 278–283.
- Meshram, J. H., & Palit, P. (2013). Biology of Industrial Bast Fibers with Reference to Quality. *Journal of Natural Fibers*, 10(2), 176–196.
- meteofrance.com. En ligne :
<http://www.meteofrance.com/climat/france/lille/59343001/relevés?fbclid=IwAR1RUnzVGC8v6kJ-4Fok7M2vDUmBV26SKcvSmQk2dBiERu613F2o1tWllg0>. Consulté le 7/10/2019.
- Mihoc, M., Pop, G., Alexa, E., & Radulov, I. (2012). Nutritive quality of romanian hemp varieties (*Cannabis sativa* L.) with special focus on oil and metal contents of seeds. *Chemistry Central Journal*, 6(1).
- Misra, S., & Gedamu, L. (1989). Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor Appl Genet*, 78, 161–168.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.
- Moniteur belge. (2018). *Décret relatif à la gestion et à l'assainissement des sols*. 28679–28750.
- Moonart, U., & Utara, S. (2019). Effect of surface treatments and filler loading on the properties of hemp fiber/natural rubber composites. *Cellulose*, 26(12), 7271–7295.
- Morin-Crini, N., Loiacono, S., Placet, V., Torri, G., Bradu, C., Kostić, M., ... Crini, G. (2019). Hemp-based adsorbents for sequestration of metals: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 393–408.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216.
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., & Monti, A. (2010). Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5), 413–419.
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., & Hellenic, T. K. (2018). Zinc in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 252–260.
- Nouri, M., & Haddioui, A. (2016). Les techniques de dépollution des sols contaminés par les métaux lourds : une revue (The remediation techniques of heavy metals contaminated soils : a review). *Maghrebien Journal of Pure and Applied Science*, 2(2), 47–58.
- Nriagu, J. O., & Pacynat, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metal. *Nature*, 333, 134–139.

- Number, V. (2012). African Journal of. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 133–140.
- Panaiteescu, D. M., Nicolae, C. A., Vuluga, Z., Vitelaru, C., Sanporean, C. G., Zaharia, C., ... Vasilievici, G. (2016). Influence of hemp fibers with modified surface on polypropylene composites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 137–146.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Khan, S., Lea, P. J., & Keys, A. J. (2002). Rubisco activity: Effects of drought stress. *Annals of Botany*, 89(SPEC. ISS.), 833–839.
- Patra, R. C., Rautray, A. K., & Swarup, D. (2011). Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–9.
- Paz-Ferreiro, J., Lu, H., Fu, S., Méndez, A., & Gascó, G. (2014). Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review. *Solid Earth*, 5(1), 65–75.
- Pejic, B. M., Vukcevic, M. M., Pajic-Lijakovic, I. D., Lausevic, M. D., & Kostic, M. M. (2011). Mathematical modeling of heavy metal ions (Cd^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+}) biosorption by chemically modified short hemp fibers. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 354–360.
- Pejic, B., Vukcevic, M., Kostic, M., & Skundric, P. (2009). Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by short hemp fibers: Effect of chemical composition. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), 146–153.
- Petit, J., Gulisano, A., Dechesne, A., & Trindade, L. M. (2019). Phenotypic Variation of Cell Wall Composition and Stem Morphology in Hemp (*Cannabis sativa* L.): Optimization of Methods. *Frontiers in Plant Science*, 10(July).
- Pickering, K. L., Beckermann, G. W., Alam, S. N., & Foreman, N. J. (2007). Optimising industrial hemp fibre for composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 38(2), 461–468.
- Piomelli, D., & Russo, E. B. (2016). The *Cannabis sativa* Versus *Cannabis indica* Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 44–46.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., & Barceló, J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Science*, 212, 15–25.
- Pourrut, B., Gupta, D. K., Corpas, F. J., & Palma, J. M. (2013). Molecular Mechanisms Involved in Lead Uptake, Toxicity and Detoxification in Higher Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants* (pp. 121–146).
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pourrut, B., Shahid, M., ... Pinelli, E. (2011). Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213, 113–136.
- Projets lauréats de l'Appel à Projets de Recherche GRAINE. (2017). *Gérer, produire et valoriser les biomasses*.

- Rahman Khan, M. M., Chen, Y., Belsham, T., Laguë, C., Landry, H., Peng, Q., & Zhong, W. (2011). Fineness and tensile properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibres. *Biosystems Engineering*, 108(1), 9–17.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181.
- Raynaud, X., Jaillard, B., & Leadley, P. W. (2007). Plants May Alter Competition by Modifying Nutrient Bioavailability in Rhizosphere: A Modeling Approach. *The American Naturalist*, 171(1), 44–58.
- Raynaud, X., Jaillard, B., & Leadley, P. W. (2007). Plants May Alter Competition by Modifying Nutrient Bioavailability in Rhizosphere: A Modeling Approach. *The American Naturalist*, 171(1), 44–58.
- Reid, R., & Hayes, J. (2003). Mechanisms and control of nutrient uptake in plants. *International Review of Cytology*, 229(3), 73–114.
- Richardson, S. D. (1957). The effect of Leaf Age on the Rate of Photosynthesis in detached Leaves of Tree Seedlings. *Acta Botanica Neerlandica*, 6, 445–457.
- Richmond, K. E., & Sussman, M. (2003). Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 268–272.
- Rugh, C. L., Wildett, H. D., Stack, N. M., Thompson, D. M., Summersii, A., & Meagher, R. B. (1996). Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 3182–3187.
- Sablons, D. dans larousse.fr. En ligne : <https://www.larousse.fr/encyclopedia/images/Chanvre/1000803>. Consulté le 3/01/2020.
- Saifullah, Meers, E., Qadir, M., de Caritat, P., Tack, F. M. G., Du Laing, G., & Zia, M. H. (2009). EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere*, 74(10), 1279–1291.
- Salentijn, E. M. J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L. M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68, 32–41.
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., ... Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171(January), 710–721.
- Seedlings, B., Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., & Dietz, K. (2003). Salicylic Acid Alleviates the Cadmium Toxicity in. *Society*, 132(May), 272–281.
- Shahzad, A. (2012). Hemp fiber and its composites - A review. *Journal of Composite Materials*, 46(8), 973–986.

- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2011). Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(2), 168–214.
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2009). Phytomining: A review. *Minerals Engineering*, 22(12), 1007–1019.
- Shi, G. R., Cai, Q. S., Liu, Q. Q., & Wu, L. (2009). Salicylic acid-mediated alleviation of cadmium toxicity in hemp plants in relation to cadmium uptake, photosynthesis, and antioxidant enzymes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(5), 969–977.
- Shi, G., & Cai, Q. (2009). Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology Advances*, 27(5), 555–561.
- Shi, G., Liu, C., Cui, M., Ma, Y., & Cai, Q. (2012). Cadmium tolerance and bioaccumulation of 18 hemp accessions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(1), 163–173.
- Shortt, R., Eng, P., Verhallen, a, & Fisher, P. (2011). *Monitoring Soil Moisture to Improve Irrigation Decisions*. (11), 1–12.
- Struik, P. C., Amaducci, S., Bullard, M. J., Stutterheim, N. C., Venturi, G., & Cromack, H. T. H. (2000). Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*, 11, 107–118.
- Su, C., Jiang, L., & Zhang, W. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics*, 3(2), 24–38.
- Sung, M., Lee, C. Y., & Lee, S. Z. (2011). Combined mild soil washing and compost-assisted phytoremediation in treatment of silt loams contaminated with copper, nickel, and chromium. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 744–754.
- Tahir, P. M., Ahmed, A. B., SaifulAzry, S. O. A., & Ahmed, Z. (2011). Review of bast fiber retting. *BioResources*, 6(4), 5260–5281.
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011.
- Taylor, N. G. (2008). Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist*, 178(2), 239–252.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 133–164). Springer, Basel.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., & Lawlor, D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401(6756), 914–917.

- Tofan, L., Paduraru, C., & Toma, O. (2016). Zinc remediation of aqueous solutions by natural hemp fibers: Batch desorption/regeneration study. *Desalination and Water Treatment*, 57(27), 12644–12652.
- Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M. R., & Montanarella, L. (2016b). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International*, 88, 299–309.
- Tóth, G., Hermann, T., Szatmári, G., & Pásztor, L. (2016a). Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Science of the Total Environment*, 565, 1054–1062.
- Tsonev, T., & Lidon, F. J. C. (2012). Zinc in plants - An overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(4), 322–333.
- Turner, B. D., Sloan, S. W., & Currell, G. R. (2019). Novel remediation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from contaminated groundwater using Cannabis Sativa L. (hemp) protein powder. *Chemosphere*, 229, 22–31.
- Valentovičová, K., Halušková, L., Huttová, J., Mistrík, I., & Tamás, L. (2009). Effect of heavy metals and temperature on the oxalate oxidase activity and lignification of metaxylem vessels in barley roots. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 457–462.
- van Aken, B. (2008). Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology*, 26(5), 225–227.
- van Breusegem, F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141(June), 384–390.
- Varun, M., D'Souza, R., Pratas, J., & Paul, M. S. (2012). Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in North Central India: Prospects of phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(1), 269–281.
- Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A. G., & Pigna, M. (2010). Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 268–292.
- Vithanage, M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, A. B., Sandhi, A., & Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: A brief overview. *Environmental Chemistry Letters*, 10(3), 217–224.
- Vonapartis, E., Aubin, M. P., Seguin, P., Mustafa, A. F., & Charron, J. B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12.
- Vukčević, M., Pejić, B., Kalijadis, A., Pajić-Lijaković, I., Kostić, M., Laušević, Z., & Laušević, M. (2014). Carbon materials from waste short hemp fibers as a sorbent for heavy metal ions - Mathematical modeling of sorbent structure and ions transport. *Chemical Engineering Journal*, 235, 284–292.

- Wan, X., Lei, M., & Chen, T. (2016). Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 563–564, 796–802.
- Wang, J., Feng, X., Anderson, C. W. N., Xing, Y., & Shang, L. (2012). Remediation of mercury contaminated sites - A review. *Journal of Hazardous Materials*, 221–222, 1–18.
- Westerhuis, W., van Delden, S. H., van Dam, J. E. G., Pereira Marinho, J. P., Struik, P. C., & Stomph, T. J. (2019). Plant weight determines secondary fibre development in fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 139(July), 111493.
- White, P. J., & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073–1080.
- Wu, H., Lai, C., Zeng, G., Liang, J., Chen, J., Xu, J., ... Wan, J. (2017). The interactions of composting and biochar and their implications for soil amendment and pollution remediation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(6), 754–764.
- Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2014). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks, and best available strategies for remediation. *Heavy Metal Contamination of Water and Soil: Analysis, Assessment, and Remediation Strategies*, 2011, 1–50.
- Xin, P. F., Gao, C. S., Cheng, C. H., Tang, Q., Dong, Z. X., Zhao, L. N., & Zang, G. G. (2016). Identification and characterization of hemp WRKY transcription factors in response to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, 60(3), 489–495.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179.
- Zimniewska, M., Rozańska, W., Gryszczynska, A., Romanowska, B., & Kicinska-Jakubowska, A. (2018). Antioxidant potential of hemp and flax fibers depending on their chemical composition. *Molecules*, 23(8).