

Mise en place d'une phytocénose métallicole en vue de la gestion
de sites pollués par les métaux lourds et étude de l'influence d'un
biostimulant sous forme de vermicompost liquide

Maurine Raskin

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

Promoteurs : Pr. Stanley Lutts (UCL)
Mathilde Blanquet (UCL)

Année académique 2021 – 2022

Remerciements

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué,
de loin ou de près, à l'aboutissement de ce mémoire.*

*Dans un premier temps, je voudrais remercier mon promoteur, le Pr. Stanley Lutts et ma
copromotrice, Mathilde Blanquet, pour leur accompagnement tout du long de ce mémoire.
Je les remercie de m'avoir encadrée, guidée, aidée et conseillée tout au long de cette année,
me permettant de rendre un travail que j'espère de qualité.*

*Merci à Marie Luyckx et Servane Bigot pour leur disponibilité et leurs précieux conseils qui
ont contribué à alimenter ma réflexion.*

Je tiens également à remercier toute l'équipe du GRPV pour son accueil et sa gentillesse.

*Merci à Paul Dekaezemaeker et Brigitte Vanpee pour leur aide technique au laboratoire
ainsi qu'à Hélène Dailly, Laurence Monin et Karine Henin pour l'analyse de mes
échantillons de terrain.*

Enfin je tiens à remercier ma maman pour ses nombreuses relectures,

*Quentin pour son soutien infailible
et mon grand-père paternel pour m'avoir transmis son amour pour la nature.*

« Nous n'héritons pas de la terre de nos parents, nous l'empruntons à nos enfants. »

Antoine de Saint-Exupéry

Mise en place d'une phytocénose métallicole en vue de la gestion de sites pollués par les métaux lourds et étude de l'influence d'un biostimulant sous forme de vermicompost liquide

Résumé

Un des grands défis du XXI^e siècle est de réduire les pollutions générées par l'activité humaine et la révolution industrielle du XIX^e siècle. Si en 1840 l'activité sidérurgique a permis à la Belgique de se démarquer au plan international, l'incidence de son succès pèse lourd sur la santé et l'environnement. Face à cet enjeu, il existe depuis plusieurs années des techniques d'assainissement des sols pollués aux métaux lourds. Toutefois, ces procédures chimiques, physiques et thermiques rencontrent de plus en plus de détracteurs et des techniques alternatives sont de plus en plus souvent envisagées. La phytoremédiation en est une. Cette technique repose sur l'utilisation de plantes résistantes aux métaux lourds pour dépolluer les sols contaminés. La phytoremédiation est appréciée pour son approche verte et non-énergivore, son faible coût et sa grande applicabilité. Nous étudions cinq espèces indigènes, potentiellement résistantes aux métaux lourds et dont les graines sont facilement accessibles dans le commerce : *Deschampsia cespitosa* L., *Festuca rubra* L., *Holcus lanatus* L., *Rumex acetosa* L., *Silène vulgaris* (Moench) Garcke.

Ce travail a cherché à déterminer à quel point le cadmium, le plomb, le zinc et l'association de ceux-ci, perturbait le comportement physio-morphologique des espèces étudiées. Une première expérience a étudié les réactions de plantes en culture hydroponique en serre, sous conditions (semi) contrôlées. Dans un second temps, une expérience de terrain s'est penchée sur le développement de ces mêmes espèces, semées en association en condition réelle sur trois terrains expérimentaux dont deux présentaient des pollutions métalliques liées à une activité industrielle différentes. Dans le cadre de cette expérience, un biostimulant sous forme de vermicompost liquide a en outre été apportée à certaines parcelles afin de déterminer s'il était possible d'améliorer la résistance et le bon développement des espèces.

L'expérience en serre nous a appris qu'au niveau morpho-physiologique, la croissance et la biomasse, ainsi que la phase sombre de la photosynthèse étaient négativement impactées pour toutes nos espèces. Nos espèces ont présenté plusieurs stratégies de résistances aux ETM quant à la perturbation de leur métabolisme chlorophyllien. Le calcul des facteurs de translocation, nous a permis de remarquer qu'une pollution au zinc augmente significativement la translocation du cadmium chez toutes les espèces et qu'on retrouve plus de cadmium et plus de zinc dans les parties racinaires des plantes exposées à ces métaux, que dans leurs parties

aériennes. Dans une optique de phytoremédiation, *Rumex acetosa* est l'espèce dont les teneurs aériennes en Cd et Zn étaient les plus élevées et *Holcus lanatus* l'espèce dont les teneurs aériennes étaient les plus élevées pour le Pb. Grâce à l'étude de l'additivité des toxicités, nous avons pu déterminer que les effets des trois polluants présents simultanément n'ont pas d'effets additifs et qu'une interaction dont la nature reste à préciser a lieu au sein de la plante.

L'expérience de terrain a mis en évidence que notre mélange d'espèces semble avoir un effet d'augmentation des teneurs en Cd et Pb pour un de nos sites expérimentaux. De plus, l'association du semi et de l'arrosage de vermicompost liquide, a tendance à réduire les teneurs en ETM des sols. Enfin, nous avons observé que l'addition de vermicompost liquide « thé » n'avait pas d'effet sur la biodisponibilité des métaux contenus dans le sol ni sur les teneurs en ETM des plantes. Toutefois, la production en biomasse avait tendance à être plus importante et un plus grand nombre d'espèces ont pu s'installer sur les parcelles arrosées de vermicompost liquide par rapport aux parcelles non semées et non arrosées de vermicompost.

Mots clés : *Deschampsia cespitosa* L., *Festuca rubra* L., *Holcus lanatus* L., *Rumex acetosa* L., *Silène vulgaris* (Moench) Garcke, éléments-traces métalliques, phytoremédiation, phytocénose métallicole, vermicompost liquide « thé », cadmium, plomb, zinc

Abstract

One of the greatest challenges of the 21st century is to reduce the pollution generated by human activity and the industrial revolution of the 19th century. If in 1840 the steel industry allowed Belgium to stand out internationally, this success has now strong deleterious impacts on human health and the environment. Several techniques are available for soil pollution but those chemical, physical and thermal procedures are meeting more and more detractors and alternative techniques are increasingly considered. Phytoremediation is one of them. This technique is based on the use of plants resistant to heavy metals to clean up contaminated soil. Phytoremediation is valued for its green and low-energy approach, low cost and wide applicability. In this master thesis we study five native species, potentially resistant to heavy metals, and whose seeds are easily accessible on the market: *Deschampsia cespitosa* L., *Festuca rubra* L., *Holcus lanatus* L., *Rumex acetosa* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. These species were retained on the basis of their natural presence on calaminarous sites characterized by high concentrations of soil heavy metals.

The aim of this work was to determine to what extent of cadmium, lead, zinc and the combination of these elements, disturbed the physio-morphological behavior of the studied species. A first experiment studied the plants reaction in hydroponic culture under greenhouse conditions, in order to ensure a (semi) controlled environment. Secondly, a field experiment focused on the development of these same species, sown in association under real conditions on three experimental sites, two of which presented metal pollution linked to a different industrial activity. As part of this experiment, the application of a biostimulant in the form of liquid vermicompost was applied to certain plots in order to determine whether it was possible to improve the resistance and development of the species.

The greenhouse experience taught us that at the morpho-physiological level, growth and biomass, as well as the dark phase of photosynthesis, were negatively impacted in all species. The considered species presented distinct resistance strategies to metal and metalloid trace elements regarding the disruption of their chlorophyll metabolism. The calculation of translocation factors allowed us to notice that zinc pollution significantly increases cadmium translocation in all species. Root concentration of cadmium and zinc were always higher than shoot concentrations. From a phytoremediation perspective, *Rumex acetosa* is the plant with the highest shoot Cd and Zn contents and *Holcus lanatus* the plant with the highest shoot Pb contents. Thanks to the study of the additivity of toxicities, we were able to determine that the effects of the three pollutants are not additive.

Field experiment has shown that our mixture of species seems to increase Cd and Pb levels for one of our experimental sites. In addition, the combination of sowing and watering with liquid vermicompost tended to reduce the soil ETM contents. Finally, we observed that the addition of “tea” liquid vermicompost had no effect on the bioavailability of the metals contained in the soil nor on the levels of ETM in the plants. However, the biomass production tended to be higher and a greater number of spontaneous species were able to settle on the plots watered with liquid vermicompost compared to the plots not sown and not watered with vermicompost.

Key words: *Deschampsia cespitosa* L., *Festuca rubra* L., *Holcus lanatus* L., *Rumex acetosa* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, metallic trace elements, phytoremediation, metallic phytocenosis, liquid “tea” vermicompost, cadmium, lead, zinc

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract	6
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Objectifs et Hypothèses	15
Synthèse bibliographique	15
I. Contamination des sols aux métaux lourds	15
1. Définitions.....	16
2. Les métaux étudiés et leur toxicité envers les végétaux	17
2.1. Le zinc	18
2.2. Le cadmium.....	19
2.3. Le plomb	21
2.4. Biodisponibilité des ETM	22
3. Les mécanismes de résistance des plantes	23
II. La phytoremédiation	26
4. Principes de la phytoremédiation.....	28
4.1. Les différentes stratégies de phytoremédiation.....	28
4.2. Avantages de la phytoremédiation	30
4.3. Inconvénients et limites de la phytoremédiation.....	32
4.4. Application de la phytoremédiation comme méthode d'assainissement des sols.	35
III. Plantes étudiées	36
5. Les pelouses calaminaires.....	36
6. <i>Deschampsia cespitosa</i> L.....	37
7. <i>Festuca rubra</i> L.	38
8. <i>Holcus lanatus</i> L.	39
9. <i>Rumex acetosa</i> L.	39

10.	<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	40
IV.	Le vermicompost.....	41
	Matériel et Méthode	44
V.	Expérience en serre	44
1.	Semis et germination.....	44
2.	Culture hydroponique et application des ETM	45
3.	Préparation des solutions	46
3.1	Solution Yoshida	46
3.2.	Solutions d'éléments traces métalliques	46
4.	Mesures morpho-physiologiques	46
4.1.	Photosynthèse nette, transpiration instantanée, conductance stomatique et concentration en CO ₂ intercellulaire	46
4.2.	Fluorescence de la chlorophylle	47
4.3.	Longueur des systèmes racinaires et aériens.....	48
4.4.	Production de biomasse et teneur en eau.....	49
5.	Dosage du contenu en chlorophylle, du malondialdéhyde et des thiols totaux.	49
5.1.	Dosage des concentrations en chlorophylle.....	49
5.2.	Dosage du malondialdéhyde.....	50
5.3.	Dosage des thiols totaux	51
6.	Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs.....	52
7.	Facteur de translocation, facteur de bioaccumulation et étude de l'additivité des toxicités	53
7.1.	Facteur de translocation.....	53
7.2.	Facteur de bioaccumulation.....	53
7.3.	Etude de l'additivité des toxicités.....	54
VI.	Expérience de terrain	54
1.	Préparation des parcelles et semis.....	54
1.1.	La Ferme de Marbaix	54

1.2.	Le site de 5NPlus	55
1.3.	Le site de Duferco.....	56
2.	Application de vermicompost	58
3.	Prélèvements d'échantillons du sol.....	58
4.	Mesures au XRF du sol.....	59
5.	Dosage du rapport carbone sur azote du sol	59
6.	Mesure du pH du sol	59
7.	Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs du sol	60
8.	Mesure de la biodisponibilité des éléments dans le sol	60
9.	Production de biomasse et contenu en eau des plantes de terrain.....	61
10.	Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs des plantes de terrain	61
11.	Traitements statistiques employés	62
Résultats	63
VII. Expérience en serre	63
12.	Résultats des mesures morpho-physiologiques.....	63
12.1.	Longueur des systèmes racinaires et aériens.....	63
12.2.	Production de biomasse.....	64
12.3.	Photosynthèse nette, transpiration instantanée, conductance stomatique et concentration en CO ₂ intercellulaire.....	69
12.4.	Fluorescence de la chlorophylle	71
12.5.	Teneurs en eau.....	72
13.	Dosage du contenu en chlorophylle, du malondialdéhyde et des thiols totaux	73
13.1.	Dosage des concentrations en chlorophylle	73
13.2.	Dosage du malondialdéhyde	74
13.3.	Dosage des thiols totaux.....	74
14.	Dosage des éléments-traces métalliques et d'éléments majeurs.....	75

15.	Facteur de translocation, facteur de bioaccumulation et étude de l'additivité des toxicités	78
15.1.	Facteur de translocation	78
15.2.	Facteur de bioaccumulation	80
15.3.	Etude de l'additivité des toxicités	81
VIII.	Expérience de terrain	82
16.	Mesures au XRF du sol.....	82
17.	Dosage du rapport carbone sur azote du sol	83
18.	Mesure du pH du sol.....	83
19.	Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs du sol	84
20.	Mesure de la biodisponibilité des éléments du sol.....	85
21.	Production de biomasse et contenu en eau des plantes de terrain.....	86
22.	Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs des plantes de terrain	89
	Discussion.....	91
	Expérience en serre	92
	Expérience de terrain.....	103
	Conclusion.....	109
	Bibliographie.....	112
	Annexes	126

Liste des figures

Figure 1 :	Image modifiée à partir de « Les éventuels effets négatifs, directs et indirects, de l'absorption de métaux lourds sur la productivité des cultures ». Le signe ↓ indique une diminution et le signe ↑ une augmentation. (Bhat et al., 2019).	p.17
Figure 2 :	Les voies d'entrée et les voies de transport des composés organiques émergents (EOC) dans les plantes (Kurade et al., 2021)	p.24
Figure 3 :	Représentation schématique des différents types de phytoremédiation. « Environmental Risk Assessment of Soil Contamination » (Favas et al., 2014).	p.29
Figure 4 :	<i>Deschampsia cespitosa</i> L. – on « Ruwe smele plant Deschampsia cespitosa.jpg » (Wikimedia Commons)	p.37
Figure 5 :	<i>Festuca rubra</i> L.– on « Festuca rubra Habitus 2009-4-23 DehesaBoyalPuertollano.jpg » (Wikimedia Commons)	p.38
Figure 6 :	<i>Holcus Lanatus</i> L. – on «https://stringfixer.com/fr/Holcus_lanatus » (Google Image)	p.39
Figure 7 :	<i>Rumex acetosa</i> L. – on « https://planteset.com/rumex-acetosa/ » (Frank Ensinger)	p.39
Figure 8 :	<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke – on “http://www.lagrottadellafaina.it/en/schioppini-or-strigoli/” (Google Image)	p.40
Figure 9 :	Evolution des plantes en serre depuis les premiers stades de croissance en terrine a), lors du transfert en hydroponie b), puis lors du stade de récolte c) (M. Raskin, 2021)	p.46
Figure 10 :	a) Premier bûchage (Blanquet, 2020) ; b) Semi et installation des filets (Blanquet, 2020) ; c) Exemple d'identification des parcelles à l'aide de rubans jaunes et bleus (Raskin, 2021)	p.55
Figure 11 :	a) Passage au motoculteur et bûchage (Blanquet, 2020) ; b) Semi et de installation des filets (Blanquet, 2020)	p.56
Figure 12 :	a) Bûchage après déblayage (Blanquet 2020); b) Délimitation des parcelles et ratissage (Blanquet, 2020); c) Installation du ruban et des filets anti-oiseux (Blanquet, 2020).	p.57
Figure 13 :	Schéma de répartition des parcelles et des prélèvements d'échantillons de sol en 2020	p.58
Figure 14 :	Histogramme de la hauteur moyenne des plantes en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.63
Figure 15 :	Histogramme de la longueur moyenne du système racinaire en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.63
Figure 16 :	Histogrammes du poids frais moyen (a) puis du poids sec moyen (b) des parties aériennes en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.64
Figure 17 :	Histogrammes du poids frais moyen (a) puis du poids sec moyen (b) des parties aériennes en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.64
Figure 18 :	Comparaison des <i>Holcus lanatus</i> pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)	p.65
Figure 19 :	Comparaison des <i>Deschampsia cespitosa</i> pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)	p.66
Figure 20 :	Comparaison des <i>Festuca rubra</i> pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)	p.66
Figure 21 :	Comparaison des <i>Silene vulgaris</i> pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn, f) plante acaule (Raskin, 30 juin 2021)	p.67
Figure 22 :	Comparaison des <i>Rumex acetosa</i> pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)	p.67
Figure 23 :	Histogramme de la photosynthèse nette moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.69
Figure 24 :	Histogramme de la transpiration instantanée moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.69
Figure 25 :	Histogramme de la conductance stomatique moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.70
Figure 26 :	Histogramme de la concentration intracellulaire en CO2 moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.70
Figure 27 :	Histogramme de l'efficacité quantique maximale des photosystèmes II moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.71
Figure 28 :	Histogramme de l'efficacité réelle moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.71

Figure 29 :	Histogramme du taux d'extinction photochimique moyen en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.71
Figure 30 :	Histogramme du taux d'extinction non-photochimique moyen en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.72
Figure 31 :	Histogramme des teneurs en eau moyennes dans les racines en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.72
Figure 32 :	Histogramme des teneurs en eau moyennes dans les parties aériennes en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.72
Figure 33 :	Histogramme des concentrations moyennes en chlorophylle a en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.73
Figure 34 :	Histogramme des concentrations moyennes en chlorophylle b en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.73
Figure 35 :	Histogramme des concentrations moyennes en caroténoïdes en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.73
Figure 36 :	Histogramme des concentrations moyennes en malondialdéhyde en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.74
Figure 37 :	Histogramme des teneurs moyennes en thiols totaux dans les parties aériennes en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.74
Figure 38 :	Histogramme des teneurs moyennes en thiols totaux dans les parties racinaires en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	P374
Figure 39 :	Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de <i>Rumex acetosa</i> L. en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.75
Figure 40 :	Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de <i>Holcus lanatus</i> L. en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.75
Figure 41 :	Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de <i>Deschampsia cespitosa</i> L. en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA1 où p<0.05	p.76
Figure 42 :	Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de <i>Silene vulgaris</i> en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. ANOVA1 où p<0.05	p.76
Figure 43 :	Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de <i>Festuca rubra</i> L. en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. ANOVA1 où p<0.05	p.77
Figure 44 :	Mesure en ppm des teneurs en ETM sur les 3 terrains à l'aide d'un analyseur XRF par Mathilde Blanquet. Les barres verticales correspondent aux erreurs standards.	p.82
Figure 45 :	Ratio carbone sur azote moyen du sol en 2020 en fonction des terrains étudiés. Chaque valeur est la moyenne de 10 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où p<0.05	p.83
Figure 46 :	pH moyen du sol en fonction des sites expérimentaux et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : <i>Rumex acetosa</i> , <i>Silene vulgaris</i> , <i>Deschampsia cespitosa</i> , <i>Holcus lanatus</i> et <i>Festuca rubra</i> . Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où p<0.05	p.83
Figure 47 :	Teneurs en ETM dans le sol en fonction des sites pour les 2 années étudiées. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats pour les sols de 2021 et de 5 réplicats pour les sols de 2020. Les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 1 où p<0.05	p.84
Figure 48 :	Teneurs en ETM dans le sol en fonction des sites et des traitements en 2021 pour chaque ETM étudié. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : <i>Rumex acetosa</i> , <i>Silene vulgaris</i> , <i>Deschampsia cespitosa</i> , <i>Holcus lanatus</i> et <i>Festuca rubra</i> . Chaque	p.84

	valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 2 où $p < 0.05$	
Figure 49 :	Biodisponibilité des ETM dans les sols en fonction des sites en 2020 et 2021. En 2021 les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats pour les sols de 2021 et de 10 réplicats pour les sols de 2020. Les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 1 où $p < 0.05$ pour 2020 et en ANOVA 2 où $p < 0.05$ pour 2021	p.85
Figure 50 :	Biomasse moyenne produite par m ² de parcelle. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$	p.86
Figure 51 :	Photographies de l'état des parcelles en septembre 2021 pour a) Corroy, b) Villers et c) Sclessin	p.88
Figure 52 :	Poids frais puis secs moyens des systèmes aériens des plantes poussant sur les parcelles en fonction des sites et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 2 où $p < 0.05$	p.88
Figure 53 :	Pourcentage du contenu en eau des parties aériennes des plantes poussant sur les parcelles en fonction des sites et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$	p.89
Figure 54 :	Teneurs moyennes en ETM dans les plantes ayant poussé sur les parcelles, en fonction des sites et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 9 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 2 où $p < 0.05$	p.89

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Extrait de l'Annexe 1 - Normes - de l'arrêté du Gouvernement Wallon relatif à la gestion et à l'assainissement des sols, Moniteur Belge, Ed. 2, W. Borsus et C. Di Antonio, (2019)	p.16
Tableau 2 :	Concentrations foliaires critiques pour la suffisance et la toxicité des éléments minéraux dans les plantes cultivées non tolérantes, en mg par g de poids sec, basé sur le tableau de White et Brown dans « <i>Plant nutrition for sustainable development and global health</i> » (2010)	p.18
Tableau 3 :	Récapitulatif des principaux avantages et inconvénients des différentes techniques de traitement des sols pollués, telles que décrites par Bruxelles environnement	p.27
Tableau 4 :	Avantages et limites de la phytoremédiation selon Favas et al., (2014) Issu de « <i>Environmental Risk Assessment of Soil Contamination</i> »	p.34
Tableau 5 :	Calculs du nombre de graines à semer selon les taux de germination communiqués par Ecosem S.A.	p.44
Tableau 6 :	Plan expérimental	p.45
Tableau 7 :	Répartition des parcelles sur les terrains	p.57
Tableau 8 :	Taux de mortalité suite à l'expérience en serre	p.65
Tableau 9 :	Coefficients de variation moyens exprimé en pourcentages	p.68
Tableau 10 :	Facteur de translocation estimé sur base des concentrations (TFc) pour les 3 ETM étudiés en fonction du traitement	p.78
Tableau 11 :	Facteur de translocation estimé sur base des quantités (TFq) pour les 3 ETM étudiés en fonction du traitement	p.79
Tableau 12 :	Facteur de bioaccumulation (BAC) pour les 3 ETM étudiés en fonction du traitement et de l'espèce	p.80
Tableau 13 :	Comparaison des effets attendus et observés pour chaque espèce en fonction des différentes analyses présentant un effet significative du traitement appliqué	p.81
Tableau 14 :	Valeurs seuils et valeurs d'intervention pour les 3 ETM étudiés selon le code wallon des bonnes pratiques, décret sol de 2008. VS = valeur seuil et VI = valeur d'intervention.	p.83
Tableau 15 :	Analyse descriptive de la biomasse s'étant développé sur les parcelles des différents sites expérimentaux	p.87
Tableau 16 :	Augmentation ou diminution des teneurs en chlorophylles a, b et en caroténoïdes pour les différentes espèces en fonction du traitement	p.96
Tableau 17 :	Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 2 facteurs en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les plantes en serre. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.	p.126
Tableau 18 :	Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 2 facteurs en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les terrains. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.	p.126
Tableau 19 :	Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 1 facteur en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les plantes en serre. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.	p.127
Tableau 20 :	Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 1 facteur en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les terrains. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.	p.127
Tableau 21 :	Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 1 facteur en RStudio pour les minéralisations des plantes de l'expérience en serre.	p.128

Objectifs et Hypothèses

Ce travail se fixe comme **objectifs** :

- Dans un premier temps, d'étudier le comportement morpho-physiologique de cinq espèces végétales exposées à différentes toxicités (plomb, cadmium, zinc et à leur mélange), à l'aide d'une expérience en conditions contrôlées sur culture hydroponique ;
- Dans un second temps, d'étudier l'influence d'une contamination du sol liée à un passé industriel, ainsi que l'impact de l'application d'un biostimulant (vermicompost) sur la dynamique des populations du mélange d'espèces, à l'aide d'une expérience sur le terrain.

Hypothèses principales :

- Les espèces végétales sélectionnées sont résistantes aux métaux lourds étudiés et adopteront une stratégie de tolérance à leur rencontre.
- Associer différentes espèces de plantes en phytocénose permettra de lutter plus efficacement contre une contamination polymétallique.
- L'application d'un biostimulant (vermicompost liquide) stimulera le développement des plantes semées sur les terrains considérés.

Synthèse bibliographique

I. Contamination des sols aux métaux lourds

Le sol est à la fois le support et le produit du vivant. Il remplit des fonctions vitales pour les êtres vivants et fait partie intégrante des écosystèmes. En tant qu'acteurs clés des cycles biogéochimiques, les sols accumulent un grand nombre d'éléments, qui modifient *de facto* sa composition. Cette précieuse ressource est pourtant menacée par des siècles d'industrialisations peu regardantes sur leurs rejets toxiques, notamment en ce qui concerne les métaux lourds. Heureusement, depuis quelques années, la prise de conscience de cette menace s'est généralisée et les pouvoirs publics se penchent de plus en plus sur des méthodes d'assainissement, qui intègrent, entre autres, « *le principe des meilleures techniques disponibles et le caractère durable de la procédure d'assainissement* » (Code Wallon de Bonnes Pratiques, 2008 version 3) dont font partie les techniques de phytoremédiation.

Le sol se construit à partir des roches-mères, qui sous l'action du temps se dégradent plus ou moins vite et libèrent des éléments qui seront transférés au sol néoformé (Nahon, 2008). En fonction de la composition de cette roche-mère, le sol peut déjà être plus ou moins riche en métaux. De plus, cette répartition des éléments minéraux n'est pas homogène, mais dépend de la mobilité et de la nature des éléments charriés, donnant ainsi naissance à des horizons d'accumulation, particulièrement dans les sols à forte différenciation texturale, plus ou moins drainants en fonction de leur granulométrie et de la perméabilité de leurs couches (Baize, 1994; Baize et Girard, 2008 ; Nahon, 2008). Il peut également s'enrichir à partir des infiltrations aqueuses plus ou moins chargées en minéraux, via les retombées atmosphériques, les boues d'épuration, certains engrais ou pesticides, etc. (Oladoye et al., 2022).

Rappelons que les proportions « normales » attendues de métaux lourds varient en fonction de l'origine pédo-géochimique du sol considéré. Les normes belges de 2019 pour les métaux et métalloïdes sont présentés dans le Tableau 1, le tableau complet est disponible en Annexe 1.

Tableau 1 : Extrait de l'Annexe 1 - Normes - de l'arrêté du Gouvernement Wallon relatif à la gestion et à l'assainissement des sols, *Moniteur Belge*, Ed. 2, W. Borsus et C. Di Antonio, (2019)

Type d'usage	Sol (mg/kg _{matière sèche})					Eaux souterraines (µg/L)	
	I naturel	II agricole	III résidentiel	IV récréatif ou commercial	V 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. Définitions

On entend par « métaux lourds », tout élément métallique dépassant les 5g/cm³ de densité. Notons que cette notion reprend l'arsenic et le sélénium, qui ne sont pas des métaux à strictement parler. On parle alors de « métalloïdes ». Depuis quelques années, on préfère le terme « élément-trace métallique » (ETM), étant donné leur faible présence dans l'environnement, à celui de « métaux lourds », jugé imprécis¹ (Pourret, 2018).

Bien que tous les ETM soient toxiques au-delà d'un certain seuil, certains sont essentiels pour le métabolisme des organismes vivants. Un métal donné peut être essentiel ou toxique, en fonction de ses concentrations, des niveaux d'exposition et de l'organisme qui y est exposé (Pourret, 2018). Ainsi le cuivre (Cu), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni) et le zinc (Zn) sont indispensables pour les fonctions physiologiques et biochimiques des plantes (Göhre et Paszkowski, 2006). Ils agissent comme co-facteurs de nombreuses enzymes et sont associés aux chaînes de transport des électrons au sein des chloroplastes et des mitochondries (Zenk,

¹ La définition de métaux lourds se base sur un seuil de densité, ne distingue pas les métaux des métalloïdes et selon Pourret, le terme « lourd » a une connotation péjorative directement associée à la toxicité par le public.

1996). Le cobalt (Co), via la vitamine B12, participe au métabolisme cellulaire. Comme le disait Paracelse : « *c'est la dose qui fait le poison* ».

La pollution des sols aux ETM peut être naturelle (e.g. activités volcaniques, altération de ions métalliques et des minéraux des roches, percolas d'eaux souterraines) ou anthropiques (e.g. industries, agriculture, décharges). Comme ils ne sont ni biodégradables, ni dégradables, les ETM peuvent s'accumuler plus ou moins rapidement, entraînant des impacts non-négligeables sur la santé ou l'environnement (Ali et al., 2013). Ils sont dès lors considérés comme « contaminants » (Yang et al., 2005). Plus précisément, tout ETM est considéré comme un contaminant, dès lors qu'il est rencontré dans des concentrations plus élevées que le niveau naturel de la région et des organismes où on le trouve, ou sous une forme qui pourrait entraîner des effets préjudiciables à la vie humaine ou à l'environnement (McIntyre, 2003 ; Masindi et Muedi, 2018). Notons que ces ETM posent particulièrement problème à cause des risques de bioamplification et de bioaccumulation au sein de la chaîne trophique ainsi que pour la contamination de nappes phréatiques par infiltration (Ali et al., 2013 ; Oladoye et al., 2022).

2. Les métaux étudiés et leur toxicité envers les végétaux

Plusieurs études menées sur différentes espèces végétales ont mis en évidence les nombreux effets toxiques directs et indirects des ETM (Figure 1) (Bhat et al., 2019). Rappelons que la toxicité de ceux-ci dépend à la fois de la durée et de la concentration à laquelle les plantes sont exposées.

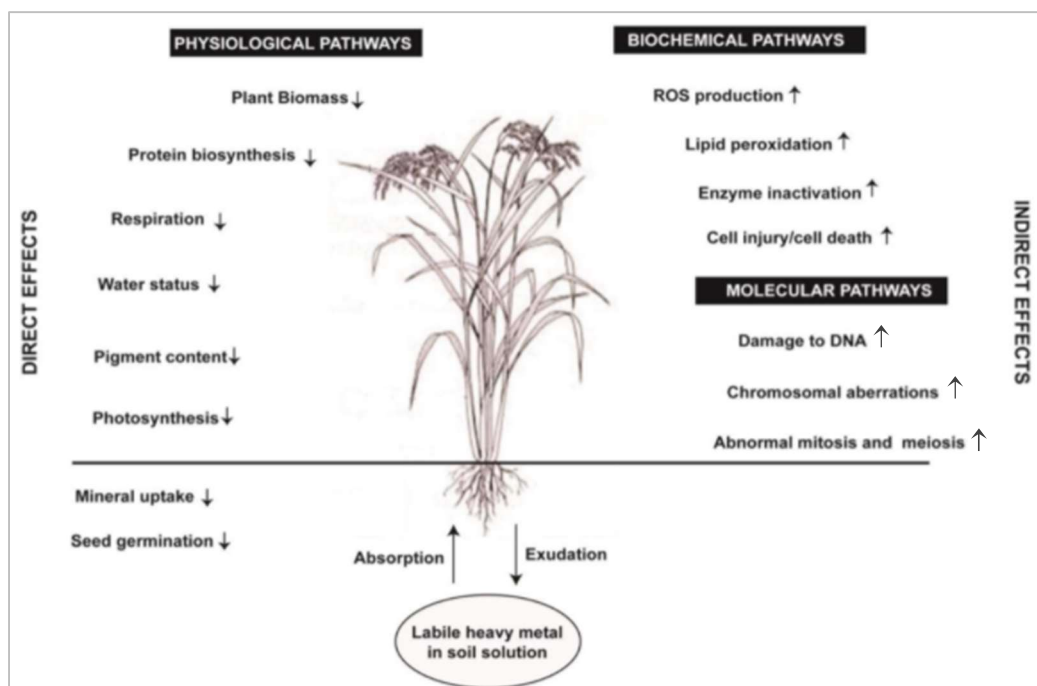


Figure 1 : Image modifiée à partir de « Les éventuels effets négatifs, directs et indirects, de l'absorption de métaux lourds sur la productivité des cultures ». Le signe ↓ indique une diminution et le signe ↑ une augmentation. (Bhat et al., 2019).

Ce travail se concentre sur 3 éléments-traces métalliques couramment rencontrés dans le cadre de pollutions terrestres aux métaux lourds : le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le plomb (Pb). Il apparaît pertinent d'étudier les effets combinés de ces 3 ETM étant donné qu'ils sont souvent associés dans les minerais naturels et que leurs métallurgies sont connexes. La Campine, région naturelle de Belgique et des Pays-Bas est un exemple révélateur à cet égard puisqu'elle présente 700km² de surface contaminée de manière diffuse au Cd, Zn et Pb par des dépôts atmosphériques historiques (Meers et al., 2010).

2.1. Le zinc

Le zinc est le 30^e élément du tableau périodique (groupe IIB, éléments caractérisés par deux électrons sur la sous-couche *s* au-delà d'une sous-couche *d* complète), sa masse molaire atomique est de 65,38 u et sa densité est de 7,13 g/cm³. Le zinc est un élément moyennement abondant dans l'écorce terrestre. Son clark² se situe entre 70 et 132 g par tonne selon les estimations. Le zinc est un métal brillant, gris bleuté à texture cristalline nette (Vallee et Falchuk, 1993).

Le zinc est un élément essentiel requis par les plantes pour leur croissance et leur développement. En effet, le zinc est impliqué dans le métabolisme des glucides et des protéines, mais également dans celui de l'auxine et fait partie intégrante des chaînes de transport des électrons (Zenk, 1996). Il participe à diverses réactions enzymatiques en tant que cofacteur et se trouve impliqué dans la formation du pollen (Ghori, 2019). De plus, le zinc contribue à la résistance contre de nombreux agents pathogènes. Notons qu'une carence en zinc peut entraîner de graves pertes de rendement des cultures (Aziz et al., 2016).

Cependant, si le zinc est nécessaire à l'état de trace (Tableau 2), son excès peut mener à une intoxication entraînant des conséquences dommageables.

Tableau 2 : Concentrations foliaires critiques pour la suffisance et la toxicité des éléments minéraux dans les plantes cultivées non tolérantes, en mg par g de poids sec, basé sur le tableau de White et Brown dans « Plant nutrition for sustainable development and global health » (2010)

Élément (essentialité)	Quantité suffisante	Seuil de toxicité
zinc (oui)	15 à 30.10 ⁻³ mg.g ⁻¹	100 à 300.10 ⁻³ mg.g ⁻¹
cadmium (non)	NA	5 à 10.10 ⁻³ mg.g ⁻¹
plomb (non)	NA	10 à 20.10 ⁻³ mg.g ⁻¹

² Teneur moyenne dans la croûte terrestre, plus particulièrement la croûte continentale.

Le zinc participant à de nombreuses réactions dans la cellule, sa toxicité modifie ces réactions et peut, par conséquent, provoquer un retard de croissance et une sénescence précoce (Ghori, 2019). Les plantes touchées par la toxicité du zinc présentent des symptômes de chlorose, en particulier sur les jeunes feuilles, mais ces symptômes peuvent également se propager aux feuilles plus âgées si la toxicité se prolonge (Ghori, 2019). De plus, des concentrations élevées en zinc entraînent la libération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), qui endommagent les tissus de la plante (Göhre et Paszkowski, 2006 et références dans cette étude). Une intoxication au zinc peut également induire une accumulation d'autres ETM, tels que le cuivre ou le manganèse dans les racines et les pousses, ou au contraire, mener à des carences, comme pour le phosphore (P) (Lee et al., 1996 ; Nagajyoti et al., 2010). La toxicité du zinc altère les photosystèmes I et II affectant, dès lors, la photosynthèse et par conséquent, la synthèse de l'ATP. Ces effets sur les photosystèmes sont réversibles tant que le stress ne perdure pas dans le temps (Paunov et al., 2018). Comme le zinc est un ion bivalent (Zn^{2+}), il peut se substituer aux ions Mg^{2+} au sein de la RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase), inhibant, ce faisant, sa capacité à fixer le carbone, mais également l'arrêt de la photosynthèse s'il se substitue au magnésium de la chlorophylle (Küpfer et al., 1998). Suite à une étude portant sur les effets de la toxicité du zinc sur les peupliers (*Populus alba* cv Villafranca), Todeschini et al. (2011) ont conclu qu'une intoxication au zinc augmentait la proportion de calcium libre dans les plantes, suite à la substitution du calcium par le zinc dans les parois cellulaires. Enfin, signalons également que les ions métalliques peuvent former des complexes avec des ligands organiques tels que les phytosidérophores (molécules chélatantes sécrétées dans la rhizosphère par certaines espèces de plantes de la famille des Poaceae (graminées) en situation de carence en fer, et dont la fonction est de permettre l'assimilation du fer (III) sous forme de complexe fer(III)-phytosidérophore) ; ces phytosidérophores sont également capables de complexer le zinc (Ma et Nomoto, 1993 ; Jouvin, 2009). De façon plus générale, les plantes sont capables de mobiliser et de prélever le zinc via des exsudats racinaires (Degryse et al., 2008).

2.2. Le cadmium

Le cadmium est le 48^e élément du tableau périodique (groupe IIB, éléments caractérisés par deux électrons sur la sous-couche *s* au-delà d'une sous-couche *d* complète), sa masse molaire atomique est de 112,4 u et sa densité se situe aux alentours de 8,645 g/cm³. Le cadmium est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celles du zinc, si ce n'est qu'il n'a pas de fonction biologique reconnue. Insoluble dans l'eau et les bases, c'est un élément

électropositif. Le cadmium est un élément relativement rare à l'état naturel (son clark s'élève à 0,15 g/t) (Nivetha et al., 2019).

Les plantes rencontrant une toxicité au cadmium (Tableau 2), présentent souvent un retard de croissance et des signes de dépérissement, telles que des feuilles chlorosées ou des extrémités racinaires brunes ainsi qu'une diminution de biomasse (Haider et al., 2021 et références dans cette étude). L'accumulation de cadmium au sein des plantes inhibe la Fe(III) réductase, conduisant à une carence de Fe (II) affectant la photosynthèse. Le cadmium interfère avec l'absorption de Ca, P, K, Mg et d'eau et réduit la translocation et l'absorption des nitrates en inhibant la nitrate réductase (Ghori, 2019 ; Ashraf et al., 2016).

Des études sur le tournesol ont montré une augmentation significative de la perméabilité membranaire des cellules de plantes soumises au Cd (Azevedo et al., 2015). L'exposition au cadmium a réduit les teneurs en protéines solubles dans les feuilles, ainsi que les activités de la catalase et de la peroxydase. Les protéines totales se sont également avérées significativement réduites de manière dose-dépendante au cadmium (Hassan et al., 2021). La dégradation de la membrane plasmique, due à la peroxydation des lipides, entraîne une perturbation de l'équilibre hydrique (Nagajyoti et al., 2010). La dégradation des membranes fragilise grandement les mitochondries, entravant ainsi le métabolisme respiratoire (Ghori, 2019). De plus, quand le cadmium se lie aux groupements soufrés (sulfhydriles) de diverses protéines structurales, il entraîne un mauvais repliement de celles-ci, interférant de ce fait, avec les fonctions de ces protéines, particulièrement les réactions redox dans la chaîne de transport des électrons (Ghori, 2019). Le cadmium engendre une réduction de la chlorophylle totale, de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des protéines solubles dans les plantes (Ashraf et al., 2016). Enfin, des taux élevés de cadmium endommagent les nucléoles, provoquant une fragmentation chromosomique (Ghori, 2019), augmentent le nombre d'aberrations chromosomiques totales et diminuent fortement le pourcentage d'indice mitotique (Hassan et al., 2021). En réponse aux dommages causés par le cadmium, il a été montré que certains types d'amendements, tel que le biochar³ permettent de réduire l'absorption racinaire des ions Cd en réduisant sa biodisponibilité pour les plantes (en réduisant le EC⁴ et le pH du sol) (Rizwan et al., 2018).

³ Le biochar est un amendement de sol issu de la pyrolyse de biomasse. C'est du charbon non fossile, destiné à d'autres usages que la combustion. Il est utilisé en agriculture pour augmenter la qualité et la productivité des sols.

⁴ Electrical Conductivity

2.3. *Le plomb*

Le plomb est le 82^e élément du tableau périodique (groupe IVB). Sa masse molaire atomique est de 207,2 u et sa densité est de 11,37 g/cm³. Relativement abondant dans la croûte terrestre (Clarke de 16g/t), le plomb est l'un des métaux les plus anciennement connus et travaillés (son extraction remonte à l'époque pré-romaine). Le plomb est un métal malléable et gris bleuâtre, qui blanchit lentement en s'oxydant (Boldyrev, 2018). C'est également un des contaminants environnementaux principaux, il s'accumule facilement dans les sols et les sédiments et on le retrouve en grandes quantités dans les milieux aquatiques. Ses rejets ont toutefois diminué de façon importante depuis l'arrêt de son utilisation dans l'essence et les peintures (Lambert et al., 2012).

Le plomb est un élément toxique, mutagène et reprotoxique (CMR) sans valeur connue d'oligoélément, ce qui le rend toxique à très faible dose (Tableau 2). Les maladies et les symptômes liés qu'il provoque chez les humains et les animaux sont regroupés sous l'appellation de « saturnisme ». Chez les plantes, les principaux symptômes sont un retard de croissance, voir une inhibition de la germination, des chloroses, une croissance racinaire réduite et un noircissement des racines (Ghori, 2019 ; Sharma et Dubey, 2005). Les réductions de germination des graines et de croissance des plantes sont principalement dues à l'interférence du Pb avec les activités enzymatiques, à l'altération des membranes, à la fermeture des stomates en raison de l'induction d'acide abscissique ainsi qu'à la corrélation négative entre le plomb et le potassium dans les plantes (Zulfiqar et al., 2019).

Une fois que le plomb pénètre à l'intérieur de la cellule, il modifie la structure et par conséquent, la perméabilité de la membrane, perturbant les teneurs en eau de la cellule et sa nutrition minérale (Ghori, 2019 ; Sharma et Dubey, 2005). Il provoque aussi des changements hormonaux et inhibe de nombreuses enzymes portant un groupement sulfhydryle (Ghori, 2019). Les plantes confrontées à la toxicité du plomb subissent une altération de leurs voies photosynthétiques, car le plomb perturbe l'ultrastructure des chloroplastes et réduit la synthèse des pigments essentiels, notamment la chlorophylle, les caroténoïdes et la plastoquinone (Zulfiqar et al., 2019). Le métabolisme est d'autant plus affecté, que le plomb bloque le cycle de Calvin ainsi que la chaîne de transport des électrons et limite la disponibilité en CO₂ en provoquant la fermeture des stomates (Sharma et Dubey 2005).

2.4. Biodisponibilité des ETM

La « biodisponibilité » pouvant avoir différents sens en fonction du domaine étudié, il peut être utile de préciser que nous parlons ici de « phyto disponibilité », c'est-à-dire de l'aptitude d'un élément-trace métallique à être transféré à la plante. Bien que tous les ETM soient non-biodégradables, certains sont mobilisables ; autrement dit, ils peuvent être absorbés par les systèmes racinaires des plantes, par diffusion, endocytose ou encore par des transporteurs métalliques (Ghori, 2019 ; Haider et al., 2021 et références dans cette étude).

La mobilité et la disponibilité des ETM au sein des sites contaminés est principalement influencée par les conditions environnementales et les propriétés physicochimiques du sol (Cipullo et al., 2018). Le pH du sol est un des facteurs clés affectant directement la phytodisponibilité. En effet, à pH faible (<5,0) les cations métalliques ont une grande mobilité et sont plus réactifs, alors qu'à pH élevé (>8,0) ils ont tendance à s'adsorber sur les particules de sol (formation de ligands organométalliques), ce qui diminue leur mobilité et donc leur disponibilité pour les plantes (Shah et Daverey, 2020).

Dans le sol, les ETM peuvent exister sous forme de particules discrètes ou associés à des composants du sol (McIntyre, 2003) :

- Ions métalliques libres et composés métalliques solubles dans la solution du sol,
- Ions échangeables sorbés sur des surfaces en phase solide inorganiques,
- Ions non échangeables et composés métalliques inorganiques précipités ou insolubles,
- Métaux complexés par de la matière organique soluble ou insoluble,
- Métaux liés dans des matériaux silicatés.

Plusieurs études ont démontré que l'absorption du plomb par les plantes est régulée par le pH, la taille des particules et la capacité d'échange cationique des sols ainsi que par l'exsudation racinaire de composés chélatants et d'autres paramètres physico-chimiques (Sharma et Dubey, 2005 ; Ashraf et al., 2016). Un taux élevé de matière organique dans le sol peut aussi entraîner une plus grande rétention des ETM (Cipullo et al., 2018 et références dans cette étude).

En 2018, Cipullo et son équipe avaient mené une expérience de 12 mois au sein de mésocosmes afin d'étudier les effets de facteurs physico-chimiques (pH, humidité et température) et de l'altération du temps sur le fractionnement des métaux lourds et des métalloïdes dans trois matrices de sols distinctement multi-contaminées (faiblement, moyennement et fortement contaminées). L'évaluation du fractionnement des ETM permet d'obtenir des informations

quant aux risques qu'ils peuvent potentiellement présenter et sur les mécanismes qui régulent leur biodisponibilité (Cipullo et al., 2018). Cette étude a pu montrer que, même si le plomb et le zinc ont été trouvés associés à la fraction échangeable du sol avec la plus forte contamination (Pb moyen total 3400 mg / kg et Zn moyen total 2100 mg / kg dans le sol fortement contaminé), ni les conditions appliquées, ni les altérations climatiques n'ont entraîné d'augmentation de leur mobilité. Cette étude a également démontré que même si les concentrations totales de plomb et de zinc dépassent les normes et les valeurs guides du Royaume-Uni (SGVs) et la directive européenne 86/278/EEC, ceux-ci étaient principalement associés à la fraction non échangeable du sol et seuls 5% étaient dissouts dans la fraction d'eau interstitielle et donc potentiellement biodisponible. De plus, la mobilité et la biodisponibilité des ETM sont restées constantes au cours des 12 mois de surveillance, suggérant que les sols étudiés présentent un risque négligeable pour l'environnement (Cipullo et al., 2018).

3. Les mécanismes de résistance des plantes

Dans la nature, les plantes, sessiles, sont constamment confrontées à des stress biotiques et abiotiques. Or, comme vu précédemment, des ETM tels que le Fe, Mn, Cu, Ni, Co, Cd, Zn, Hg et l'As s'accumulent depuis la nuit des temps dans les sols. C'est pourquoi les plantes ont dû développer différents mécanismes leur permettant d'absorber les métaux essentiels au maintien de leur homéostasie, tout en essayant de contrer leurs excès, qui peuvent avoir des conséquences néfastes. D'autres mécanismes ont pour objectif d'éviter ou de limiter l'accumulation d'éléments non-essentiels toxiques.

Certains des mécanismes de résistance à la toxicité des plantes, se concentrent sur la prévention à l'exposition aux ETM présents dans le sol (stratégie d'évitement) ou sur la capacité de la plante à détoxifier les métaux (stratégie de tolérance). D'autres mécanismes sont spécifiques et ne sont déclenchés que lorsque la contrainte respective est rencontrée. La première stratégie de défense d'une plante est de réduire l'absorption de métaux lorsqu'elle est exposée à une forte concentration exogène en ETM, via l'utilisation d'exsudats cellulaires et racinaires empêchant les métaux d'entrer dans la cellule (Ghori, 2019). De nombreuses plantes ont des mécanismes exclusifs pour les ions métalliques individuels et peuvent séquestrer ces ions dans des compartiments spécifiques, si jamais elles les absorbent, évitant ainsi leur exposition aux composants sensibles des cellules (Shah et Daverey, 2020 et références dans cette étude). La deuxième stratégie de défense, consiste à utiliser des mécanismes qui chélatent, transportent, séquestrent et détoxifient ces ions métalliques dans les vacuoles de la plante (Ghori, 2019). Etant donné cette toxicité métallique, les cellules subissent un stress oxydatif, qui engendre la

production de protéines et d'hormones liées à ce stress, mais également d'antioxydants, de molécules de signalisation et l'initiation de la synthèse de protéines chaperonnes comme les protéines de choc thermique (HSP), les déhydrines, ou les Late Embryogenesis Protein (Kurade et al., 2021 ; Noor et al., 2022).

Les plantes acquièrent les ETM du sol via les racines qui les ont absorbés, soit par transport symplastique (via la membrane plasmique des cellules endodermiques des racines), soit par transport apoplastique (via l'espace libre entre les parois cellulaires), comme illustré sur la Figure 2 (Shah et Daverey, 2020). Précisons que même si les plantes peuvent absorber des contaminants par l'air (par les feuilles), le principal point d'entrée des ETM dans les plantes se fait par les racines, car la plupart des métaux possèdent une volatilité minimale et les plantes y sont surtout exposés par leur charroi dans l'eau ou le sol (Kurade et al., 2021). Un apport par l'eau de pluie n'est toutefois pas à exclure.

Les métaux lourds progressent par les espaces intercellulaires dans le cas du transport apoplastique et par des canaux ioniques spécifiques ou des transporteurs dans le cas du transport symplastique. Les protéines de transport spécifiques aux métaux, telles que le facilitateur de diffusion des cations (CDF), les transporteurs régulés par le zinc, les protéines de transport régulées par le fer ou encore la protéine macrophage associée à la résistance naturelle (NRAMP), aident les ETM à traverser la membrane plasmique (Shah et Daverey, 2020 et références dans cette étude). Les métaux et métalloïdes sont ensuite chélatés par les différents chélateurs (tels que le glutathion, les métallothionéines et les phytochélatines) produits par les plantes.

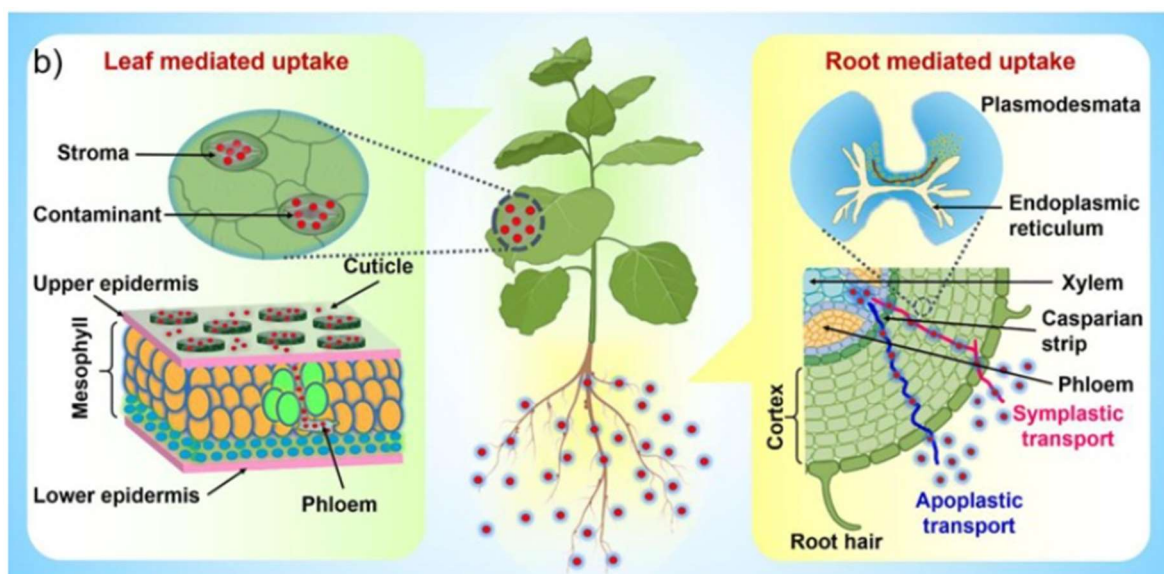


Figure 2 : Les voies d'entrée et les voies de transport des composés organiques émergents (EOC) dans les plantes (Kurade et al., 2021)

Les métallothionéines, le glutathion et les phytochélatines jouent un rôle majeur dans les mécanismes de détoxification, notamment dans la régulation de l'élimination des espèces réactives à l'oxygène (ROS) pour le glutathion ou de la chélation des ions métalliques pour les phytochélatines et les métallothionéines. Dans une étude publiée en 2018, Chaâbene et son équipe ont signalé l'expression induite de gènes de phytochélatines synthases et de métallothionéine sous stress métallique Cr et Cd chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Ils ont conclu que la surexpression de ces gènes était responsable de la translocation, de la séquestration et de la tolérance aux métaux Cd et Cr chez cette espèce (Chaâbene et al., 2018).

Une fois chélatés, ces éléments métalliques peuvent être soit séquestrés dans des emplacements où ils n'endommagent pas les machineries cellulaires, comme les vacuoles et/ou les parois cellulaires voire l'épiderme, les trichomes ou même la cuticule, soit transportés vers les pousses via le xylème pour les plantes hyperaccumulatrices⁵ (Shah et Daverey, 2020). Afin d'être chargés dans la sève xylémienne, les ions métalliques doivent franchir le cadre de Caspari, qui a pour effet de bloquer le flux apoplastique en forçant le passage symplastique (Figure 2). Le chargement du xylème est un phénomène hautement régulé par des protéines membranaires telles que l'ATPase de type P, l'ATPase de transport des métaux lourds, la MATE (protéine d'extrusion multi-drogue et toxines) et les protéines de transport d'oligopeptides (Shah et Daverey, 2020).

Si la plante dispose de transporteurs spécifiques pour des éléments essentiels comme le Cu, Zn, Ni, Mn, tel n'est pas le cas pour des éléments non-essentiels comme le Cd, Pb, Hg ou As. Dans ce cas, les éléments toxiques sont absorbés par voie racinaire, au niveau des cellules et des organites, par des transporteurs peu spécifiques qui sont normalement dévolus au transport d'autres éléments présentant une faible sélectivité (Yang et al., 2022). Ainsi, le Cd est absorbé par des transporteurs peu spécifiques de Zn ou de Fe, l'arsenate est absorbé par des transporteurs de phosphate et le sélénate par des transporteurs de sulfates (Feki et al., 2021 ; Riyazuddin et al., 2022).

⁵ Les plantes sont dites hyperaccumulatrices si elles ont un grand potentiel de détoxification et de séquestration des métaux lourds, ce qui leur permet d'accumuler de grandes quantités dans les parties aériennes de la plante sans provoquer de phytotoxicité (Shah et Daverey, 2020).

II. La phytoremédiation

Les options traditionnelles d'assainissement des sols pollués aux métaux, impliquent souvent des pratiques de génie civil conventionnelles (procédés physiques, chimiques et thermiques), appliquées séparément, en combinaison ou dans un enchaînement de traitements successifs et qui nécessitent généralement l'élimination physique du métal ou la minimisation de l'exposition sur le site (Tableau 3) (McIntyre, 2003). Ces options d'assainissement, qu'elles soient « *in situ* » ou « *ex situ* », sont de plus en plus critiquées pour leur coût élevé, leur exigence énergétique, la destruction du site, les problèmes logistiques et le mécontentement croissant du public qu'elles provoquent (Favas et al., 2014 ; Shikha and Singh, 2021). De plus, les technologies de remédiation physico-chimique influencent les propriétés du sol, sa fertilité et sa biodiversité et sont donc inadaptées aux sols cultivés (Shah et Daverey, 2020). Dès lors, ces critiques ouvrent des portes aux techniques alternatives.

Tableau 3 : Récapitulatif des principaux avantages et inconvénients des différentes techniques de traitement des sols pollués, telles que décrites par Bruxelles environnement, <https://environnement.brussels/thematiques/sols/le-traitement-des-sols-pollues/quelles-sont-les-differentes-techniques>

Technique	Avantages	Désavantages
Excavation ex-situ on site	Traitement d'un grand volume de terres contaminées. Limite les coûts et les risques environnementaux liés aux nombreux transports. Applicable si nappe phréatique atteinte.	Nécessite une importante surface de stockage et des unités mobiles de traitement. Soumis à des conditions d'exploitations particulières. Risques de pollutions sonores, gazeuses et liquides on site. Nombreuses complications.
Excavation ex-situ off site	Evacuation vers un centre de traitement approprié ou une décharge contrôlée. Travaux de terrassement classiques. Simple et rapide. Pour tout type de contaminant.	Mise en œuvre particulière, destinée à limiter les risques de dissémination des polluants. Nombreux transports. Description des travaux obligatoire. Coût et gêne des travaux.
Venting (extraction de l'air du sol)	Adaptée au traitement des terres polluées par des contaminants volatils. Alternative à l'excavation lorsque le sol est suffisamment perméable et que les contaminants sont volatils.	Exclusivement pour la zone insaturée du sol. Coût et gêne de l'installation de puits d'extractions d'air.
Pump and treat (pompage souterrain et traitement en surface)	La plus simple et la plus pratique en zone urbaine densément peuplée. Technique bien maîtrisée.	Coût élevé. Efficacité limitée aux polluants hydrosolubles et aux sols perméables. Peut durer plusieurs années.
Bioremédiation (utilisation de microorganismes souterrains)	Transformation écologique des polluants hydrocarbures en CO ₂ et en eau.	Nécessite l'apport d'oxygène et de nutriments comme l'azote ou le phosphore pour être pleinement efficace. Dure plusieurs années. Utilisation limitée aux sites où les autres techniques d'assainissement sont inappropriées. Pas adapté aux métaux lourds.
Oxydation (destruction chimique)	Destruction rapide des polluants.	Application non homogène. Pour noyaux de pollutions circonscrits, présentant une concentration très élevée pour un volume restreint.
Barrières (écran de traitement pour les eaux souterraines)	Ecran permettant le traitement de l'eau souterraine s'écoulant naturellement vers lui.	Exclusivement pour les pollutions affectant les nappes phréatiques.
Ecrémage de couche flottante	Optimise le rapport entre le volume de produit pur extrait et le volume d'eau souterraine pompé par rapport au pump and treat.	Exclusivement pour les pollutions affectant les nappes phréatiques et uniquement sur les polluants liquides, non solubles et plus légers que l'eau.
Air sparging (injection d'air dans la nappe phréatique)	Particulièrement intéressante lorsque les conditions du terrain rendent la faisabilité d'un pompage de l'eau souterraine hasardeuse.	Nécessite puits d'injection, des drains d'extraction et une installation d'épuration.

Parmi les techniques prometteuses étudiées dans le cadre de l'assainissement des sols, on trouve la « phytoremédiation⁶ ». Ce terme, apparu en 1980, désigne les différentes techniques qui utilisent des végétaux afin de dégrader, fixer ou extraire des polluants du sol (Willey, 2007). Au cours des dernières décennies, les méthodes scientifiques relatives à la phytoremédiation ont connu un développement rapide (Shah et Daverey, 2020). C'est pourquoi le recours à la phytoremédiation semble tout à fait indiqué dans l'établissement d'un protocole d'assainissement de sols contaminés aux métaux lourds, des suites d'un passé industriel.

4. Principes de la phytoremédiation

La phytoremédiation est une technologie qui repose sur l'utilisation de certaines plantes ou de produits issus de plantes (McIntyre, 2003 ; Shikha et Singh 2021) ainsi que les microorganismes associés (Favas et al., 2014), dans le but d'assainir les sols, l'eau et/ou l'air contaminés par des polluants environnementaux, via la dégradation, l'extraction ou l'immobilisation des contaminants. Cette technique est d'autant plus appréciée qu'elle est innovante, facile à mettre en place, peu onéreuse, respectueuse de l'environnement, visuellement plaisante et qu'il s'agit d'une alternative envisageable sur le long terme, aux méthodes d'ingénierie couramment utilisées sur les sites de déchets dangereux (McIntyre, 2003 ; Willey, 2007 ; Kurade et al., 2021).

4.1. Les différentes stratégies de phytoremédiation

La phytoremédiation reprend un ensemble de techniques, se basant sur l'utilisation de plantes qui tolèrent, dégradent, fixent ou accumulent plus ou moins efficacement des composés polluants. Il existe 5 grandes stratégies de phytoremédiation :

- La phytoextraction : les contaminants sont absorbés par la plante et donc extraits du milieu.
- La phytostabilisation : les contaminants sont immobilisés par la plante.
- La phytodégradation : la plante décompose les contaminants organiques en composés moins toxiques.
- La phytovolatilisation : les contaminants sont rendus volatiles par l'intermédiaire de la plante.
- La phytostimulation : la plante stimule des microorganismes dépollueurs (champignons, bactéries, etc.).

⁶ Du grec "*phyton*", qui signifie "plante", et du latin "*remedium*", qui signifie "remédier" ou "corriger".

Ces différentes stratégies de phytoremédiation sont illustrées à la Figure 3.

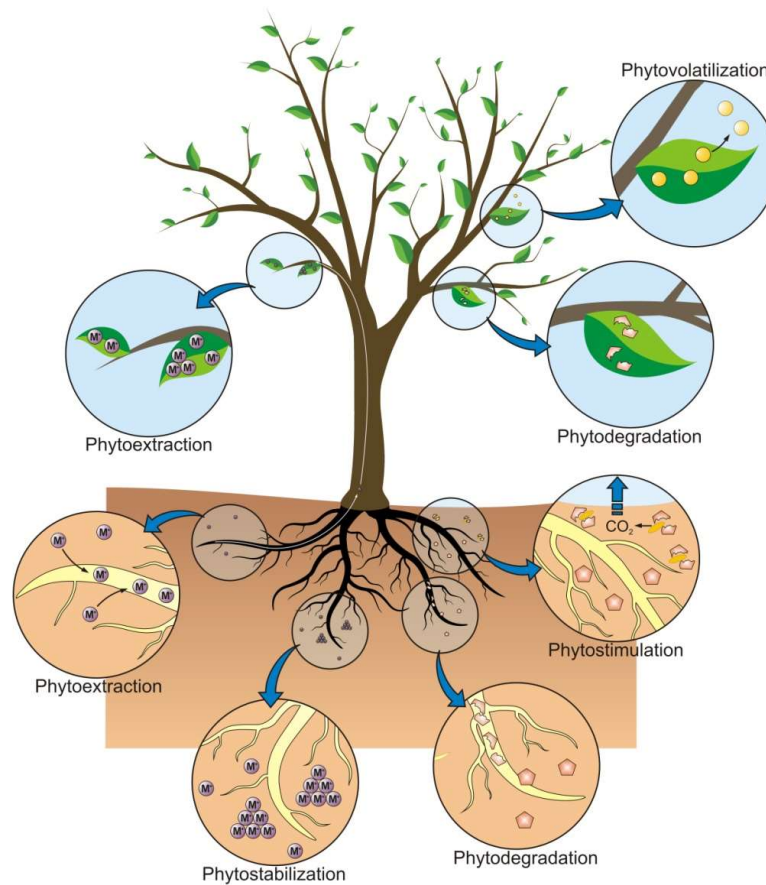


Figure 3 : Représentation schématique des différents types de phytoremédiation.
« Environmental Risk Assessment of Soil Contamination » (Favas et al., 2014).

Ces différentes stratégies, dépendent de la nature et des propriétés du contaminant (s'il est inerte, volatile ou sujet à la dégradation dans la plante ou dans le sol) ainsi que des caractéristiques de la plante considérée et peuvent être utilisés conjointement par cette dernière (Favas et al., 2014).

- **Phytodégradation** : les contaminants organiques sont métabolisés ou minéralisés à l'intérieur des cellules végétales par des enzymes spécifiques, notamment des nitroréductases (dégradation des composés nitroaromatiques), des déshalogénases (dégradation des solvants chlorés et des pesticides) et des laccases (dégradation des anilines) (Nebeska et al., 2021 ; Favas et al., 2014).
- **Phytostabilisation** : les contaminants, organiques ou inorganiques, sont incorporés dans la lignine des parois cellulaires des cellules des racines, ou dans l'humus, tandis que les métaux sont précipités par l'action directe des exsudats racinaires et sont ensuite piégés, sous une forme insoluble, dans la matrice du sol (Shah et Daverey, 2020). Cette technique permet d'éviter la mobilisation de ces contaminants et de limiter leur diffusion dans le sol (Favas et al., 2014 ; Oladoye et al., 2022).

- **Phytovolatilisation** : certains métaux/métalloïdes (ions d'éléments des groupes IIB, VA et VIA du tableau périodique, notamment Hg, Se et As) peuvent être volatilisés par les plantes. Après avoir été absorbés par les racines, puis transformés en formes non toxiques, ils sont libérés dans l'atmosphère. Cette technique peut également être utilisée pour les composés organiques (Kurade et al., 2021). Il faudra veiller à tenir compte de la présence éventuelle d'ETM également toxiques sous leur forme volatile (e.g. Hg⁰) (Guarino et al., 2020).
- **Phytoextraction / phytoaccumulation** : les contaminants, principalement les ETM, peuvent être absorbés par les racines, puis éventuellement transportés et accumulés dans les parties aériennes. Cette technique peut utiliser des plantes hyperaccumulatrices, qui ont la capacité de stocker de fortes concentrations⁷ de métaux spécifiques dans leurs parties aériennes (0,01% à 1% de poids sec, selon le métal) (Shah et Daverey, 2020). Toutefois, la faible production de biomasse par ces plantes limite les quantités effectivement extraites du sol.
- **Phytostimulation** : les contaminants sont dégradés par la flore de microorganismes de la rhizosphère, qui utilisent les exsudats et les métabolites des plantes comme source de carbone et d'énergie. En outre, les plantes peuvent elles-mêmes exsuder des enzymes biodégradables. De ce fait, l'application de la phytostimulation est limitée aux contaminants organiques (Favas et al. 2014 ; Ortiz-Castro et Lopez-Bucio, 2019).

A ces 5 grands principes viennent s'en ajouter d'autres, considérés par certains auteurs comme des catégories de phytoremédiation à part entière et par d'autres auteurs comme des variations des grandes stratégies exposées ci-dessus ; les barrières hydrauliques, les couvertures végétales, les zones humides construites, la phytodésalinisation, etc. (Favas et al., 2014). Ce mémoire n'étudiera pas ceux-ci.

4.2. Avantages de la phytoremédiation

Les avantages relatifs à l'utilisation de la phytoremédiation comprennent, entre autres, la possibilité de l'appliquer *in situ*, le fait que ce soit une technologie verte passive, fonctionnant à l'énergie solaire, facile à mettre en œuvre et applicable à un large gamme de métaux, de radionucléides et de substances organiques (Favas et al., 2014 ; Kurade et al., 2021 ; McIntyre, 2003). De plus, sa large applicabilité permet de l'utiliser sur des sites difficilement assainis par d'autres méthodes. Par exemple, la phytoremédiation paraît particulièrement adaptée aux grands sites présentant de faibles concentrations de contaminants, largement dispersés à faible

⁷ 100 mg kg⁻¹ of As and Cd; 1000 mg kg⁻¹ of Cu, Cr, Ni, Se, Pb and Co; 10 000 mg kg⁻¹ of Zn and Mn. (Carocci et al., (2015) in Shah et Daverey, 2020)

profondeur (McIntyre, 2003). Ensuite, la large manne de connaissances des pratiques agricoles et sylvicoles peut être appliquée à la culture et à la gestion des plantes sur les sites contaminés (McIntyre, 2003). Enfin, la couche arable peut être laissée en l'état, sans perturbation du site (Shah et Daverey, 2020 ; Parveen et al., 2022).

La phytoremédiation offre également l'avantage d'éliminer les substances toxiques capables de se mettre en suspension dans l'air ou dans l'eau, pouvant entraîner une exposition humaine et écologique. A travers leur couverture végétale, les plantes stabilisent le sol contaminé et contribuent à réduire la propagation des polluants, en réduisant les poussières transportées par le vent ou l'érosion hydrique et la lixiviation (Favas et al., 2014 ; McIntyre, 2003 ; Shen et al., 2022).

En outre, la phytoremédiation est un bon moyen de produire des résidus végétaux riches en métaux recyclables, voir économiquement valorisables ; le « phytomining », qui permet de recycler les métaux lourds extraits du sol en vue de leur réutilisation pour des applications commerciales (Favas et al., 2014 ; McIntyre, 2003 ; Liu et Tran, 2021). La biomasse produite par les plantes accumulatrices peut également être éliminée par incinération, entraînant une importante réduction de la masse et du volume des contaminants qui devraient être mis en décharge. Des techniques microbiologiques sont aujourd'hui disponibles pour réduire significativement les quantités de cendres générées, grâce à des techniques de lixiviation biologique (Liu et Tran, 2021).

Selon McIntyre (2003), pour l'enlèvement d'un mètre de sol d'un site d'une acre (40,5 ares), les coûts correspondants aux méthodes « traditionnelles » (enlèvement, isolement, incinération, puis le retour des résidus sous forme de matériel stérile sur le site et éventuellement supplémentation) peuvent être de 0,6 à 2,5 millions de dollars selon la densité du sol et les frais de transport et d'enfouissement. En comparaison, les coûts pour la phytoremédiation du même site d'un acre, y compris la préparation du site, la plantation et la récolte de matériel végétal, peuvent varier de 2 000 \$ à 5 000 \$ seulement (McIntyre, 2003). De plus, on estime que le maintien en culture d'un site pendant dix ans coûte⁸ beaucoup moins cher que les méthodes conventionnelles de nettoyage du site (Bruxelles environnement, 2017). Des coûts aussi avantageux pourraient également permettre le nettoyage simultané d'un plus grand nombre de sites.

⁸ Ces coûts dépendent des caractéristiques du site, ainsi que de la disponibilité de l'équipement et des matériaux agricoles et de leur facilité d'utilisation.

La phytoremédiation offre l'avantage supplémentaire de rendre les sites contaminés plus attrayants sur le plan esthétique, un bonus suscitant l'intérêt et le soutien du public (Kurade et al., 2021 ; Noor et al., 2022 ; Rocha et al., 2022).

4.3. Inconvénients et limites de la phytoremédiation

Bien que la phytoremédiation offre de nombreux avantages par rapport aux techniques conventionnelles d'assainissement des sols, un regard réaliste sur cette technique fait ressortir de sérieuses limites, comme illustré par le Tableau 4 (Favas et al., 2014 ; McIntyre, 2003 ; Shah et Daverey, 2020).

Premièrement, les plantes hyperaccumulatrices n'accumulent souvent qu'un élément spécifique, ce qui réduit l'applicabilité de la phytoremédiation aux sites présentant une pollution mixte (McIntyre, 2003 ; Shen et al., 2022). En outre, toutes les plantes ne sont pas hyperaccumulatrices et les sites concernés doivent présenter une concentration en polluants limitée afin que la phytotoxicité ne soit pas trop importante et que la végétation puisse croître et se développer (Shah et Daverey, 2020). La texture du sol, la concentration en polluants, le pH, la salinité et les niveaux de toxicité doivent tous se situer dans les limites de tolérance des plantes (Favas et al., 2014). Comme pour toute technologie de dépollution, les difficultés liées à la caractérisation des déchets et les effets des conditions hétérogènes du site s'appliquent (McIntyre, 2003 ; Bruxelles environnement, 2017). Les contaminants métalliques étroitement liés au sol peuvent s'avérer difficiles à éliminer en raison de leur faible biodisponibilité pour les plantes (Shah et Daverey, 2020). Pour surmonter cette difficulté on pourrait proposer de recourir à divers agents chélateurs synthétiques (acide citrique, EDTA, EGTA, CDTA, DTPA, etc.), mais outre les coûts supplémentaires que cela engendrerait, la nature non dégradabile et toxique et la persistance de ces agents dans le sol ainsi que les risques de percolas, pourraient créer de futurs problèmes (Shah et Daverey, 2020 ; Gravilescu 2022 ; Kafle et al., 2022).

Une autre critique adressée à la phytoremédiation est qu'elle est souvent plus lente que les traitements physiques, chimiques ou thermiques et nécessite plusieurs saisons de croissance pour le nettoyage du site (Favas et al., 2014 ; Shah et Daverey, 2020). Par conséquent, cette technologie n'est pas appropriée lorsque le contaminant ciblé présente un danger imminent pour la santé humaine ou l'environnement (Kurade et al., 2021 ; McIntyre, 2003). Par ailleurs, les exigences de temps peuvent s'avérer inhibitrices selon l'avenir envisagé pour la propriété (e.g. promoteurs immobiliers) (Bruxelles environnement, 2017).

Quant à la production de biomasse pour l'extraction, la plupart des plantes hyperaccumulatrices ont des taux de croissance lents et produisent de petites quantités de biomasse (Shah et Daverey, 2020 ; McIntyre, 2003). Ce caractère peut être exacerbé par les climats nordiques plus froids du Nord de l'Europe et on observe des différences de sorption des contaminants en fonction des régions climatiques (McIntyre, 2003). Des recherches sont en cours pour tenter d'introduire des gènes dans des cultivars à croissance rapide, afin de réguler la croissance des racines ou pour augmenter la production d'enzymes végétales sélectionnées (Kumar et al., 2022 ; Tussipkan et Manabayeva, 2022 ; Kafle et al., 2022).

La plupart des informations requises afin de procéder à une évaluation correcte peuvent ne pas être facilement disponibles pour les espèces visées par la phytoremédiation (McIntyre, 2003). Par ailleurs, de nombreuses espèces de plantes hyperaccumulatrices sont relativement rares, avec de petites populations qui se trouvent souvent dans des régions éloignées ou dont la distribution est très restreinte et il faudrait éviter de recourir à des plantes non indigènes invasives (McIntyre, 2003 ; Sabreena et al., 2022). Notons que la collecte de propagules à partir de plantes de terrain peut également poser problèmes car la reproduction de certaines plantes est sporadique ou peu fréquente et les graines d'espèces indigènes peuvent être difficiles à récolter, à séparer et à nettoyer (McIntyre, 2003). Or la culture de ces espèces pourrait être entravée par des exigences de germination et des mécanismes de pollinisation très spécifiques ainsi que par la sensibilité de ces espèces aux maladies et aux herbivores locaux (Shen et al., 2022).

La phytoremédiation peut également nécessiter des coûts d'intrants tels que le prétraitement des polluants ou des interventions supplémentaires pour assainir efficacement le site (agents chélateurs artificiels, irrigation, amendements du sol, insecticides) (Gavrilescu 2022). Notons que le terrain et l'instabilité des pentes du site affecteront l'efficacité et le coût. En outre, les techniques de récolte, de traitement et d'élimination de la biomasse contaminée doivent être soigneusement conçues et prises en compte, tout en évaluant leurs potentiels impacts environnementaux (Liu et Tran, 2021).

Enfin, pour pouvoir recourir aux principes de la phytoremédiation, les plantes choisies doivent posséder un certain nombre de caractéristiques (McIntyre, 2003):

- La possibilité de transférer vers l'atmosphère l'humidité des sols et des eaux souterraines contaminées.
- La production d'enzymes de dégradation.
- La capacité de survivre dans une large gamme de conditions écologiques.
- La possibilité de faire pénétrer son système racinaire à des profondeurs importantes et de créer de vastes zones exploratoires.
- La capacité d'accumuler certains contaminants.
- La capacité de produire et de métaboliser de nombreuses toxines naturelles.
- La capacité de ramener le site contaminé à un certain seuil de santé et de stabilité.

Tableau 4 : Avantages et limites de la phytoremédiation selon Favas et al., (2014) Issu de « Environmental Risk Assessment of Soil Contamination »

Advantages	Limitations
<i>In situ</i> and passive technique	Limited to shallow soils or where contamination is localized to the surface (< 5 m)
Uses solar energy and is low cost	Still under development and therefore not accepted by many regulatory agencies
Has reduced environmental impact and contributes to the landscape improvement	There is little knowledge of farming, genetics, reproduction and diseases of phytoremediating plants
High acceptance by the public	Metal concentrations in the soil can be toxic and lethal to plants
Provides habitat for animal life	Generally, plants are selective in metal remediation
Reduction in dispersal of dust and contaminants by wind	Treatment slower than the traditional physico-chemical techniques
Reduction of surface runoff	Contamination may spread through the food chain if accumulator plants are ingested by animals
Reduction of leaching and mobilization of contaminants in soil	Efficient phytoremediating plants may not adapt to climatic and environmental conditions at contaminated sites
Harvesting of the plants or organs that have accumulated metals is easy to accomplish with existing technology	If the plants release compounds to increase the mobility of the metals, these can be leached into groundwater
The harvested biomass can be economically valuable	The area to be decontaminated must be large enough to allow application of cultivation techniques
Plant process more easily controlled than those of microorganisms	Toxicity and bioavailability of degradation products remain largely unknown

4.4. Application de la phytoremédiation comme méthode d'assainissement des sols

Parmi les composés pouvant être traités par phytoremédiation, on trouve, bien entendu, les métaux et les métalloïdes, mais aussi des composés inorganiques (tels que NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}), des éléments chimiques radioactifs, des hydrocarbures pétroliers, des pesticides et herbicides (de type atrazine, bentazone, composés chlorés et nitroaromatiques), des solvants chlorés, des déchets organiques industriels et bien d'autres encore (Favas et al., 2014 ; Parveen et al., 2022).

Le choix du recours à la phytoremédiation pour un site contaminé par des ETM, dépend de différents facteurs et critères propres au site étudié. Dans son article de 2003, McIntyre énumère différents critères à prendre en compte dans les processus de sélection de la méthode d'assainissement envisagée :

- Taille, emplacement et historique du site
- Accessibilité du site
- Efficacité des options de remédiation envisagées en fonction du site
- Caractéristiques du sol : structure, texture, pH, potentiel redox, capacité d'échange cationique, etc.
- Composition, état physique et état chimique des contaminants
- Degré et profondeur de la contamination (concentration et distribution)
- Utilisation finale prévue pour le site
- Ressources techniques et financières disponibles
- Connaissance de la technologie par les autorités réglementaires
- Questions environnementales, juridiques et de sensibilisation du public

Le succès de l'application de la phytoremédiation, sera en grande partie dépendant du contexte socio-économique et écologique que nous voulons instaurer pour l'avenir. Selon Willey (2007), la phytoremédiation sera probablement toujours une solution relativement lente, à faible technologie, aux problèmes de dégradation des sols ou de pollution des eaux. Cependant, ce type de technologie est étonnamment adapté à une multitude de contextes et pourrait avoir une résonance particulière avec les exigences du public du XXI^e siècle.

III. Plantes étudiées

Comme évoqué précédemment, trois problèmes que soulève la phytoremédiation, sont d'une part l'accès aux graines des espèces non-cultivées, d'autre part l'utilisation d'espèces indigènes acclimatées et enfin, le fait que les plantes hyperaccumulatrices soient plutôt spécifiques à un seul élément. Ce mémoire a donc pris le parti de se baser sur 5 espèces (2 dicotylédones et 3 monocotylédones) indigènes, potentiellement résistantes aux EMT et dont les graines sont commercialisées. Le but final est de pouvoir proposer aux propriétaires de terrains pollués aux métaux lourds, un mélange de graines, en vue de faire pousser une « pelouse calaminaire » qui appliquerait la phytoremédiation.

5. Les pelouses calaminaires

Ces pelouses métallicoles sont des communautés végétales herbacées qui se sont développées sur des sols riches en métaux, principalement suite à des activités industrielles métallurgiques. La toxicité du sol amène une flore très spécialisée : il s'agit de communautés héliophiles dominées par les métalphytes. On note également la présence de taxons endémiques au nord-est de la province de Liège et aux zones frontalières adjacentes (LIFE Pays Mozan, 2021).

Les métalphytes qui s'y développent, donnent un aspect de pelouses denses au site. On y rencontre des espèces de plantes typiques, puisque spécialisées, comme la pensée calaminaire (*Viola calaminaria*), le tabouret calaminaire (*Nocaea caerulescens* subsp. *calaminare*), le silène calaminaire (*Silene vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *humilis*) ou encore la fétuque de Westphalie (*Festuca ovina* subsp. *guestfalica*) ainsi que des lichens et des bryophytes tout aussi caractéristiques de cet habitat (LIFE Pays Mozan, 2021).

On définit 3 types de pelouses calaminaires :

- les sites dits primaires, où l'affleurement du filon métallifère provient naturellement du sol (cette catégorie a quasiment disparu de nos jours).
- les sites dits secondaires, où la contamination du sol s'est faite via dépôt minier.
- les sites dits tertiaires, où la contamination est d'origine atmosphérique, due au voisinage des industries métallurgiques (retombées atmosphériques, zones d'épandages de déchets, etc.). (LIFE Pays Mozan, 2021)

6. *Deschampsia cespitosa* L.



Figure 4 : *Deschampsia cespitosa* L.
– on « Ruwe smele plant *Deschampsia cespitosa*.jpg » (Wikimedia Commons)

La canche cespiteuse est une plante herbacée de la famille des Poaceae, présente en Eurasie et en Amérique du Nord (sauf dans les États américains du sud-est).

En échantillonnant des sols et des plantes de divers sites contaminés par des métaux au Canada et en Europe, la tolérance aux métaux lourds a été observée chez *Deschampsia cespitosa* L. (Beauv.) (Von Frenckell-Insam et Hutchinson, 1993). Les plantes européennes ont été échantillonnées à partir de sites contaminés au zinc et au plomb, deux métaux qui nous intéressent dans le cadre de ce travail. L'expérience de Von Frenckell-Insam et Hutchinson (1993) a pu mettre en évidence que les plantes prélevées sur des sites contaminés par les

métaux présentaient une tolérance accrue aux ions métalliques avec des concentrations non élevées dans les sols d'origine (co-tolérance générale, non spécifique, de faible niveau). Ainsi, la plupart des plantes ont présenté une tolérance à des niveaux plus élevés de Zn et de Pb. De plus, étant donné que les minerais métallifères à élément unique ou les pollutions monospécifiques sont rares, il n'est pas surprenant que la tolérance multiple aux métaux soit également un phénomène fréquemment rencontré chez cette espèce (Von Frenckell-Insam et Hutchinson, 1993).

Selon Hutchinson et Cox (1984), qui ont travaillé sur *D. cespitosa*, L. des tolérances au Cd, Pb et Zn étaient corrélées, à la fois dans les clones tolérants et non tolérants, indiquant ce faisant, la possibilité d'un mécanisme de tolérance commun pour ces ions (Von Frenckell-Insam et Hutchinson, 1993).

Selon Gucwa-Przepiora et al. (2007 ; 2013), *D. cespitosa* établit facilement des symbioses mycoriziennes : toutefois, l'importance de cette symbiose diminue proportionnellement aux teneurs biodisponibles en ETM et des traitements de stabilisation augmentent les taux de symbiose, suggérant que celle-ci ne joue pas un rôle prépondérant dans la protection de la plante vis-à-vis des contaminants. Enfin, signalons que selon Coulaud et McNeilly (1992), il existe une très grande variabilité au sein de l'espèce, mais aussi une grande variabilité au sein même

des populations. Nkongolo et al. (2014) rapportent toutefois que la variabilité intra-population peut diminuer au niveau des sites qui présentent un fort degré de contamination.

7. *Festuca rubra* L.



Figure 5 : *Festuca rubra* L.
- on « *Festuca rubra* Habitus 2009-4-23
DehesaBoyalPuertollano.jpg » (Wikimedia
Commons)

La fétuque rouge ou fétuque traçante, est une espèce de la famille des Poaceae, vivant à l'état naturel en Europe, en Asie tempérée et en Afrique et Amérique septentrionales, où elle occupe une grande variété de milieux, depuis les bords de mer jusqu'aux pelouses montagnardes (De Litardiere, 1950).

Les espèces *Festuca* combinent de bonnes propriétés de sorption des métaux dans les tissus racinaires alliées à une tolérance élevée aux métaux lourds présents dans les sols ainsi que des techniques culturales éprouvées (Krzyżak et al., 2006). Des recherches antérieures menées par Kucharski et Sas-Nowosielska, en 2004 lors d'expériences en hydroponie, ont identifié un certain nombre de cultivars de *Festuca rubra* et de *Festuca arundinacea* comme appropriées pour lier et retenir divers métaux lourds sur ou dans leur tissu racinaire (Krzyżak et al., 2006). Ces caractéristiques avantageuses font des *Festuca* d'excellentes candidates à la phytostabilisation dans des projets d'assainissement de sols contaminés aux métaux lourds.

Gomez et al. (2016) ont démontré que *F. rubra* présente une bonne tolérance au Zn et peut, dans une certaine mesure, accumuler cet élément au niveau des parties aériennes alors que le Pb est séquestré au niveau des racines. Selon Gajic et al. (2016) *F. rubra* se comporte comme un « excluser » pour Cu, As et Mn. Toutefois, l'apparition de symptômes tels que la production de malondialdéhyde, une altération de la fluorescence chlorophyllienne et une réduction des teneurs en pigments photosynthétiques souligne qu'une accumulation des ETM au sein des feuilles peut se produire. L'espèce demeure toutefois capable de réagir au stress oxydatif induit par les ETM, par le biais de la production d'antioxydants endogènes, particulièrement des composés phénoliques. Simon (2005) souligne l'intérêt de *F. rubra* pour la gestion de sites poly-contaminés et son rôle en phytostabilisation lié à ses propriétés racinaires. En outre, selon cet auteur, l'apport de matière organique permet d'augmenter l'extraction du Zn. En 2003 Ma et al. ont isolé chez le cultivar Merlin de *F. rubra* un gène présent en deux exemplaires et codant

pour une métallothionéine riche en cystéine susceptible de séquestrer des éléments non essentiels (tels que Cd, Pb et Cr) et dans une moindre mesure des éléments essentiels (comme Cu, Zn) présents en excès.

8. *Holcus lanatus* L.



Figure 6 : *Holcus Lanatus* L. – on « https://stringfixer.com/fr/Holcus_lanatus » (Google Image)

La houlque laineuse est une plante herbacée vivace de la famille des Poacées, très commune en Europe, fréquente dans les prairies naturelles acides et parfois cultivée comme couvre-sol.

Dans le cadre de la recherche concernant l'élimination de divers métaux lourds de sols contaminés, de nombreuses plantes tolérantes aux ETM ont été étudiées. *Holcus lanatus* fait partie de ces espèces récurrentes, ce qui laisse paraître qu'il s'agit d'une bonne candidate à la phytoextraction de polluants métalliques à partir de sols contaminés (Begum et Malairajan, 2019 ; Symeonidis et Karataglis, 1992). Selon Rengel (2000), les populations de houlque laineuse capables de tolérer la toxicité du Zn sont également performante en situation de déficience en Zn :

ce résultat intéressant suggère qu'il existe une forte plasticité adaptative en réponse à des variations importantes en cet élément. *Holcus lanatus* est également connue pour être une espèce qui présente une bonne résistance à l'arsenic (Dradrach et al. 2020), élément qui ne sera toutefois pas pris en considération dans le cadre de ce mémoire.

9. *Rumex acetosa* L.



Figure 7 : *Rumex acetosa* L. – on « <https://planteset.com/rumex-acetos/> » (Frank Ensinger)

L'oseille commune, grande oseille ou oseille des prés, est une plante aromatique vivace de la famille des Polygonacées. C'est une plante potagère fréquemment cultivée en Europe, appréciée pour son goût acide agréable et caractéristique.

Sa possible utilisation en phytoremédiation a été envisagée, puisqu'en tant que plante à faibles besoins, l'oseille croît dans de nombreux écosystèmes tels que les prairies, les friches, les forêts, les parcs ou encore à

proximité des plans d'eau. Dans le cadre d'une étude visant à déterminer l'innocuité de la consommation d'oseille provenant de sites naturels, les concentrations de métaux dans *Rumex acetosa* ont été comparées aux normes de concentrations maximales de polluants autorisées dans les légumes-feuilles et leur corrélation avec les teneurs en métaux lourds dans le sol sous les plantes (Gawęda, 2009). La teneur admissible pour le plomb a été dépassée dans tous les échantillons de feuilles d'oseille et des concentrations excessives de cadmium étaient présentes dans environ 90 % des échantillons (Gawęda, 2009). Cette expérience a mis en évidence que les racines de *R. acetosa* accumulent fortement les métaux (la concentration de ces derniers était plus faible dans les tiges), faisant de cette espèce un excellent sujet d'étude pour la phytoaccumulation.

Selon Zhao et al. (2012), la capacité de transfert des ETM depuis les racines vers les parties aériennes chez *R. acetosa* est plus importante pour le Cd que pour Cu et les taux d'absorption des différents éléments font l'objet d'une régulation au cours du développement de la plante. Barrutia et al. (2009) ont comparé une population métallicole et non métallicole et constatent que pour un site polycontaminé (Cd, Pb et Zn), les taux d'accumulation des ETM sont plus importants pour la première que pour la seconde et que les taux de phytoextraction pour le Zn peuvent atteindre $6.8 \text{ mg plante}^{-1} \text{ mois}^{-1}$, soit des valeurs comparables à celles obtenues par des espèces hyperaccumulatrices. Dans une étude complémentaire, Barrutia et al. (2010) rapportent que l'utilisation d'agents chélatants (EDTA) pour une stratégie de phytoextraction induite est plus performante pour la population métallicole, plus particulièrement pour la mobilisation du Pb.

10. *Silene vulgaris* (Moench) Garcke



Figure 8 : *Silene vulgaris* (Moench) Garcke
– on "<http://www.lagrottadellafaina.it/en/schioppini-or-strigoli/>"
(Google Image)

Le silène enflé ou silène commun est une plante herbacée vivace de la famille des Caryophyllacées. Assez commune en Europe, cette espèce héliophile pionnière, est surtout présente sur les substrats calcaires et plus spécifiquement dans des déblais miniers, haldes et pelouses calaminaires.

Cette plante tolérante aux métaux lourds peut accumuler des quantités considérables d'ETM dans ses racines et ses pousses. La distribution intracellulaire des ETM dans les feuilles de silène a été étudiée par Brungezu et son équipe (1999) grâce à des méthodes conventionnelles et analytiques de microscopie électronique. *Silene vulgaris* est donc la parfaite candidate pour étudier la phytoextraction. Garcia-Gonzalo et al. (2017) ont mis en évidence les interactions entre le système racinaire de *S. vulgaris* et les bactéries du sol susceptibles de contribuer à la mobilisation des métaux lourds. Une inoculation avec des souches adaptées de *Pseudomonas* permet effectivement d'augmenter les taux de phytoextraction du Cd et du Zn (Plocinicsak et al., 2019). De nos jours, des écotypes présentant des niveaux distincts de résistance aux ETM ont été caractérisés (Koszelnik-Leszek et al., 2019; Muszynska et al. 2019a, 2019b ; 2020). L'implication des métallothionéine dans les stratégies de résistance au cuivre chez cette espèce a été mise en évidence (Nevratlova et al., 2014).

IV. Le vermicompost

Le vermicompost est un produit obtenu au départ de la digestion par des vers de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*) de divers résidus solides résultant, la plupart du temps, de l'industrie alimentaire (Singh et al., 2020) ou de déchets de jardinage (Chinsamy et al., 2013). Cette stratégie retient de plus en plus l'attention puisqu'elle permet de recycler, à moindre coût, des sous-produits et des déchets en vue de l'obtention d'un fertilisant de bonne qualité. Depuis quelques années, plusieurs études ont montré que l'application de vermicompost permettait de stimuler la croissance et le rendement des plantes cultivées, de lutter contre un certain nombre de maladies, d'apporter des quantités appréciables d'azote, de phosphore et de potassium, mais également d'améliorer la structure du sol et son activité microbiennes (Datta et al., 2016 ; Garg et al., 2012 ; Yang et al., 2015 ; Rupani et al., 2018).

Le vermicompost peut en effet contenir diverses substances utiles à la plante telles que des éléments minéraux, des composés anti-oxydants (composés phénoliques, flavonoïdes et acide ascorbique), des substances humiques, des phytohormones mais aussi des « plant growth promoting bacteria » dont l'activité bénéfique sur la plante est indirecte (Singh et al., 2020; Aremu et al., 2015 ; Hernandez et al., 2015). La composition du vermicompost (et donc son impact potentiel sur la plante) est cependant très variable et dépend de la nature et de la composition de la matière organique recyclée, ainsi que de la nature, de la densité et de l'activité physiologique des lombrics utilisés et des modalités de la conduite du processus de digestion (durée, températures, humidité,...) (Bhat et al., 2018).

A côté d'une fraction « solide » pouvant être utilisée de façon traditionnelle comme un compost, il est possible d'obtenir une fraction « liquide » selon deux modalités distinctes : premièrement, par récupération des percolats obtenus durant le processus de digestion (on parle alors de « *vermicompost leachate* ») ou deuxièmement, par infusion, au terme du processus de digestion et selon des modalités standardisées, de vermicompost solide dans un certain volume d'eau afin d'en extraire les principes actifs (on parle alors de « *vermicompost tea* »). Ces produits liquides peuvent alors être pulvérisés sur des parcelles cultivées ou revégétalisées (Aleman-Ramirez et al., 2020).

L'utilisation de vermicompost *leachate* permet d'améliorer la résistance de la tomate à la salinité (Chinsamy et al. 2013 ; Benazzouk et al. 2020). Cette amélioration est associée à une réduction de l'absorption et de l'accumulation de Na^+ et permet de réduire la production d'éthylène induite par le stress, responsable d'une sénescence précoce au niveau des jeunes feuilles. Le produit améliore la gestion des stress hydriques et oxydatifs secondaires par le biais d'une stimulation de la synthèse de proline et d'anthocyane. Le percola de vermicompost utilisé, est particulièrement riche en acide salicylique et induirait une augmentation des taux d'accumulation d'hormones anti-sénescentes que sont les cytokinines (particulièrement celles appartenant à la catégorie des dihydrozeatines) (Benazzouk et al., 2020).

Selon Liu et al. (2019), une application de vermicompost réduirait la biodisponibilité du cadmium et augmenterait le pH du sol. Si ceci peut avoir un effet positif dans une stratégie de phytostabilisation, cela s'avère contre-productif dans une stratégie de phytoextraction. Liu et son équipe ont toutefois utilisé du vermicompost solide et non une formulation liquide de type thé ou percola. Des données comparables sont fournies par He et al. (2017) et précisent que des métaux lourds tels que Cd et Pb peuvent être retenus au niveau de groupes fonctionnels -COOH, -OH, -NH et -CO. Selon ces auteurs, l'adsorption peut également concerner des polluants organiques comme la tétracycline et dépend en grande partie des propriétés de surface des particules constitutives du vermicompost solide. Une fixation de Pb^{2+} sur ces mêmes groupes fonctionnels fut mise en évidence par Zhang et al. (2020). De Fatima Esteves et son équipe (2020) soulignent cependant que le vermicompost peut avoir des propriétés particulièrement intéressantes au niveau de la structure du sol, rendant possible une amélioration de la croissance des plantes sans pour autant conduire à une immobilisation des métaux lourds : parmi les 3 espèces testées sur des terrils miniers fortement contaminés (*Pennisetum glaucum*, *Sorghum bicolor* et *Zea mays*), la croissance des plantes était stimulée, mais les teneurs en métaux dans

les tissus végétaux étaient maintenus ; ce qui tend à suggérer que la biodisponibilité n'est pas réduite de façon notable.

A notre connaissance, aucune étude à ce jour ne prend en compte l'application de vermicompost liquide sur site contaminé par les métaux lourds. Il est possible d'envisager une double action d'une telle application :

- 1) une stimulation de croissance comparable à celle obtenue pour la fraction solide.
- 2) une modification des taux d'accumulation de métaux lourds qui pourrait résulter de la formation de complexe soluble absorbable par la plante et qui n'irait pas dans le sens de la réduction de biodisponibilité évoquée pour la fraction solide.

Nous avons donc décidé, dans le cadre du présent mémoire, d'avoir recours à une application de thé de vermicompost, pour les essais de terrain uniquement.

Matériel et Méthode

Deux expériences ont été menées de front : la première en conditions semi-contrôlées sous serres avait pour but d'étudier le comportement morpho-physiologique de cinq espèces végétales exposées à différentes toxicités. Ces espèces végétales (*Silene vulgaris*, *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus*, *Rumex acetosa*, *Festuca rubra* subsp. *commutata*) ont été choisies du fait de leur présence, à l'état spontané, dans les pelouses calaminaires (cf. Synthèse bibliographique). La deuxième s'est déroulée sur le terrain afin d'étudier l'influence de contaminations de sol liées à un passé industriel, ainsi que l'impact de l'application d'un biostimulant (vermicompost liquide) sur la dynamique des populations du mélange d'espèces.

V. Expérience en serre

1. Semis et germination

Pour cette expérience, des graines de chacune des espèces ont été semées dans des terrines en fonction de leur taux de germination (Tableau 5), sur du terreau commercial non pollué. Ces graines ont été fournies par la société Ecosem S.A. Le semis a été réalisé le 31 mars à raison de 3 terrines par espèce.

Tableau 5 : Calculs du nombre de graines à semer selon les taux de germination communiqués par Ecosem S.A.

Nom de l'espèce	Taux de germination estimé*	Nombre de graines pour obtenir 5g/m ² **	Nombre de graines par terrine de 0.11m ²	Nombre de graines par parcelle de 4m ²
<i>Festuca rubra</i>	88%	1134	125	4536
<i>Deschampsia cespitosa</i>	22%	4410	485	17640
<i>Holcus lanatus</i>	60%	1638	180	6552
<i>Rumex acetosa</i>	96%	378	42	1512
<i>Silene vulgaris</i>	42%	2310	254	9240

* Taux de germination déterminé à raison de 10 graines par pot de 2 litres.

** Densité recommandée par le fournisseur (Ecosem)

Une fois germées, les jeunes plantules ont été arrosées 3 fois par semaine avec de l'eau de pluie.

Les conditions de la serre du 1^{er} avril au 30 juin 2021 étaient :


























- Températures : 20°C ± 2°C (jour et nuit) comme consigne et 23,6 °C le jour et 19,7°C la nuit comme moyennes observées.

- Humidité relative : $65\% \pm 5^\circ\text{C}$ comme consigne et 61% comme moyenne observée.
- Photopériode : 16 heures d'éclairage (de 06h00 à 22h00) dans le spectre rouge et bleu sous éclairage artificiel LED Lumigrow Pro 325 pour un rayonnement cumulé moyen de $4861,46 \text{ W/m}^2$.

2. Culture hydroponique et application des ETM

Quatre semaines après le semis, soit le 27 avril, les plantules de chaque espèce ont été transférées en solution nutritive de Yoshida (Yoshida et al., 1976) dans des bacs à hydroponie d'une contenance de 1,3 litres, à raison de 3 plantules par bac et 3 bacs par espèces (soit au total 9 plantes par espèce et par traitement). Nous disposons donc de 75 bacs hydroponiques contenant 225 plantules au total, répartis en 3 répétitions de 3 réplicats pour chacune des 5 solutions (témoins, Pb, Cd, Zn et un mélange des 3 ETM Pb+Cd+Zn comme traitement mixte) pour les 5 espèces étudiées (Tableau 6).

Tableau 6 : Plan expérimental

	Rumex	Houlque	Silène	Canche	Féтуque
Témoins					
Plomb $Pb(NO_3)_2$					
Cadmium $Cd.Cl_2 \times 2. \frac{1}{2} H_2O$					
Zinc $Zn.Cl_2$					
Mix des 3 ($Pb+Cd+Pb$)					

Les solutions nutritives ont été changées toutes les semaines pendant 6 semaines.

La première application d'éléments-traces métalliques a eu lieu le 12 mai, soit 2 semaines après le transfert en hydroponie. Ce délai a été choisi afin de permettre aux plantules de s'acclimater au milieu hydroponique avant de subir un stress métallique, permettant ainsi d'éviter d'accumuler les facteurs de stress et de biaiser éventuellement l'expérience.

Les 75 bacs ont été répartis sur 3 tables dans la serre. Comme ils étaient regroupés par traitement et par espèce (afin d'éviter les risques de pollutions croisées lors de l'application des traitements et du renouvellement des solutions) les facteurs de randomisation étaient la répartition des lots de traitements sur les tables ainsi que la position des tables au sein de la serre.

La récolte a eu lieu le 5 juillet, soit 10 semaines après le transfert en hydroponie.



Figure 9 : Evolution des plantes en serre depuis les premiers stades de croissance en terrine a), lors du transfert en hydroponie b), puis lors du stade de récolte c) (M. Raskin, 2021)

3. Préparation des solutions

3.1 Solution Yoshida

La solution Yoshida est une solution nutritive possédant tous les nutriments nécessaires à la croissance de cultures végétales. Sa composition se trouve en Annexe 2. La solution Yoshida était préparée en laboratoire puis stockée en tourie de 24 litres à l'obscurité dans la serre.

3.2. Solutions d'éléments traces métalliques

Les traitements aux éléments-traces métalliques ont été imposés via l'ajout de 1,3 ml de solutions mères concentrées de $Zn.Cl_2$ et/ou de $Pb(NO_3)_2$ et/ou $Cd.Cl_2 \times 2\frac{1}{2}H_2O$ aux solutions nutritives afin d'obtenir les concentrations finales souhaitées, soit 10 μM de cadmium, 100 μM de zinc, 250 μM de plomb et la somme de ces éléments avec les mêmes concentrations pour le traitement mixte. Ces solutions étaient issues de solutions mères dont les compositions se trouvent en Annexe 3. Ces solutions mères étaient préparées en laboratoire puis stockées en flacons Pyrex à l'obscurité dans la serre.

4. Mesures morpho-physiologiques

Diverses mesures morpho-physiologiques ont été réalisées à l'aide d'appareils de mesures physiologiques, d'outils de dosages ou déterminés par calculs. Ces mesures ont débuté en fin d'expérience, soit fin juin quand les plantes avaient 3 mois. L'ensemble de ces mesures nous permet de déterminer l'état général des plantes étudiées.

4.1. Photosynthèse nette, transpiration instantanée, conductance stomatique et concentration en CO_2 intercellulaire

Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un IRGA - Infra-Red Gaz Analyzer – (de type ADC BioScientific LCI-SD System Serial 33413, Hoddesdon, UK) qui permet de réaliser des mesures non destructives de l'efficacité photosynthétique. Cet appareil détermine les différences de concentrations en CO_2 entre l'air entrant et l'air sortant d'une chambre

d'assimilation dans laquelle une feuille de la plante à analyser est contenue. L'appareil base ses mesures sur la radiation infra-rouge absorbée par le CO₂, puisque les gaz hétéroatomiques absorbent les rayons infrarouges à des longueurs d'onde bien précises (Ngo, 2006). Un rayon infrarouge à la longueur d'onde caractéristique du CO₂ est envoyé sur la surface foliaire et l'IRGA mesure la réduction de transmission de longueur d'onde infrarouge, qui sera dès lors proportionnelle à la quantité de CO₂ présente dans la chambre d'assimilation (LCi Portable Photosynthesis System de ADC BioScientific Ltd, 2004). Outre la concentration en CO₂ dans l'espace intercellulaire, en mmol.mol⁻¹ (C_i), cette mesure permet également de déterminer le taux de transpiration instantanée, en mol.m⁻².s⁻¹ (E), la conductance stomatique en mol.m⁻².s⁻¹ (g_s), ainsi que le taux de photosynthèse nette en μmol.m⁻².s⁻¹ (A).

Les échanges gazeux ont été mesurés sur une feuille choisie arbitrairement (bien que suffisamment développée que pour remplir au maximum la chambre d'assimilation) pour 5 plantes de chaque espèce, choisies aléatoirement parmi les 9 plantes disponibles par traitement. L'aire de la surface de la feuille soumise à la pression dans la chambre d'assimilation ayant son importance, le pourcentage de surface occupée par chaque feuille dans celle-ci a également été noté. Pour chaque feuille, 3 mesures ont été réalisées afin de prendre la moyenne de ces 3 mesures comme valeur finale.

4.2. *Fluorescence de la chlorophylle*

Cette mesure s'est faite à l'aide d'un fluorimètre (de type FMS 2 de Hansatech Instruments Ltd) qui permet de réaliser des mesures non destructives de la fluorescence chlorophyllienne. Cet appareil se base sur une technique qui consiste à envoyer un flux de photons sur les feuilles puis à mesurer la partie de l'énergie dissipée sous forme d'émission de fluorescence. Des pinces munies d'un disque en position fermée sont placées sur les feuilles pendant 30 minutes. La portion recouverte du limbe foliaire s'habitue alors à l'obscurité. Dès lors, les accepteurs primaires d'électrons des photosystèmes II sont oxydés et prêts à recevoir les électrons afin d'initier la phase claire de la photosynthèse. Au terme de cette période, les disques d'occultation sont ouverts. Dans un premier temps, l'appareil mesure la fluorescence minimale (F_0) en induisant une lumière trop faible pour permettre la photosynthèse, mais suffisante pour induire la fluorescence. Un flash lumineux saturant est ensuite appliqué. Un pic transitoire de la fluorescence est alors observé, traduisant le fait que tous les transporteurs d'électrons ont été réduits au sein des photosystèmes et les réactions photochimiques ne sont momentanément plus possibles. Le flash lumineux saturant permet à l'appareil de mesurer la fluorescence maximale (F_m). La différence entre la fluorescence minimale (F_0) et la fluorescence maximale (F_m)

correspond à la fluorescence variable (F_v) et le rapport de F_v sur F_m permet de quantifier l'état des photosystèmes, F_v/F_m étant un bon indicateur de l'efficacité quantique maximale des PSII. Après le flash lumineux, une lumière d'intensité constante (lumière actinique) est appliquée durant 1 à 2 minutes pour permettre à la feuille de se réhabituer à la lumière. Un nouveau pic de fluorescence apparaît, mais contrairement au premier, sa décroissance est lente et dure plusieurs minutes. Ce phénomène est appelé l'extinction (ou « quenching ») et résulte de plusieurs processus liés à la photosynthèse : les enzymes du cycle de Calvin doivent atteindre leur activité maximale, l'ouverture complète des stomates nécessite une durée d'adaptation, etc. A ce stade, il y a compétition entre les différentes formes de dissipation de l'énergie d'excitation (fluorescence, chaleur, phosphorescence, luminescence et photochimie). A cet instant, l'appareil mesure la fluorescence de base chez la plante adaptée à la lumière (F_S). Ensuite, un deuxième flash lumineux saturant est envoyé sur la feuille, provoquant une nouvelle fois la fermeture des centres réactionnels. Ce deuxième flash permet de mesurer la fluorescence maximale après adaptation à la lumière (F_m'). F_m' est plus faible que F_m car dans ce cas, il s'agit d'une extinction non-photochimique (NPQ), ce qui correspond ici à une dissipation sous forme calorifique. Le rapport de $(F_m' - F_S)/F_m'$ permet de mesurer l'efficacité de la photochimie du photosystème II (Φ_{PSII}) (Maxwell et Johnson, 2000).

Tous ces paramètres ont pu être obtenus à partir de l'utilisation du fluorimètre FMS 2 Hansatech qui a été utilisé sur une feuille choisie arbitrairement (bien que suffisamment développée que pour supporter la pince) de 4 plantes de chaque espèce par traitement, choisies aléatoirement parmi les 9 plantes disponibles par traitement. Une mesure par feuille a été effectuée. Néanmoins, étant donné la configuration de l'appareil (largeur des pinces de mesure), la fluorescence n'a pas pu être mesurée pour *Festuca rubra* dont les feuilles étaient trop étroites.

4.3. Longueur des systèmes racinaires et aériens

Au moment de la récolte, 5 plantes de chaque espèce et pour chaque traitement, choisies aléatoirement, ont été séparées au niveau du collet. La longueur du système aérien a été mesurée de l'apex de la feuille la plus longue au collet. Le système racinaire, quant à lui, a d'abord été rincé à l'eau déminéralisée, séché à l'aide de papier Tork puis mesuré du collet à l'extrémité de la racine la plus longue. Le but est de comparer l'effet des stress sur la longueur du système racinaire, entre les plantes soumises aux différents traitements.

4.4. *Production de biomasse et teneur en eau*

A l'issue de l'expérience en serre, les 4 plantes restantes pour chaque traitement ont également été récoltées et séparées au niveau du collet. Les racines ont préalablement été rincées à l'eau déminéralisée et séchées à l'aide de papier Tork. Les systèmes aériens et racinaires ont été pesés séparément dans des enveloppes individuelles, puis mis à l'étuve à 80°C pendant 6 jours. Les pesées avant et après passage à l'étuve représentent, respectivement, la masse fraîche (PFrais) et la masse sèche (PSec) qui permettront de déterminer la biomasse produite par la plante mais également de déterminer la teneur en eau (WC) des plantes via la formule :

$$WC = \frac{100 * (PFrais - PSec)}{PFrais}$$

5. Dosage du contenu en chlorophylle, du malondialdéhyde et des thiols totaux.

Les 5 plantes dont on a mesuré la longueur des systèmes aériens et racinaires ont ensuite été plongées dans l'azote liquide le temps du transport, puis conservées au congélateur à -80 °C, afin de figer leur état physiologique ; ceci dans le but de pouvoir réaliser différents dosages nécessitant des extraits d'échantillons frais. Etant donné la petite taille des espèces étudiées, les 5 plantes d'un même traitement ont été regroupées lors du broyage à l'azote liquide, afin d'obtenir suffisamment de matière pour les différents dosages et d'homogénéiser les échantillons. Les différents dosages ont donc été réalisés sur des réplicats techniques.

5.1. *Dosage des concentrations en chlorophylle*

La chlorophylle a été dosée uniquement dans les parties aériennes, soit dans 25 des 50 échantillons frais. Le protocole utilisé est celui décrit par Lichtenthaler (1987). Cent mg de matière fraîche broyée à l'azote liquide dans un mortier ont été recueillies dans un tube Falcon de 15 ml. Ce dernier était porté à 10ml avec de l'acétone 80% avant d'être vortexé puis conservé dans de la glace à l'obscurité. Les Falcons ont ensuite été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C (centrifugeuse Sigma 3-30KS). Immédiatement après centrifugation, l'absorbance du surnageant est mesurée à 3 longueurs d'ondes différentes : 663,2 ; 646,8 et 470nm (Spectrophotomètre Shimadzu UV-1800). Des tripliquas techniques ont été réalisés. Les concentrations en chlorophylles a, b et en caroténoïdes sont fournies en mg.L⁻¹ d'acétone d'après les formules :

$$Ca \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = (12,25 * D_{663,2}) - (2,79 * D_{646,8})$$

$$Cb \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = (21,50 * D_{646,8}) - (5,10 * D_{663,2})$$

$$C_{\text{carot}} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = ((1000 * D_{470}) - (1,82 * Ca) - (85,02 * Cb)) / 198$$

où D représentent les absorbances mesurées à 663,2 nm ; 646,8 nm et 470nm et Ca, Cb et Ccarot les concentrations respectives d'acétone en mg.L⁻¹ de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes.

L'équation suivante permet de calculer les concentrations en mg.g⁻¹ de matière fraîche (MF) :

$$Ca \text{ (mg.g}^{-1}\text{MF)} = [Ca \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} / Pds \text{ (g)}] * [10 \text{ (mL)} / 1000]$$

$$Cb \text{ (mg.g}^{-1}\text{MF)} = [Cb \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} / Pds \text{ (g)}] * [10 \text{ (mL)} / 1000]$$

$$C_{\text{carot}} \text{ (mg.g}^{-1}\text{MF)} = [C_{\text{carot}} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} / Pds \text{ (g)}] * [10 \text{ (mL)} / 1000]$$

où Pds(g) représente le poids exact en grammes de matière fraîche pesée.

5.2. Dosage du malondialdéhyde

Le dosage du malondialdéhyde (MDA) permet d'estimer la peroxydation des lipides dans les membranes des systèmes biologiques (Sinnhuber et al., 1958). Doser le MDA est donc pertinent dans le cadre de l'étude de stress environnementaux pouvant induire une variation du niveau d'oxydation des lipides. Le protocole suivi pour doser le MDA fut celui de Heath et Packer (1968). Suivant ce protocole, 250 mg de matière fraîche broyée furent disposés dans un falcon de 15 ml avec 5 ml d'acide trichloroacétique (5% poids/volume) contenant 1,25% de glycérol. Les échantillons furent ensuite vortexés puis gardés dans de la glace avant d'être centrifugés à 12000 g (RCF) à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu fut filtré sur papier Whatman n°1 et récolté dans un nouveau falcon. Deux ml de ce surnageant filtré furent ajoutés à 2 ml d'acide thiobarbiturique (TBA – 0,67%) puis homogénéisés au vortex. Après quoi les échantillons furent chauffés pendant 30 minutes au bain-marie à 100 °C, avant d'être refroidis sur glace puis centrifugés pendant 1 minute à 12000 g afin d'éliminer la turbidité. L'absorbance fut mesurée immédiatement après centrifugation aux longueurs d'onde 532 nm et 600 nm. Des duplicas techniques furent réalisés. Les blancs contenaient 2 ml de TCA et 2 ml de TBA.

La concentration de MDA dans les cuvettes fut calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 155mM⁻¹cm⁻¹ et l'équation :

$$Cc = Abs / \epsilon \text{ (mmoles/l)}$$

obtenue via la loi de Beer-Lambert : $Abs = \epsilon * L * cc$

où Abs est la différence entre l'absorbance à 532 nm et à 600 nm ; ϵ le coefficient d'extinction molaire ; L le trajet parcouru par le rayon (soit la largeur de la cuvette = 1 cm) ; Cc la concentration de MDA en mmol/l.

Sachant que la dilution est de 2, la concentration de MDA (en mol/g) dans les échantillons de départ fut calculée comme suit :

$$\text{Concentration} = Cc(\text{mmol/l}) * \text{dilution} * \text{volume de départ(l)} / \text{poids(g)}$$

où Cc est la concentration de MDA mesurée par l'absorbance ; le volume de départ est le volume d'extraction (soit 0,005 l) ; le poids est la masse fraîche exactement pesée.

5.3. Dosage des thiols totaux

Le glutathion est le principal composé thiol non-protéique (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine). Ce tripeptide joue un rôle important dans la protection cellulaire, notamment au niveau de la détoxification des substances xénobiotiques et dans l'anti-oxydation des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (Righa et Bousseboua, 2015). Le glutathion, au même titre que les phytochélatines (des agents de chélation qui tiennent un rôle déterminant dans la séquestration vacuolaire des métaux chez les végétaux), est repris dans les thiols totaux. Faute de matériel disponible en quantité suffisante, nous n'avons pas été en mesure de procéder à une estimation spécifique des teneurs en glutathion et c'est donc l'ensemble des thiols totaux (glutathion + phytochélatines) qui a été pris en compte ici.

Les thiols totaux ont été dosés par la méthode de De Vos et al. (1992) : entre 50 et 100 mg de matière fraîche broyée ont été ajoutés à 2 ml d'une solution composée de 5 g d'acide sulfosalicylique et 0,2478 g de DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) dans un tube Eppendorf de 2 ml placé sur glace. Les tubes Eppendorf ont été centrifugés pendant 30 minutes à 10000 g à 4 °C. Pour chaque échantillon 300 μ l de surnageant ont été mélangés à 630 μ l de K_2HPO_4 0.5 M. Une première absorbance (A1) à 412 nm a été mesurée au spectrophotomètre. Ensuite, 25 μ l d'une solution composée de 0,124 g de DTPA ainsi que de 1,245 g de K_2HPO_4 et de 0,198 de DTNB (réactif d'Ellman) ont été ajoutés aux échantillons. Une deuxième absorbance (A2) à 412 nm a été mesurée après avoir laissé les échantillons reposer 2 minutes à température ambiante. La différence entre les absorbances A2 et A1, via la courbe d'étalonnage établie au départ de cystéine, donne la concentration recherchée en thiols par gramme de matière fraîche.

6. Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs

Les plantes qui avaient été séchées à l'étuve afin de déterminer la biomasse sèche, ont été broyées grossièrement à l'aide d'un mixer, puis plus finement au pilon-mortier pour être utilisées dans le cadre des différents dosages nécessitant des extraits d'échantillons secs. Etant donné la petite taille des espèces étudiées, les 4 plantes d'un même traitement ont été regroupées, afin d'obtenir suffisamment de matière pour les différents dosages et d'homogénéiser les échantillons. Les différents dosages ont donc été réalisés sur des répliques techniques.

Le dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs s'est fait après minéralisation à l'eau régale. Entre 50 et 100 mg de matière sèche ont été pesés précisément et placés dans un ballon jaugé de 10 ml auquel ont été ajoutés 4 ml d'acide nitrique (HNO_3) concentré (68%). Les ballons ont été laissés toute une nuit sur le bain de sable non chauffé dans le but de dissoudre complètement la matière organique. Le lendemain le bain de sable était chauffé progressivement jusqu'à évaporation complète de l'acide nitrique. Les résidus ont été dissouts avec 2 ml d'eau régale (1,5 ml d' HCl concentré 37% et 0,5 ml d' HNO_3 concentré 68%) par échantillon. Après quoi, les ballons ont été replacés quelques minutes sur le bain de sable jusqu'à la dissolution complète du résidu. Chaque jaugé a ensuite été porté jusqu'au trait avec de l'eau déminéralisée, puis son contenu fut filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman n°1 et récupéré dans un Falcon de 15 ml. Le dosage a été réalisé à l'ICP (spectrométrie à plasma à couplage inductif (Varian, type MPX)) qui est une méthode physique d'analyse chimique permettant de mesurer la nature et la concentration des éléments étudiés. Les ETM étudiés sont le Zn, Pb, Cd et les éléments majeurs dosés dans le cadre de ce mémoire sont le calcium (Ca), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le potassium (K), le magnésium (Mg), le manganèse (Mn) et le phosphore (P).

7. Facteur de translocation, facteur de bioaccumulation et étude de l'additivité des toxicités

7.1. Facteur de translocation

Le facteur de translocation (*TF*) est estimé sur base des concentrations (*TFc*) ou des quantités (*TFq*) de l'élément dans la plante :

$$TFc = \frac{\text{concentration dans les parties aériennes}}{\text{concentration dans les parties racinaires}}$$

$$TFq = \frac{\text{quantité dans les parties aériennes}}{\text{quantité dans les parties racinaires}}$$

La distinction entre les deux se justifie par le fait que l'effet des métaux lourds sur la croissance des parties aériennes et des parties racinaires n'est pas nécessairement identique.

7.2. Facteur de bioaccumulation

Le facteur de bioaccumulation (BAC) permet d'exprimer la concentration moyenne de l'élément dans la plante divisée par la concentration de l'élément dans le sol ou la solution.

Comme nous avons utilisé des solutions nutritives, il faut exprimer la concentration moyenne de l'élément dans la plante par litre d'eau contenu dans la plante. Etant donné que les systèmes racinaires et aériens n'ont pas les mêmes teneurs en eau, il faut travailler séparément sur les deux types d'organes avant de tenir compte de leur proportions relatives pour obtenir une estimation moyenne.

- Teneurs dans les racines (mg/kg PS) → Teneurs en mg/L (*Tpr*) sur base des teneurs en eau dans le système racinaire.
- Teneurs dans les feuilles (mg/kg PS) → Teneurs en mg/L (*Tpa*) sur base des teneurs en eau dans les parties aériennes.

$$\text{Soit } PF_T = PF_R + PF_{PA}$$

où PF_T est le poids frais de la plante entière ; PF_R le poids frais des racines et PF_{PA} est le poids frais des parties aériennes.

Alors les teneurs moyennes dans la plante (T) sont :

$$T = [Tpr \times PF_R / PF_T] + [Tpa \times PF_{PA} / PF_T]$$

et le facteur de bioaccumulation : $BAC = \frac{T}{\text{teneurs en solution}}$

7.3. Etude de l'additivité des toxicités

Un des objectifs de ce travail est de déterminer si le Cd, le Zn et le Pb ont des effets additifs (cumulatifs) ou non sur la plante. Si effets additifs il y a, alors ;

$$\begin{array}{l} \text{effet du Cd seul} + \text{effet du Zn seul} + \text{effet du Pb seul} = \text{effet du traitement mixte (Pb+Zn+Cd)} \\ \text{(effets attendus)} \qquad \qquad \qquad = \qquad \qquad \text{(effet observé)} \end{array}$$

Par contre, si l'égalité entre les valeurs attendues et les valeurs observées n'est pas respectée, c'est qu'il y a une interaction entre les polluants. Cette hypothèse peut être testée pour chacun des paramètres pris en considération.

VI. Expérience de terrain

La spécificité des essais de terrain par rapport aux cultures hydroponiques, est qu'ils intègrent l'application d'un biostimulant (vermicompost liquide) et que les synergies entre espèces ont pu être étudiées puisqu'elles étaient semées en tant que mélange de graines.

Pour cette expérience 3 terrains expérimentaux ont été étudiés :

- un terrain servant de contrôle sur un champ de la Ferme de Marbaix, la ferme expérimentale de l'UCLouvain, située à Corroy-le-Grand.
- un terrain présentant une pollution métallique spécifique liée à une activité industrielle en lien avec les métaux (destinés à des applications pharmaceutiques, électroniques et industrielles avancées), situé sur le site de 5NPlus à Villers-la-Ville.
- un terrain présentant une pollution métallique typique liée à son passé industriel sidérurgique et situé sur un site appartenant à Duferco à Sclessin

1. Préparation des parcelles et semis

1.1. La Ferme de Marbaix

Située à Corroy-le-Grand, la Ferme de Marbaix est un centre d'expérimentation de l'UCLouvain qui accueille des chercheurs sur 40 hectares de terres. Un terrain y a été alloué pour cette expérience en 2020, comme terrain contrôle (50°40'04.0''N, 4°38'25.9''E).

Un premier passage au tracteur afin d'ameublir le sol eu lieu en juillet 2020, après quoi 2 bandes de bâches de 17 m sur 1,8 m, espacées entre elles de 80 cm, furent installées à même le sol (Figure 10a) afin d'étouffer la végétation issue de la banque de graines susceptible de pousser.

Deux mois après le bâchage, les bâches furent retirées et un premier désherbage au désherbeur thermique eut lieu, ainsi qu'un second passage au tracteur. Les parcelles furent ensuite laissées nues afin de permettre la germination éventuelle de la banque de graines encore présentes dans le sol. Fin septembre 2020, les 12 parcelles carrées d'1m80 de côté furent délimitées à l'aide de piquets et de rubalises et identifiées à l'aide de rubans de couleurs jaunes ou bleus (Figure 10c). Après quoi les parcelles concernées (rubans jaunes) furent semées à l'aide du mélange de graines étudiées : *Silene vulgaris*, *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus*, *Rumex acetosa*, *Festuca rubra* (cf. Tableau 5 dans « expérience en serre » pour le calcul des semis). Enfin un filet anti-oiseaux fut installé (Figure 10b) afin d'assurer la protection des semis. Celui-ci fut retiré fin avril 2021, quand les plantules avaient atteint le filet, soit 40 cm de haut.



Figure 10 : a) Premier bâchage (Blanquet, 2020) ; b) Semi et installation des filets (Blanquet, 2020) ; c) Exemple d'identification des parcelles à l'aide de rubans jaunes et bleus (Raskin, 2021)

Les différents traitements furent randomisés au sein des parcelles afin que deux traitements identiques ne soient jamais placés côte à côte et que les quatre traitements soient chacun à une extrémité (Tableau 7).

1.2. Le site de 5NPlus

L'entreprise 5NPlus, spécialisée dans la production de métaux (métaux purs, semi-conducteurs, sels, alliages, poudres métalliques, additifs alimentaires pour animaux, ingrédients pharmaceutiques actifs, ...) et dont le siège social se situe à Montréal au Québec, nous a alloué un terrain sur son site de Villers-la-Ville en 2020 (50°33'20.5''N, 4°33'11.6''E). En tant que terrain présentant des traces de métaux rares, notamment de bismuth, cette parcelle était intéressante à étudier dans le cadre de cette expérience. En effet, ce type d'élément n'est pas typique d'une pollution industrielle.

En juillet 2020, 2 bandes de bâches de 17 m sur 1,8 m, espacées entre elles de 80cm, furent installées à même le sol afin d'étouffer la végétation présente. Un passage au motoculteur afin

d'ameublir le sol et d'extraire les cailloux eut lieu le 3 septembre 2020, après quoi les bâches furent réinstallées (Figure 11a). Un passage au désherbeur thermique eut lieu fin septembre et les bâches furent enlevées. Le 30 septembre 2020, 12 parcelles carrées d'1m80 de côté furent délimitées à l'aide de piquets et de rubalises et identifiées à l'aide de rubans de couleurs jaunes ou bleus comme illustré précédemment (Figure 10c). Les parcelles furent disposées dans le même ordre que celles situées sur le site contrôle (Tableau 7). Après quoi les parcelles concernées furent semées à l'aide du mélange de graines étudiées et des filets anti-oiseaux furent installés (Figure 11b). Ceux-ci furent ensuite retirés fin avril 2021, quand les plantules avaient atteint le filet et les passages entre les parcelles furent tondus, afin de conserver une bonne limitation et de faciliter l'observation.



Figure 11 : a) Passage au motoculteur et bâchage (Blanquet, 2020) ; b) Semis et de installation des filets (Blanquet, 2020)

1.3. Le site de Dufenco

Dufenco Participations Holding SA, est une société basée au Luxembourg. Ses activités principales sont le commerce, la production, l'importation et l'exportation d'acier. Dans le cadre de cette expérience, l'entreprise nous a alloué un terrain lui appartenant à Sclessin (50°37'1.78''N, 5°32'19.89''E). Sur ce site se trouvait auparavant l'usine Chimeuse (ancienne usine d'engrais et de produits chimiques active entre 1928 et 1961), aujourd'hui fermée. Le site a été rasé et remblayé. Cette parcelle présente une pollution typique liée au passé industriel sidérurgique du site.

Début août 2020, un premier passage au gyrobroyeur eut lieu afin de déblayer l'espace et d'installer 6 bandes de bâches d'1m80 de large et 5 m de long (Figure 12a). Début septembre, le sol fut ameubli et les pierres enlevées à l'aide d'une tractopelle, avant que les bâches ne soient remises. Vingt jours plus tard, celles-ci furent retirées afin de pouvoir passer le désherbeur thermique sur les parcelles. Fin septembre les 12 parcelles carrées d'1m80 de côté furent

délimitées à l'aide de piquets et de rubalises, puis on ratissa les jeunes pousses adventices et les pierres avant de lisser le sol puis d'identifier les différentes parcelles à l'aide de rubans colorés (Figure 12b). Les parcelles concernées furent semées à la volée, puis le sol fut tassé à l'aide d'une planche afin de s'assurer le bon contact entre les graines et le sol. Enfin, des filets anti-oiseaux furent installés comme on peut le voir sur la Figure 12c. Ceux-ci furent finalement retirés fin avril 2021, quand les plantules avaient atteint le filet, soit 40cm de haut.



Figure 12 : a) Bâchage après déblayage (Blanquet 2020); b) Délimitation des parcelles et ratissage (Blanquet, 2020); c) Installation du ruban et des filets anti-oiseaux (Blanquet, 2020).

Les parcelles auraient dû être disposées de la même manière que sur les deux autres sites. Néanmoins, l'espace dégagé ne le permettant pas, elles ont dû être disposées différemment. Les différents traitements furent dès lors randomisés au sein des parcelles afin que deux traitements identiques ne soient jamais placés côte à côte et que les quatre traitements différents se situent chaque fois aux quatre coins du site (Tableau 7).

Tableau 7 : Répartition des parcelles sur les terrains
Légende : O = ni semé, ni arrosé au vermicompost ; J = semé ; B = arrosé au vermicompost

Corroy-le-Grand	Villers-la-Ville	Sclessin																																							
<table border="1"> <tr> <td>O</td><td>JB</td><td>J</td><td>B</td><td>O</td><td>J</td> </tr> <tr> <td>JB</td><td>B</td><td>O</td><td>JB</td><td>J</td><td>B</td> </tr> </table>	O	JB	J	B	O	J	JB	B	O	JB	J	B	<table border="1"> <tr> <td>O</td><td>JB</td><td>J</td><td>B</td><td>O</td><td>J</td> </tr> <tr> <td>JB</td><td>B</td><td>O</td><td>JB</td><td>J</td><td>B</td> </tr> </table>	O	JB	J	B	O	J	JB	B	O	JB	J	B	<table border="1"> <tr> <td>O</td><td>B</td><td>JB</td><td>O</td><td>J</td> </tr> <tr> <td>JB</td><td>J</td><td>O</td><td>JB</td><td>B</td> </tr> <tr> <td></td><td>B</td><td>J</td><td></td><td></td> </tr> </table>	O	B	JB	O	J	JB	J	O	JB	B		B	J		
O	JB	J	B	O	J																																				
JB	B	O	JB	J	B																																				
O	JB	J	B	O	J																																				
JB	B	O	JB	J	B																																				
O	B	JB	O	J																																					
JB	J	O	JB	B																																					
	B	J																																							

2. Application de vermicompost

La quantité de Vermicompost PurLife recommandée par l'entreprise fournisseuse PurVer était de 100 litres par hectare de terrain, soit 40 ml pour des parcelles de 4 m². Pour obtenir une dilution à 1% (dilution conseillée en culture en pleine terre selon PurVer), on porte les 40 ml de vermicompost à 4 litres dans un arrosoir. Chaque parcelle portant un ruban bleu était arrosée avec le vermicompost dilué à l'aide d'un arrosoir. Chaque parcelle ne portant pas de ruban bleu était arrosée à l'eau de ville afin de ne pas fausser le bilan hydrique total. Deux tourilles de 24 litres étaient systématiquement préparées, afin de remplir les arrosoirs une fois sur site. L'arrosage des parcelles avait lieu de façon systématique toutes les deux semaines.

3. Prélèvements d'échantillons du sol

En 2020, cinq échantillons par site furent prélevés, entre les parcelles comme indiqués par les chiffres rouges sur la Figure 13. Cet échantillonnage de sol avait pour but de doser les éléments majeurs et les éléments traces métalliques présents dans le sol avant traitement (temps t₀). A chaque point, trois carottes de sol furent prélevées à l'aide d'une tarière, puis déposées dans un seau pour y être homogénéisées. Une fraction de cette terre fut prélevée et stockée dans des sachets de congélation, puis complètement séchée dans une pièce prévue à cet effet, en veillant à bien désagréger les mottes préalablement. Le sol sec fut ensuite concassé et tamisé à 2 mm et les échantillons tamisés furent conservés dans des pots hermétiques pendant 1 an à température ambiante.

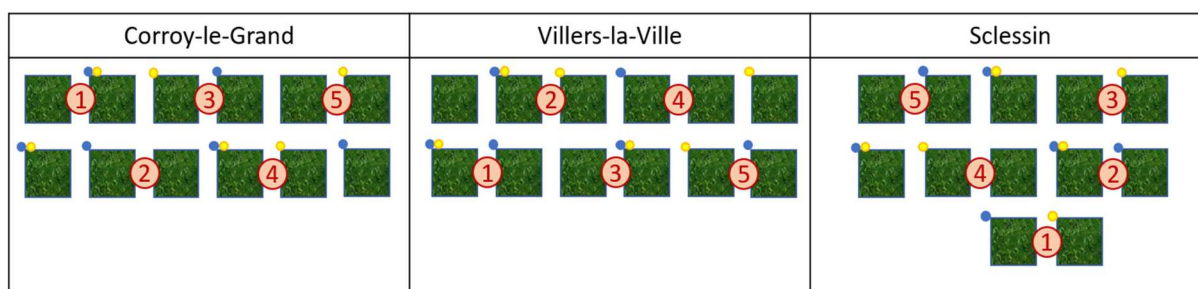


Figure 13 : Schéma de répartition des parcelles et des prélèvements d'échantillons de sol en 2020

En 2021, deux échantillons furent prélevés dans chacune des parcelles. Ce deuxième échantillonnage de sol, qui eut lieu après récolte, avait pour but de doser les éléments majeurs et les éléments traces métalliques présents dans le sol après traitement. Pour chaque terrain, deux carottes de sol furent prélevées à deux endroits au sein de chaque parcelle, à l'aide d'une tarière, puis déposées dans un seau pour y être homogénéisées avec les carottes de sols des deux autres parcelles au traitement identique. Une fraction de cette terre homogénéisée fut prélevée et stockée dans des sachets de congélation, puis complètement séchée dans une pièce prévue à

cet effet, en veillant à bien désagréger les mottes préalablement. Le sol sec fut ensuite concassé et tamisé à 2 mm, puis les échantillons tamisés furent conservés dans des pots hermétiques à température ambiante.

4. Mesures au XRF du sol

Une première mesure des teneurs en ETM fut réalisée à l'aide d'un Analyseur XRF Thermo Scientific™ Niton™ XL3t GOLDD portable (Kalnicky et Singhvi, 2001). Cet appareil de mesure permet d'identifier les métaux et les alliages de façon rapide, précise et non destructive, à partir d'échantillons, même pour les éléments légers difficiles à analyser grâce à la spectroscopie par fluorescence à rayons X (Thermo Scientific™). Le XRF Niton XL3t GOLDD (Geometrically Optimized Large Area Drift Detector) offre deux types de calibration ; « SOL » et « MINING ». Les sols des 5 échantillons prélevés en 2020 ont été mesurés 4 fois (deux fois en mode « SOL » et deux fois en mode « MINING ») en laboratoire après concassage et tamisage. Chaque échantillon a été analysé en tripliquas.

5. Dosage du rapport carbone sur azote du sol

20 à 30 mg des 15 échantillons de sol finement broyés de 2020, furent pesés dans une cupule en étain pour le dosage C/N. La cupule était ensuite repliée sur elle-même de façon à chasser l'air et d'en faire une toute petite boulette compacte, afin d'être placée dans l'analyseur élémentaire organique (vario El Cube, Elementar) par combustion sèche, selon la méthode de Dumas (1831). Cette méthode consiste en une combustion totale à 950°C de la matrice organique sous oxygène. L'azote est quantitativement converti en N₂ tandis que les autres produits volatils issus de la combustion sont piégés. Les gaz produits sont réduits par du cuivre et mesurés à l'aide d'un détecteur à conductivité thermique (TCD).

6. Mesure du pH du sol

Le pH d'un sol est fonction de nombreux paramètres, comme la nature des composants minéraux, mais aussi la quantité et qualité de la fraction humique, les amendements ou la porosité du sol, entre autres. Connaître le pH des sols étudiés est intéressant car il conditionne la biodisponibilité des minéraux (Degryse et al., 2003). Pour ce faire, 5 g de sol finement broyé furent insérés dans des béchers de 50 ml, auxquels furent ajoutés 25 ml d'eau distillée. Les suspensions furent agitées pendant 1 heure et immédiatement après le pH fut mesuré au moyen d'une électrode à pH. Ceci fut fait pour les 4 traitements des 3 sites de 2021.

7. Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs du sol

Afin de doser les éléments traces présents dans les sols étudiés, la minéralisation HNO₃:HCl sous reflux fut choisie puisqu'il s'agit de la méthode préconisée par le décret wallon du 6/12/2019 pour la mesure des ETM (ISO 11466 :1995 – Qualité du sol ; Querio, 2017). Ceci fut fait sur les échantillons de sols finement broyés de 2020 et 2021 ainsi que sur un standard de sol (Certified Reference Material BAM-U115)⁹ comme témoin.

1,5g de sol sec finement broyé, pesés précisément, et 16 ml d'eau régale (12 ml HCl + 4 ml HNO₃) furent insérés dans des tubes de minéralisation en verre de 250 ml. Les tubes reposaient toute une nuit (16 heures) à température ambiante afin qu'une première digestion de la matière organique puisse avoir lieu. Passé ce délai, les échantillons étaient chauffés à reflux pendant 2 heures à environ 150 °C. La température variait d'une série d'échantillons à l'autre car il était important de conserver une légère ébullition, tout en évitant que les vapeurs ne montent pas trop dans les réfrigérants (les vapeurs devaient rester dans le tiers inférieur) afin d'éviter que les produits de réactions volatils ne s'échappent. Après quoi, les échantillons refroidissaient et une fois la température ambiante atteinte, ils étaient filtrés à l'aide de papiers Filtres Whatman Grade 1 au-dessus d'un ballon jaugé de 50 ml. Les tubes de minéralisation étaient rincés et filtrés plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée. Le contenu des ballons jaugés était ensuite dilué 2 fois avant passage à l'ICP iCAP PRO 6000 Series Thermo Scientific™ (spectrométrie à plasma à couplage inductif) afin que les acides n'abiment pas l'appareil de mesure.

8. Mesure de la biodisponibilité des éléments dans le sol

La mesure de biodisponibilité des éléments, soit la fraction immédiatement disponible pour les plantes dans le cadre de ce mémoire, fut effectuée grâce à l'extraction sélective au CaCl₂ (Degryse et al., 2003). Un gramme de sol finement broyé fut pesé avec précision dans des falcons 15 ml, auxquels on ajouta 10 ml de CaCl₂ 0.01M. Les solutions obtenues furent mélangées pendant 24 heures (temps d'équilibration) puis centrifugées pendant 10 à 20 minutes à 3000 g avant d'être filtrés. Le filtrat obtenu put être acidifié à l'aide de 20 µl HNO₃ afin d'avoir une meilleure stabilité. Le filtrat fut ensuite analysé à l'ICP iCAP PRO 6000 Series Thermo Scientific™.

⁹ BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und prüfung, Germany, Berlin, Certified Reference Material, BAM-U115, Aqua Regia Extractable Trace Elements in Soil, Certified values, Certificat papier, date de délivrance 28/10/2020, validité de 36 mois à partir de la date de délivrance.

9. Production de biomasse et contenu en eau des plantes de terrain

Une première estimation de la biomasse des parcelles fut réalisée en pesant la biomasse fauchée lors de la récolte en fin d'expérience (fin Septembre 2021, soit exactement 1 an après le semi). Les espèces présentes sur une parcelle étaient identifiées à l'aide d'une flore biologique avant d'être coupées au taille-haie puis ratissées et déposées dans une manne, afin de connaître la biomasse totale récoltée pour chaque parcelle. Un échantillon de cette biomasse totale était ensuite prélevé à l'aide d'une sonde à fourrage et déposé dans un sac en plastique micro-perforé. Le poids frais de ces échantillons était déterminé par pesée avant que ceux-ci ne soient mis à l'étuve à 70°C pendant plusieurs jours. Les pesées avant et après passage à l'étuve représentent, respectivement, la masse fraîche (PFrais) et la masse sèche (PSec) qui permettront de déterminer la biomasse produite par le mélange de plantes, mais également de déterminer le contenu en eau (WC) des plantes grâce à la formule reprise au point II.4.4.

10. Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs des plantes de terrain

Les échantillons de plantes, ayant été séchées à l'étuve afin de déterminer la biomasse sèche, ont ensuite été broyés grossièrement à l'aide d'un mixer, puis plus finement au pilon-mortier. Les différentes espèces présentes, dans l'échantillon de plantes provenant d'une même parcelle, furent ainsi homogénéisées, afin d'obtenir l'information pour l'ensemble de la biomasse d'une parcelle. Les dosages ont été réalisés sur des réplicats techniques.

La méthode de dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs contenus dans les plantes de terrain, est en tout point pareille à celle utilisée pour les plantes en serre. Celle-ci est détaillée au point II.6.

11. Traitements statistiques employés

Le but de cette expérience est de comprendre comment les différentes espèces (*Deschampsia cespitosa*, *Festuca rubra*, *Holcus lanatus*, *Rumex acetosa*, *Silene vulgaris*) réagissent à différentes toxicités de cadmium, de zinc, de plomb et à leur mélange (intraspécifique), mais également de comparer leur réponses entre elles afin d'analyser leur association (interspécifique). C'est pourquoi le test statistique utilisé est une ANOVA (analyse de la variance) à 2 facteurs (variables catégorielles) ; l'espèce et le traitement appliqué. En ce qui concerne les mesures de hauteurs et de biomasses, étant donné que ces propriétés sont dépendantes de l'espèce, il n'est pas pertinent d'étudier ces mesures de façon interspécifique et celles-ci ont donc été analysées à l'aide d'une ANOVA 1 où l'unique facteur était le traitement.

En ce qui concerne les expériences de terrain, les prélèvements de sol de 2020 ayant été pris aléatoirement au sein des sites, l'unique facteur était le site, c'est pourquoi ces échantillons ont été comparés à l'aide d'une ANOVA 1. Les prélèvements de sol de 2021, quant à eux, ont été pris au sein des différentes parcelles, qui présentaient différents traitements, sur les 3 sites. C'est pourquoi ils ont été analysés à l'aide d'une ANOVA 2 puisqu'il y avait 2 facteurs (le site et le traitement). Le but de cette analyse est de vérifier si on observe une différence entre les traitements, si cette différence dépend des sites expérimentaux et quelle variabilité est observée entre les 3 sites.

L'homogénéité des variances à chaque fois été vérifiée à l'aide d'un test de Levene. La statistique F et la p valeur de chaque analyse sont disponibles dans les tableaux 17, 18, 19, 20 et 21 en annexe. La normalité a systématiquement été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Pour toutes les figures, les données ont été représentées sous forme de valeurs moyennes \pm erreur standard. Le logiciel utilisé était R Studio.

Résultats

Comme nous souhaitons comparer des données d'une espèce à l'autre, nous avons choisi la représentation en histogrammes. Le code couleur précisant le traitement étudié est constant pour tous les graphiques de la partie résultats.

VII. Expérience en serre

12. Résultats des mesures morpho-physiologiques

12.1. Longueur des systèmes racinaires et aériens

La longueur du système racinaire et la hauteur du système aérien sont trop différentes d'une espèce à l'autre que pour pouvoir être comparées de façon interspécifique. C'est pourquoi ces mesures ont été analysées à l'aide d'un test statistique d'analyse de la variance à 1 seul facteur (ANOVA1 ; facteur = le traitement) pour chaque espèce prise séparément afin de ne pas perdre d'information due à la différence naturelle intrinsèque aux plantes.

Comme le montre la figure 14, statistiquement, il n'y a pas de différence notable entre la hauteur

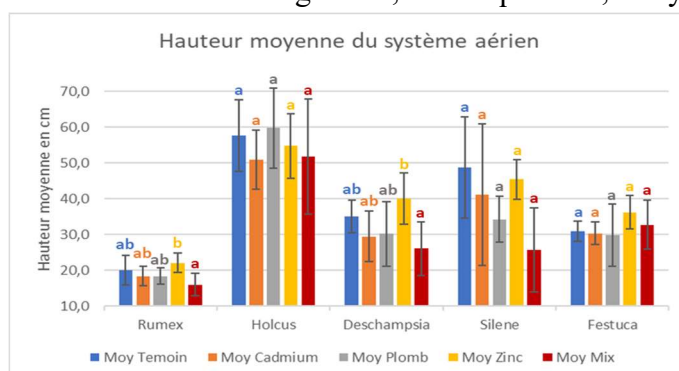


Figure 14 : Histogramme de la hauteur moyenne des plantes en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où $p < 0.05$

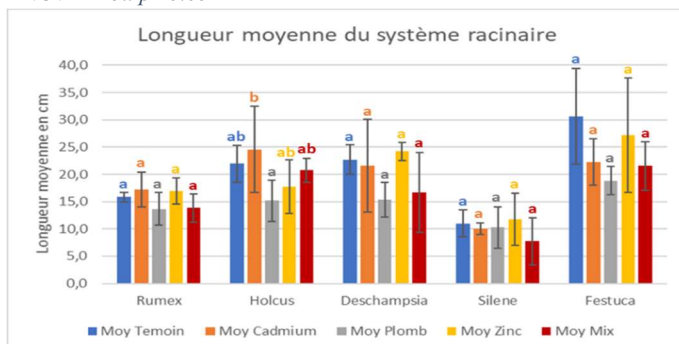


Figure 15 : Histogramme de la longueur moyenne du système racinaire en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où $p < 0.05$

du système aérien des témoins et la hauteur du système aérien des plantes ayant poussé dans une solution polluée à $10\mu\text{M}$ de Cd, à $100\mu\text{M}$ de Zn et/ou à $250\mu\text{M}$ de Pb. Toutefois chez le rumex et la canche, le Zn semble avoir stimulé l'élongation, tandis que le traitement mixte l'a réduite. Chez ces deux espèces les plantes soumises au traitement mixte ont une longueur plus faible que celles exposées au zinc.

A la figure 15, on voit qu'il n'y a pas non plus de différence significative entre la longueur du système racinaire des témoins et celle des plantes ayant poussé dans les solutions polluées. Pour la houlque, le Cd semble même avoir un effet bénéfique sur la croissance, contrairement au Pb.

12.2. Production de biomasse

La biomasse (et donc par conséquent les poids) des système racinaires et aériens est également trop différente d'une espèce à l'autre que pour pouvoir être comparée de façon interspécifique. C'est pourquoi ces mesures ont été analysées à l'aide d'un test statistique d'ANOVA1 (facteur = le traitement) pour chaque espèce prise séparément afin de ne pas perdre d'information due à la différence naturelle intrinsèque aux plantes.

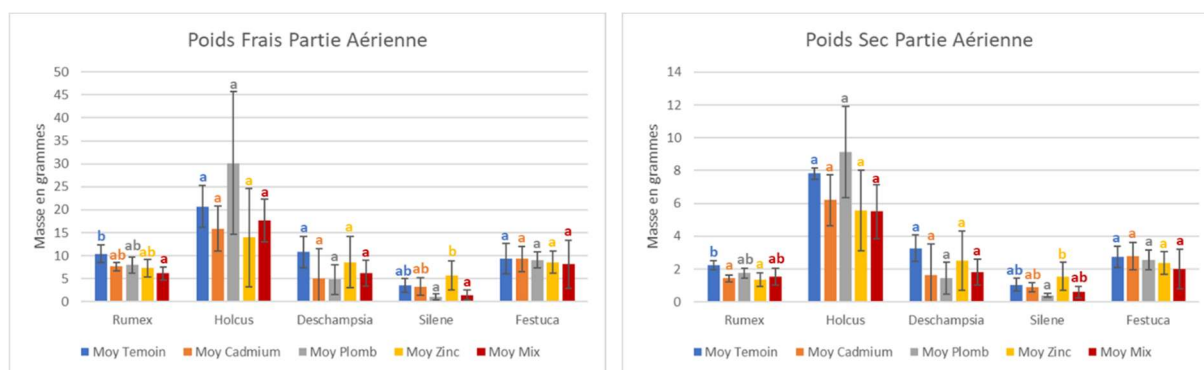


Figure 16 : Histogrammes du poids frais moyen (a) puis du poids sec moyen (b) des parties aériennes en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où $p < 0.05$

Comme on peut le voir sur la figure 16a le poids frais des rumex a baissé de façon significative entre les plantes témoins et les plantes ayant poussé dans le milieu aqueux présentant les 3 contaminants. Sur ce même graphique, nous notons une différence nette entre le poids frais du silène lorsqu'il croît en présence de Zn ou qu'il croît en présence de Pb ou du traitement mixte. En ce qui concerne le poids sec des parties aériennes (figure 16b), pour le rumex, ce sont les plantes soumises au Cd ou au Zn qui ont un poids moyen significativement plus faible que le poids moyen des témoins. Concernant le silène, seuls les plantes ayant évolué en présence de $250\mu\text{M}$ Pb sont significativement différents des plants ayant poussé en présence de $100\mu\text{M}$ Zn.

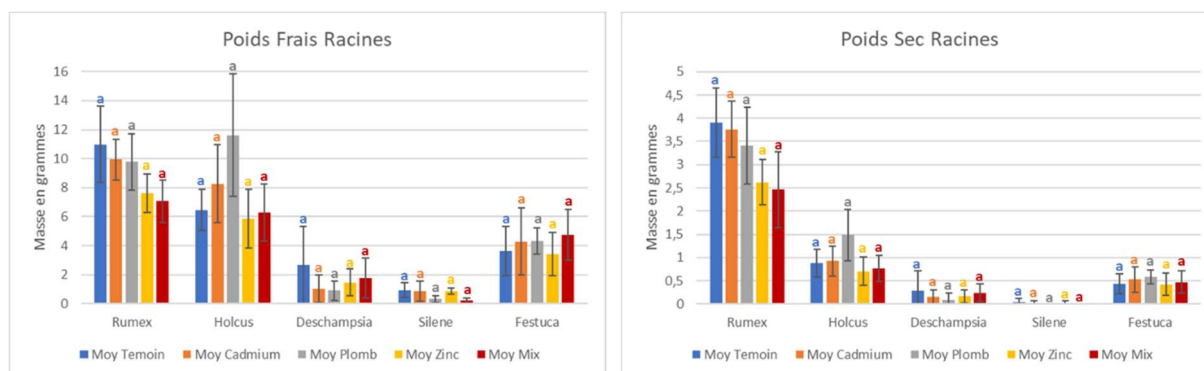


Figure 17 : Histogrammes du poids frais moyen (a) puis du poids sec moyen (b) des parties racinaires en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où $p < 0.05$

La figure 17 montre qu'il n'y a pas de différence significative du poids des systèmes racinaires entre les différents traitements, que ce soit pour le poids frais ou sec.

D'un point de vue qualitatif, en fin d'expérience, plusieurs plantes de houlque présentaient des symptômes prononcés de nécrose (figure 18) et 5 houlques étaient mortes (nécrose totale de toutes les feuilles) (3 plants du traitement zinc, 1 du mix et 1 plante témoin). Les plantes de *Silene vulgaris* (figure 21) étaient très sèches et cassantes (les symptômes étant moins prononcés pour la pollution au Zn) : 2 plantes étaient mortes pour le traitement au Pb et 2 autres pour le traitement Cd. Un des plant de silène exposé au Cd était acaule (figure 21f). Les canches (figure 19) et les fétuques (figure 20) par contre ne présentaient pas de symptômes marqués, quel que soit le traitement. Les rumex (figure 22) souffraient de nécroses, principalement chez les plants exposés au Cd, au Pb ou au traitement mixte. Le taux de mortalité a été calculé dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Taux de mortalité suite à l'expérience en serre

Traitement	Rumex	Houlque	Silène	Canche	Fétuque
Témoins	0	1/9 soit 11%	0	0	0
Plomb	0	0	2/9 soit 22%	0	0
Cadmium	0	0	2/9 soit 22%	0	0
Zinc	0	3/9 soit 33%	0	0	0
Mix	0	1/9 soit 11%	0	0	0

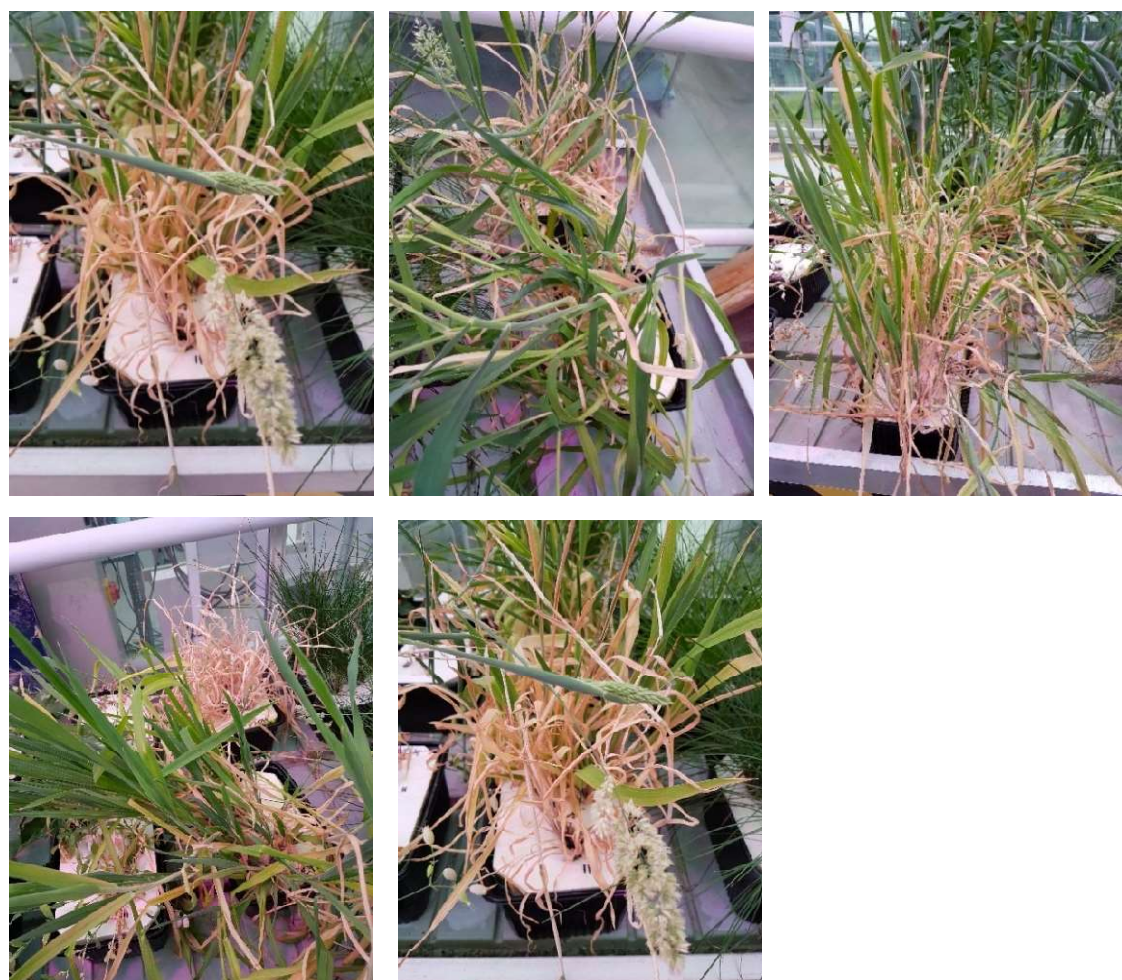


Figure 18 : Comparaison des *Holcus lanatus* pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)

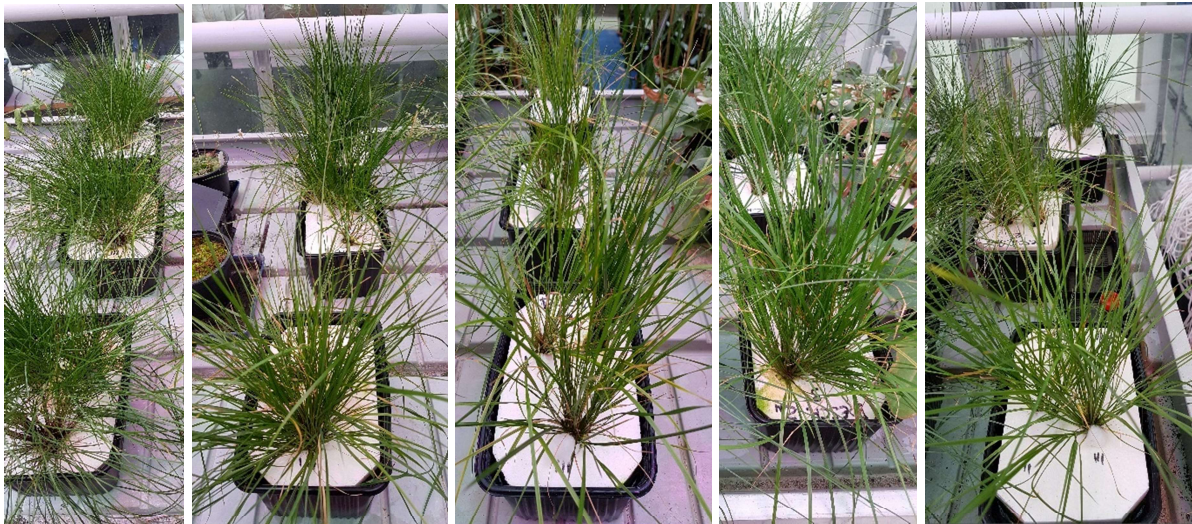


Figure 19 : Comparaison des *Deschampsia cespitosa* pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)



Figure 20 : Comparaison des *Festuca rubra* pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)





Figure 21 : Comparaison des *Silene vulgaris* pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn, f) plante acaule (Raskin, 30 juin 2021)



Figure 22 : Comparaison des *Rumex acetosa* pour les différents traitements a) Témoin, b) Cadmium, c) Plomb, d) Zinc, e) Mélange Cd+Pb+Zn (Raskin, 30 juin 2021)

Visuellement, nous constatons qu'il y a donc bien des différences morphologiques qui s'expriment, avec une variabilité plus ou moins forte au sein d'une même espèce. Au sein des espèces, nous constatons une très grande variabilité de comportements entre les plantes soumises à un même traitement. L'erreur standard mesurée est donc très importante. Cette variabilité peut expliquer pourquoi les différences qualitatives que présentent les photos ci-dessus ne se traduisent pas par des différences statistiques.

Pour estimer cette variabilité, nous avons calculé la moyenne des coefficients de variation pour chaque espèce sur l'ensemble des analyses morpho-physiologiques effectuées en réponse à chaque traitement. Les moyennes de ces coefficients pour chaque espèce en fonction du traitement sont reprises dans le tableau 9. Nous constatons que ces coefficients varient en fonction de l'espèce considérée et en fonction des polluants appliqués. Nous avons choisi, pour les mesures physiologiques présentées ci-après, de procéder à des analyses de la variance à 2 facteurs (ANOVA2) afin de pouvoir réaliser une comparaison entre espèces, tout en tenant compte, qu'étant donné des coefficients de facteurs élevés, les résultats statistiques masquent des tendances pourtant visibles sur les histogrammes.

Tableau 9 : Coefficients de variation moyens exprimé en pourcentages

	Témoïn	Cadmium	Zinc	Plomb	Mix
Rumex	13,4%	14,7%	11,2%	14,6%	11,1%
Houlque	24,8%	22,0%	17,8%	20,2%	31,0%
Canche	22,6%	16,3%	25,6%	11,4%	16,4%
Silène	27,9%	25,5%	47,6%	12,8%	22,1%
Fétuque	23,6%	18,1%	17,5%	34,8%	21,7%

12.3. Photosynthèse nette, transpiration instantanée, conductance stomatique et concentration en CO₂ intercellulaire

Les mesures de photosynthèse nette (*A*), transpiration instantanée (*E*), conductance stomatique (*g_s*) et de concentration en CO₂ intercellulaire (*C_i*) ont été estimées à l'aide d'un IRGA (cf Matériel et Méthode). La superficie estimée qu'occupaient les feuilles dans la chambre d'assimilation ont été prise en compte dans le calcul des résultats finaux.

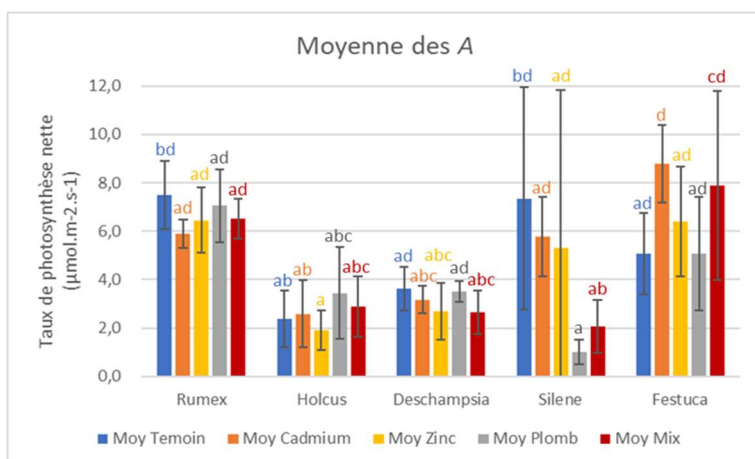


Figure 23 : Histogramme de la photosynthèse nette moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

fétuque semble présenter des taux de photosynthèse nette supérieurs en présence de Cd ou du traitement mixte. Si nous comparons les espèces entre elles, nous remarquons que la houlque et la canche ont un taux de photosynthèse nette significativement inférieure à celui de la fétuque en cas de pollution au cadmium. La houlque, la canche et le silène présentent des taux de photosynthèse inférieurs à ceux du rumex et de la fétuque en présence de la pollution mixte Cd+Zn+Pb.

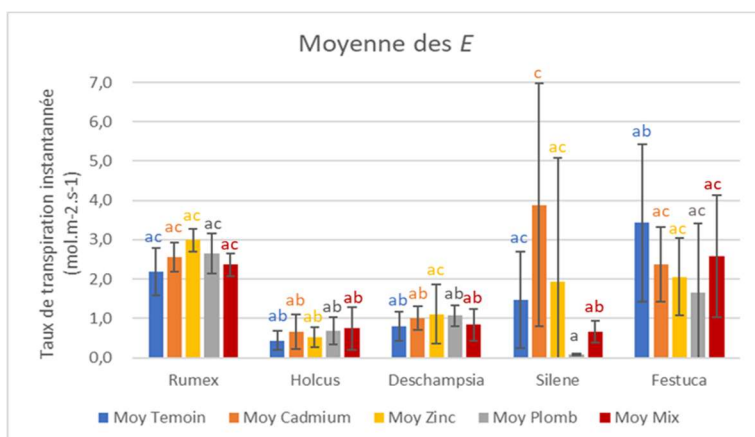


Figure 24 : Histogramme de la transpiration instantanée moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

Comme nous pouvons le constater à la figure 23 des pollutions aux ETM de 10µM de Cd, 100µM de Zn et/ou 250 µM de Pb, n'ont pas eu d'effets significatifs sur le taux de photosynthèse nette du rumex, de la houlque, ni de la canche. Le silène, présente quant à lui, une photosynthèse nette très faible en présence de Pb ou du traitement mixte par rapport au témoin. La

La figure 24 montre que les traitements n'ont pas d'impact sur les taux de transpiration instantanée pour 4 des 5 espèces étudiées. Seul le silène présente un taux de transpiration quasiment nul en présence de plomb et un taux de transpiration accru en présence de Zn et de Cd (avec toutefois une hétérogénéité très importante entre les plantes).

En présence de Cd, le silène présente un taux de transpiration significativement supérieur à celui de la houlque et de la canche.

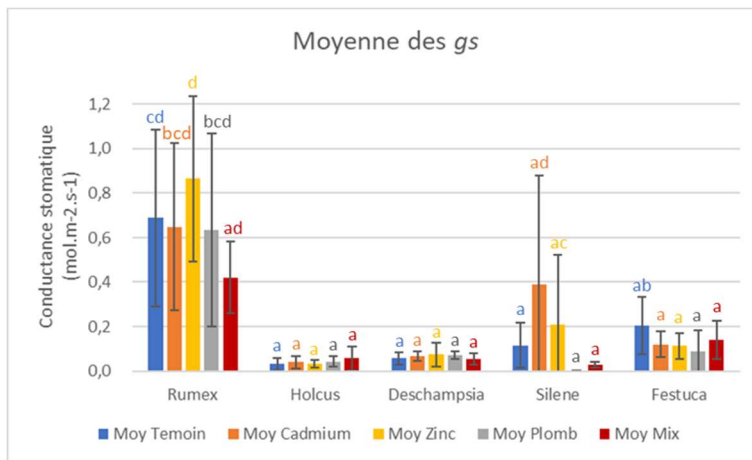


Figure 25 : Histogramme de la conductance stomatique moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

faible en présence de Pb ou du traitement mixte, comparée à sa conductance en présence de Cd.

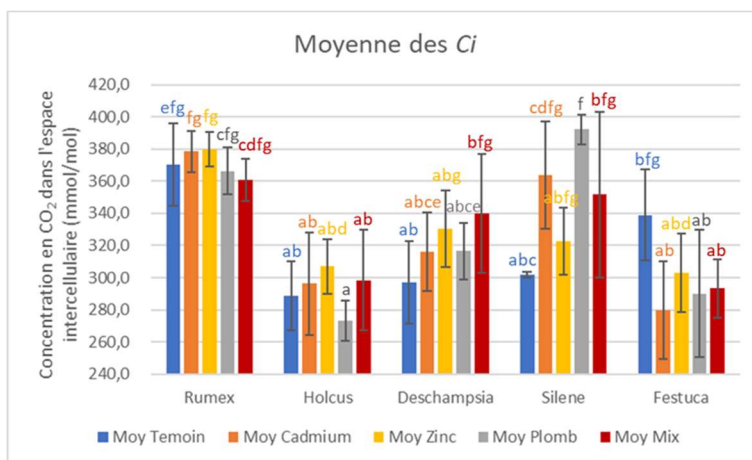


Figure 26 : Histogramme de la concentration intracellulaire en CO_2 moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 5 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

augmenté pour le silène en présence de Pb, de Cd et du traitement mixte, cette concentration en CO_2 a, au contraire, fortement diminué en présence de ces contaminants pour la fétuque.

La figure 25 montre que les différentes pollutions n'ont pas eu d'impact significatif majeur sur la conductance stomatique pour 4 des espèces étudiées. Compte tenu du coefficient de variation très élevé du silène, les effets des traitements ne se traduisent pas par des différences significatives mais nous noterons cependant chez cette espèce, une conductance stomatique très

La figure 26 nous apprend que la concentration intracellulaire en gaz carbonique a varié de façon significative, uniquement pour les plants de silène, exposés à $250\mu\text{M}$ de plomb, même si visuellement nous avons noté une forte variation pour le silène et la fétuque entre les témoins et les plants contaminés au Cd et au Pb. Si la concentration intracellulaire en gaz carbonique a fortement

12.4. Fluorescence de la chlorophylle

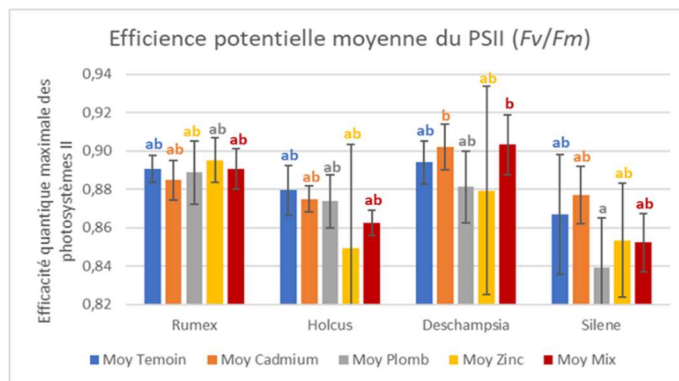


Figure 27 : Histogramme de l'efficacité quantique maximale des photosystèmes II moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10 μ M de Cd, 100 μ M de Zn, 250 μ M de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0,05$

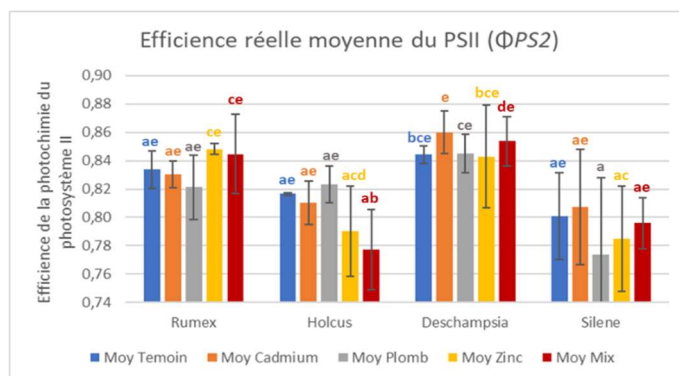


Figure 28 : Histogramme de l'efficacité réelle moyenne en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10 μ M de Cd, 100 μ M de Zn, 250 μ M de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0,05$

photochimique des PSII significativement supérieure à celle de la houlque pour le mélange Pb+Zn+Cd. Le test ANOVA confirme que ces effets sont dûs au facteur « espèce ».

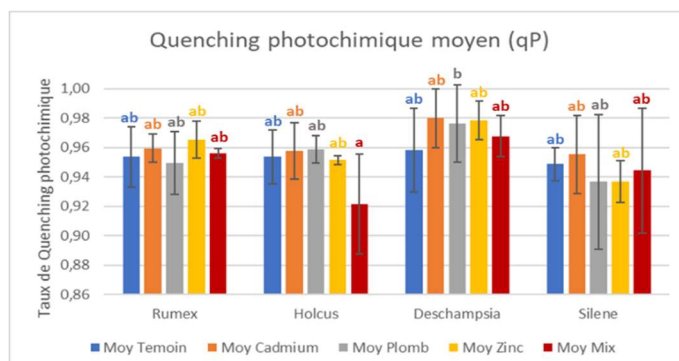


Figure 29 : Histogramme du taux d'extinction photochimique moyen en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10 μ M de Cd, 100 μ M de Zn, 250 μ M de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0,05$

La figure 27 montre qu'aucune des pollutions aux ETM étudiés n'a eu d'influence significative sur l'efficacité quantique maximale des photosystèmes II et les espèces présentent toutes les 4 des efficacités potentielles comparables en situation témoin. Seule l'efficacité potentielle du silène semble souffrir d'une pollution au plomb.

Comme on peut le voir à la figure 28, l'efficacité réelle du PSII n'a pas été significativement affectée par les pollutions de plomb, de zinc ou de cadmium si on les compare aux témoins. Toutefois, on remarque que la canche présente une efficacité photochimique des PSII significativement supérieure à celle du silène en présence de plomb. La canche et le rumex ont une efficacité

La figure 29 montre que les différentes pollutions aux ETM étudiés n'ont pas eu d'influence sur le taux d'extinction (Quenching) photochimique des 4 espèces étudiées et que celles-ci présentent des taux comparables entre espèces.

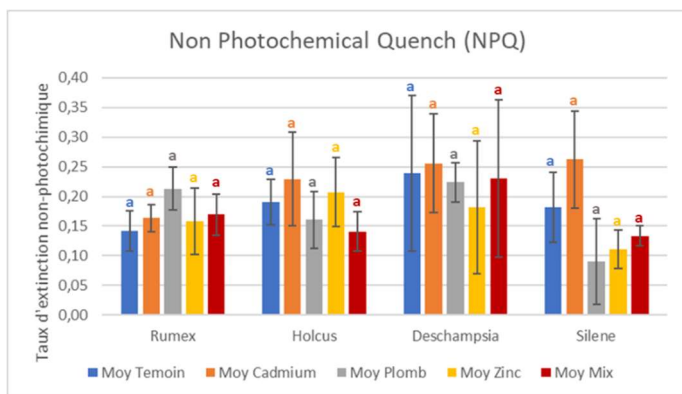


Figure 30 : Histogramme du taux d'extinction non-photochimique moyen en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0,05$

12.5. Teneurs en eau

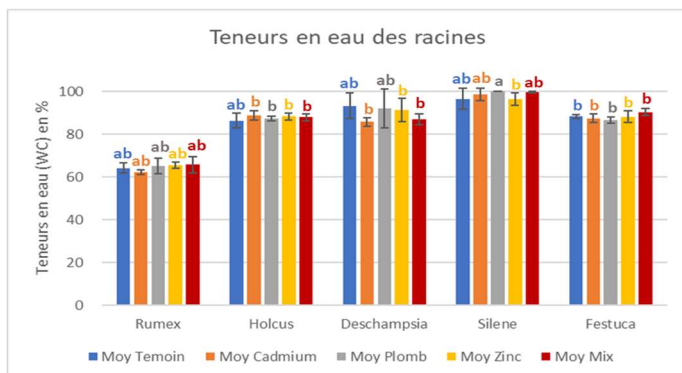


Figure 31 : Histogramme des teneurs en eau moyennes dans les racines en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0,05$

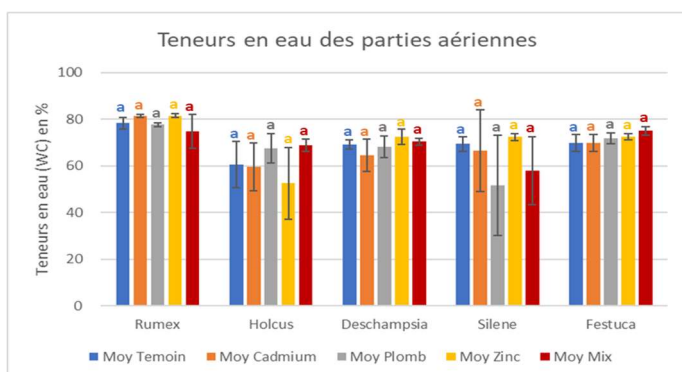


Figure 32 : Histogramme des teneurs en eau moyennes dans les parties aériennes en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0,05$

La figure 30 démontre que les différentes pollutions aux ETM étudiés n'ont pas non plus eu d'influence sur le taux d'extinction non-photochimique, sauf pour le silène, où il est plus élevé en présence de cadmium et plus faible en présence de plomb.

Les teneurs en eau étant des rapports, il est possible de comparer les résultats obtenus par les différentes plantes, c'est pourquoi le test statistique ANOVA2 a été utilisé pour les teneurs en eau, bien que la biomasse ait été analysée via une ANOVA1.

Les figures 31 et 32 nous indiquent qu'il n'y a pas de variation significative des teneurs en eau, que ce soit pour le système racinaire ou aérien. Sauf pour le silène, dont les teneurs en eau des parties aériennes sont visiblement plus faibles lors d'une contamination à $250\mu\text{M}$ de plomb. En outre, le rumex présente des teneurs en eau racinaire sensiblement plus faibles que les autres espèces.

13. Dosage du contenu en chlorophylle, du malondialdéhyde et des thiols totaux

13.1. Dosage des concentrations en chlorophylle

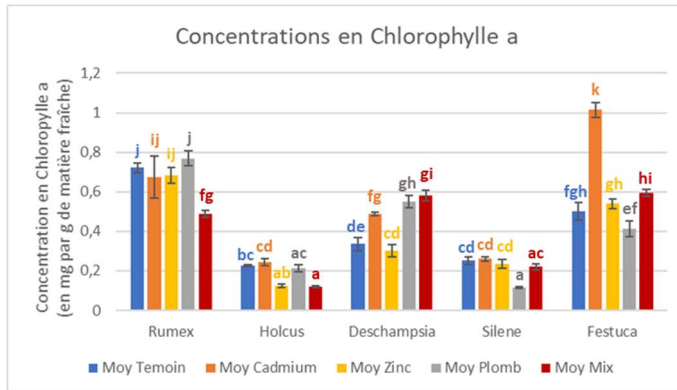


Figure 33 : Histogramme des concentrations moyennes en chlorophylle a en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

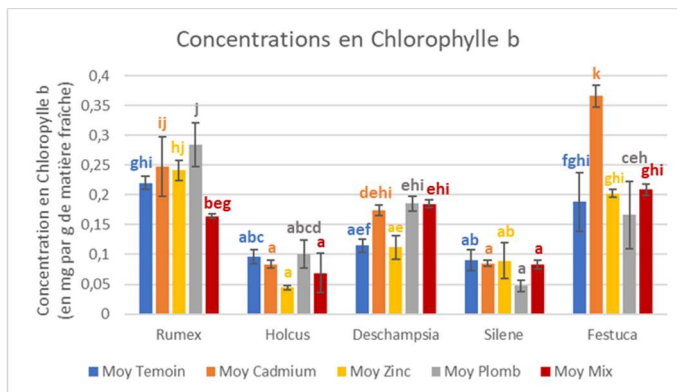


Figure 34 : Histogramme des concentrations moyennes en chlorophylle b en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

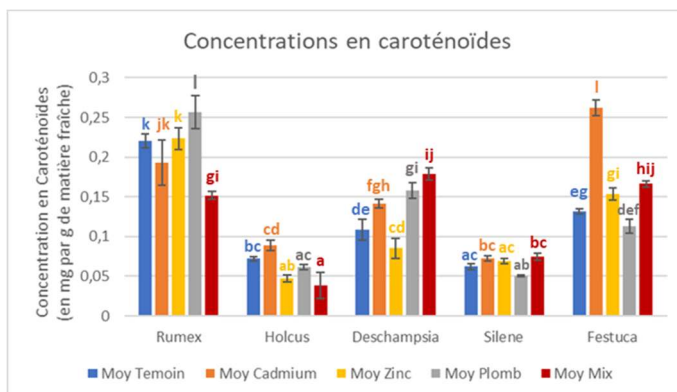


Figure 35 : Histogramme des concentrations moyennes en caroténoïdes en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10µM de Cd, 100µM de Zn, 250µM de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 4 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

La figure 33 indique que la concentration en chlorophylle a est significativement plus basse en présence de la pollution mixte pour le rumex et la houlque tandis qu'elle augmente pour la canche. La concentration en chlorophylle a augmente également en présence de cadmium pour la canche et la fétuque. Le zinc ne semble pas affecter la concentration en chlorophylle a tandis que le plomb fait augmenter celle-ci pour le canche et la réduit pour le silène.

La figure 34 montre que la concentration en chlorophylle b est significativement plus élevée en présence de plomb pour le rumex et en présence de cadmium pour la fétuque.

Sur la figure 35, la concentration en caroténoïdes est significativement plus élevée en présence d'une contamination au plomb pour le rumex et la canche. Elle diminue en présence de la pollution mixte Pb+Cd+Zn pour le rumex et la houlque tandis qu'elle augmente pour la canche et la fétuque. La concentration en caroténoïdes augmente également de façon significative en présence de cadmium pour la canche et la fétuque.

13.2. Dosage du malondialdéhyde

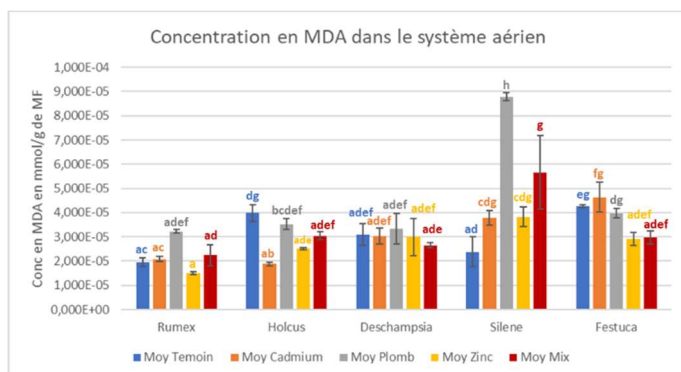


Figure 36 : Histogramme des concentrations moyennes en malondialdéhyde en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

La figure 36 indique que la concentration en MDA est beaucoup plus élevée pour le silène en présence de Pb et du traitement mixte. La houlque présente une diminution de concentration en MDA en présence de Cd et la fétuque présente une diminution de concentrations en MDA en présence de Cd et du traitement mixte.

13.3. Dosage des thiols totaux

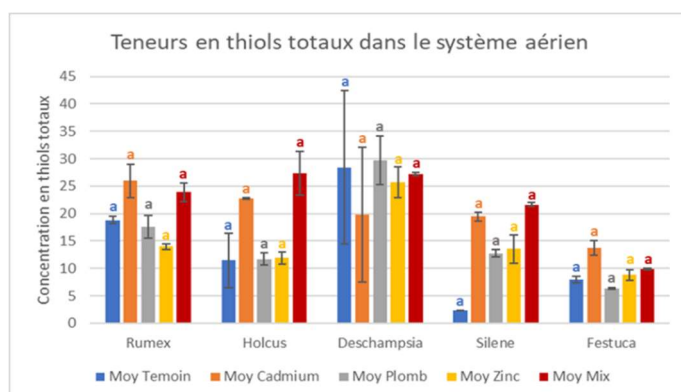


Figure 37 : Histogramme des teneurs moyennes en thiols totaux dans les parties aériennes en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

Comme le montre la figure 37, en ce qui concerne le système aérien, il y a une augmentation systématique des teneurs en thiols totaux en présence de cadmium ou du traitement mixte, sauf pour la canche. Le silène semble avoir de très fortes teneurs de thiols totaux en milieu pollué si on compare les plantes stressées avec les plantes témoin.

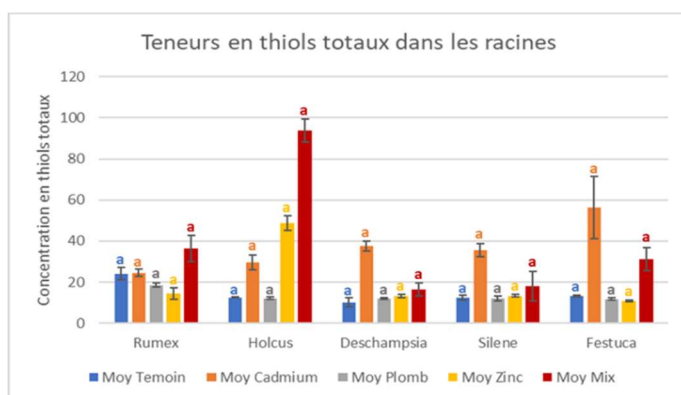


Figure 38 : Histogramme des teneurs moyennes en thiols totaux dans les parties racinaires en fonction de l'espèce et du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

En ce qui concerne le système racinaire (figure 38), il semble y avoir une augmentation systématique des thiols totaux en présence de cadmium ou du traitement mixte, mais, en dépit de tendances marquées, aucune différence n'apparaît significative. Une augmentation des teneurs racinaires en thiols totaux ne s'observe que pour la houlque. Le test ANOVA2 nous apprend que l'effet de l'espèce n'est pas significatif. Des tendances manifestes peuvent cependant être mises en évidence : ainsi, les teneurs en

thiols sont particulièrement élevés chez la houlque en réponse à une pollution au zinc ou à une pollution mixte, alors que les teneurs des autres espèces exposées à ces mêmes traitements sont beaucoup plus faibles.

14. Dosage des éléments-traces métalliques et d'éléments majeurs

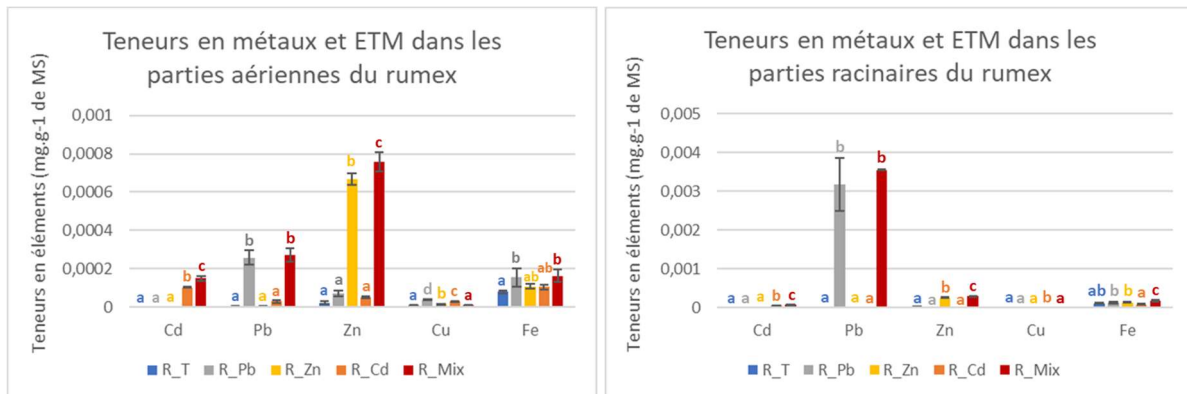


Figure 39 : Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de *Rumex acetosa L.* en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. ANOVA1 où $p < 0.05$

Comme on peut le voir à la figure 39, la quantité de plomb retrouvé est vraiment plus importante dans la partie racinaire pour les rumex exposés à une pollution au Pb ou au traitement mixte, et ceci s'accompagne d'une augmentation des teneurs en fer dans les parties aériennes. On retrouve plus de cadmium dans les parties aériennes des plantes exposées au Cd ou au traitement mixte et, de la même façon, on retrouve plus de zinc dans les parties aériennes des plantes polluées au Zn ou au traitement mixte. On retrouve plus de cuivre et de fer dans les parties aériennes pour tous les traitements et on retrouve plus de fer dans les rumex exposés à du Pb ou au traitement mixte. La présence de cuivre au niveau aérien semble plus importante pour les plantes exposées au Pb.

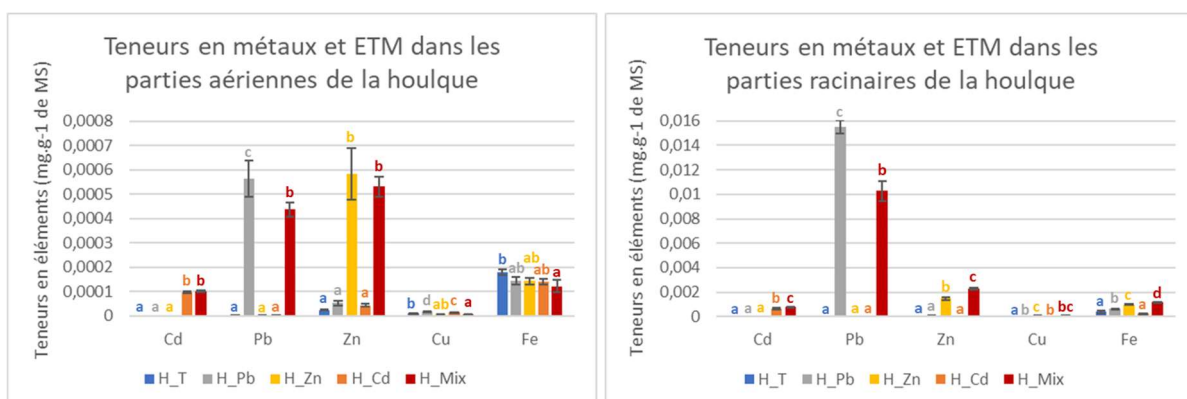


Figure 40 : Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de *Holcus lanatus L.* en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. ANOVA1 où $p < 0.05$

La figure 40 nous apprend que la concentration de plomb retrouvée est vraiment plus importante dans la partie racinaire pour les houlques ayant été exposées au Pb ou au traitement mixte. On retrouve plus de cadmium dans les parties aériennes des plantes exposées au Cd ou au traitement

mixte et plus de zinc dans les parties aériennes des plantes exposées au Zn ou à la pollution mixte. La concentration en cuivre au niveau aérien semble plus importante pour les houlques exposées au Pb. Les teneurs aériennes en fer étaient significativement plus élevées pour les houlques témoins que pour celles contaminées au mélange Pb+Zn+Cd.

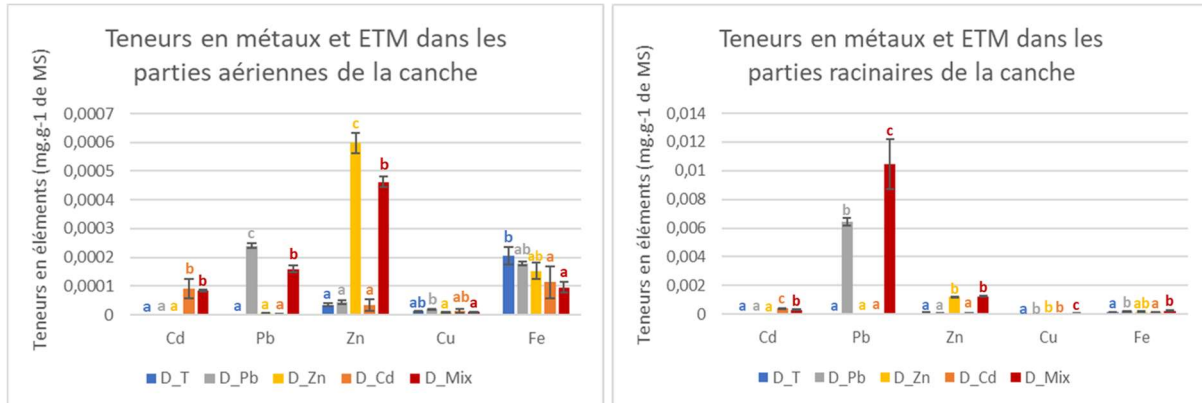


Figure 41 : Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de *Deschampsia cespitosa* L. en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où $p < 0.05$

La figure 41 nous apprend que comme pour le rumex et la houlque, la canche présente des concentrations plus importantes de plomb dans la partie racinaire pour les plantes ayant été confrontées au Pb ou à la pollution mixte. On retrouve également plus de zinc dans les parties aériennes des plants exposés au Zn ou au traitement mixte et plus de cadmium dans les parties aériennes des plants exposés au Cd ou au traitement mixte. Les teneurs aériennes en fer étaient significativement plus élevées pour les canches témoins que pour celles contaminées au Cd ou au mélange Pb+Zn+Cd.

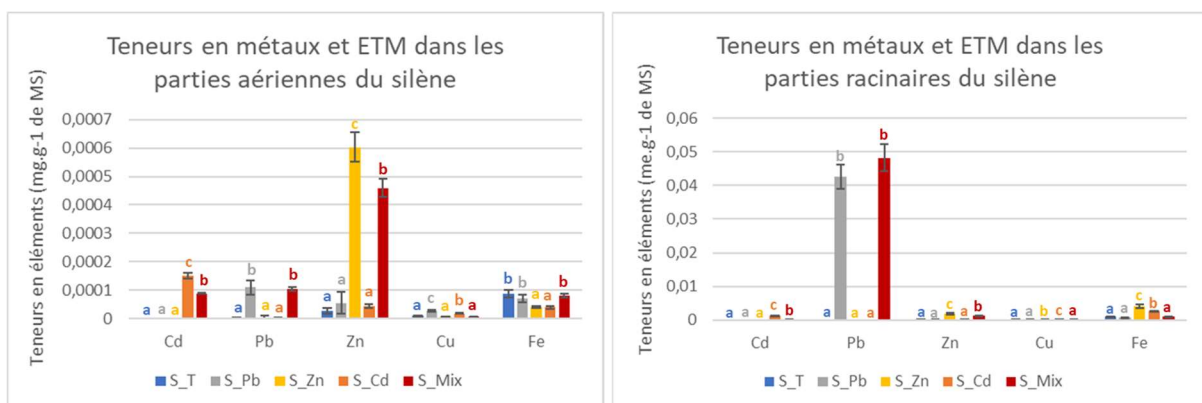


Figure 42 : Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de *Silene vulgaris* en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à $10\mu\text{M}$ de Cd, $100\mu\text{M}$ de Zn, $250\mu\text{M}$ de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. ANOVA 1 où $p < 0.05$

La figure 42 confirme la tendance selon laquelle on retrouve des quantités plus importantes de plomb dans les parties racinaires que dans les parties aériennes pour les plantes ayant été

exposées au Pb ou au traitement mixte. On retrouve aussi significativement plus de zinc dans les parties aériennes des plantes exposées au Zn ou au traitement mixte et plus de cadmium dans les parties aériennes des plantes exposées au Cd ou au traitement mixte que pour les autres traitements. Le cuivre est plus présent dans les plantes de silène exposées à une pollution au Pb ou au Cd pour les parties aériennes et dans les plantes de silène exposées à une pollution au Zn et au Cd pour les parties racinaires. Les teneurs aériennes en fer sont significativement plus élevées pour les silènes témoins que pour celles contaminées au Zn ou au Cd, alors que les teneurs racinaires y sont plus faibles.

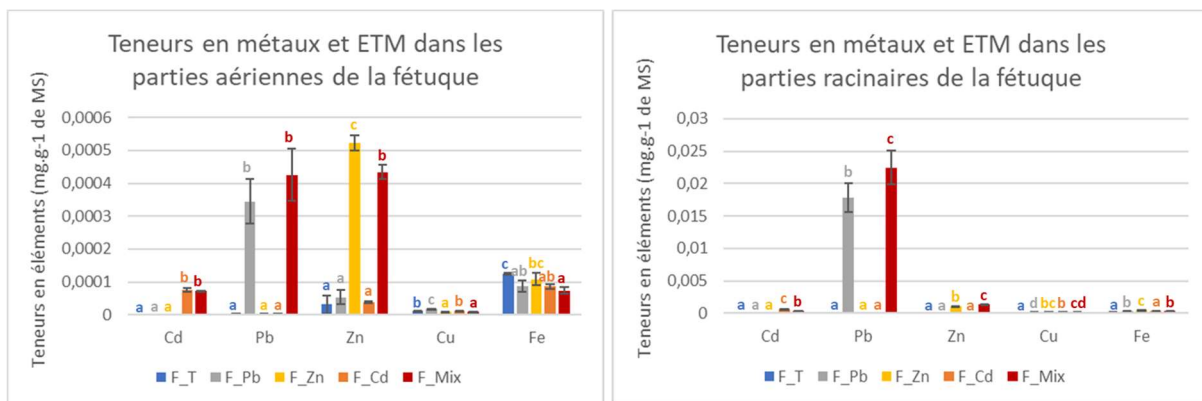


Figure 43 : Teneurs en métaux dans les parties aériennes puis racinaires de *Festuca rubra* L. en fonction du traitement. Les plantes ont été exposées durant 8 semaines à 10 μ M de Cd, 100 μ M de Zn, 250 μ M de Pb ou à ces 3 polluants simultanément. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. ANOVA1 où $p < 0,05$

La figure 43 présente également des quantités plus importantes de plomb dans la partie racinaire que dans les parties aériennes pour les fétuques ayant été confrontées au Pb ou au traitement mixte. On retrouve des concentrations plus élevées de cadmium dans les parties aériennes des plants exposés au Cd ou au traitement mixte, ainsi que des concentrations plus élevées de zinc dans les parties aériennes des plantes exposées au Zn ou au traitement mixte par rapports aux autres traitements. Le cuivre est plus présent dans les plantes de fétuque exposés à une pollution au Pb pour les parties aériennes et dans les plants de fétuque exposées à une pollution au Zn pour les parties racinaires. Les teneurs aériennes en fer sont significativement plus élevées pour les fétuques témoins que pour celles exposées au Pb, au Cd ou au traitement mixte et les teneurs racinaires en fer sont significativement plus élevées pour les plantes exposées à 100 μ M de Zn que pour les autres traitements.

15. Facteur de translocation, facteur de bioaccumulation et étude de l'additivité des toxicités

15.1. Facteur de translocation

Les facteurs de translocation estimés sur base des concentrations dans les parties aériennes et racinaires sont présentés dans le tableau 10.

Pour les plantes exposées au cadmium, le facteur de translocation de cet élément est le plus élevé pour le rumex alors qu'il demeure inférieur à 1 pour toutes les autres espèces. Il est intéressant de noter que la translocation du Cd augmente chez les plantes exposées à une pollution mixte en comparaison aux plantes exposées au Cd seul, sauf pour la houlque. Le facteur de translocation du plomb chez les plantes exposées à cet élément est très faible, le rumex présentant à nouveau les valeurs les plus élevées. Une pollution mixte réduit la translocation du plomb, sauf chez la houlque où le facteur est plus élevé pour la pollution au Pb. Le facteur de translocation du zinc pour les plantes exposées à un excès de cet élément est également très élevé chez le rumex, alors que le silène présente la valeur la plus faible. Une pollution mixte réduit le facteur de translocation du zinc, sauf chez le rumex où elle n'a pas d'impact et chez le silène où elle l'augmente.

Il est à noter qu'une pollution en un élément peut affecter la translocation d'un autre élément qui n'est pas intentionnellement ajouté à la solution et qui ne s'y trouve donc, à priori, qu'à l'état de trace. C'est particulièrement le cas pour une pollution au zinc qui augmente de façon déterminante la translocation du Cd chez toutes les espèces.

Tableau 10 : Facteur de translocation estimé sur base des concentrations (TFc) pour les 3 ETM étudiés en fonction du traitement. ND = Non déterminé.

Espèce	Traitement	TFc du Cd	TFc du Pb	TFc du Zn
Rumex	Témoin	0,3263	1,0037	1,0150
Rumex	Pb	ND	0,0814	5,4983
Rumex	Zn	2,8340	0,6980	2,5890
Rumex	Cd	1,6772	5,2291	6,4508
Rumex	Mix	2,1434	0,0761	2,5851
Houlque	Témoin	0,2658	0,2141	0,6166
Houlque	Pb	1,7534	0,0362	0,7628
Houlque	Zn	0,7065	0,4343	0,3895
Houlque	Cd	0,1518	0,3545	0,9601
Houlque	Mix	0,1324	0,0425	0,2317
Canche	Témoin	0,2988	0,3182	0,3224
Canche	Pb	2,1773	0,0374	0,6532
Canche	Zn	1,6687	0,4313	0,4953
Canche	Cd	0,2256	0,4630	0,4460
Canche	Mix	0,2696	0,0153	0,3683
Silene	Témoin	0,3739	0,3078	0,2157
Silene	Pb	ND	0,0026	0,6352

Silene	Zn	1,4899	0,3465	0,3145
Silene	Cd	0,1236	0,1047	0,2361
Silene	Mix	0,3426	0,0022	0,3354
Fétuque	Témoin	0,2824	0,3963	0,5658
Fétuque	Pb	1,3838	0,0193	0,5333
Fétuque	Zn	1,9898	0,2622	0,4960
Fétuque	Cd	0,1342	0,5303	0,5984
Fétuque	Mix	0,1918	0,0190	0,3269

Le Tableau 11 présente ces mêmes facteurs de translocation exprimés cette fois sur base des quantités dans les organes concernés et non sur base des concentrations. Les valeurs de TFq sont du même ordre de grandeur que celles de TFc. Les mêmes tendances sont observées, et c'est encore une fois le rumex qui présente les taux de translocation les plus élevés. De façon générale, la présence d'un élément en excès dans la solution a pour conséquence de réduire le TFq de cet élément par rapport aux témoins : le rumex exposé au Cd et au Zn, de même que la canche et le silène exposés au Zn échappent toutefois à cette règle générale.

Tableau 11 : Facteur de translocation estimé sur base des quantités (TFq) pour les 3 ETM étudiés en fonction du traitement. ND = Non déterminé.

Espèce	Traitement	TFq du Cd	TFq du Pb	TFq du Zn
Rumex	Témoin	0,3012	0,8620	0,8950
Rumex	Pb	ND	0,0939	6,3320
Rumex	Zn	2,5728	0,6378	2,3708
Rumex	Cd	1,7785	5,5224	6,4347
Rumex	Mix	2,2636	0,0812	2,7295
Houlque	Témoin	0,3174	0,2587	0,7331
Houlque	Pb	1,8009	0,0372	0,7521
Houlque	Zn	0,7736	0,4765	0,4254
Houlque	Cd	0,1642	0,3803	1,0327
Houlque	Mix	0,1195	0,0382	0,2098
Canche	Témoin	0,3084	0,3439	0,3479
Canche	Pb	2,5397	0,0433	0,7401
Canche	Zn	1,6085	0,4167	0,4750
Canche	Cd	0,2667	0,5522	0,5227
Canche	Mix	0,2742	0,0158	0,3753
Silene	Témoin	0,4348	0,3580	0,2585
Silene	Pb	ND	0,0031	0,8021
Silene	Zn	1,4739	0,3448	0,3109
Silene	Cd	0,1710	0,1401	0,3205
Silene	Mix	0,4268	0,0027	0,4186
Fétuque	Témoin	0,2809	0,3898	0,5549
Fétuque	Pb	1,4480	0,0204	0,5575
Fétuque	Zn	1,7714	0,2359	0,4447
Fétuque	Cd	0,1480	0,5870	0,6615
Fétuque	Mix	0,1750	0,0171	0,2980

15.2. Facteur de bioaccumulation

Comme on peut le voir dans le tableau 12, les valeurs de BAC, très inférieures à 1, attestent que les concentrations moyennes de tous les éléments pris en compte sont plus faibles dans les plantes que dans la solution nutritive.

Pour les plantes exposées au Cd, c'est le rumex qui présente les valeurs de BAC les plus faibles pour cet élément alors que la houlque présente les valeurs les plus élevées. Comparée à la pollution au Cd, la pollution mixte réduit les valeurs de BAC du cadmium chez toutes les espèces, sauf chez le rumex où une augmentation est observée. Pour les plantes exposées au Pb, les valeurs de BAC en cet élément sont les plus élevées chez le rumex et chez la fétuque, les valeurs observées étant équivalentes chez ces deux espèces. Les valeurs les plus faibles sont observées chez le silène. Chez cette espèce, de même que chez la canche, une pollution mixte augmente les valeurs de BAC du Pb comparativement au traitement Pb seul. Chez les plantes exposées à un excès de zinc, la houlque présente à nouveau les valeurs de BAC maximales pour cet élément. En comparaison avec une pollution au zinc, une pollution mixte augmente les valeurs de BAC en cet élément chez le rumex et le silène, et le réduit chez les autres espèces.

Tableau 12 : Facteur de bioaccumulation (BAC) pour les 3 ETM étudiés en fonction du traitement et de l'espèce

Espèce	Traitement	BAC du Cd	BAC du Pb	BAC du Zn
Rumex	Témoin	1,279E-07	1,928E-08	6,626E-07
Rumex	Pb	5,164E-08	1,170E-05	9,371E-07
Rumex	Zn	8,691E-08	2,117E-08	1,053E-05
Rumex	Cd	1,362E-05	5,702E-08	5,564E-07
Rumex	Mix	1,881E-05	1,262E-05	1,481E-05
Houlque	Témoin	8,185E-08	1,080E-08	9,010E-07
Houlque	Pb	1,348E-07	9,843E-06	1,477E-06
Houlque	Zn	2,281E-07	1,711E-08	2,721E-05
Houlque	Cd	3,027E-05	1,284E-08	1,534E-06
Houlque	Mix	2,705E-05	6,252E-06	1,909E-05
Canche	Témoin	7,277E-08	7,282E-09	1,068E-06
Canche	Pb	1,738E-07	2,428E-06	1,279E-06
Canche	Zn	1,376E-07	2,728E-08	1,666E-05
Canche	Cd	2,184E-05	1,045E-08	1,235E-06
Canche	Mix	1,679E-05	4,971E-06	1,419E-05
Silene	Témoin	9,298E-08	9,899E-09	7,135E-07
Silene	Pb	1,894E-07	7,544E-07	2,294E-06
Silene	Zn	1,092E-07	1,783E-08	1,495E-05
Silene	Cd	2,475E-05	1,837E-08	1,147E-06
Silene	Mix	2,418E-05	1,045E-06	2,097E-05
Fétuque	Témoin	7,539E-08	1,279E-08	8,553E-07
Fétuque	Pb	1,157E-07	1,188E-05	1,422E-06
Fétuque	Zn	1,106E-07	1,282E-08	1,350E-05
Fétuque	Cd	2,061E-05	1,401E-08	1,007E-06
Fétuque	Mix	1,321E-05	1,211E-05	1,062E-05

15.3. Etude de l'additivité des toxicités

Les paramètres mesurés où le traitement avait un effet significatif ($p \leq 0,05$) sont repris dans le tableau 13 afin de comparer si il y a une égalité entre les valeurs attendues et observées.

Tableau 13 : Comparaison des effets attendus et observés pour chaque espèce en fonction des différentes analyses présentant un effet significative du traitement appliqué

Analyse	Espèce	Effet attendu (Cd + Pb + Zn)	Effet observé (Mix)	Egalité
NPQ	Rumex	(0,163 + 0,213 + 0,158)	0,170	≠
	Holcus	(0,230 + 0,160 + 0,207)	0,141	≠
	Deschampsia	(0,256 + 0,224 + 0,181)	0,230	≠
	Silene	(0,262 + 0,091 + 0,112)	0,133	≠
WC racinaire	Rumex	(62,252 + 65,240 + 65,594)	65,736	≠
	Holcus	(88,833 + 87,184 + 88,332)	88,012	≠
	Deschampsia	(85,740 + 92,115 + 91,366)	86,853	≠
	Silene	(98,620 + 100,00 + 96,445)	99,838	≠
	Festuca	(87,543 + 86,602 + 88,259)	90,410	≠
Chlorophylle a	Rumex	(0,675 + 0,769 + 0,682)	0,487	≠
	Holcus	(0,244 + 0,212 + 0,125)	0,120	≠
	Deschampsia	(0,489 + 0,551 + 0,302)	0,580	≠
	Silene	(0,260 + 0,115 + 0,235)	0,220	≠
	Festuca	(1,014 + 0,413 + 0,539)	0,595	≠
Chlorophylle b	Rumex	(0,248 + 0,285 + 0,241)	0,164	≠
	Holcus	(0,084 + 0,100 + 0,044)	0,069	≠
	Deschampsia	(0,174 + 0,185 + 0,112)	0,185	≠
	Silene	(0,085 + 0,047 + 0,090)	0,083	≠
	Festuca	(0,366 + 0,167 + 0,203)	0,209	≠
Caroténoïdes	Rumex	(0,193 + 0,257 + 0,224)	0,152	≠
	Holcus	(0,089 + 0,062 + 0,047)	0,038	≠
	Deschampsia	(0,141 + 0,158 + 0,085)	0,179	≠
	Silene	(0,072 + 0,051 + 0,069)	0,075	≠
	Festuca	(0,263 + 0,113 + 0,154)	0,166	≠
Malondialdéhyde	Rumex	(2,084 + 3,225 + 1,514) ⁻⁵	2,250 ⁻⁵	≠
	Holcus	(1,881 + 3,519 + 2,510) ⁻⁵	3,049 ⁻⁵	≠
	Deschampsia	(3,028 + 3,331 + 2,992) ⁻⁵	2,650 ⁻⁵	≠
	Silene	(3,791 + 8,786 + 3,824) ⁻⁵	5,661 ⁻⁵	≠
	Festuca	(4,629 + 3,978 + 2,915) ⁻⁵	2,980 ⁻⁵	≠
Thiols totaux racinaires	Rumex	(24,524 + 18,571 + 14,524)	36,429	≠
	Holcus	(29,524 + 12,143 + 48,690)	93,929	≈
	Deschampsia	(37,619 + 12,024 + 13,214)	16,429	≠
	Silene	(35,595 + 12,024 + 13,333)	17,976	≠
	Festuca	(56,191 + 11,786 + 10,952)	31,071	≠

Comme on le voit au Tableau 13, il n'y a qu'une seule fois où cette supposition se révèle exacte (pour les thiols totaux racinaires de la houlque). Sinon les valeurs du Mix se rapprochent beaucoup plus des moyennes des 3 ETM, soit

$$(\text{effet du Cd seul} + \text{effet du Pb seul} + \text{effet du Zn seul})/3 = \text{effet du Mix}$$

On peut donc rejeter l'hypothèse selon laquelle il y aurait additivité des toxicités, il y a plutôt une interaction entre ces 3 polluants.

VIII. Expérience de terrain

16. Mesures au XRF du sol

Les résultats du XRF ont montré qu'il y avait bien des traces de métaux inhabituels voire rares sur le site expérimental de Villers-la-ville, comme du molybdène (Mo), du thorium (Th), du plomb (Pb), de l'arsenic (As) ou du bismuth (Bi). Tandis qu'on trouve une large gamme de métaux couramment rencontrés en sidérurgie sur le sol à Sclessin ; plomb (Pb), arsenic (As), cuivre (Cu), mercure (Hg), zinc (Zn), nickel (Ni), fer (Fe), manganèse (Mn), chrome (Cr), vanadium (V), scandium (Sc) et aluminium (Al). Il nous semblait intéressant de le signaler, même si ce mémoire ne se concentre que sur le zinc, le cadmium et le plomb et c'est pourquoi seuls les effets de ces 3 ETM sont étudiés ci-après.

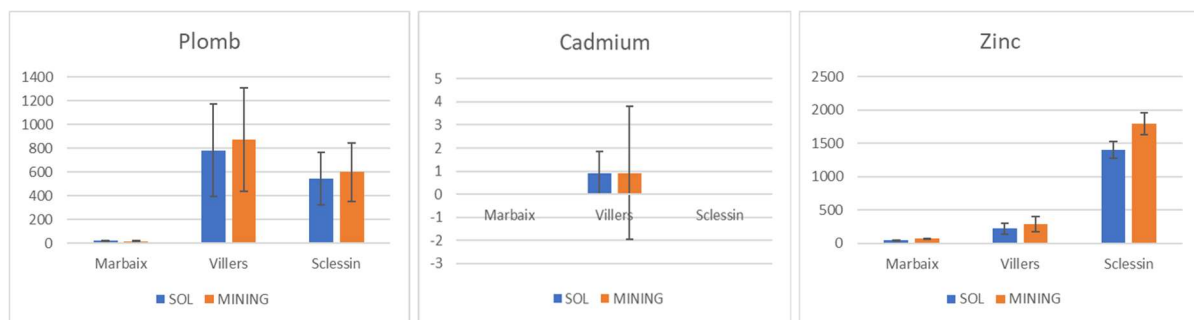


Figure 44: Mesure en ppm des teneurs en ETM sur les 3 terrains à l'aide d'un analyseur XRF par Mathilde Blanquet. Les barres verticales correspondent aux erreurs standards.

Comme on peut le voir sur la figure 44, le plomb est presque absent sur le site contrôle (Marbaix), il est compris aux alentours des 800 ppm pour Villers et aux alentours de 600 ppm pour Sclessin, soit en deçà de la norme pour zone industrielle selon le décret sol de 2008 (tableau 14) (Code Wallon de Bonnes Pratiques, 2008 - version 3).

Les résultats sont faussés pour le cadmium, car le XRF n'était pas programmé pour mesurer ce métal. Toutefois, on remarque que l'appareil a quand même détecté des traces de Cd à Villers, mais pas sur les deux autres sites.

Le zinc était surtout présent à Sclessin, où il dépassait les 1500 ppm, ce qui est bien au-delà de la norme pour une zone industrielle (tableau 14) puisqu'on dépasse la valeur d'intervention¹⁰ qui est de 1360 ppm. A Villers, les quantités de zinc retrouvées étaient inférieures à 500 ppm, soit bien en deçà des normes pour zone industrielle. Pour la ferme de Marbaix, la quantité de

¹⁰ La valeur seuil est définie comme la concentration en polluant dans le sol au-delà de laquelle les risques pour les espèces et les processus biologiques du sol sont susceptibles d'être inacceptables. La valeur d'intervention est définie comme la concentration en polluant dans le sol au-delà de laquelle le fonctionnement de l'écosystème est menacé à un point tel que des mesures de gestion des risques sont requises. (Code wallon des bonnes pratiques – Guide de référence pour l'étude des risques)

zinc retrouvé respectait les normes de pollution pour les zones agricoles, puisqu'elle était inférieure à 210 ppm (tableau 14).

Tableau 14 : Valeurs seuils et valeurs d'intervention pour les 3 ETM étudiés selon le code wallon des bonnes pratiques, décret sol de 2008. VS = valeur seuil et VI = valeur d'intervention.

	Plomb	Cadmium	Zinc
Zone industrielle	VS : 1150ppm VI : 2300ppm	VS : 8ppm VI : 16ppm	VS : 680ppm VI : 1360ppm
Zone d'habitat	VS : 150ppm VI : 300ppm	VS : 3ppm VI : 6ppm	VS : 500ppm VI : 1000ppm
Zone de loisir/agricole	VS : 70ppm VI : 140ppm	VS : 2ppm VI : 4ppm	VS : 210ppm VI : 420ppm
Zone naturelle	VS : 70ppm VI : 140ppm	VS : 1ppm VI : 2ppm	VS : 150ppm VI : 300ppm

17. Dosage du rapport carbone sur azote du sol

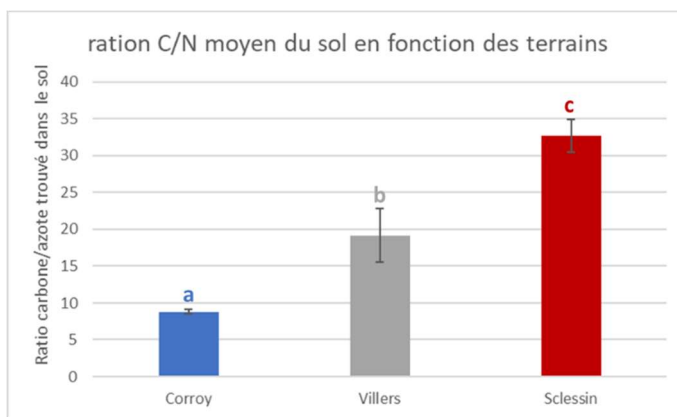


Figure 45 : Ratio carbone sur azote moyen du sol en 2020 en fonction des terrains étudiés. Chaque valeur est la moyenne de 10 répliqués et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 1 où $p < 0.05$

Comme on peut le voir à la figure 45, les ratios C/N étaient fort différents pour les 3 terrains expérimentaux.

Ce ratio était significativement plus élevé sur le site de Sclessin en comparaison des deux autres sites et significativement plus élevé à Villers-la-Ville qu'à Corroy.

18. Mesure du pH du sol

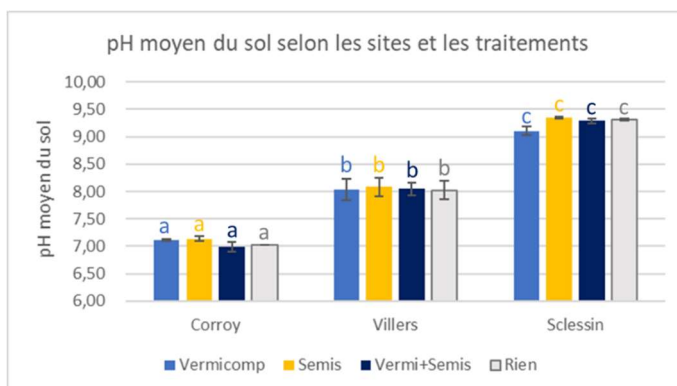


Figure 46 : pH moyen du sol en fonction des sites expérimentaux et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 2 répliqués et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

La figure 46 nous apprend que le facteur « site » a un effet très marqué sur le pH, tandis que les traitements n'ont aucune influence. Bien que les 3 sites expérimentaux aient des sols fort basiques, on observe toutefois des différences très marquées entre Sclessin, qui a un pH supérieur à 9, Villers qui a un pH avoisinant 8 et Corroy qui a un pH aux alentours de 7.

19. Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs du sol

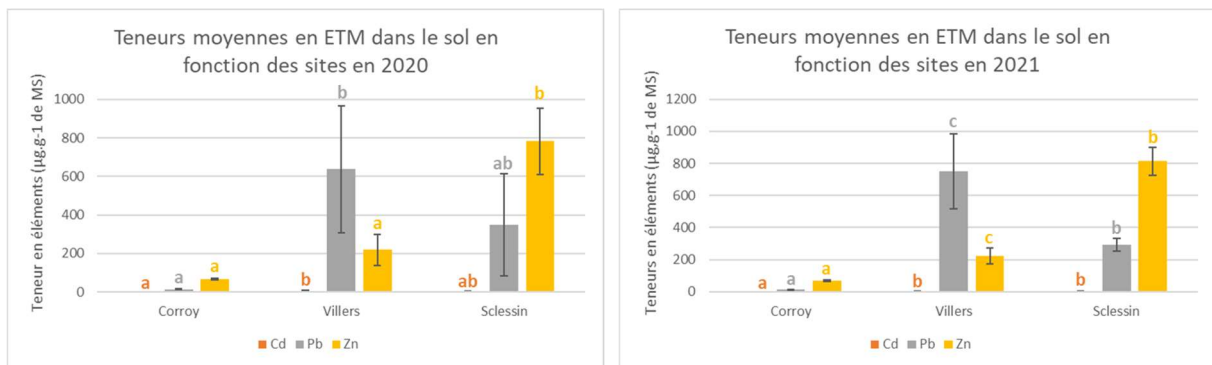


Figure 47 : Teneurs en ETM dans le sol en fonction des sites pour les 2 années étudiées. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats pour les sols de 2021 et de 5 réplicats pour les sols de 2020. Les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 1 où $p < 0.05$

Grâce à la figure 47, nous apprenons qu'il n'y a pas de variation de la pollution en ETM du sol entre 2020 et 2021, sauf pour le plomb qui aurait légèrement augmenté sur le site de Villers-la-Ville. L'analyse post-hoc nous apprend qu'en 2020 Villers était significativement plus polluée en Cd et en Pb que Corroy, mais que les teneurs sont identiques à Sclessin ; alors qu'en 2021, Villers était également plus polluée en Pb que Sclessin. Les teneurs en Zn étaient comparables pour Corroy et Villers en 2020, mais ne l'étaient plus en 2021. Rappelons que l'activité industrielle a toujours lieu à Villers.

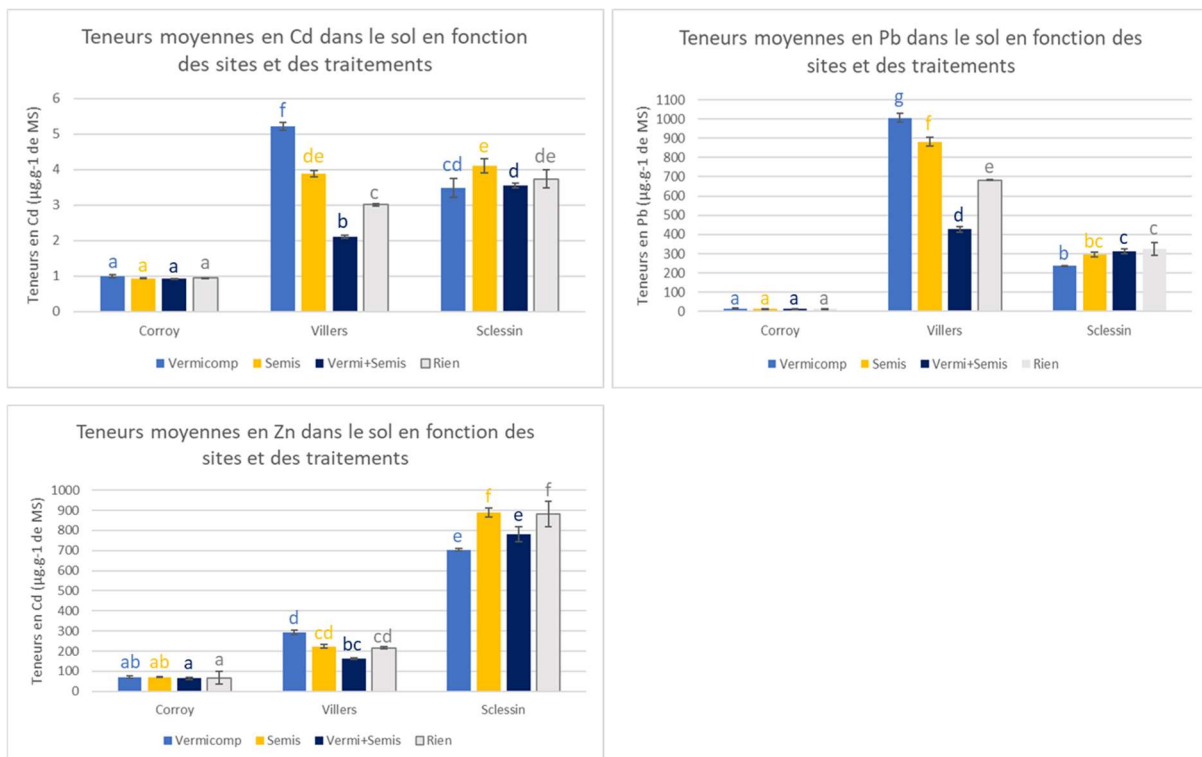


Figure 48 : Teneurs en ETM dans le sol en fonction des sites et des traitements en 2021 pour chaque ETM étudié. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 2 où $p < 0.05$

Comme on peut le voir à la figure 48, le **vermicompost** n'a pas d'effet sur les teneurs en ETM du sol à Corroy. De façon surprenante, les parcelles de Villers qui reçoivent du vermicompost seul ont des teneurs plus élevées en Cd et en Pb. A Sclessin, par contre, le vermicompost réduit légèrement les teneurs du sol en Pb et Zn. Le **mélange semé** semble également avoir un effet sur les teneurs du sol en Cd et Pb à Villers. L'association du mélange semé arrosé de vermicompost, quant à lui, réduit les teneurs du sol en Cd et en Pb pour Villers et en Zn pour Sclessin, quand on compare les résultats avec ceux des parcelles sur lesquelles nous ne sommes pas intervenus.

L'analyse de la variance confirme que, comme vu précédemment (figure 47), le site a un effet significatif sur la réponse des teneurs en ETM du sol.

20. Mesure de la biodisponibilité des éléments du sol

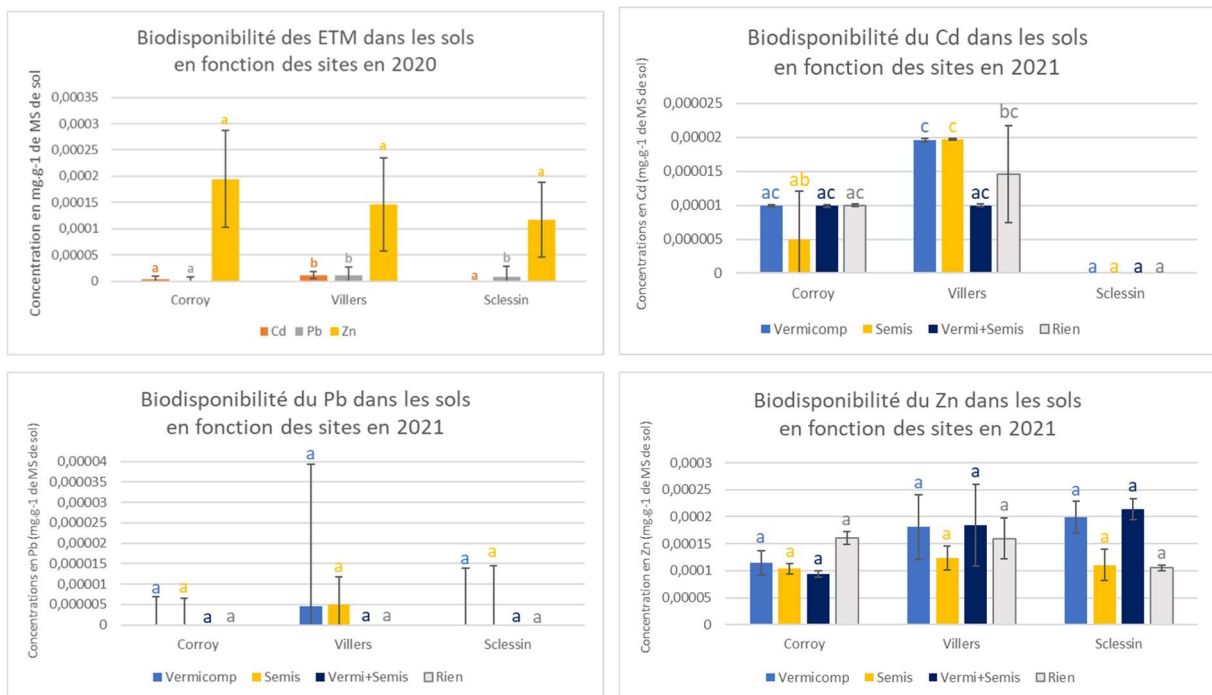


Figure 49 : Biodisponibilité des ETM dans les sols en fonction des sites en 2020 et 2021. En 2021 les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 2 réplicats pour les sols de 2021 et de 10 réplicats pour les sols de 2020. Les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 1 où $p < 0.05$ pour 2020 et en ANOVA 2 où $p < 0.05$ pour 2021

La figure 49 nous apprend que la biodisponibilité du Cd était plus importante à Villers qu'à Corroy et Sclessin en 2020, alors qu'en 2021 cette différence est plus ténue. La biodisponibilité du Pb était significativement plus importante à Villers et Sclessin qu'à Corroy en 2020 alors qu'il n'y a plus de différence en 2021. La biodisponibilité du Zn est comparable pour les 3 sites expérimentaux. Au regard des résultats de l'ANOVA2 pour les sols de 2021, nous remarquons que ni la biodisponibilité du Cd, ni celle du Pb ou du Zn n'était dépendante du traitement (semis

ou vermicompost). Notons cependant qu'à Sclessin, l'addition de vermicompost augmente la biodisponibilité du Zn en l'absence comme en présence de semis.

21. Production de biomasse et contenu en eau des plantes de terrain

Bien qu'en 2020 un désherbage systématique des parcelles eut lieu, les sols des différents sites expérimentaux n'en étaient pas moins riches d'une banque de graine. Durant l'année qu'a duré l'expérience, une végétation spontanée s'est donc développée sur les parcelles (semées et non semées). Ceci explique que nous ayons pu calculer une biomasse pour les parcelles non-semées.

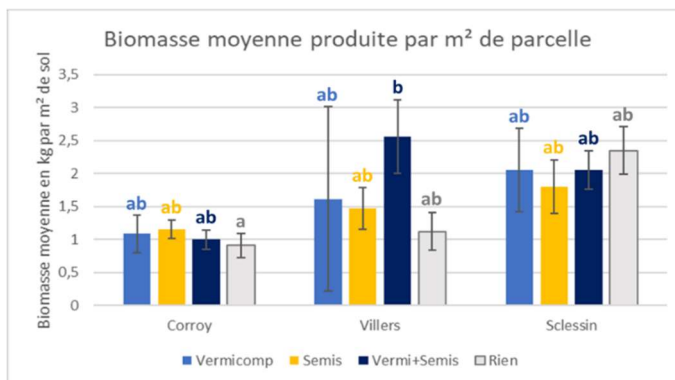


Figure 50 : Biomasse moyenne produite par m² de parcelle. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : Rumex acetosa, Silene vulgaris, Deschampsia cespitosa, Holcus lanatus et Festuca rubra. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

Comme le montre la figure 50, l'addition de vermicompost stimule la production de biomasse sur le site de Villers, même si cet effet n'est pas considéré comme significatif. Seule la production de biomasse pour les parcelles semées et arrosées au vermicompost à Villers était significativement plus élevée que pour les parcelles sans intervention de Corroy, mais le test ANOVA2 nous

apprend que c'est un effet du site et non pas un effet du traitement.

Afin de mieux pouvoir interpréter cette biomasse, nous avons fait une analyse descriptive des espèces s'étant développées sur les parcelles (tableau 15). Des photographies permettant de mieux visualiser la biomasse produite en fonction des sites sont disponibles à la figure 51.

Tableau 15 : Analyse descriptive de la biomasse s'étant développé sur les parcelles des différents sites expérimentaux

	Semées	Semées et arrosées de Vermicompost	Ni semées, ni arrosées de Vermicompost	Arrosées de Vermicompost
Corroy	Holcus lanatus Silene vulgaris Deschampsia cespitosa Festuca rubra Rumex acetosa Trifolium sp. Erigeron canadensis Filago sp. Achillea millefolium Taraxacum sp. Epilobium sp. Sonchus arvensis Papaveraceae Glebionis segetum	Holcus lanatus Silene vulgaris Deschampsia cespitosa Festuca rubra Rumex acetosa Trifolium sp. Erigeron canadensis Filago sp. Sonchus arvensis	Erigeron canadensis Trifolium sp. Filago sp. Taraxacum sp. Sonchus arvensis Achillea millefolium Poaceae	Erigeron canadensis Trifolium sp. Glebionis segetum Epilobium sp. Achillea millefolium Taraxacum sp. Filago sp. Sonchus arvensis Poaceae
Villers	Holcus lanatus Silene vulgaris Deschampsia cespitosa Festuca rubra Medicago lupulina Geranium sp. Taraxacum sp. Trifolium sp. Bellis perennis	Holcus lanatus Silene vulgaris Deschampsia cespitosa Festuca rubra Medicago lupulina Asteraceae (chardon) Erigeron canadensis Epilobium sp. Geranium sp. Bellis perennis Plantago lanceolata Papaveraceae Ranunculus sp. Trifolium sp.	Medicago lupulina Taraxacum sp. Bellis perennis Achillea millefolium Epilobium sp. Convolvulaceae (liseron) Plantago lanceolata Poaceae Apiaceae	Erigeron canadensis Medicago lupulina Taraxacum sp. Bellis perennis Silene latifolia Poaceae Trifolium sp. Epilobium sp. Plantago lanceolata Ranunculus sp. Asteraceae (chardon)
Sclessin	Melilotus albus Silene vulgaris Rubus sp. Tanacetum vulgare	Melilotus albus Silene vulgaris Rubus sp.	Melilotus albus Rubus sp. Erigeron canadensis Asteraceae (chardon)	Melilotus albus Rubus sp. Erigeron canadensis Asteraceae (chardon)

Concernant les parcelles semées, on remarque que le rumex ne s'est pas développé sur celles-ci à Villers et que seul le silène c'est développé à Sclessin. Le fait d'arroser les parcelles semées de vermicompost a permis à plus d'espèces de s'installer à Villers. En ce qui concerne les parcelles non semées arrosées de vermicompost, elles ont permises à plus d'espèces de se développer que les parcelles non semées et non arrosées de vermicompost.

En dehors des espèces semées, on notera que la vergerette du canada (*Erigeron canadensis*) était largement présente à Corroy (où elle a colonisé tous les types de parcelles) ainsi qu'à Villers (où elle n'a colonisé que les parcelles arrosées de vermicompost) et Sclessin (où on ne la retrouve que sur les parcelles non semées).

Corroy était principalement couvert de trèfle, de *Filago*, de vergerette du canada et de laiteron des champs (*Trifolium*, *Filago*, *Erigeron canadensis* et *Sonchus arvensis* sont présents sur tous les types de parcelles) mais également beaucoup d'achillée millefeuille et de pissenlits (*Achillea millefolium*, *Taraxacum*). Les graminées adventices ne poussaient que sur les parcelles non semées.

Villers était principalement couvert de pâquerettes, de trèfles, de pissenlits et de plantain (*Bellis perennis*, *Trifolium*, *Taraxacum* et *Plantago lanceolata*). *Erigeron canadensis*, *Ranunculus* sp. et les chardons ne s’y sont développées que sur les parcelles traitées au vermicompost. Une culture spontanée de silène à larges feuilles (*Silene latifolia*) a poussé sur une parcelle arrosée au vermicompost à Villers.

Sclessin présentait une richesse spécifique assez faible avec seulement 5 espèces différentes et une grande dominance du mélilot blanc et du silène enflée (*Melilotus albus*, *Silene vulgaris*). Outre ces 2 espèces on trouvait énormément de ronces (*Rubus* sp.) sur le site.



Figure 51 : Photographies de l'état des parcelles en septembre 2021 pour a) Corroy, b) Villers et c) Sclessin

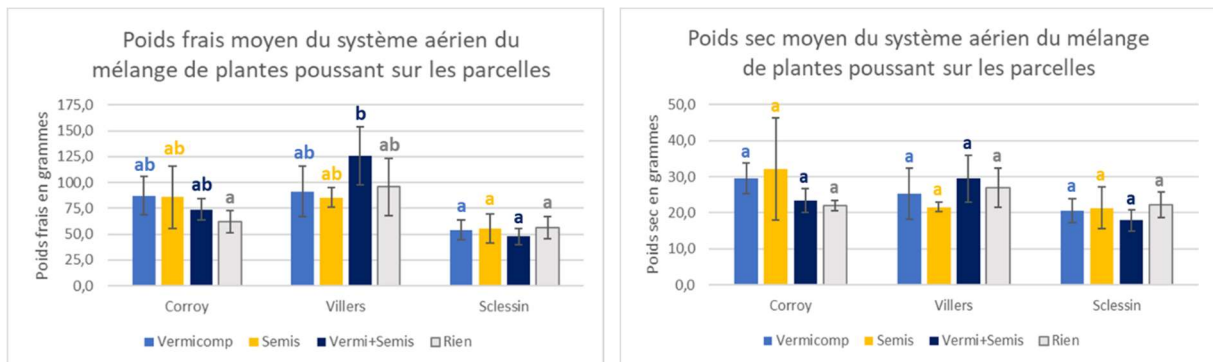


Figure 52 : Poids frais puis secs moyens des systèmes aériens des plantes poussant sur les parcelles en fonction des sites et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : *Rumex acetosa*, *Silene vulgaris*, *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus* et *Festuca rubra*. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 2 où $p < 0.05$

La Figure 52 nous confirme qu'il n'y a pas d'effet du traitement utilisé sur les poids frais ou secs moyens du système aérien des plantes. Encore une fois, seule la production de biomasse pour les parcelles semées et arrosées au vermicompost à Villers était significativement plus élevée que pour les parcelles sans intervention de Corroy, mais ici aussi le test ANOVA2 nous indique que c'est un effet du site et non pas un effet du traitement employé.

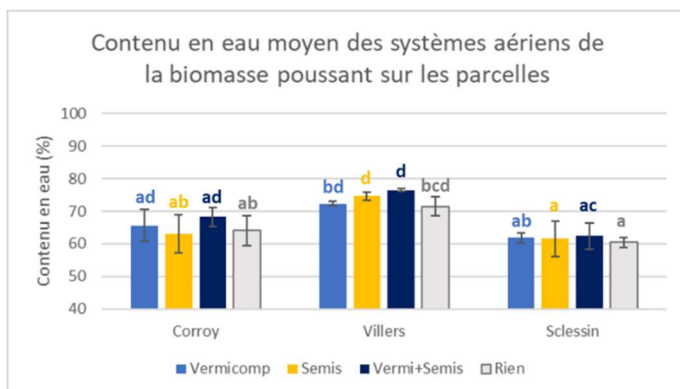


Figure 53 : Pourcentage du contenu en eau des parties aériennes des plantes poussant sur les parcelles en fonction des sites et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : *Rumex acetosa*, *Silene vulgaris*, *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus* et *Festuca rubra*. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testé en ANOVA 2 où $p < 0.05$

La figure 53 montre les teneurs en eau de la biomasse récoltée ; elle confirme qu'il n'y a pas d'effet du traitement mais bien un effet du site. Les teneurs en eau des systèmes aériens des plantes récoltées à Villers sur les parcelles semées étaient significativement différentes des teneurs en eau des plantes récoltées à Sclessin et Corroy. Les teneurs en eau des plantes récoltées sur les parcelles semées et arrosées de vermicompost ou sur lesquelles nous ne

sommes pas intervenues, à Villers, étaient significativement différentes du contenu en eau des plantes ayant poussé sur les parcelles avec respectivement les mêmes conditions à Sclessin.

22. Dosage des éléments-traces métalliques et des éléments majeurs des plantes de terrain

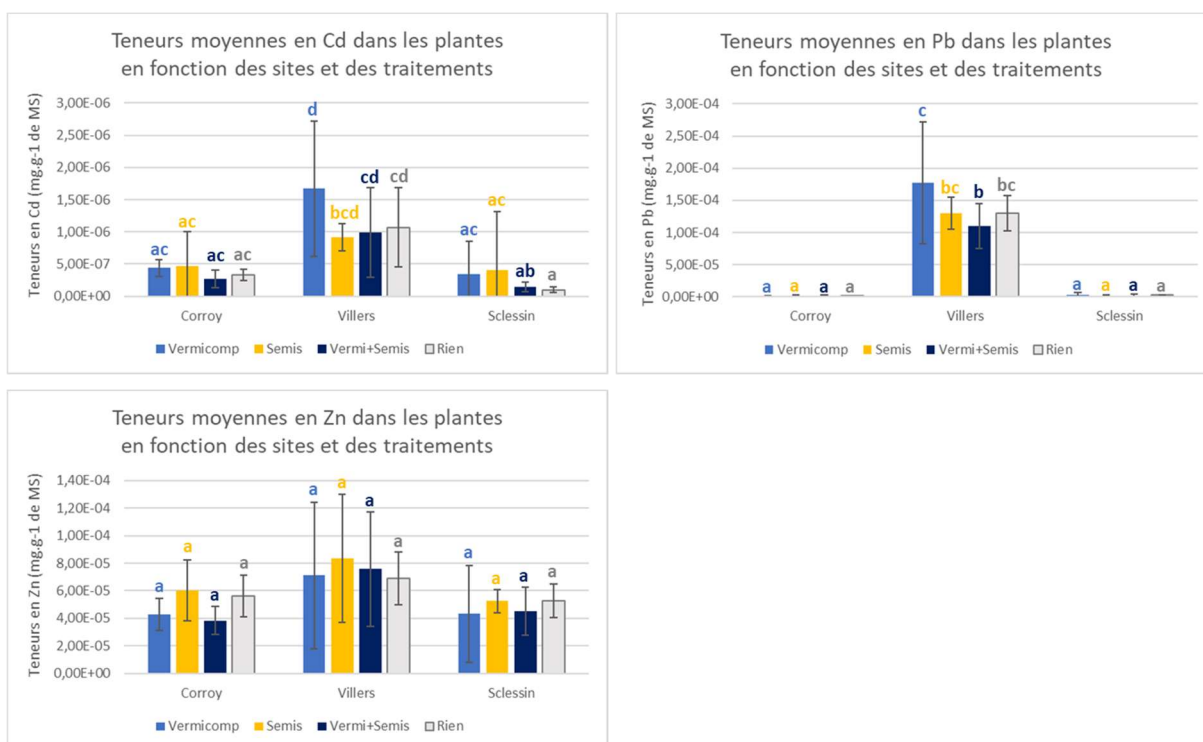


Figure 54 : Teneurs moyennes en ETM dans les plantes ayant poussé sur les parcelles, en fonction des sites et des traitements. Les parcelles ont été arrosées soit de 40ml d'eau, soit de 40ml de vermicompost, voir semées du mélange de graines étudiées : *Rumex acetosa*, *Silene vulgaris*, *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus* et *Festuca rubra*. Chaque valeur est la moyenne de 9 réplicats et les barres verticales correspondent aux erreurs standards. Testés en ANOVA 2 où $p < 0.05$

Le test post-hoc nous apprend que l'effet du site est significatif pour le Cd et le Pb, tandis que ni le site, ni le traitement n'ont un effet significatif sur les réponses au zinc. A la figure 54, nous observons que le vermicompost épandu sur des parcelles non semées a augmenté les teneurs en Cd contenus dans les plantes ayant poussé sur des parcelles à Villers par rapport à Corroy ou Sclessin. Les teneurs en Pb ont également été significativement plus élevées, pour les plantes ayant poussé sur des parcelles de Villers par rapport à Corroy ou Sclessin, tous traitements confondus. Les teneurs en Cd étaient significativement plus importantes chez les plantes ayant poussé sur des parcelles semées et arrosées de vermicompost (Vermi+Semis) à Villers-la-Ville que chez les plantes ayant poussées sur des parcelles semées et arrosées de vermicompost à Sclessin. Il en va de même pour les parcelles sur lesquelles aucune intervention n'a eu lieu (Rien).

Discussion

Les espèces qui ont été étudiées dans le cadre de ce travail ont été choisies sur base de leur présence rapportée sur des sites calaminaires contaminés aux métaux lourds. Il importe cependant de signaler que les graines utilisées ont une origine commerciale (elles nous ont été fournies par la société Ecosem) et qu'elles ne proviennent pas du site calaminaire : au moment où ce travail a été initié, les graines n'étaient pas disponibles sur les sites pour des raisons climatiques. Cette précision a son importance dans la mesure où certains auteurs ont démontré qu'il existait de fortes différences pour une même espèce, entre écotype métallicole et non-métallicole : ceci a été montré chez la Houle laineuse (Symeonidis et Karataglis, 1992 ; Rengel 2000), chez *Rumex acetosa* (Barrutia et al., 2009 ; 2010), chez la canche (Nkongolo et al., 2014 ; von Frenckell-Insam et Hutchinson, 1993) et chez *Silene vulgaris* (Garcia-Gonzealo et al., 2017 ; Koszelnik-Leszek et al., 2019 ; Muszynska et al., 2019a et b). Il est peu probable que les semences obtenues auprès du fournisseur correspondent à des écotypes métallicoles et pour cette raison, notre étude ne reflètera pas pleinement les potentialités des espèces concernées pour une revégétalisation sur sols contaminés, mais elle fournira des pistes d'information sur leur comportement en réponse à des éléments distincts et à leur mélange.

Outre les différences entre écotypes, nous constatons que, pour une espèce donnée, au sein d'un même lot de semences, le matériel obtenu est très hétérogène. A l'exception de *Festuca rubra*, il n'y a pas pour les espèces étudiées de « cultivars » reconnus, fruit d'une sélection humaine et il n'est pas surprenant qu'une hétérogénéité subsiste au sein de notre matériel. Pour la canche, par exemple, Coulaud et McNeilly (1992) considèrent que la variabilité au sein même des populations ou des écotypes peut être considérable. Ceci a pour conséquence des erreurs standards très importantes (particulièrement pour le Silène) qui compromettent le bien-fondé des comparaisons pour certains paramètres, des différences à priori manifestes entre certaines espèces n'étant pas confirmées statistiquement. La solution eut été de cultiver, pour chaque espèce, un plus grand nombre de plantes afin d'augmenter le nombre de répétitions mais ceci n'était malheureusement pas compatible avec l'infrastructure mise à notre disposition et avec les délais impartis.

Expérience en serre

1. Influence d'une contamination multiple aux ETM sur la morphologie des cinq espèces végétales lors de l'expérience en conditions contrôlées sur culture hydroponique.

L'analyse de la morphologie des plantes étudiées est l'approche la plus immédiate pour commencer notre analyse de la résistance aux métaux de ces plantes afin de pouvoir créer une phytocénose métallicole. L'étude de la morphologie des 5 espèces de plantes s'est basée sur une approche purement qualitative (observations visuelles) et une approche quantitative (longueur des systèmes racinaires et aériens, ainsi que la production de biomasse).

Du point de vue quantitatif, il ressort que, chez le rumex et la canche, le zinc stimule l'élongation aérienne, tandis que le traitement mixte la réduit (figure 14). Chez les plantes, l'élongation des organes est placée principalement sous le contrôle des auxines et des gibbérélines. Les données disponibles dans la littérature confirment que les métaux lourds ont un impact sur la balance hormonale des plantes (Feki et al., 2012). Une augmentation de l'élongation n'implique pas nécessairement une augmentation de poids. Les poids frais des systèmes aériens des rumex et des silènes ont également souffert de leur exposition au traitement mixte (figure 16a). Enfin, le poids frais des silènes s'étant développés en présence de zinc, est significativement plus élevé que le poids frais des silènes s'étant développés en présence de plomb. Le zinc est un élément essentiel qui, sous son seuil de toxicité, est favorable à la croissance des plantes (Zenk, 1996). Il n'est pas exclu que les plantes soient mieux armées pour gérer un excès en cet élément que pour le plomb et le cadmium qui ne sont pas des éléments requis par le métabolisme : une toxicité au cadmium (Heider et al., 2021) et au plomb (Sharma et Dubey, 2005) entraînent en effet rapidement un retard de croissance et une diminution de la biomasse.

Le seuil de toxicité du zinc pour les plantes non tolérantes aux ETM est de l'ordre 100 à 300.10⁻³ mg par g de poids sec pour les plantes cultivées non tolérantes selon White et Brown (2010). Nous avons ajouté 17,7 g de Zn en solution, soit une concentration d'autant plus importante que contrairement à un sol, la totalité du Zn ajouté en solution est biodisponible. A l'exception du rumex (figure 16b), toutes les espèces présentent des élongations aériennes (figure 14) et une biomasse (figure 16) supérieures ou égales au témoin en présence de zinc, ce qui souligne l'intérêt de ce matériel pour la résistance au zinc (Von Freckell-Insam et Hutchinson, 1993 ; Gomez et al., 2016 ; Rengel, 2000). Les concentrations en Zn au sein des parties aériennes demeurent toujours inférieures aux seuils de toxicités définis par White et

Brown (2010), même chez les plantes exposées au zinc ou au traitement mixte, ce qui laisse penser que ces espèces limitent l'absorption et la translocation du zinc et que leur résistance est liée à un processus d'exclusion plutôt qu'à un phénomène de tolérance, ce qui a déjà été suggéré par Gajic et al. (2016) chez *Festuca rubra*.

Toutefois, d'un point de vue qualitatif, l'analyse visuelle des plantes nous apprend que 3 des 9 plantes de houlques exposées au traitement « zinc » sont mortes (figure 18) et que plusieurs présentaient des signes de nécroses. *Holcus lanatus* L. était l'espèce qui a présenté le plus haut taux de mortalité – avec 33% de plantes mortes pour le traitement au zinc et 11% pour les plantes exposées au traitement mixte – mais c'est également la seule à avoir présenté un taux de mortalité chez les plantes témoins (tableau 8), ce qui donne à penser que la solution standard utilisée n'était pas optimale pour cette espèce. Une des silènes exposés au traitement cadmium était acaule (figure 21f). Plusieurs articles témoignent du fait que « l'accumulation de Cd dans les plantes peut provoquer plusieurs changements physiologiques, biochimiques et structurels » (Khan et al., 2009 ; Nazar, 2012 ; Aslam et al., 2014). Ce phénotype pourrait donc être lié à un impact hormonal, comme évoqué ci-dessus. Cette observation demeure cependant ponctuelle et ne concerne qu'une plante : nous ne pouvons donc exclure qu'un mutant soit accidentellement présent dans le lot de semences utilisé et que le phénotype ne soit pas dû à l'action de métaux lourds.

Le fait que la canche présente un retard de croissance suite à l'exposition au traitement mixte, mais pas suite à l'exposition au Pb seul, ou au Cd seul, pourrait corroborer les observations de Hutchinson et Cox (1984) selon lesquelles *Deschampsia cespitosa* L. présente une tolérance corrélée entre le Cd, le Pb et le Zn. A l'inverse, des phénomènes de « co-tolérance » chez cette espèce ont été rapportés par von Frenkel-Insam et Hutchinson (1993a, 1993b), mais cette co-tolérance varie en fonction des écotypes ou des populations étudiées et implique principalement le zinc et le nickel, ce deuxième élément n'ayant pas été étudié ici.

2. Influence d'une contamination multiple aux ETM sur la physiologie de cinq espèces végétales lors de l'expérience en conditions contrôlées sur culture hydroponique.

L'étude de la physiologie des cinq espèces étudiées s'est, entre autres, axée sur le taux de photosynthèse, puisqu'il s'agit d'un facteur clé contribuant au bon développement et à la croissance de la plante. Il ressort de notre expérience que les traitements au plomb et mixtes semblent diminuer fortement le taux de photosynthèse nette du silène (figure 23). Le plomb impacte également négativement le silène au niveau de son taux de transpiration instantanée

(figure 24) et sa conductance stomatique (figure 25) et augmente de façon significative la quantité de CO₂ intercellulaire (figure 26) par rapport aux plantes témoins. Cela peut s'expliquer par une moins bonne conversion du CO₂ en sucres. La réduction de la conductance stomatique en présence du plomb et du mélange s'explique aisément puisqu'une contamination au plomb a pour conséquence la fermeture des stomates suite à la synthèse d'acide abscissique (Zulfiqar et al., 2019). Le plomb agit également au niveau des canaux ioniques qui assurent le transport de K entre les cellules de garde et les cellules annexes, ce qui affecte la turgescence des cellules de garde et compromet l'ouverture de l'ostiole (Feki et al., 2021 ; Chen et al., 2022).

La fétuque, par contre, semble présenter des taux de photosynthèse nette (figure 23) supérieurs en présence de Cd ou du traitement mixte. Cette espèce semble également présenter un taux de transpiration instantanée (figure 24), une conductance stomatique (figure 25) et une concentration en CO₂ intercellulaire (figure 26) légèrement inférieurs - quoique de façon non significative - lorsque les plantes se développent dans des traitements contaminés au Pb, au Cd, au Zn ou au mélange de ces 3 ETM par rapport aux plantes qui se sont développées dans des milieux sans contamination. L'intérêt de *Festuca rubra* dans des stratégies de phytogestion a été souligné dans plusieurs études (Ma et al., 2003 ; Simon 2005 ; Gomez et al., 2016 ; Gajic et al., 2016). Une réduction de conductance stomatique peut s'expliquer par la nécessité de limiter les pertes en eau, les métaux lourds induisant toujours un stress hydrique secondaire (Noor et al., 2022 ; Thakur et al., 2022). Néanmoins, le fait que la concentration en CO₂ intercellulaire diminue démontre que l'assimilation de CO₂ se poursuit efficacement, la diminution du *C_i* pouvant alors s'expliquer par la fermeture partielle des stomates. Ce comportement peut donc s'intégrer dans la mise en place d'une stratégie de résistance et d'adaptation. Par contre, l'effet du cadmium sur le silène qui se marque par une augmentation de la transpiration (et des métaux lourds que le flux transpiratoire charrie) et une augmentation du *C_i* malgré la maintien de l'ouverture des stomates sont à interpréter comme des symptômes de dégâts puisqu'ils témoignent d'une inhibition de la photosynthèse alors que l'apport de CO₂ n'est pas un facteur limitant, une telle inhibition pouvant être associée à une altération de la Rubisco et/ou à d'autres enzymes de la phase sombre (Riyazuddin et al., 2022).

Les mesure de fluorescence chlorophyllienne suggèrent par contre que la phase claire de la photosynthèse est résiliente à une pollution, quelle que soit la nature de cette dernière. Rappelons qu'étant donné la taille des feuilles de *Festuca rubra* L., le fluorimètre n'a pas pu être utilisé sur cette espèce. Les figures 27, 28, 29 et 30 démontrent qu'aucune des pollutions aux trois métaux étudiés n'a eu d'influence significative sur l'efficacité quantique maximale

des PSII, l'efficacité réelle des PSII ou les taux d'extinctions photochimiques et non-photochimiques. Les quatre espèces présentent toutes des réponses comparables aux réponses des plantes témoins. La phase claire de la photosynthèse n'a pas été impactée par la contamination aux ETM ; les plantes traitées ne souffrent pas de dérèglement de la chaîne de transport des électrons. L'intégrité des systèmes photosynthétiques est donc maintenue, et plusieurs composés protecteurs peuvent intervenir in situation de stress pour garantir cette intégrité (Feki et al., 2021).

Seul le silène semble présenter des modifications au niveau du Non Photoschemical Quenching. Aucune de ces modifications n'est significative mais il est intéressant de souligner qu'une tendance à l'augmentation du NPQ est observée pour le Cd, alors qu'une réduction est rapportée pour les autres traitements. Une augmentation de NPQ est fréquente chez les plantes en conditions de stress et correspond à une augmentation de la dissipation de l'énergie incidente sous forme de chaleur : ce n'est pas, à priori un symptôme de dégâts puisque cela permet d'éviter qu'un excès d'énergie non utilisée n'endommage les photosystèmes et tout particulièrement les antennes collectrices (Maxwell et Johnson, 2000). Une réduction du NPQ est par contre plus rare, mais peut correspondre au fait que les antennes collectrices sont déjà altérées ou qu'une modification des teneurs en xanthophylles intervient, altérant de ce fait le processus de dissipation thermique : une telle réduction a été récemment rapportée par Luyckx et al. (2021) chez le chanvre exposé au Cd.

Si l'on se penche sur les dosages des concentrations en chlorophylles *a*, *b* et en caroténoïdes (respectivement, les figures 33, 34 et 35), nous remarquons que le plomb augmente de façon significative les concentrations en chlorophylles *b* et en caroténoïdes du rumex et les concentrations en chlorophylles *a* et en caroténoïdes de la canche (tableau 16) par rapport aux plantes témoins. Ceci peut sembler paradoxal puisque la toxicité du plomb est connue pour perturber l'ultrastructure des chloroplastes, réduisant de ce fait la synthèse de chlorophylle et de caroténoïdes (Zulfiqar et al., 2019). Le cadmium augmente les concentrations en chlorophylles *a*, *b* et en caroténoïdes de la fétuque et de la canche – mais pas de façon significative pour la chlorophylle *b* des canches – (figure 34). Ces observations contrastent avec les observations habituelles selon lesquelles le cadmium engendre une diminution de la chlorophylle totale, des chlorophylles *a* et *b* des plantes (Ashraf et al., 2016). Le rumex et la houlque ont des concentrations en chlorophylles *a* et en caroténoïdes qui chutent en présence du traitement mixte, alors que ces teneurs augmentent pour la canche (tableau 16).

Tableau 16 : Augmentation ou diminution des teneurs en chlorophylles a, b et en caroténoïdes pour les différentes espèces en fonction du traitement

ETM	Chlorophylle a	Chlorophylle b	Caroténoïdes
Plomb	↗ canche et ↘ silène	↗ rumex	↗ rumex et canche
Cadmium	↗ canche et fétuque	↗ fétuque	↗ canche et fétuque
Zinc	NA	NA	NA
Mix	↘ rumex et houlque ↗ canche	NA	↘ rumex et houlque ↗ canche et fétuque

A la vue de ces résultats, il semblerait que, dans les conditions de cette expérience, *Deschampsia cespitosa* L. présente une excellente résistance à la perturbation de sa synthèse en chlorophylle par les 3 ETM, puisque la synthèse de ces pigments est augmentée lors de son exposition au Cd, au Pb ou au mélange. Toujours dans ces conditions, *Festuca rubra* L. présente également une augmentation de ces pigments en présence de cadmium et n'est pas inquiétée par le mélange, tandis que *Rumex acetosa* L. présente une augmentation en chlorophylle b et en caroténoïdes en présence de plomb mais une diminution de chlorophylle a et en caroténoïdes en présence du traitement mixte.

Les observations visuelles confirment que le rumex avait des feuilles plus rouges pour le traitement au plomb que pour les autres traitements, ce qui pourrait être liée à la synthèse de pigments protecteurs contre les stress oxydatif (augmentation des teneurs en caroténoïdes ou synthèse de polyphénols et de flavonoïdes assumant une fonction antioxydante (figure 22). Une telle synthèse a déjà été mise en évidence chez *Festuca rubra* (Gajic et al., 2016). Pour le rumex, les feuilles du traitement mixte avaient commencé leur sénescence, ce qui explique la chute du taux de pigments. L'éthylène, principale hormone à action sénescence est connue pour stimuler les chlorophyllases (Woo et al., 2022). Les chutes de concentration en chlorophylle dans les plantes exposées au traitement mixte peuvent s'expliquer par une réduction de la production de chlorophylle, une dégradation du contenu existant, voir la combinaison de ces deux mécanismes (Ashraf et Harris, 2013). Un déficit de chlorophylle peut aussi être lié à une altération des membranes thylakoïdes des chloroplastes. Toutefois, cette hypothèse ne semble pas plausible ici puisque la mesure de l'efficacité photochimique des photosystèmes II (figure 28) montre que les photosystèmes de nos plantes traitées ne semblent pas affectés par le Cd, le Zn ou le Pb quand on compare leurs valeurs à celles des témoins.

Certes, une augmentation des teneurs en chlorophylle peut étonner, et pourtant, elle est rapportée dans la littérature pour des plantes exposées à des doses modérées de métaux lourds pour des durées limitées. En effet, il est connu que pour des feuilles dont le statut en cytokinine est maintenu, les voies de synthèse des chlorophylles au départ de leurs précurseurs sont assez

résistantes aux facteurs de l'environnement : une réduction de synthèse peut certes s'observer, mais si cette réduction est plus faible que la réduction de l'élongation du limbe, il y aura, par simple effet de « concentration », une augmentation des teneurs en pigments (Riyazuddin et al., 2022). Ce n'est que dans un second temps, lorsque la sénescence est clairement initiée (cf ci-dessus) qu'une activation des chlorophyllases conduit à une réduction effective des teneurs en pigments photosynthétiques (Woo et al., 2022).

Etant donné que le stress hydrique influence la conductance stomatique et le taux de photosynthèse nette, les teneurs en eau contenues dans les espèces végétales ont évidemment été étudiées. Les figures 31 et 32 nous apprennent qu'il n'y a pas de variation significative des teneurs en eau, que ce soit pour le système racinaire ou aérien. Etant donné le coefficient de variation très élevé du silène, les effets des traitements ne se traduisent pas par des différences statistiquement significatives, mais nous noterons cependant que le silène présente des teneurs en eau visiblement plus faibles dans ses parties aériennes lors d'une contamination au plomb. Cela s'expliquerait par le fait que le plomb altère les membranes, perturbant ainsi les teneurs en eau des cellules (Ghori, 2019 ; Sharma et Dubey, 2005).

3. Résistance des espèces végétales étudiées au stress oxydatif

Un des mécanismes de résistance des plantes face à la toxicité métallique, est de se protéger des stress oxydatifs que cette dernière entraîne, via des molécules antioxydantes ou des agents chélateurs. Le dosage du malondialdéhyde (MDA) permet d'estimer l'ampleur de la peroxydation des membranes lipidiques qui ont lieu dans les plantes lors de leur exposition aux ETM. La figure 36 nous apprend que les concentrations en MDA sont significativement plus élevées chez le silène en présence de plomb et du traitement mixte, ce qui, une fois de plus, confirme la forte sensibilité de cette espèce, en tous cas pour les plantes issus du lot de graines que nous avons reçu. Le plomb est connu pour produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui endommagent l'ultrastructure tissulaire (Kumar et Prasad, 2018), ce qui explique la libération de MDA, sous-produit de la dégradation oxydative des membranes lipidiques. Plusieurs études ont montré la sensibilité au stress oxydatif d'écotypes non-métalliques de *Silene vulgaris*. Pour Muszyńska et al. (2019 ; 2020), la sensibilité de ces écotypes est liée aux faibles performances d'enzymes antioxydantes comme l'ascorbate peroxydase. Outre les dégâts occasionnés aux membranes (Wiszniewska et al., 2020), Muszyńska et Labudda (2020) rapportent également une perturbation de la structure de multiples protéines.

La houlque, par contre, présente une diminution de concentration en MDA en présence de Cd et la fétuque présente une diminution de concentrations en MDA en présence de Cd et du traitement mixte. Le stress oxydatif fait partie de la vie de tout eucaryotes évoluant dans une atmosphère oxydante, même s'il n'est pas soumis au stress. Une réduction de MDA chez des plantes stressées demeure néanmoins surprenante. Deux hypothèses explicatives peuvent être envisagées : la première est que ces espèces sont particulièrement bien armées et qu'elles stimulent leurs barrières antioxydantes pour faire face à la situation (activation des enzymes antioxydantes, augmentation de la synthèse d'antioxydants endogènes) et que cette stimulation est tellement efficace qu'elle conduit à une réduction des teneurs en MDA comparativement à des plantes témoins chez lesquelles il n'y a pas de stimulation puisque ces plantes ne sont pas stressées. Une seconde hypothèse est à mettre en lien avec la nature même du MDA. Il est souvent admis dans la communauté scientifique qu'il s'agit d'un composé inerte, qui n'est pas catabolisé, qui n'est pas toxique et dont l'accumulation témoigne d'un stress oxydatif. Ceci n'est pas tout à fait correct : Del Rio et al. (2005) ont démontré que le MDA est un aldéhyde toxique qui peut entrer en interaction avec l'ADN et les protéines et que la réactivité même du MDA peut expliquer une réduction de ses teneurs APRES sa synthèse ; il existerait par ailleurs des mécanismes de détoxification du MDA chez les cellules animales, mais rien de tel n'a été rapporté à ce jour pour les cellules végétales.

Le glutathion et les phytochélatines, composés ayant un rôle primordial dans la détoxification des substances xénobiotiques, sont repris dans les thiols totaux (Righa et Bousseboua, 2015). Malheureusement, il ne nous a pas été possible de faire une distinction entre ces deux classes de composés, faute de matériel végétal disponible. Le glutathion est un antioxydant endogène qui intervient pour réparer les dégâts commis par les métaux lourds après la formation de composés d'oxygène actif, tandis que les phytochélatines interviennent pour séquestrer les métaux lourds par chélation et stockage vacuolaire avant qu'ils n'induisent la synthèse de ces composés d'oxygène actif. En outre, le glutathion est un précurseur des phytochélatines qui sont des polymères associant de 2 à 11 glutathion (Feki et al., 2021 ; Zhao et al., 2022). La synthèse de phytochélatine doit donc être finement régulée pour ne pas conduire à une perte de capacité antioxydante mais elle doit être suffisante que pour assurer la séquestration des ETM présents. Les teneurs en thiols totaux sont souvent plus importantes au niveau racinaire car c'est à ce niveau que les phytochélatines sont majoritairement produites. La différence entre les deux types d'organes est toutefois peu marquée dans notre étude (Figures 36 et 37). Au niveau racinaire, les teneurs en thiols totaux sont stimulées par la présence de Cd chez toutes les

espèces, sauf le rumex. Le zinc, par contre, n'induit pas d'accumulation racinaires de thiols (sauf chez la houlque) et ceci est à mettre en lien avec d'autres données obtenues dans notre laboratoire qui montrent que le cadmium se fixe sur les fonctions thiols des phytochélatines, mais que le zinc est incapable de s'y fixer et est plutôt associé à des acides organiques (Lefèvre et al., 2016). La houlque se caractérise par une forte accumulation de thiols totaux et cette accumulation importante s'observe en présence de Cd, de Zn et d'une pollution mixte, le Cd et le Zn ayant à priori une action additive (Figure 36). Rien, à ce stade ne permet de souligner que l'accumulation de thiols totaux est due aux phytochélatines plutôt qu'au glutathion dans ce cas précis, mais il faut signaler que *Holcus lanatus* présente une résistance particulièrement élevée à l'arsenic, un élément très efficacement associé aux phytochélatines, et qu'une capacité constitutive de cette espèce à synthétiser ces peptides non protéiques ne peut donc être exclue (Dradrach et al., 2020). Outre les phytochélatines, des protéines riches en cystéines, les métallothionéines, peuvent également intervenir dans la séquestration d'éléments au niveau de fonctions thiols. Ces protéines ont été identifiées et étudiées chez *Festuca rubra* (Ma et al., 2003) ainsi que chez *Silene vulgaris* (Nevrtalova et al., 2014) et les gènes correspondant peuvent être surexprimés en conditions de stress.

4. Etude du comportement des éléments-traces métalliques au sein des différentes plantes étudiées

Ce travail s'est concentré sur trois éléments-traces métalliques couramment rencontrés dans le cadre de pollutions terrestres aux métaux lourds : le cadmium, le plomb et le zinc. Puisque ces métaux sont souvent associés (dans les minerais naturels ou en métallurgie) (Yang et al., 2022 ; Oladoye et al., 2022) il a semblé pertinent d'étudier leurs effets combinés. Etant donné que nous cherchons à déterminer si les plantes étudiées sont résistantes à ces éléments-traces métalliques, comparer les valeurs relatives des ETM contenus dans les plantes exposées aux toxicités métalliques par rapport aux valeurs contenues dans les plantes témoins peut sembler plus important que de connaître les valeurs absolues.

Comme décrit précédemment, toutes les plantes exposées à une pollution au plomb présentent des quantités de plomb beaucoup plus élevées dans la partie racinaire que dans la partie aérienne (figures 38, 39, 40, 41 et 42). Ces teneurs élevées peuvent s'expliquer par la tendance du plomb à se lier sur les groupements carboxyles des composants du mucilage racinaire (Sharma et Dubey, 2005) et sur les polymères des parois cellulaires (principalement les composés pectiques et hémicellulosiques) (Thakur et al., 2022). Par ailleurs, un rinçage insuffisant des racines avant la minéralisation ne peut être exclu si l'on considère que le plomb est fortement adsorbé à la

surface des racines. Tafvizi et Babak (2014) qui ont étudié les effets du plomb sur l'accumulation du fer, du manganèse et du zinc dans *Zea mays* ont observé exactement la même chose : « *Les variétés de maïs étudiées dans l'expérience actuelle ont accumulé plus de Pb dans les racines que dans les pousses et ne peuvent donc pas être utilisées comme hyperaccumulateurs à des fins de phytoremédiation.* » Ces observations concordent avec les valeurs obtenues pour le facteur de translocation du plomb, qui sont très faibles chez les plantes exposées à cet élément (tableau 10).

On remarque que l'exposition au Pb, ou au traitement mixte, s'accompagne d'une augmentation des teneurs en fer dans les parties aériennes (pour le rumex) (figure 38) mais surtout racinaires (pour la houlque, la canche et la fétuque) (figures 39, 40 et 42). Ceci confirme les observations de Tafvizi et Babak (2014) selon lesquelles une contamination au plomb du sol accroît l'accumulation de Mn et de Fe dans les racines : les mécanismes sous-jacents demeurent inconnus, tout comme nous manquons d'information sur la nature des transporteurs susceptibles de contribuer à une absorption accidentelle de plomb (Sharma et Dubey, 2005 ; Feki et al., 2021). Chez le silène et la fétuque, les teneurs racinaires en fer sont significativement plus élevées pour les plantes exposées à 100 μM de Zn que pour les autres traitements. Etant donné que les ions de Zn^{2+} et Fe^{2+} hydratés ont des rayons similaires (Nagajyoti et al., 2010), nous nous attendions plutôt, par effet de compétition, à une réduction des teneurs en fer. L'homéostasie du fer est cependant très finement régulée chez les plantes et il a été démontré qu'une carence en fer pouvait, à terme, conduire à une augmentation de la densité des transporteurs afin de compenser cette carence (Murgia et al., 2022). Les teneurs en éléments ont été mesurées à la fin de l'expérience (soit après 8 semaines d'exposition) et un tel processus visant à compenser (ou surcompenser) une carence initiale en fer ne peut être exclu.

De façon générale, la translocation d'un élément peut influencer celle d'un autre élément, comme nous avons pu le remarquer dans le calcul des facteurs de translocation, où on voit clairement qu'une pollution au zinc augmente significativement la translocation du cadmium pour toutes les espèces (tableau 10). Par ailleurs, chez le rumex, la houlque, le silène et la fétuque (figures 38, 39, 41 et 42), l'exposition au plomb semble entraîner une augmentation de la quantité de Cu au niveau aérien et une exposition au Cd induirait une augmentation de la quantité de Cu racinaire chez le rumex, le silène et la fétuque (figure 38, 41 et 42). Les raisons sous-jacentes à ces observations demeurent imprécises. De façon générale, deux processus conditionnent la translocation des éléments vers les parties aériennes : d'une part le flux transpiratoire (lui-même conditionné par la conductivité hydraulique de la racine, l'anatomie

du système vasculaire et surtout la conductance stomatique et l'humidité relative de l'atmosphère) et d'autre part l'identité, la localisation, la sélectivité et la densité des transporteurs (Yang et al., 2022) si l'on ne tient pas compte d'un flux de by-pass résiduel au niveau endodermique. Il est difficile, à ce stade, de déterminer si une modification en un élément essentiel par suite d'une pollution en un autre élément est un effet « collatéral » d'une perturbation ou si elle répond à un besoin métabolique précis.

Les teneurs aériennes en fer étaient significativement plus élevées pour les plantes témoins que pour celles exposées au mélange Pb+Zn+Cd tandis que les teneurs racinaires étaient significativement plus faibles pour les témoins que pour les plantes contaminées au traitement mixte. Il semblerait donc que le traitement mixte diminue la translocation du fer vers les parties aériennes. Cela pourrait s'expliquer par l'inhibition de la Fe(III) réductase racinaire, induite par le Cd, conduisant à une carence en Fe(II), pouvant potentiellement gravement affecter la photosynthèse (Alcantara et al. 1994). Toutefois, il convient de souligner que la Fe(III) réductase ne joue de rôle prédominant que chez les dicotylédones (le rumex et le silène dans notre cas), alors que chez les graminées l'absorption de fer est contrôlée par l'excrétion de phytosidérophores. En outre, ce ne sont pas ces systèmes de transport qui sont impliqués dans le chargement des lames vasculaires.

On retrouve plus de cadmium dans les parties racinaires que dans les parties aériennes des plantes exposées au Cd et de la même façon on retrouve plus de zinc dans les parties racinaires que dans les parties aériennes des plantes exposées au Zn, sauf pour le rumex où les valeurs moyennes pour les 3 ETM sont plus élevées dans les parties aériennes. Ces observations vont dans le même sens que celles obtenues pour les facteurs de translocation estimé sur base des concentrations (tableau 10) où l'on peut voir que T_{Fc} du Cd diminue pour les plantes contaminées au cadmium (sauf chez le rumex) et que le T_{Fc} du Zn diminue pour les plantes contaminées au zinc (sauf chez le rumex). Ces facteurs de translocation élevés font de *Rumex acetosa* L. une parfaite candidate pour la phytoremédiation. L'intérêt de *Rumex acetosa* pour la bioremédiation de sols contaminés a déjà été envisagé (Zhao et al., 2012). Pourtant, selon le tableau 12 qui contient les valeurs de bioaccumulation des éléments, le rumex présente des facteurs de bioaccumulation plus faibles pour le cadmium et le zinc que les autres espèces. Toujours selon le tableau 12, c'est la houlque qui présentait les meilleurs facteurs de bioaccumulation pour ces 2 métaux.

Dans une optique de phytoremédiation, si on regarde les valeurs pour les parties aériennes, *Rumex acetosa* L. est la plante dont les teneurs en Cd et Zn sont les plus élevées ($5,06 \cdot 10^{-5}$ mg.g⁻¹ de MS pour le Cd et $3,13 \cdot 10^{-4}$ mg.g⁻¹ de MS pour le Zn) et *Holcus lanatus* L. est la plante dont les teneurs aériennes sont les plus élevées ($2,00 \cdot 10^{-4}$ mg.g⁻¹ de MS) pour le plomb. Ajoutons que, à quelques exceptions près, la présence d'un élément en excès dans la solution, a pour conséquence de réduire les TFC et TFq de cet élément par rapport aux témoins. Notons cependant que pour le Cd et le Pb, les valeurs de translocation des témoins pour ces éléments n'ont pas beaucoup de sens : en effet, ces éléments ne sont pas ajoutés dans la solution témoin et leur présence ne peut être liée qu'à des impuretés présentes dans les sels utilisés pour la solution nutritive et en des concentrations qui sont probablement en deçà du seuil de fiabilité de l'ICP.

Le tableau des facteurs de bioaccumulation (tableau 12) nous apprend que la pollution mixte augmente considérablement les facteurs de bioaccumulation du Cd, du Pb et du Zn chez toutes les espèces. Grâce à l'étude de l'additivité des toxicités (tableau 13), nous savons désormais que les effets des polluants ne sont pas additifs. Une interaction entre les polluants peut se produire dans la solution nutritive si l'on envisage la formation de précipités. Ceci, toutefois, n'explique pas une augmentation des facteurs de bioaccumulation dans la plante. Par ailleurs, l'utilisation du programme VisualMINTEQ utilisé lors de la conception des solutions nous indique que de tels précipités ne se forment pas et que la spéciation des ETM reste la même en solution simple et en solution mixte (Lutts, communication personnelle). C'est donc bien dans la plante que ces interactions ont lieu et des études complémentaires sont indispensables pour en préciser la nature antagoniste ou synergique. De telles interactions ont déjà été mise en évidence chez la houlque mais leur nature et leur importance varie en fonction des génotypes (Symeonidis et Karataglis, 1992).

Expérience de terrain

1. Etude de terrains polycontaminés aux métaux lourds en vue de l'établissement d'une phytocénose métallicole

Si les études en culture hydroponique nous ont permis de mieux comprendre le comportement des plantes exposées aux métaux lourds, elles ne sont toutefois pas pleinement représentatives des situations de terrain. Sur sol pollué, le comportement des plantes est également fonction de la structure et de la texture des sols. En outre, les plantes établissent des relations avec leur environnement biotique et ces interactions peuvent considérablement influencer la réponse des plantes aux polluants. *Deschampsia cespitosa* par exemple établit des symbioses mycorhiziennes (Gucwa-Przepióra et al., 2007 ; 2013). De même, le comportement de *Silene vulgaris* est influencé par les bactéries présentes dans la rhizosphère (García-Gonzalo et al., 2017) et la nature de la communauté microbienne est elle-même influencée par la présence de métaux lourds (Pacwa-Plociniczak et al., 2018). Enfin, il est admis que, dans la limite de leurs solubilités, les éléments ajoutés en solution nutritive sont totalement disponibles pour la plante, alors qu'en conditions de sols, la biodisponibilité influencées par de multiples paramètres pédologiques limite le transfert des éléments du sol vers la plante (Alloway, 2013). Toutes ces considérations justifient qu'une approche réalisée en culture hydroponique soit complétée par une approche de terrain.

Comme on a pu le voir précédemment, le plomb est presque absent sur le terrain de contrôle (Corroy) et ne dépasse pas les normes industrielles pour les deux autres sites expérimentaux (figure 44). Bien que l'Analyseur XRF Thermo Scientific Niton GOLDD portable n'était pas programmé pour mesurer le taux de cadmium contenu dans le sol, l'appareil a tout de même détecté sa présence à Villers. Sclessin présentait une pollution au zinc, très utilisé en aciérie, à un taux qui nécessite une intervention (tableau 14). Le site étant laissé « à l'abandon », cela en fait un très bon terrain d'étude pour la mise en place d'une phytocénose métallicole en vue de la gestion de sites pollués aux métaux lourds. Etant donné que le site de Corroy présentait des valeurs inférieures aux normes pour les 3 métaux, cela nous conforte dans notre choix de « terrain contrôle ».

Afin de mieux comprendre les terrains sur lesquels nous travaillons, le rapport C/N – ou le rapport massique du carbone sur l'azote – a été étudié. Ce rapport est un indicateur qui permet de se faire une idée du degré d'évolution de la matière organique dans le sol. Le dosage du rapport du carbone sur l'azote (figure 45) nous apprend que le ratio C/N était fort différent pour

les 3 sites expérimentaux. Le sol de la ferme expérimentale de Corroy présentait un taux moyen compris entre 8 et 12, soit un rapport optimal permettant une bonne activité microbienne et un bon équilibre entre humification et minéralisation (Requasud¹¹ – Fiche explicative carbone). Ceci n'est pas surprenant puisqu'il s'agit du champ de culture, donc surveillé et amendé pour assurer la meilleure fertilité au sol. Les sols de l'industrie 5N+ à Villers-la-Ville et de Duferco à Sclessin présentait des taux moyens bien supérieurs à 12 (respectivement 19 et 33) (figure 45). Cela se traduit par une minéralisation excessivement lente et, par conséquent, un stock d'humus élevé et moins d'éléments nutritifs à disposition des plantes (Requasud – Fiche explicative carbone).

Etant donné que la phytodisponibilité des métaux est directement affectée par le pH du sol (Alloway, 2013), il était primordial de connaître celui-ci pour les différents terrains étudiés. La figure 46 nous apprend que les trois sites ont des sols basiques. Avec un pH moyen de 7, le sol de Corroy présente une acidité qui permet une bonne disponibilité des minéraux et autres éléments nutritifs (Requasud – Fiche explicative pH). Encore une fois, le fait qu'il s'agisse d'un champ agricole n'est peut-être pas étranger à ce résultat. Villers-la-Ville a un sol dont le pH moyen avoisine 8, soit un pH pour lequel les métaux ont une mobilité moindre (Shah et Daverey, 2020). Enfin, Sclessin a un pH moyen qui dépasse 9 (figure 46). Il s'agit donc d'un sol dans lequel les métaux vont s'absorber sur les particules de sol pour former des ligands organométalliques, limitant fortement leur mobilité (Shah et Daverey, 2020). L'analyse de la variance à 2 facteurs nous a confirmé que le traitement appliqué n'avait pas d'effet sur le pH et que celui-ci dépendait uniquement des sites. De façon générale, la biodisponibilité que nous avons estimée est très faible pour les éléments pris en considération. Soulignons néanmoins que dans le cas particulier de 5N+, la société commercialise, outre le Zn et le Cd, des métaux semi-conducteurs tels que l'antimoine (Sb), le bismuth (Bi), le tellure (Te) et l'indium (In). Si nous n'avons pas tenu compte de ces éléments dans notre approche, par souci de cohérence, nous ne pouvons exclure que le comportement des plantes soit aussi influencé par leur éventuelle présence dans le substrat.

Suite à l'étude des teneurs moyennes en éléments dans les sols, nous savons qu'il n'y a pas eu de variation des taux en ETM entre 2020 et 2021, sauf pour la quantité de plomb contenue dans le sol de Villers-la-Ville (figure 47). Cette augmentation est surprenante. Si le site de Villers

¹¹ REQUASUD est un réseau de laboratoires wallons qui mesure la qualité du milieu et la qualité des produits agricole et agroalimentaire. Ils donnent également des conseils agronomiques pour gérer au mieux les Cultures et travaillent, entre autre avec le CRA-W, l'UCL et Gembloux Agro - Bio Tech.

est toujours en activité, celle-ci ne semble pas devoir conduire à une augmentation des teneurs sur des intervalles de temps aussi courts. La figure 48 nous a permis d'apprendre qu'à Villers, les parcelles arrosées au vermicompost avaient des teneurs plus élevées en Cd et en Pb que les parcelles sur lesquelles nous ne sommes pas intervenus. Cette observation est également très surprenante, le vermicompost n'apportant pas ces polluants. L'explication la plus probable réside dans le fait que sur sols pollués, il existe une très grande hétérogénéité dans la distribution des éléments (Yang et al., 2022) et que les points d'échantillonnage n'étant pas parfaitement identiques en 2020 et 2021, les prélèvements de la seconde année ont peut-être été réalisés dans des zones plus contaminées.

Le vermicompost apporte beaucoup de substances humiques et son effet bénéfique sur les plantes peut en partie être expliqué par cet apport. Dans notre cas, toutefois, les sols contaminés (Villers et surtout Sclessin) sont déjà caractérisés par une teneur importante en matière organique, ou, en tous cas, par un rapport C/N élevé. Or un taux de matière organique élevé peut entraîner une plus grande rétention des ETM (Cipullo et al., 2018 ; He et al., 2017 ; Zhang et al., 2020) et ceci cadre bien avec les faibles biodisponibilités que nous avons observées dans notre étude. De nombreuses études montrent qu'un apport de vermicompost permet de réduire la biodisponibilité des ETM par fixation sur différents groupes (He et al., 2017 ; Liu et al., 2019 ; Wang et al., 2022 ; Khosropour et al., 2022 ; Sengupta et al., 2022). Cette réduction de biodisponibilité n'est pas nécessairement incompatible avec une stratégie de phytoextraction : en effet, Hoehne et al. (2016) ont montré qu'une réduction de biodisponibilité permet d'assurer une très forte stimulation de la croissance, notamment au niveau racinaire, de telle sorte que le prélèvement par la plante est au total plus important. Il importe de souligner que ces études concernent exclusivement le vermicompost solide, alors que c'est une formulation liquide que nous avons utilisé dans nos essais, et concernent souvent des sols miniers acides pauvres en matière organique, soit très différents de ceux que nous avons traité. A notre connaissance, seuls Santos et al. (2022) ont étudiés les effets d'un extrait liquide dans le cadre de problématiques de pollution, mais cette étude concerne l'arsenic (dont la chimie est très différente des cations analysés ici) et se déroule en solution nutritive, n'apportant donc pas d'informations complémentaires sur l'effet d'un vermicompost liquide sur la biodisponibilité des ETM. Afin de vérifier l'influence des facteurs qui précèdent, nous avons donc mesuré la biodisponibilité des ETM dans les sols. La figure 49 confirme qu'il n'y a pas d'effet du traitement et que la biodisponibilité des métaux dépend des propriétés du site.

Les questions qui se posent sont donc de savoir si la matière organique soluble présente dans une formulation liquide est capable de se fixer aux ETM, si elle reste soluble après cette fixation et si le complexe obtenu est susceptible d'être absorbé par la plante ou percolera dans le profil, ce qui n'est pas en soit le but recherché. A Corroy l'ajout de vermicompost liquide n'a pas eu d'influence sur les teneurs en métaux du sol et à Sclessin le vermicompost a permis de diminuer les teneurs du sol en Pb et Zn (figure 48). Une étude menée par Lv et al. (2016) a montré qu'après 90 jours d'utilisation de vermicompost, le pH, le carbone organique total et le rapport C/N avaient été réduits, tandis que la conductivité électrique augmentait. Ces changements de propriétés du sol permettraient une meilleure mobilité des métaux dans le sol de Sclessin, ce qui pourrait expliquer la diminution des teneurs. Etant donné les grandes différences de propriétés des sols des sites expérimentaux, des effets différents de l'application de vermicompost liquide ne seraient pas surprenants.

Le mélange d'espèces semées semble également avoir un effet d'augmentation des teneurs en Cd et Pb du sol à Villers quand on compare les résultats avec ceux des parcelles sur lesquelles nous ne sommes pas intervenus (figure 48). L'association du semi et de l'arrosage de vermicompost, a tendance à réduire les teneurs en ETM des sols, notamment en Cd et en Pb pour Villers et en Zn pour Sclessin. La question est de déterminer si cela est dû au bon développement d'une phytocénose métallicole qui a permis la phytoextraction de ces métaux. Le dosage des ETM dans les plantes (Figure 53) n'indique pas une teneur plus importante pour les plantes fertilisées au vermicompost mais la production en biomasse avait tendance à être plus importante pour le site de Villers.

La biodisponibilité du Cd était plus importante à Villers qu'à Corroy et Sclessin en 2020, alors qu'en 2021 la différence avec Corroy n'était plus. Les valeurs moyennes nous apprennent que la biodisponibilité du Cd a augmenté à Corroy tandis qu'elle n'a pas changé à Villers. Ce changement de biodisponibilité peut être la conséquence de plusieurs facteurs : modification du pH du sol, un amendement en éléments minéraux, etc. liés à l'entretien de la parcelle ou un changement des exsudats racinaires émis suite à l'apparition d'une nouvelle végétation sur le champ de culture mis à notre disposition (cf. tableau 15 pour connaître les espèces qui ont poussé sur les parcelles de Corroy). En effet, de nombreuses plantes issues de la banque de graines du sol se sont développées au sein de nos parcelles, au point de rentrer en compétition, dans certains cas, avec la végétation que nous avons semées.

2. Impact de l'application de vermicompost (biostimulant) liquide sur la dynamique de population du mélange d'espèces végétales en conditions de terrain.

Stimulation de la croissance et du rendement végétal par apport de vermicompost liquide « thé »

Le vermicompost est constitué de produits de la digestion de déchets organiques par des lombrics. Il permet d'améliorer la santé du sol, sa vie microbienne ainsi que l'état et la disponibilité des éléments nutritifs (Adhikary, 2012). Le vermicompost utilisé dans le cadre de cet expérience provient de la société PUR VER[®] qui utilise les vers composteurs *Eisenia fetida* et *andrei* à qui ils fournissent des déchets organiques : matières végétales locales (drêches de brasserie, marc de café,...) ou sous-produits d'animaux tels que le fumier (PUR VER - Lombricompostage). Nous avons utilisé un vermicompost liquide (appelé « thé » car obtenu par infusion du vermicompost liquide), le Green Booster[®] un biostimulant produit à partir du vermicompost PUR VER[®] à l'aide d'un procédé d'extraction. Il ne s'agit donc pas de « vermicompost leachate », qui est la fraction liquide récupérée au terme du processus de compostage et dont l'utilisation est rapportée dans certaines études (Bibadabi et al., 2016 ; Benazzouk et al., 2020).

L'arrosage au vermicompost n'augmente pas significativement la biomasse produite dans le cadre de notre expérience, mais une tendance manifeste doit être soulignée pour le site de Villers, où la biomasse moyenne produite par les parcelles semées augmente de plus de 60% suite à l'apport de vermicompost. Une telle augmentation ne se présente pas à Sclessin. En outre, le tableau 15 nous apprend que le fait d'arroser nos parcelles non semées de vermicompost a permis à plus d'espèces de s'installer par rapport aux parcelles non semées et non arrosées de vermicompost. L'analyse descriptive nous a montré que nos parcelles ont gardé une végétation propre au site sur lequel elles se trouvaient ; A Corroy on trouvait une végétation spontanée typique des bords de champs, à Villers on trouvait des adventices courantes aux pelouses tandis qu'à Sclessin peu d'espèces ont réussi à se développer sur ce sol très caillouteux. De notre mélange de graines, seule *Silene vulgaris* s'est développée sur les parcelles semées de Sclessin (tableau 15). Le contenu en eau des plantes n'était pas lié, aux différents traitements non plus (figure 53).

Modification des taux d'accumulation des ETM suite à l'apport de vermicompost liquide

L'analyse des plantes s'étant développées sur les différents terrains nous a appris que les teneurs en zinc dans les plantes ne dépendaient ni du site, ni du traitement (semis et ou arrosage de vermicompost) appliqué (figure 54). L'absorption du zinc est principalement régie par les transporteurs de Zn et les chélateurs de métaux du système végétal, ainsi que par le stade de croissance des plantes, les facteurs édaphiques, la saison, etc. (Gupta et al., 2016).

Les teneurs en Pb, elles, dépendaient bien du site et étaient significativement plus élevées, pour les plantes ayant poussé sur les parcelles de Villers par rapport à Corroy ou Sclessin, tous traitements confondus (figure 54). Il y a là un lien évident avec les teneurs en plomb du sol de Villers (figure 47). Dans une expérience sur la phytoextraction du plomb assistée par des champignons, Manzoor et son équipe (2019) ont observé que l'augmentation de la concentration en Pb dans le sol s'accompagnait souvent d'une augmentation des concentrations solubles en cet élément dans la solution du sol. Le taux élevé de plomb dans le sol de Villers expliquerait donc de lui-même le taux plus élevé de plomb que l'on retrouve dans les plantes qui s'y sont développées.

A la figure 54, nous avons également remarqué que l'application de vermicompost sur des parcelles non semées avait significativement augmenté les teneurs en Cd contenus dans les plantes ayant poussé sur ces parcelles à Villers, en comparaison à toutes les autres parcelles de Corroy ou Sclessin. Les teneurs en Cd étaient significativement plus importantes chez les plantes ayant poussé sur des parcelles semées et arrosées de vermicompost (Vermi+Semis) à Villers-la-Ville que chez les plantes ayant poussé sur des parcelles semées et arrosées de vermicompost à Sclessin. Il en va de même pour les parcelles sur lesquelles aucune intervention n'a eu lieu (Rien). Or nous savons que les teneurs moyennes du sol en cadmium sont comparables entre Villers et Sclessin (figure 47), bien qu'il y ait une différence dans les teneurs contenues dans les plantes. Rappelons que Sclessin avait un pH extrêmement élevé ; le pH conditionne fortement la mise en solution, et par conséquent, la biodisponibilité des minéraux. Le pH trop élevé de Sclessin, rend le cadmium moins phytodisponible qu'à Villers. Ceci peut expliquer les différences de teneurs en Cadmium et en Plomb des plantes s'étant développées à Villers-la-Ville par rapport à celles s'étant développées à Sclessin. En outre, il est possible que la nature même de la végétation spontanée issue de la banque de graines à Villers soit plus compatible avec une absorption de Cd, tout comme il est fort possible que toutes les espèces ne réagissent pas de la même façon à une certaine dose de vermicompost.

Conclusion

Cette expérience qui s'est déroulée sur une période de deux ans pour la partie « terrain » et sur une période de 10 mois pour la partie « serre », a eu pour but d'étudier la résistance aux toxicités du Cd, du Zn et ou du Pb de 5 espèces végétales (*Rumex acetosa* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Holcus lanatus* L., *Festuca rubra* L., *Deschampsia cespitosa* L.) en vue de les associer dans le cadre d'une stratégie de phytoremédiation aux éléments-traces métalliques. Il a également été question d'expérimenter l'impact de l'apport d'un biostimulant sous forme de vermicompost liquide « thé » sur cette phytocénose métallicole.

Dans un premier temps, l'expérience en culture hydroponique nous a appris que la morphologie des espèces a souffert de leur exposition à des taux élevés de Cd et Pb (retard de croissance et diminution de la biomasse), mais que celles-ci semblent mieux armées pour faire face à un excès de Zn. Les cinq espèces étudiées font appel à un processus d'exclusion plutôt qu'à un phénomène de tolérance. Au niveau de la phase sombre de la photosynthèse, l'étude des réponses physiologiques a montré que le plomb semble impacter *Silene vulgaris* plus négativement que les autres espèces et que *Festuca rubra* présente une bonne stratégie d'adaptation aux ETM. Par contre, nos analyses suggèrent que la phase claire de la photosynthèse est résiliente aux pollutions étudiées ; l'intégrité des systèmes photosynthétiques a été maintenue. Dans le cadre de notre expérience *Deschampsia cespitosa* a présenté une excellente résistance à la perturbation de sa synthèse en chlorophylle puisque la synthèse de ses pigments était augmentée lors de son exposition au Cd, au Pb ou au mélange. Le dosage des concentrations en MDA a confirmé la sensibilité de notre cultivar commercial de *Silene vulgaris* au plomb et les teneurs en thiols totaux étaient stimulées par la présence de Cd chez toutes les espèces, sauf le rumex.

Au niveau de l'accumulation des métaux dans les plantes cultivées en milieu hydroponique ; toutes les espèces exposées à une pollution au plomb présentaient des quantités de plomb beaucoup plus élevées dans la partie racinaire que dans la partie aérienne et l'exposition au plomb s'accompagnait d'une augmentation des teneurs en fer, majoritairement dans les racines. De plus, il semblerait que notre traitement mixte diminue la translocation du fer vers les parties aériennes. Le calcul des facteurs de translocation, nous a permis de remarquer qu'une pollution au zinc augmente significativement la translocation du cadmium chez toutes les espèces. On retrouve plus de cadmium dans les parties racinaires des plantes exposées au Cd et plus de zinc

dans les parties racinaires des plantes exposées au Zn que dans leurs parties aériennes, sauf pour le rumex où les valeurs moyennes pour les 3 ETM sont plus élevées dans les parties aériennes.

Ces facteurs de translocation élevés font de *Rumex acetosa* une parfaite candidate pour la phytoremédiation. Dans une optique de phytoremédiation, si on regarde les valeurs pour les parties aériennes, *Rumex acetosa* est l'espèce dont les teneurs en Cd et Zn sont les plus élevées et *Holcus lanatus* l'espèce dont les teneurs sont les plus élevées pour le Pb. La prise en considération du traitement mixte associant les 3 ETM nous montre que ces derniers n'ont pas un effet additif sur les plantes et que des interactions dont la nature reste à préciser se manifestent au sein de celles-ci.

Dans un second temps, l'expérience en conditions de terrain polycontaminé nous a permis de remarquer que le mélange d'espèces semées semblait avoir un effet d'augmentation des teneurs en Cd et Pb pour un de nos sites expérimentaux, quand on compare les résultats avec ceux des parcelles sur lesquelles nous ne sommes pas intervenus. L'association du semi et de l'arrosage de vermicompost, a tendance à réduire les teneurs en ETM des sols. L'expérience de terrain nous a permis d'observer que l'augmentation de la concentration en Pb dans le sol s'accompagnait souvent d'une augmentation des concentrations solubles en cet élément dans la solution du sol, ce qui expliquerait le taux plus élevé de plomb que l'on retrouve dans les plantes qui se sont développées sur des sols pollués au Pb. De notre mélange de graines, seule *Silene vulgaris* s'est développée sur les parcelles semées de Sclessin.

Enfin, nous avons appris que l'addition de vermicompost liquide « thé » n'avait pas d'effet sur la biodisponibilité des métaux contenus dans le sol de nos parcelles expérimentales (déjà prédisposées à une faible mobilité des métaux dans le sol de par leur pH et leur fraction humique élevés). Le dosage des ETM dans les plantes n'indique pas de teneurs plus importantes pour les plantes fertilisées au vermicompost, mais la production en biomasse avait tendance à être plus importante pour un de nos sites (Villers) et un plus grand nombre d'espèces issues de la banque de graines avaient pu croître sur les parcelles arrosées de thé de vermicompost par rapport aux parcelles non semées et non arrosées de vermicompost.

Nous sommes conscients qu'un certain nombre d'informations additionnelles permettraient de mieux éclaircir les résultats obtenus. Ainsi, il serait intéressant de comparer les réponses des cultivars s'étant développés sur un site pollué, à l'aide de graines provenant de sites calaminaires, par rapport à nos écotypes commerciaux. En outre, nos sites expérimentaux ont été choisis pour leur pollution spécifique, mais nous avons vu que cela engendrait une

importance prépondérante du facteur site dans nos analyses statistiques. Une option intéressante serait de refaire l'expérience de terrain sur plusieurs sites choisis aléatoirement parmi les sols wallons et de regarder si l'effet du site est toujours prépondérant à l'effet du traitement. De plus nous avons vu que les sols des sites choisis étaient excessivement basiques. Une expérience complémentaire pourrait-être de vérifier si l'acidification du sol par moyen biologique (aiguilles de sapins), diminuerait le pH et augmenteraient la biodisponibilité des ETM. Nous savons que les plantes établissent des relations avec leur environnement biotique et que ces interactions peuvent considérablement influencer la réponse des plantes aux polluants : il pourrait donc être judicieux d'inoculer les parcelles de terrains expérimentaux avec une microflore mycorhizienne ou une microfaune bactérienne adaptées.

Bibliographie

- ADC BioScientific Ltd, 2004. LCi Portable Photosynthesis System.
- Adhikary, S. (2012). Vermicompost, the story of organic gold: A review.
- Alcántara, E., Romera, FJ, Cañete, M., & De la Guardia, MD (1994). Effets des métaux lourds sur l'induction et la fonction de la Fe (III) réductase racinaire chez les plantes de concombre déficientes en Fe (*Cucumis sativus* L.). *Journal de Botanique Expérimentale*, 45, 1893-1898.
- Aleman-Ramirez, J.L., Pérez-Sarinana, B.Y., Torres-Arellano, S., Saldana-Trinidad, S., Longoria, A., Sebastian, P.J. (2020) Bioethanol production from *Ataulfo mango* supplemented with vermicompost leachate. *Catalysis Today* 353:173-179.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91:869-881. ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- Alloway, B.J. (2013) Bioavailability of elements in soil. In: *Essential of Medical Geology; Revised Edition*. O. Selinus et al. (eds). Springer Science; pp 351-373.
- Aremu, A.O., Stirk, W.A., Kulkarni, M.G. et al. (2015) Evidence of phytohormones and phenolic acids variability in garden-waste-derived vermicompost leachate, a well known plant growth stimulant. *Plant Growth Regulation* 75:483-492.
- Ashraf, M. H. P. J. C., & Harris, P. J. (2013). Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.
- Ashraf, M. Y., Roohi, M., Iqbal, Z., Ashraf, M., Öztürk, M., Gücel, S. (2016) Cadmium (Cd) and lead (Pb) induced changes in growth, some biochemical attributes, and mineral accumulation in two cultivars of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47:405-413.
- Aslam, R., Ansari, M. Y. K., Choudhary, S., Bhat, T. M., & Jahan, N. (2014). Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annum* L.—An important spice crop of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 465-472.
- Azevedo, H., Gomes Glória Pinto, C., Santos, C. (2005) Cadmium effects in sunflower: membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. *Journal of Plant Nutrition*, 28:12, 2233-2241.

- Aziz, M.A., Ahmad, H.R., Corwin, D.L., Sabir, M., Ozturk, M., Hakeem, K.R. (2016) Influence of farmyard manure on retention and availability of nickel, zinc and lead in metal-contaminated calcareous loam soils. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 25:289–296.
- Baize, D. Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français, premiers résultats du programme ASPITET. *Courier de l'environnement de l'INRA n°22*, INRA, Unité de Science du sol, 45160 Ardon
- Baize, D., Girard, M-C. (2008) *Référentiel pédologique*, Association française pour l'étude du sol. Editions Quae, 405 pages. ISBN 2759201856, 9782759201853.
- Barrutia, O., Epelde, L., Garcia-Plazaola, J.I., Garbisu, C., Becerril, J.M. (2009) Phytoextraction potential of two *Rumex acetosa* L. accessions collected from metalliferous and non-metalliferous sites : effects of fertilization. *Chemosphere* 74:259-264.
- Barrutia, O., Garbisu, C., Hernandez-Allica, J., Garcia-Plazola, J.I., Becerril, J.M. (2010) Differences in EDTA-assisted metal phytoextraction between metallicolous and non-metallicolous accessions of *Rumex acetosa* L. *Environmental Pollution* 158:1710-1715.
- Begum, G., Malairajan, S. (2019). Phytoremediation of heavy metals Pb and Cr in contaminated soil by *Holcus lanatus* and *Cynodon dactylon* plants. *Journal of Science* 9:49-54. DOI:10.21276/jos.2019.9.2.3
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 21-34.
- Benazzouk, S., Dobrev, P.I., Djzouli, Z.E., Motyka, V., Lutts S. (2020) Positive impact of vermicompost leachate on salt stress resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) at the seedling stage: a phytohormonal approach. *Plant and Soil* 446:145-162.
- Bhat, S.A., Sing, J., Vig, A.P. (2018) Earthworms as organic wastemanagers and biofertilizer ptoducers. *Waste and Biomass Valorization* 9:1073-1086.
- Bhat, J.A., Shivaraj, S.M., Singh, P., Navadagi, D.B., Tripathi, D.K., Dash, P.K., Solanke, A.U., Sonah, H., Deshmukh, R. (2019) Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. *Plants* 8:71. <https://doi.org/10.3390/plants8030071>
- Bibadabi, S. S., Afazel, M., Poodeh, S. D., 2016. The effect of vermicompost leachate on morphological, physiological and biochemical indices of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a soil less culture system. *International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture* 5:251-262.

- Boldyrev, M. (2018). Lead: Properties, history, and applications. WikiJournal of Science, 1(2), 1-23.
- Brungezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., Neumann, D. (1999) Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. Journal of Plant Physiology 154: 536-546
- Bruxelles environnement, Les différentes techniques. Online. Mis à jour le : 02/08/2017, consulté le : 15/12/2021. Retrieved on : <https://environnement.brussels/thematiques/sols/le-traitement-des-sols-pollues/quelles-sont-les-differentes-techniques>
- Chaâbene Z., Rorat A., Rekik Hakim I., Bernard F., Douglas G.C., Elleuch A., Vandebulcke F., Mejdoub H. (2018) Insight into the expression variation of metal-responsive genes in the seedling of date palm (*Phoenix dactylifera*) Chemosphere 197:123-134, 10.1016/j.chemosphere.2017.12.146
- Chen, L., Beiyuan, J., Hu, W., Zhang, Z., Duan, C. et al. (2022) Phytoremediation of potentially toxic elements (PTEs) contaminated soils using alfalfa (*Medicago sativa* L.): a comprehensive review. Chemosphere 293:133577.
- Chinsamy, M., Kulkarni, M.G., Van Staden J. (2013) Garden-waste-vermicompost leachate alleviates salinity stress in tomato seedlings by mobilizing salt tolerance mechanisms. Plant Growth Regulation 71:41-47.
- Cipullo, S., Snapir, B., Tardif, S., Campo, P., Prpich, G., Coulon, F. (2018) Insights into mixed contaminants interactions and its implication for heavy metals and metalloids mobility, bioavailability and risk assessment, Science of The Total Environment 645:662-673, ISSN 0048-9697.
- Code Wallon des bonnes pratiques, Décret du 5 décembre 2008 relatif à la gestion des sols, Version 3, Guide de Référence pour le Projet d'Assainissement, Direction Générale Opérationnelle, de L'agriculture, des Ressources Naturelles et de L'environnement, Département du Sol et des Déchets, Direction de la protection des sols et Direction de l'assainissement des sols.
- Coulaud, J., McNeilly, T. (1992) Zinc tolerance in populations of *Deschampsia cespitosa* (Graminaea) beneath electricity pylon. Plant Systematic and Evolution 179:175-185.
- Datta, S., Singh, J., Singh, S., Singh, J. (2016) Earthworms, pesticides and sustainable agriculture : a review. Environmental Science and Pollution Research 23:8227-8243.
- De Fatima-Esteves, G., Diazo de Souza, K.R., Brassanin, I.A. et al. (2020) Vermicompost improves maize, millet and sorghum growth in iron mine tailings. Journal of Environmental Management 264:110468.

- De Litardiere, R., (1950) Sur le *Festuca rubra* L. subsp. *violacea* (GAUD.) HACK. dans les Pyrénées, p. 75- 76 - Départ./Région : , Le Monde des plantes, 7, N°272
- De Vos, C.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H. (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. Plant Physiology 98:853-858.
- Degryse, F., Broos, K., Smolders, E., Merckx, R. (2003). Soil solution concentration of Cd and Zn can be predicted with a CaCl₂ soil extract. European Journal of Soil Science 54: 149-158.
- Degryse, F., Verma, V.K., Smolders, E. (2008) Mobilization of Cu and Zn by root exudates of dicotyledonous plants in resin-buffered solutions and in soil. Plant and Soil 306:69–84. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9449-4>
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 15:316-328.
- Dradrach, A., Karczewska, A., Szopka, K. (2020) Arsenic uptake by two tolerant grass species : *Holcus lanatus* and *Agrostis capillaris* growing in soils contaminated by historical mining. Plants 9:980.
- Dumas, J. B. A. (1831). Procédés de l'analyse organique. Ann. Chim. Phys, 47:198-205.
- ELEMENTAR Analysensysteme, vario EL cube CHNS analyseur élémentaire, Fiche produit, Online. Consulté le : 20 décembre 2021. Retrieved on : <https://www.elementar.com/fr/produits/analyseurs-elementaires-organiques/vario-el-cube>
- Favas, P.J.C., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M.S. (2014) Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora, Environmental Risk Assessment of Soil Contamination, Maria C. Hernandez-Soriano, IntechOpen, DOI: 10.5772/57469.
- Feki, K., Tounsi, S., Mrabet, M., Mjadhbi, H., Brini, F. (2021) Recent advances in physiological and molecular mechanisms of heavy metal accumulations. Environmental Science and Pollution Research 28:64967-64986.
- Gajic, G., Djurdjevic, L., Kostic, O., Jaric, S., Mitrovic, M., Stevanovic, B., Pavlovic, P. (2016) Assessment of the phytoremediation potential and an adaptative response of *Festuca rubra* L; sown on fly ash deposits: native grass has a pivotal role in ecorestoration management. Ecological Engineering 93:250-261.

- Garcia-Gonzalo, P., Pradas del Real, A.E., Lobo, M.C., Pérez-Sanz, A. (2017) Different genotypes of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke grown on chromium-contaminated soils influence root organic acid composition and rhizosphere bacterial communities. *Environmental Science and Pollution Research* 24:25713-25724.
- Garg, V.K., Suthar, S., Yadav, A. (2012) Management of food industry waste employing vermicompost technology. *Bioresource Technology* 126:437-443.
- Gavrilescu, M. (2022) Enhancing phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Current Opinion in Biotechnology* 74:21-31.
- Gawęda, M. (2009) Heavy metal content in common sorrel plants (*Rumex acetosa* L.) obtained from natural sites in Małopolska province. *Polish Journal of Environmental Studies* 18:213-218.
- Ghori, N.-H., Ghori, T., Hayat, M.Q., Imadi, S.R., Gul, A., Altay, V., Ozturk, M. (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 16:1807–1828.
- Göhre, V., Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223:1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0225-0>
- Gomez, J., Yunta, F., Esteban, E., Carpena, R.O., Zornorza, P. (2016) Use of radiometric indices to evaluate Zn and Pb stress in two grass species (*Festuca rubra* L. and *Vulpia myuros* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 23:23329-23248.
- Guarino, F., Miranda, A., Castiglione, S., Cicatelli, A. (2020) Arsenic phytovolatilization and epigenetic modifications in *Arundo donax* L; assisted by a PGR consortium. *Chemosphere* 251:126310.
- Gucwa-Przepiora, E., Blaskowski, J., Kurtyka, R., Makowski, L., Malkowski, E. (2013) Arbuscular mycorrhiza of *Deschampsia cespitosa* (Poacea) at different soil depths in highly metal-contaminated site in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82:251-258.
- Gucwa-Przepiora, E., Malkopwski, E., Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Kryzak, J., Kita, A., Römkens, P.F.A.M. (2007) Effect of chemophytostabilization practices and arbuscular mycorrhiza colonization of *Deschampsia cespitosa* ecotype Warynski at different soil depths. *Environmental Pollution* 150:338-346.
- Gupta, N., Ram, H., & Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15:89-109.

- Haider, F.U., Liqun, C., Coulter, J.A., Cheema, S.A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., Farooq, M., (2021) Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211:111887, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>.
- Hassan, M., Israr, M., Mansoor, S., Hussain, S. A., Basheer, F., Azizullah, A., Ur Rehman, S. (2021). Acclimation of cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in mung bean seedlings by priming effect of phytohormones and proline. *Plos One* 16: e0257924.
- Hansatech Instruments Ltd, n.d. Fluorescence Monitoring System FMS 2 User Manual.
- He, X., Zhang, Y., Shen, m., Tian, Y., Zheng, K., Zeng, G. (2017) Vermicompost as a natural adsorbent: evaluation of simultaneous metals (Pb, Cd) and tetracycline adsorption by sewage sludge-derived vermicompost. *Environmental Science and Pollution Research* 24:8375-8384.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 25:185-188.
- Hernandez, O.L., Calderin, A., Huelva, R., Martinez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N.O., Olivares, L.P., Canellas, L.P. (2015) Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy Sustainable Development* 35:225-232.
- Hoehne, L., de Lima, C.V.S., Martini, M.C., Altmayer, T., Brietzke, D.T., Finatto, J., Gonçalves, T.E., Granada, C.E. (2016) Addition of vermicompost to heavy-metal contaminated soil increases the ability of black oat (*Avena strigosa* Schreb) plants to remove Cd, Cr and Pb. *Water Air and Soil Pollution* 227:443.
- Jouvin, D., (2009) Fractionnement isotopique du cuivre et du zinc lors de processus biogéochimiques dans les sols. *Géochimie*. Université Paris Diderot.
- Kafle, A., Timilsina, A., Gautam, a., Adhikari, K., Bhattarai, A., Aryal, N. (2022) Phytoremediation : mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environmental Advances* 8 :100203
- Kalnicky, D. J., Singhvi, R. (2001) Field portable XRF analysis of environmental samples, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 83, Issues 1–2, Pages 93-122, ISSN 0304-3894, [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(00\)00330-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(00)00330-7).
- Khan, N.A., Anjum, N.A., Nazar, R., & Iqbal, N. (2009). Increased activity of ATP-Sulfurylase and increased contents of cysteine and glutathione reduce high cadmium-

- induced oxidative stress in mustard cultivar with high photosynthetic potential. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56, 670-677.
- Khorsropour, E., Weisany, W., Tahi, N.A., Hakimi, L. (2022) Vermicompost and biochar can alleviate cadmium stress through minimizing its uptake and optimizing biochemical properties in *Berberis integerrima bunge*. *Environmental Science and Pollution Research* 29:17476-17486.
- Koszelnik-Leszek, A., Szajsner, H., Podlaska, M. (2019) The improving influence of laser stimulation on phytoremediation capabilities of selected *Silene vulgaris* ecotypes. *Archives of Environmental Protection* 45:79-85.
- Kumar, A., & Prasad, M. N. V. (2018). Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 401-418.
- Kumar, K., Shinde, A., Aeron, V., Verma, A., Arif, N.S. (2022) Genetic engineering of plants for phytoremediation advances and challenges. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* (in press).
- Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M. (1998) In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research* 58:123–133. <https://doi.org/10.1023/A:1006132608181>
- Kurade, M.B., Ha, Y.H., Xiong, J.Q., Govindwar, S.P., Jang, M., Jeon, B.H. (2021) Phytoremediation as a green technology tool for emerging environmental pollution: a step forwards towards sustainable rehabilitation of the environment. *Chemical Engineering Journal* 415:129040.
- Krzyżak, J., Lane, T., Czerwińska, A. (2006) The potential use of festuca cultivars and lignite for phytostabilization of heavy metal polluted soils. *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*, Springer. 367–374.
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F., Pouliquen, H. (2012). Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution*, 170, 254-259.
- Lee, C.W., Choi, J.M., Pak, C.H. (1996) Micronutrient toxicity in seed geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *Journal of American Society of Horticultural Science* 121:77–82
- Lefèvre, I., Vogel-Mikus, K., Arcon, I., Lutts S. (2016) How does root of the metal-resistant perennial bush *Zygophyllum fabago* cope with cadmium and zinc toxicities? *Plant and Soil* 404:193-207.

- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll Fluorescence Signatures of Leaves during the Autumnal Chlorophyll Breakdown, *Journal of Plant Physiology*, Volume 131, Issues 1–2, Pages 101-110, ISSN 0176-1617, [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80271-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80271-7).
- LIFE Pays Mozan, Les pelouses calaminaires, Communication sur le projet de restauration de pelouses et prairies de grand intérêt biologique, Natagora, Natuurpunt, Natuurmonumenten, Agentschap Natuur en Bos, Universiteit Gent, Département de la Nature et des Forêts, Natura 2000, Thierry Ory (coordinateur du projet). Online. Consulté le : 29 mai 2021.
Retrieved on : <https://www.lifepaysmosan.eu/index.php?id=3281&L=462>
- Liu, B., Wu, C., Pan, P., Fu, Y., He, Z., Wu, L., Li, Q. (2019) Remediation effectiveness of vermicompost for a potentially toxic metal-contaminated tropical acid soil in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182:109394
- Liu, Z., Tran, K.Q. (2021). A review on disposal and utilization of phytoremediation plants containing heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 226:112821.
- Luyckx, M., Hausman, J.F., Isenborgh, A., Guerriero, G., Lutts, S. (2021). Silicon reduces cadmium absorption and increases root-to-shoot translocation without impacting growth in young plants of hemp (*Cannabis sativa* L.) on a short term basis. *Environmental Science and Pollution Research* 28:37963-37977.
- Lv, B., Xing, M., & Yang, J. (2016). Speciation and transformation of heavy metals during vermicomposting of animal manure. *Bioresource Technology*, 20:397-401.
- Ma, M., Lau, P.S., Jia, Y.T., Tsang, W.K., Lam, S.K.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. (2003) The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Science* 164:51-60.
- Ma, J. F., Nomoto, K. (1993) Inhibition of mugeinic acid-ferric complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiologia Plantarum*, 89:331-334.
- Manzoor, M., Gul, I., Kallerhoff, J., & Arshad, M. (2019). Fungi-assisted phytoextraction of lead: tolerance, plant growth-promoting activities and phytoavailability. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 :23788-23797.
- Masindi, V., Muedi, K. L. (2018) Environmental Contamination by Heavy Metals, Saleh, H. E-D. M. and Aglan, R. BoD – Books on Demand, 116. ISBN : 1789233607
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659-668.
- McIntyre, T. (2003). Phytoremediation of Heavy Metals from Soils. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 97–123. DOI:10.1007/3-540-45991-x_4

- Meers, E., Van Slycken, S., Adriaensen, K., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Du Laing, G., Witters, N., Thewys, T., Tack, F.M.G. (2010) The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment, *Chemosphere*78:35-41. ISSN0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.015>.
- Murgia, I., Marzorati, T., Vigani, G., Morandini, P. (2022) Plant iron nutrition: the long road from soil to seeds. *Journal of Experimental Botany* 73:1809-1824.
- Muszynska, E., Labudda, M. (2020) Effects of lead, cadmium and zinc on protein changes in *Silene vulgaris* shoots cultured in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204:111086
- Muszynska, E., Labudda, M., Kaminska, I., Gorecka, M., Bederska-Blaszczyk, M. (2019a) Evaluation of heavy metal-induced response in *Silene vulgaris* ecotypes. *Protoplasma* 256:1279-1297.
- Muszynska, E., Labudda, M., Kral, A. (2020) Ecotype-specific pathways of reactive oxygen species deactivation in facultative metallophyte *Silene vulgaris* (Moench) Garcke treated with heavy metals. *Antioxidants* 9:102.
- Muszynska, E., Labudda, M., Rozanska, E., Hanus-Fajerska, E., Koszelnik-Leszk, A. (2019b) Structural, physiological and genetic diversification of *Silene vulgaris* ecotypes from heavy-metal contaminated areas and their synchronous *in vitro* cultivation. *Planta* 249:1761-1778.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemical Letters* 8:199–216.
- Nahon, D., L'épuisement de la Terre, L'enjeu du XXI^e siècle, Odile Jacob, Février 2008, 15, Rue Soufflot, 75005 Paris, ISBN : 978-2-7381-2042-7
- Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, M. I. R., Syeed, S., & Khan, N. A. (2012). Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 3, Article ID:24162,4 pages. DOI:10.4236/ajps.2012.310178
- Nebeska, D., Trögl, J., Sevcu A. et al. (2021) *Miscanthus x giganteus* role in phytodegradation and changes in bacterial community of soil contaminated by petroleum industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 224:112630.
- Nevrtalova, E., Baloun, J., Hudzieczek, V., Cegan, R., Vyskot, B., Dolezel, J., Safar, J., Milde, D., Hoba, R. (2014) Expression response of duplicated *metallothionein 3* gene to copper stress in *Silene vulgaris* ecotypes. *Protoplasma* 251:1427-1439.

- Nivetha, A., Mangala Devi, S., Prabha, I. (2019). Fascinating physic-chemical properties and resourceful applications of selected cadmium nanomaterials. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 29(5), 1423-1438.
- Nkongolo, K.J., Gervais, S., Michael, P., Zhou, Y. (2014). Comparative analysis of inter simple sequence repeats and simple sequence repeats markers: genetic analysis of *Deschampsia cespitosa* populations growing in metal contaminated regions in Canada. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 10:69-80.
- Ngo, K. (2006). Etude d'un système multicapteur pour la détection sélective des gaz. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de droit, d'économie et des sciences - Aix-Marseille III, France. fftel-00119934
- Noor, I., Sohail, H., Sun, J., Nawaz, M.A., Li, G., Hasanuzzaman, M., Liu, J. (2022) Heavy metal and metalloid toxicity in horticultural plants : Tolerance mechanisms and remediation strategies. *Chemosphere* 303 :135196.
- Oladoye, P.O., Olowe, O.M., Asemoloye, M.D. (2022) Phytoremediation technology and food security impacts of heavy metal contaminated soils : a review of littérature. *Chemosphere* 288 :132555.
- Ortiz-Castro R., Lopez-Bucio J. (2019) Phytostimulation and root architectural responses to quorum-sensing signals and related molecules from rhizobacteria. *Plant Science* 264:135-142.
- Pacwa-Plociniczak, M.; Plocianiczak, T., Yu, D., Kurola, J.M., Sinkkonen, A., Piotrowska-Seget, Z., Riomantschuk M. (2018) Effect of *Silene vulgaris* and heavy metal pollution on soil microbial diversity in long-term contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution* 229:13.
- Parveen, S., Bhat, I.U.H., Khanam, Z., Rak, A.E., Yusoff, H.M., Akhter, M.S. (2022) Phytoremediation: *In situ* alternative for pollutant removal from contaminated natural media: a brief review. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 12:4945-4960.
- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., Goltsev, V. (2018) Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 19:787.
- Plociniczak, T., Chodor, M., Pacwa-Plociniczak, M., Piotrowska-Seget, Z. (2019) Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants. *Chemosphere* 219:250-260.

- Pourret, O., On the Necessity of Banning the Term “Heavy Metal” from the Scientific Literature, *Sustainability*, vol.10, n°8, 2018, p.2879, online consulted 17/03/21, ISSN 2071-1050, DOI : 10.3390/su10082879
- PUR VER, qu’est-ce que le lombricompostage et le lombricompost ? Dernière mise à jour en 2022, dernière consultation le 11/08/2022, retrieved on www.purver.com
- Querio, L. (2017). RAPPORT D’ETUDE. Comparaison des méthodes de minéralisation de métaux sur sédiments et boues. AGLAE. 39 pages.
- Rengel, Z. (2000) Ecotypes of *Holcus lanatus* tolerant to zinc toxicity also tolerate zinc deficiency. *Annals of Botany* 86:1119-1126.
- Righa, A., Bousseboua, S. (2015). Etude de l’effet du zinc sur le système antioxydant de l’haricot blanc (*Phaseolus vulgaris* L.). Université des Frères Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire. Algérie.
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M.I.R., Kumar, M., Ramteke, P.W., Gupta, R. (2022) A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules* 12 :43.
- Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Qayyum, M.F., Nawaz, R. (2018) Residual effects of biochar on growth, photosynthesis and cadmium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) under Cd stress with different water conditions. *Journal of Environmental Management* 206:676–683.
- Rocha, C.S., Rocha, D.C., Kochi, L.Y., Carneiro, D.N.M., dos Reis, M.V., Gomes, M.P. (2022) Phytoremediation by ornamental plants : a beautiful and ecological alternative. *Environmental Science and Pollution Research* 29:3336-3354.
- Rupani P.D.F, Embrandiri A., Ibrahim, M.H., Ghole, W., Lee, C.T., Abbaspour, M. (2018) Effects of different vermicompost extracts on palm oil effluent and palm-pressed fiber mixture on seed germination of mung bean and its relative toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 25:35805-35810.
- Sabreena, Hassan, S., Bhat, S.A., Kumar, V., Ganai, B.A., Ameen F. (2022) Phytoremediation of heavy metals: an indispensable contrivance in green remediation technology. *Plants* 11:1255.
- Santos, J.F.L.A., Busato, J.G., Pittarello, M., da Silva, J., Horák-Terra, I., Evaristo, A.B., Diobbss, L.B. (2022) Alkaline extract from vermicompost reduced the stress promoted by As on maize plants and increased their phytoextraction capacity. *Environmental Science and Pollution Research* 29 :20864-20877.

- Sengupta, S., Bhattacharyya, K., Mandal, J., Chattopadhyay, A.P. (2022) Complexation, retention and release pattern of arsenic from humic/fulvic acid extracted from zinc and iron enriched vermicompost. *Journal of Environmental Management* 318 : 115531.
- Shah, V., Daverey, A. (2020) Phytoremediation: a multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation* 18:100774.
- Sharma, P., Dubey, R.S. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17:35–52. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100004>
- Shen, X., Dai, M., Yang, J., Sun, L., Tan, X., Peng, C., Ali, I., Naz, I. (2022) A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: performance and challenges. *Chemosphere* 291:132979.
- Shikha, D., Singh, P.K. (2021) *In situ* phytoremediation of heavy metal-contaminated soil and groundwater: a green inventive approach. *Environmental Science and Pollution Research* 28:4104-4124.
- Simon, L. (2005) Stabilization of metals in acidic mine spoil with amendments and red fescue (*Festuca rubra* L.) growth. *Environmental Geochemistry and Health* 27:289-300.
- Singh, S., Singh, J., Kandoria, A., Quadar, J., Bhat, S.A., Chowdhary, A.B., Vig, A.P. (2020) Bioconversion of different organic waste into fortified vermicompost with the help of earthworms: a comprehensive review. *International Recycling of Organic Waste in Agriculture* 9:423-439.
- Sinnhuber, R. O. (1958). 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technology*, 12:9-12.
- Symeonidis, L., Karataglis, S. (1992) Interactive effects of cadmium, lead and zinc on root growth of two metal tolerant genotypes of *Holcus lanatus* L. *Biometals* 5:173–178 <https://doi.org/10.1007/BF01061325>
- Tafvizi, M., & Moteszarezhadeh, B. (2014). Effects of lead on iron, manganese, and zinc concentrations in different varieties of maize (*Zea mays*). *Communications in soil science and plant analysis*, 45, 1853-1865.
- Thakur, M., Praveen, S., Divte, P.R., Mitra, R., Kumar, M. et al. (2022) Metal tolerance in plants: molecular and physiochemical interface determines the “not so heavy effect” of heavy metals. *Chemosphere* 287:131957
- Thermo Scientific™, Analyseur Niton™ XL3t GOLDD+ XRF, Descriptif Produit. Online. Consulté le : 03 décembre 2021. Retrieved on : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/XL3TGOLDDPLUS>

- Todeschini, V., Lingua, G., D'Agostino, G., Carniato, F., Roccotiello, E., Berta, G. (2011) Effects of high zinc concentration on poplar leaves: a morphological and biochemical study. *Environmental and Experimental Botany* 71:50–56.
- Tussipkan, D., Manabayeva, S.A. (2022) Alfalfa (*Medicago sativa* L.): genotypic diversity and transgenic alfalfa for phytoremediation. *Frontiers in Environmental Science* 10:828257.
- Vallee, B. L., Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*, 73(1), 79-118.
- Von Frenckell-Insam, B.A.K., Hutchinson, T., (1993a) Occurrence of heavy metal tolerance and co-tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. from European and Canadian populations. *New Phytologist* 125:555-564.
- Von Frenckell-Insam, B.A.K., Hutchinson, T., (1993b) Nickel and zinc tolerance and co-tolerance in populations of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. Subject to artificial selection. *New Phytologist* 125:547-553.
- Wang, F., Miao, L., Wang, Y., Zhang, M., Zhang, H., Ding, Y., Zhu, W. (2022) Using cow dung and mineral vermireactors to produce vermicompost for use as a soil amendment to slow Pb²⁺ migration. *Applied Soil Ecology* 170 :104299.
- White, P.J., Brown, P.H. (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health, *Annals of Botany* 105:1073–1080, <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Willey, N. (2007) *Phytoremediation : methods and reviews*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 478 pages. ISBN : 1-58829-541-9
- Wiszniewska, A., Kaminska, I., Hanus-Fajerska, E., Sliwinska E., Kozminska, A. (2020) Distinct co-tolerance responses to combined salinity and cadmium exposure in metallicolous and non-metallicolous ecotypes of *Silene vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 201: 116823.
- Woo, H.R., Kim, H.J., Lim, P.O., Nam, H.G. (2022) Leaf senescence: systems and dynamics aspects. *Annual Review of Plant Biology* 70:347-376
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P. J. (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18:339-353.
- Yang, L., Wang, J., Yang, Y., Li, S., Wang, T., Oleksak, P. et al. (2022) Phytoremediation of metal pollution: Hotspots and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 234:113403.

- Yang, Z., Yang, F., Liu, J.L., Wu, H.T., Yang, H., Shi, Y., Liu, J., Zhang, Y.F., Luo, Y.R., Chen, K.R. (2022) Heavy metal transporters: functional mechanisms, regulation, and application in phytoremediation. *Science of the Total Environment* 809:151099
- Yang, L., Zhao, F., Chang, Q., Li, T., Li, F. (2015) Effects of vermicompost on tomato yield and quality and soil fertility in greenhouse under different soil water regimes. *Agricultural Water Management* 160:98-105.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H., Gomez, K.A. (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd Ed., Manila, Philippines: International Rice Research Institute.
- Zenk, M. H., (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179:21-30, ISSN 0378-1119, [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00422-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00422-2).
- Zhang, W., Du, W., Wang, F., Xu, H., Zhao, T., Zhang, H., Ding, Y., Zhu, W. (2020) Comparative study on Pb²⁺ removal from aqueous solutions using biochars derived from cow manure and its vermicompost. *Science of the Total Environment* 716:137108.
- Zhao, F.J., Tang, Z., Song, J.J., Huang, X.Y., Wang, P. (2021) Toxic metals and metalloids: uptake, transport, detoxification, phytoremediation and crop improvement for safer food. *Molecular Plant* 15:27-44.
- Zhang, Y., Tian, Y., Hu, D., Fan, J., Shen, M., Zeng, G. (2019) Is vermicompost the possible in situ sorbent ? Immobilization of Pb, Cd and Cr in sediment with sludge derived vermicompost, a column study. *Journal of Hazardous Materials* 367:83-90
- Zhao, Y., Shentu, J., Chen, K. (2012) *Rumex acetosa* L. application on the bioremediation of soil polluted by combined heavy metals of Cd, Cy, and Pb. *Advanced Material Research* 518:3069-3073.
- Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Maqsood, M., Hussain, M., Ishfaq, M., Ahmad, M., Anjum, M.Z. (2019) Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of Environmental Management* 250:109557, ISSN0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109557>.

Annexes

ANOVA 2

Tableau 17 : Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 2 facteurs en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les plantes en serre. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.

Mesure	Espèce	Traitement	Espèce*Traitement
A	F=18.12 p= 4.076e-11	F= 0.9199 p= 0.4557	F= 2.116 p= 0.01335
E	F=12.71 p= 2.119e-08	F=1.931 p= 0.1112	F=1.796 p=0.04188
gs	F= 38.35 p= 2.01e-19	F=1.627 p= 0.1733	F=1.125 p= 0.3433
Ci	F= 40.11 p= 1.148e-18	F=0.3526 p= 0.8415	F=3.628 p= 5.693e-05
Fv/Fm	F= 10.4 p= 1.321e-05	F=1.412 p= 0.2409	F=0.7693 p= 0.6788
PS2	F= 21.56 p= 1.355e-09	F=0.6013 p= 0.6632	F= 1.268 p= 0.2612
qP	F= 6.397 p=0.0007826	F= 1.057 p= 0.3858	F= 0.798 p= 0.6508
NPQ	F= 4.259 p= 0.008577	F= 2.475 p= 0.05372	F= 1.447 p= 0.1706
Water Content racines	F=14.07 p=1.301e-08	F=2.468 p=0.05191	F=1.261 p= 0.2449
Water Content feuilles	F= 2.212 p= 0.07569	F= 1.294 p= 0.2799	F= 1.117 p= 0.3557
Chlorophylle a	F= 673.4 p= 8.37e-43	F= 54.41 p= 1.3e-17	F= 47.63 p= 1.193e-24
Chlorophylle b	F= 147.1 p= 5.364e-27	F= 12.69 p= 3.349e-07	F= 10.63 p= 4.918e-11
Caroténoïdes	F= 571.6 p= 4.631e-41	F= 28.89 p= 1.849e-12	F= 40.41 p= 5.124e-23
MDA	F= 48.37 p= 2.055e-11	F= 23.23 p= 4.119e-08	F= 12.8 p= 2.707e-08
Thiols totaux Feuilles	F= 4.887 p= 0.004742	F= 0.5308 p= 0.7142	F= 1.219 p= 0.3202
Thiols totaux Racines	F= 1.506 p= 0.2307	F= 4.361 p= 0.00821	F= 1.251 p= 0.2997

Tableau 18 : Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 2 facteurs en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les terrains. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.

Mesure	Site	Traitement	Site*Traitement
pH sol	F= 906.1 p=8.102e-14	F= 1.134 p= 0.3745	F= 1.068 p= 0.4321
Minéralisations sol	Cd F= 1142 p= 2.038e-14	F= 74.03 p= 5.204e-08	F= 71.28 p= 1.104e-08
	Pb F= 4779 p= 3.889e-18	F= 147.8 p= 9.707e-10	F= 210.6 p= 1.908e-11
	Zn F= 2333 p= 2.848e-16	F= 8.785 p= 0.002352	F= 15.89 p= 4.47e-05
Biodisponibilité sol	Cd F= 60.77 p= 5.263e-07	F= 1.232 p= 0.341	F= 2.679 p= 0.06906
	Pb F= 1.605 p= 1.605	F= 0.7984 p= 0.5182	F= 0.7984 p= 0.5892
	Zn F= 4.007 p= 0.04646	F= 3.134 p= 0.06552	F= 2.661 p= 0.07037
Biomasse parcelles	F= 11.48 p= 0.000317	F= 1.152 p= 0.3486	F= 1.763 p= 0.1495
Poids frais plantes	F= 18.1 p= 1.611e-05	F= 0.5584 p= 0.6476	F= 1.78 p= 0.1459
Poids secs plantes	F= 3.889 p= 0.03443	F= 0.1874 p= 0.9039	F= 1.547 p= 0.2059
Water content plantes	F= 41.41 p= 5.155e-08	F= 2.108 p= 0.1297	F= 0.7854 p= 0.591
Minéralisations plantes	Cd F= 32.74 p= 1.444e-11	F= 2.295 p= 0.08274	F= 1.08 p= 0.3798
	Pb F= 220.3 p= 1.344e-36	F= 2.969 p= 0.03572	F= 2.919 p= 0.01168
	Zn F= 10.58 p= 7.054e-05	F= 1.031 p= 0.3826	F= 0.4885 p= 0.8155

ANOVA 1

Tableau 19 : Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 1 facteur en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les plantes en serre. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.

Longueur racinaire	Rumex	F= 2.2082	p= 0.1048
	Holcus	F= 2.8639	p= 0.05012
	Deschampsia	F= 2.5609	p= 0.07017
	Silene	F= 0.9104	p= 0.4769
	Festuca	F= 2.428	p= 0.08152
Hauteur système aérien	Rumex	F= 2.7504	p= 0.0568
	Holcus	F= 0.5616	p= 0.6932
	Deschampsia	F= 2.8709	p= 0.04973
	Silene	F= 2.6495	p= 0.06354
	Festuca	F= 1.1873	p= 0.3467
Poids Frais aérien	Rumex	F= 3.7001	p= 0.02744
	Holcus	F= 1.9136	p= 0.1604
	Deschampsia	F= 1.2509	p= 0.332
	Silene	F= 3.9283	p= 0.02241
	Festuca	F= 0.0984	p= 0.9813
Poids Frais racinaire	Rumex	F= 3.3221	p= 0.03882
	Holcus	F= 3.2392	p= 0.04197
	Deschampsia	F= 0.8945	p= 0.4913
	Silene	F= 2.7696	p= 0.06613
	Festuca	F= 0.4027	p= 0.8038
Poids Sec aérien	Rumex	F= 3.8625	p= 0.02374
	Holcus	F= 2.6419	p= 0.07513
	Deschampsia	F= 1.2177	p= 0.3445
	Silene	F= 3.5305	p= 0.03201
	Festuca	F= 0.5722	p= 0.6869
Poids Sec racinaire	Rumex	F= 3.4725	p= 0.03376
	Holcus	F= 2.932	p= 0.05636
	Deschampsia	F= 0.3919	p= 0.8112
	Silene	F= 1.0077	p= 0.4343
	Festuca	F= 0.3472	p= 0.8419

Tableau 20 : Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 1 facteur en RStudio pour les différentes mesures réalisées sur les terrains. Les p-valeurs > à 0.05 sont en gras.

Mesure		Statistique	
Ratio C/N dans le sol	/	F= 239.47	p= 2.2e-16
Teneurs ETM sols 2020	Cd	F= 4.4289	p= 0.03626
	Pb	F= 8.1315	p= 0.005858
	Zn	F= 59.681	p= 5.811e-07
Teneurs ETM sols 2021	Cd	F= 36.238	p= 1.552e-07
	Pb	F= 58.374	p= 2.648e-09
	Zn	F= 366.49	p= 2.2e-16
Biodisponibilité sols 2020	Cd	F= 16.815	p= 1.807e-05
	Pb	F= 8.9369	p= 0.001051
	Zn	F= 2.1428	p= 0.1369

Tableau 21 : Résultats du test statistique de l'analyse de la variance à 1 facteur en RStudio pour les minéralisation des plantes de l'expérience en serre

Rumex aérien	Cd	F= 478.06	p= 2.276e-11
	Cu	F= 414.18	p= 4.642e-11
	Fe	F= 5.0159	p= 0.01766
	Pb	F= 107.26	p= 3.609e-08
	Zn	F= 545.47	p= 1.181e-11
Rumex racinaire	Cd	F= 5818.2	p= 2.2e-16
	Cu	F= 13.583	p= 0.000474
	Fe	F= 14.068	p= 0.0004104
	Pb	F= 109.99	p= 3.192e-08
	Zn	F= 1021	p= 5.205e-13
Holcus aérien	Cd	F= 1690.6	p= 4.206e-14
	Cu	F= 138.46	p= 1.037e-08
	Fe	F= 5.4164	p= 0.01389
	Pb	F= 175.07	p= 3.28e-09
	Zn	F= 91.074	p= 7.986e-08
Holcus racinaire	Cd	F= 249.51	p= 5.716e-10
	Cu	F= 71.488	p= 2.568e-07
	Fe	F= 102.54	p= 4.492e-08
	Pb	F= 802.04	p= 1.734e-12
	Zn	F= 997.57	p= 5.845e-13
Deschampsia aérien	Cd	F= 30.393	p= 1.425e-05
	Cu	F= 6.2367	p= 0.008766
	Fe	F= 6.0336	p= 0.009787
	Pb	F= 794.67	p= 1.815e-12
	Zn	F= 523.47	p= 1.45e-11
Deschampsia racinaire	Cd	F= 3337.3	p= 1.409e-15
	Cu	F= 44.582	p= 2.421e-06
	Fe	F= 13.45	p= 0.0004935
	Pb	F= 114.34	p= 2.643e-08
	Zn	F= 1777	p= 3.28e-14
Silène aérien	Cd	F= 708.72	p= 3.21e-12
	Cu	F= 94.852	p= 6.557e-08
	Fe	F= 18.969	p= 0.000116
	Pb	F= 67.61	p= 3.356e-07
	Zn	F= 210.54	p= 1.322e-09
Silène racinaire	Cd	F= 1312.7	p= 1.486e-13
	Cu	F= 123.32	p= 1.828e-08
	Fe	F= 129.36	p= 1.446e-08
	Pb	F= 314.64	p= 1.814e-10
	Zn	F= 108.08	p= 3.477e-08
Fétuque aérien	Cd	F= 481.54	p= 2.196e-11
	Cu	F= 54.487	p= 9.393e-07
	Fe	F= 7.6829	p= 0.004257
	Pb	F= 61.893	p= 5.121e-07
	Zn	F= 403.2	p= 5.304e-11
Fétuque racinaire	Cd	F= 310.87	p= 1.926e-10
	Cu	F= 28.356	p= 1.953e-05
	Fe	F= 71.996	p= 2.482e-07
	Pb	F= 160.95	p= 4.959e-09
	Zn	F= 1538.4	p= 6.735e-14

Annexe 1 : l'Annexe 1 - Normes - de l'arrêté du Gouvernement Wallon relatif à la gestion et à l'assainissement des sols, Moniteur Belge, Ed. 2, W. Borsus et C. Di Antonio, (2019)

Annexe 2 : Solution de Yoshida

Annexe 3 : Composition des solutions mères

Annexe

Annexe 1ère - Normes

Type d'usage		Sol (mg/kg _{matière sèche})					Eaux souterraines (µg/L)
		I naturel	II agricole	III résidentiel	IV récréatif ou commercial	V 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
Hydrocarbures aromatiques non halogénés							
benzène	VS	0.10	0.10	0.10	0.20	0.20	10
Éthylbenzène	VS	0.3	0.3	0.3	3.0	3.0	300
Toluène	VS	4.0	4.0	7.0	7.0	22.0	700
Xylènes (somme)	VS	1	1	2	8	30	500
Styrene	VS	0.4	0.4	0.4	0.4	2	20
Phénol	VS	0.3	0.3	0.7	0.7	1.4	120
Hydrocarbures aromatiques polycycliques non halogénés							
Naphtalène	VS	2.5	2.5	2.5	2.5	6.3	60
Acénaphylène	VS	4.8	4.8	6.3	8	43	70
Acénaphène	VS	2	2	4	4	6	180

Type d'usage		Sol (mg/kg _{matière sèche})					Eaux souterraines (µg/L)
		I naturel	II agricole	III résidentiel	IV récréatif ou commercial	V industriel	
Fluorène	VS	5.9	5.9	9	9	16	120
Phénanthrène	VS	7.6	7.6	13	13	25	120
Anthracène	VS	2.8	2.8	2.8	2.8	6.9	75
Fluoranthène	VS	6	6	11.6	23	47	4
Pyrène	VS	6.7	6.7	13	15.4	28.6	90
Benzo(a)anthracène	VS	9.5	9.5	9.5	9.5	17.3	7
Chrysène	VS	1.1	1.1	2.3	9.7	17.6	1.5
Benzo(b)fluoranthène	VS	1.7	1.7	3.3	11	21	1.5
Benzo(k)fluoranthène	VS	1	1	2	5.3	9.3	0.8
Benzo(a)pyrène	VS	0.87	0.87	3.6	9.5	14.4	0.7
Dibenzo(ah)anthracène	VS	0.81	0.81	1.8	1.8	3.2	0.7
Benzo(g,h,i)pérylène	VS	0.8	0.8	1.5	6.8	11.1	0.3
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	VS	4.5	4.5	7	7	12	0.22
Hydrocarbures chlorés							
Dichlorométhane	VS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	20
Trichlorométhane	VS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	200
Tetrachlorométhane	VS	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	2
Tetrachloroéthène (PCE)	VS	0.2	0.2	0.2	0.7	1.2	40
Trichloroéthène (TCE)	VS	0.05	0.05	0.05	0.7	0.7	70
1,2-Dichloroéthène (somme) (DCE)	VS	0.1	0.1	0.1	0.4	0.5	50
Chloroéthène (VC)	VS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	5
1,1,1 - trichloroéthène (1,1,1-TCA)	VS	1	1	3.5	5.5	15	500

Type d'usage		Sol (mg/kg _{matière sèche})					Eaux souterraines (µg/L)
		I naturel	II agricole	III résidentiel	IV récréatif ou commercial	V industriel	
1,1,2 - trichloroéthane (1,1,2 - TCA)	VS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	12.0
1,2 - dichloroéthane (1,2 - DCA)	VS	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	30
Cyanures							
Cyanures libres	VS	2	2	2	2	2	70
Autres composés organiques							
Methyl-tert-butyl-éther (MTBE)	VS	1.5	1.5	1.5	1.5	2	300
Hydrocarbures pétroliers							
Fraction EC > 5-8	VS	6	6	6	6	9	60
Fraction EC > 8-10	VS	21	21	21	150	600	200
Fraction EC > 10-12	VS	75	75	75	580	600	200
Fraction EC > 12-16	VS	75	75	75	750	920	200
Fraction EC > 16-21	VS	650	650	650	1250	2700	300
Fraction > C21-C35	VS	650	650	650	2100	5300	300

(1) Les valeurs proposées pour le chrome total se basent sur le chrome trivalent.

(2) Les valeurs proposées pour le chrome hexavalent se basent exclusivement sur les risques pour la santé humaine. Les données actuellement disponibles ne permettent pas de tenir compte des risques pour les eaux souterraines et les écosystèmes.

Vu pour être annexé à l'arrêté du Gouvernement wallon du 13 décembre 2018 modifiant l'annexe 1ère du décret du 1er mars 2018 relatif à la gestion et à l'assainissement des sols

Le ministre-président,

W. BORSUS

Le Ministre de l'Environnement, de la Transition écologique, de l'Aménagement du Territoire, des Travaux publics, de la Mobilité, des Transports, du Bien-être animal et des Zonings,

C. DI ANTONIO

Yoshida

Solution Yoshida

UCL-groupe de recherche en physiologie végétale		
Auteur : Brigitte Vanpee	Créé : Octobre 2007	Modifié : par

Préparation des solutions stock pour culture hydroponique (Bac de 50L)-YOSHIDA modifié

MACRO →

Source	Quantité(g /5L) g/3L	Quantité finale(mg/L)	Concentration finale	Numérotation produits
NH ₄ NO ₃	457 → 274,2g/3L	114.25	1.43mM	A61 ✓
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	201.5 → 120,9g/3L	50.37	323µM	A68 ✓
K ₂ SO ₄	357 → 214,2g/3L	89.25	512µM	A56 ✓
CaCl ₂ ·2H ₂ O	443 → 265,8g/3L	110.75	750µM	A77
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1620 → 972g/3L	405	1.64mM	A335 ✓

MICRO

MnSO ₄ ·H ₂ O	7.73	1.93	11.4µM	A17
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.13	0.033	0.14µM	A15
H ₃ B ₃	14.3	3.58	57.8µM	A18
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.10	0.275	0.96µM	A2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.40	0.100	0.4µM	A27

FER

Fer-EDTA	4.7	15.7	42.7µM	A135
----------	-----	------	--------	------

Prélever 375ml de ^{macro} et 300ml de micro+4.7g de Fer ;

⇒ Porter à 24L la tourille avec de l'eau déminéralisée ;

Prélever 4L de solution et porter à 50L les bacs avec de l'eau déminéralisée (ou 80 ml de solution et porter à 1L avec de l'eau distillée)

↳ 2L → 25L

4L → 50L
 0,104L → 1,3L
 104ml
) : 38,46

09/05

Calculs des conc. de Mld à inoculer:

1) Préparation solutions-mères;

(Préparation d'une solution plus conc. que ce qu'on veut).

Cadmium $Cd \cdot Cl_2 \times 2 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ 228,36 g/mol 10 μM
10 mM

$$\begin{aligned} & 1 \text{ mole/l} \rightarrow 228,36 \text{ g/l} \\ & 10^{-2} \text{ mol/l} \rightarrow 2,28 \text{ g/l} = 0,228 \text{ g/100 ml} \end{aligned}$$

Zinc $Zn \cdot Cl_2$ 136,28 g/mol 100 μM
100 mM

$$\begin{aligned} & 1 \text{ mole/l} \rightarrow 136,28 \text{ g/l} \\ & 10^{-1} \text{ mol/l} \rightarrow 13,63 \text{ g/l} = 1,363 \text{ g/100 ml} \end{aligned}$$

Plomb $Pb(NO_3)_2$ 331,20 g/mol 250 μM
250 mM

$$\begin{aligned} & 1 \text{ mole/l} \rightarrow 331,20 \text{ g/l} \\ & 2,5 \times 10^{-1} \text{ mol/l} \rightarrow 82,8 \text{ g/l} = 8,28 \text{ g/100 ml} \end{aligned}$$

2) Volume à prélever;

$$C_i \times V_i = C_j \times V_j$$

$$Cd: \frac{10 \times 10^{-6} M \times 1,3 L}{10 \times 10^{-3} M} = 0,0013 L = 1,3 \text{ ml}$$

$$Zn: \frac{100 \times 10^{-6} M \times 1,3 L}{100 \times 10^{-3} M} = 0,0013 L = 1,3 \text{ ml}$$

$$Pb: \frac{250 \times 10^{-6} M \times 1,3 L}{250 \times 10^{-3} M} = 0,0013 L = 1,3 \text{ ml}$$

} Par bac

3) Volume à préparer;

$$1,3 \text{ ml} \times 30 \text{ bacs} \times 1 \text{ application/sem} \times 4 \text{ semaines} = 156 \text{ ml}$$

V_i
Cid identique pour les 3) (2 x 15) 15 Mld seul + 15 Mix doses pour

$\approx 200 \text{ ml}$