



HAL
open science

Amélioration de la phytoremédiation par *Miscanthus x giganteus* d'un technosol contaminé construit à partir de sédiments : co-culture avec *Trifolium repens* L. et bioaugmentation avec des microorganismes endémiques

Laura Wechtler

► To cite this version:

Laura Wechtler. Amélioration de la phytoremédiation par *Miscanthus x giganteus* d'un technosol contaminé construit à partir de sédiments : co-culture avec *Trifolium repens* L. et bioaugmentation avec des microorganismes endémiques. *Ecotoxicologie*. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0221 . tel-03230327

HAL Id: tel-03230327

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03230327v1>

Submitted on 19 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thèse

Pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention : « Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes »

Soutenue publiquement par :

Laura WECHTLER

Le jeudi 17 décembre 2020

Amélioration de la phytoremédiation par *Miscanthus x giganteus* d'un technosol contaminé construit à partir de sédiments : co-culture avec *Trifolium repens* L. et bioaugmentation avec des microorganismes endémiques

Membres du jury

Mme Annabelle DERAM,
Professeur, Université de Lille

Rapporteur

Mr Christophe BERTSCH,
Professeur, Université de Haute Alsace

Rapporteur

Mr Philippe LAVAL-GILLY,
Maître de conférences HDR, Université de Lorraine

Directeur de thèse

Mme Sonia HENRY
Maître de conférences, Université de Lorraine

Co-directrice de thèse

Remerciements

Premièrement, je souhaiterais remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Philippe Laval-Gilly ainsi que Sonia Henry, ma co-directrice, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse mais aussi pour leur accompagnement tout au long de ce travail. Merci pour votre confiance et pour tous les conseils que vous avez su m'apporter. Philippe, merci également pour votre soutien, votre investissement tout au long de la thèse et pour votre grande disponibilité.

Je tiens à remercier les membres du jury Mme Annabelle Deram et Mr Christophe Bertsch pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier la Communauté d'Agglomérations « Portes de France-Thionville », la Communauté de Communes de « Cattenom et Environs » et la ville de Thionville pour leur soutien financier.

Je remercie chaleureusement Jairo Falla pour ses précieux conseils en microbiologie ainsi que pour toutes nos discussions et pour son accompagnement en congrès. Cette semaine en Grèce était très enrichissante !

Merci également à Antonietta Specogna, Directrice de l'IUT de Thionville-Yutz, et Benoit Herber, responsable administratif, pour m'avoir permis de venir pendant le confinement afin de maintenir mes expérimentations en cours.

Merci à Antoine Bonnefoy, pour ta « sympathie » (puisque c'est pour cela que tu souhaites que je te remercie !). Merci pour ton aide. Merci également à Patrick pour tes dépannages informatiques !

Merci également à mes collègues et amies Louise et Emmeline pour tous les bons moments passés ensemble, nos discussions, nos rires. Merci Emmeline pour les ballades avec nos toutous. Merci Louise pour toutes nos sorties, nos soirées, pour tous les trucs « dégueu » autrichiens que tu m'as fait goûter ! Merci également pour cette semaine passée en Grèce ;) . Je te souhaite une bonne continuation pour la suite ! Merci également à Dani et aux autres doctorants du laboratoire, notamment Romane, Dulce, Victor, etc.

Je tiens aussi à remercier mes prédécesseurs : Mélanie Mazziotti et Nicolas Abar pour m'avoir formé durant mes stages de M1 et M2.

Merci à Julie pour son aide concernant la réglementation des sédiments pollués et la respiration microbienne du sol.

Je souhaite également remercier Mme Vasseur pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Merci également aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui m'ont aidé sur les différentes expérimentations : Sarah, Hindi et Christophe. Merci encore Sarah pour ton aide psychologique autour de verres au bar ;) . Je souhaite également remercier tous les autres

stagiaires qui sont passés par le labo particulièrement Sandhya. Merci pour ta bonne humeur et ta sympathie. Par contre, j'attends encore tes remerciements pour t'avoir prêté une partie de mon bureau ... ☺

De façon plus personnelle, je souhaiterais remercier mes amies : Ophélie pour tout ton soutien même si je ne suis sûre que tu comprends tout ce que je fais ;), pour nos soirées papotage (depuis de très très nombreuses années maintenant), Time's up et Escape Game ! ; Cyrielle pour ton aide et ton soutien, nos soirées (programmées très longtemps à l'avance), tu es également une super co-équipière d'Escape Game ! Merci également à Tiffany, pour toutes nos randonnées avec Mia et Spyke ☺, malgré la distance maintenant, on continue à se voir dans des paysages différents. Merci également à Elisa qui était beaucoup présente au début de ma thèse.

Un grand merci à Laura, Maria, Céline, Aurélie, Aline et Marion pour tous les week-ends détente à cheval ☺.

Je terminerai en remerciant ma famille, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, merci pour votre soutien et pour avoir cru en moi ! Merci à mes parents, mes grands-mères, mon frère, ma cousine. Je souhaite également remercier ma marraine et ma cousine : Pascale et Marine, pour avoir relu et corrigé mes articles en anglais. J'espère qu'il y en aura d'autres ! Une pensée également pour mon pépé et pour André...

Enfin j'aimerai remercier mon compagnon pour son soutien depuis le début de mes études supérieures et tes encouragements. Merci également à ses parents, Valérie et Tony. Sans oublier mes animaux : Stiche, mon petit chat qui m'accompagne et me suit depuis quasiment 8 ans maintenant et Mia, mon adorable toutou !

A tous, merci d'avoir contribué de près ou de loin à ce travail de thèse !

Communications

- **Publications :**

Wechtler, L., Henry, S., Falla, J., Walderdorff, L., Bonnefoy, A., Laval-Gilly, P., 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation from a contaminated technosol composed of dredged sediments with *Miscanthus x giganteus* and *Trifolium repens* L. in mono- and co-culture. J Soils Sediments. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02648-6>

Wechtler, L., Laval-Gilly, P., Bianconi, O., Walderdorff, L., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., Henry, S., 2019. Trace metal uptake by native plants growing on a brownfield in France: zinc accumulation by *Tussilago farfara* L. Environ Sci Pollut Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06892-3>

- **Présentations orales :**

Wechtler, L., Henry, S., Falla, J., Walderdorff, L., Bonnefoy, A., Laval-Gilly, P., 2020-07. Dissipation des HAP par phytoremediation avec *Miscanthus x giganteus* et *Trifolium repens* L. en mono- et en co-culture dans un technosol créé à partir de sédiments excavés. SEFA 2020, en ligne.

- **Présentations par poster :**

Wechtler, L., Henry, S., Falla, J., Walderdorff, L., Bonnefoy, A., Berns S., Boolell L., Laval-Gilly, P., August 2019. Phytoremediation of *Miscanthus x giganteus* and *Trifolium repens* L. as mono- and co-culture on a mixture of contaminated sediments and soil, ISTA, Thessaloniki, Greece

Wechtler, L., Henry, S., Falla, J., Bonnefoy, A., Laval-Gilly, P., Avril 2019. *Miscanthus x giganteus* en association avec *Trifolium repens* sur un technosol contaminé : effet sur la biomasse et sur la dégradation des HAP, Approche méthodologique. Journée Jeunes Chercheurs, Valorisation du végétal, entre recherche et innovation, Nancy

Table des matières

Remerciements	
Communications	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des Annexes	
Liste des tableaux.....	
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Les sédiments de curage	3
1.1. Définitions et caractéristiques	3
1.2. Réglementation sur les sédiments de curages	4
2. Les sols et technosols	5
2.1. Définitions et caractéristiques	5
2.2. Réglementation sur les sites et sols pollués	6
3. Contamination par les HAP	7
3.1. Présentation et origine des HAP	7
3.2. Toxicité des HAP.....	8
3.3. Propriétés physico-chimiques des HAP	11
3.4. Les HAP dans l'environnement	13
3.5. Le devenir des HAP dans les sols et technosols.....	15
4. Contamination par des ETM.....	18
4.1. Présentation et origine des ETM	18
4.2. Toxicité des ETM – Propriétés physico-chimiques des ETM.....	19
4.3. Toxicité des ETM	22
4.4. Contamination des sols par les ETM.....	22
4.5. Devenir des ETM dans les sols	23
5. Les techniques de dépollution des sols.....	27
5.1. Généralités.....	27
5.2. La phytoremédiation.....	28
6. Choix de <i>Miscanthus x giganteus</i> en phytoremédiation	32

6.1.	Origine de <i>Miscanthus x giganteus</i>	32
6.2.	Présentation de <i>Miscanthus x giganteus</i>	33
6.3.	Caractéristiques agronomiques	34
6.4.	Productivité.....	37
6.5.	Valorisation de la biomasse de MxG.....	38
6.6.	<i>Miscanthus x giganteus</i> en phytoremédiation	40
7.	Voies d'amélioration de la phytoremédiation par <i>Miscanthus x giganteus</i>	42
7.1.	La co-culture	42
7.2.	Phytoremédiation assistée par bioaugmentation	46
8.	Objectifs de la thèse.....	48
	Matériels et méthodes.....	51
1.	Présentation du site d'étude.....	51
1.1.	Caractérisation de la contamination des sédiments excavés.....	51
1.2.	Caractérisation de la contamination du site hôte	52
1.3.	Création du technosol étudié	54
2.	Amélioration de la phytoremédiation par co-culture.....	56
2.1.	Mise en place de l'expérimentation	56
2.2.	Paramètres étudiés.....	57
3.	Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation	71
3.1.	Isolement des microorganismes.....	71
3.2.	Suivi de la croissance bactérienne dissipation du benzo(a)pyrène dans le milieu de culture.....	72
3.3.	Identification des microorganismes	72
3.4.	Mise en place de l'expérimentation	73
3.5.	Analyses	75
4.	Analyses statistiques	79
	Résultats & Discussion	81
1.	Amélioration de la phytoremédiation par co-culture.....	81
1.1.	Caractérisation initiale des sols	81
1.2.	Suivi des teneurs en polluants dans les sols	85
1.3.	Suivi de l'écotoxicité et de la génotoxicité du technosol	94
1.4.	Suivi des végétaux.....	98

1.5. Suivi de la microflore des sols.....	112
1.6. Conclusion pour la partie « Amélioration de la phytoremédiation par co-culture »	124
2. Partie Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation	126
2.1. Sélection et identification du microorganisme.....	126
2.2. Suivi des teneurs en polluants dans le technosol	132
2.3. Suivi de l'écotoxicité du technosol	140
2.4. Suivi des végétaux.....	141
2.5. Suivi de la microflore du technosol	146
2.6. Conclusion pour la partie phytoremédiation couplée à la bioaugmentation	154
3. Comparaison des deux méthodes utilisées : la co-culture et la bioaugmentation pour améliorer la phytoremédiation par MxG	157
Conclusion & perspectives	161
Annexes	165
Références bibliographiques.....	189
Résumé.....	206
Abstract	206

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

BaP : Benzo(a)pyrène

BCF : Facteur de Bioconcentration

BH: Bushnell-Haas

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CMR : Cancérigène Mutagène et Reprotoxique

Ct : « cycle threshold », cycle seuil

DTPA : Acide diéthylène triamine penta acétique

EFSA : European Food Safety Authority (ou "Autorité européenne de sécurité des aliments")

ETM : Élément trace métallique

ETT : Equivalence de toxicité totale

FPGN : Fond Pédogéochimique naturel

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (ou « Chromatographie en phase liquide à haute performance »)

ICPE : Installation Classée pour la Protection de l'Environnement

IEM : Interprétation de l'Etat des Milieux

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

IRCC : Indice de Risque Cumulatif de Cancer

K_H : Constante de Henry

K_{oc} : Coefficient de partage carbone organique – eau

K_{ow} : Coefficient de partage octanol – eau

LB : Luria-Bertani

MxG : *Miscanthus x giganteus*

OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle

PCB : Polychlorobiphényles

PCR : Polymerase Chain Reaction (ou « Réaction en chaîne par polymérase »)

PVPP : Polyvinylpyrrolidone

qPCR : PCR quantitative

Rpm : rotation par minute

UFC: Unité Formant Colonie

US EPA : United States Environmental Protection Agency (ou "Agence américaine de protection de l'environnement")

Liste des figures

Figure 1: Arrangements moléculaires possibles des HAP	7
Figure 2: Processus de dépôts des polluants	13
Figure 3 : Facteurs biotiques et abiotiques influençant la dégradation des HAP dans le sol (Doyle et al., 2008)	16
Figure 4 : Processus de dégradation d'un cycle aromatique par les bactéries en condition aérobie (Juhász and Naidu, 2000)	17
Figure 5 : Voies d'exposition des ETM sur les Hommes (www.bretagne.ars.sante.fr/sites-et-sols-pollues-0)	20
Figure 6 : Contribution des différents types d'aliments à l'exposition des Hommes aux ETM en France	21
Figure 7 : Répartition des sept familles de polluants identifiés dans les sols ou dans les nappes des sites pollués évalués en 2012 (Antoni, 2013).....	22
Figure 8 : Différentes formes et localisations des ETM dans les sols (Baize, 2007)	24
Figure 9: Transferts d'ETM entre les différents compartiments de l'environnement (Bourrelier et al., 1998)	25
Figure 10 : Réponses des végétaux vis-à-vis d'un sol contaminé aux ETM (Baker, 1981)	26
Figure 11 : Les différentes techniques de phytoremédiation	29
Figure 12 : Schéma morphologique d'un plant de <i>Miscanthus x giganteus</i> (D'après Mazziotti, 2017)	33
Figure 13 : Photographie d'une inflorescence de <i>Miscanthus x giganteus</i> (source : www.france-miscanthus.org).....	34
Figure 14 : Cycle de développement d'une culture de MxG (D'après Técher, 2011)	35
Figure 15: Schéma morphologique du trèfle blanc (<i>Trifolium repens</i> L.) d'après (Thomé, 1885) (http://www.biolib.de/thome/band3/tafel_115.html). Les légendes de cette figure correspondent à 1 : feuille, 2 : fleur avant la floraison, 3 : fleur pendant la floraison, 4 : calice, 5 : Fleurs après floraison, 6 : gousse, 7 : akène.	44
Figure 16 : Carte représentant les points de prélèvements réalisés sur le Nachtweidgraben et le Warpich.....	51
Figure 17 : Les différentes étapes de création du technosol	54
Figure 18 : Photographie du bassin de rétention en eau du site d'étude.....	55
Figure 19 : Présentation des différentes modalités testées pour l'expérimentation "Amélioration de la phytoremédiation par co-culture"	57
Figure 20 : Paramètres étudiés pour l'expérimentation "Amélioration de la phytoremédiation par co-culture"	58
Figure 21 : Principales étapes de réalisation du test « Inhibition de la croissance racinaire » (ISO 11269-1)	61
Figure 22 : Principales étapes de réalisation du test "Émergence - croissance"	62
Figure 23 : Principales étapes de la réalisation du test <i>Vicia faba</i> micronoyaux en phase solide	63
Figure 24 : Principales étapes de réalisation du test <i>Vicia faba</i> micronoyaux en phase liquide.....	63
Figure 25 : Présentation des différentes modalités testées dans l'expérimentation « Phytoremédiation assistée par bioaugmentation ».....	74
Figure 26 : Paramètres étudiés dans l'expérimentation "Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation"	75

Figure 27 : Représentation schématique du protocole de mesure de la respiration microbienne du sol	78
Figure 28 : Concentrations en HAP (mg.kg ⁻¹ de sol sec) dans le technosol à T0 et à TF (après 263 jours) en fonction des différentes conditions testées : non planté (NP), en présence de Miscanthus x giganteus (MxG), de trèfle blanc et de la co-culture. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions à TF pour un HAP considéré (ANOVA suivi d'un test de Tukey HSD, p < 0,05, n=6). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives pour les concentrations d'un HAP considéré entre T0 et TF pour chaque condition (test t pour échantillons appariés, p < 0,05, n=6).....	86
Figure 29 : Résultats de l'équivalence de la toxicité totale relative au benzo(a)pyrène (ETT) (graphique de gauche) et de l'indice de risque cumulatif de cancer (IRCC) (graphique de droite) calculés à T0 (gris) et à TF (jaune) pour les différentes conditions testées. Les barres de couleur rouge sur les graphiques indiquent la valeur seuil de chaque indice (0,6 mg/kg pour l'ETT et 1 pour l'IRCC). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions à TF (ANOVA suivi d'un test de Tukey HSD, p < 0,05, n=6). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives pour l'indice calculé entre T0 et TF, pour une condition considérée (test t pour échantillons appariés, p < 0,05, n=6).	89
Figure 30 : Concentrations des 7 ETM étudiés (mg.kg ⁻¹ de sol sec) mesurées dans le technosol après 263 jours d'expérimentation en fonction des différentes conditions testées (non planté, MxG, trèfle blanc et co-culture). Des lettres différentes entre les conditions indiquent des différences statistiquement significatives (p < 0,05 ; n=3).	92
Figure 31 : Longueurs des racines d'avoine (mm) mesurées lors du test d'écotoxicité "Inhibition de la croissance racinaire" à T0 (graphique de gauche) et à la fin de l'expérimentation (graphique de droite) en fonction des différentes modalités testées. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions (p < 0,05, n= 3)	94
Figure 32 : Nombre de micronoyaux comptés dans les cellules racinaires de Vicia faba pour le test de génotoxicité à T0 (graphique de gauche) et à TF (graphique de droite). Les lettres minuscules sont utilisées pur montrer les différences entre les conditions pour la phase solide (en bleu, contact direct avec le sol) alors que les lettres majuscules sont utilisées pour la phase liquide (en orange, exposition des racines aux lixiviats de sol). Les lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions (p < 0,05, n=3).	96
Figure 33 : Évolution de la croissance du rejet principal de MxG (cm) au cours du temps pour chacune des modalités. La période du début de floraison des MxG est indiqué sur le graphique. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes modalités pour un même temps donné (p > 0,05)	98
Figure 34 : Teneur en chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de MxG au cours du temps (n=9). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités pour un même temps (p < 0,05).	99
Figure 35 : Taux de floraison moyen de MxG (%) dans le sol standard, le technosol et dans le technosol en présence de trèfle blanc. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les modalités (p < 0,05).	101
Figure 36 : Masses sèches des feuilles, tiges et fleurs de MxG dans les différentes conditions. Des lettres différentes pour une même partie indiquent des différences significatives entre les modalités (p < 0,05).	102

Figure 37 : Taux de chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de trèfle au cours du temps (n= 27). Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre les deux modalités : trèfle seul (en bleu) et trèfle en co-culture avec MxG (en vert) pour un même temps (p < 0,05).	103
Figure 38 : Masse sèche (g) des parties aériennes du trèfle blanc en monoculture et en co-culture avec MxG. Deux lettres identiques indiquent l'absence de différence significative (p > 0,05).	104
Figure 39 : Nombre de copies de l'ADNr 16S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en gris) et à TF (en jaune). Des lettres minuscules différentes permettent de montrer les différences entre les modalités à T0 alors que les majuscules permettent de montrer les différences entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF (p < 0,05, n=6).	112
Figure 40 : Nombre de copies de l'ADNr 18S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en bleu) et à TF (en rouge). Des lettres minuscules différentes permettent de montrer les différences entre les modalités à T0 alors que les majuscules permettent de montrer les différences entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF (p < 0,05, n=6).	113
Figure 41 : Nombre de copies du gène PAH-RHD α GP par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en orange) et à TF (en bleu). Des lettres minuscules différentes permettent de montrer les différences entre les modalités à T0 alors que les majuscules permettent de montrer les différences entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF (p < 0,05, n=6).	115
Figure 42 : Variations dans l'abondance relative (%) des phylums bactériens dans le sol standard à T0 (T0 témoin) et après culture de MxG (TF : Témoin MxG).	117
Figure 43 : Variations de la proportion relative des phylums bactériens dans le technosol à T0 et à la fin des 263 jours d'expérimentation : dans le technosol non planté, après culture de MxG, de trèfle blanc et de la co-culture.	118
Figure 44 : Proportion (%) des différents phylum fongiques pour le technosol (à T0 et aux différentes conditions à TF : non planté, après culture de MxG, de trèfle blanc ou de la co-culture) (graphique de gauche) et pour le sol standard à T0 et à TF après culture de MxG (graphique de droite).....	121
Figure 45 : Photographies d'une colonie formée par le microorganisme sélectionné pour la bioaugmentation après 7 jours, 11 jours et 14 jours de culture sur un milieu BH + 25 mg.L ⁻¹ de BaP incubé à 30°C. Le trait noir représente une échelle de 1 cm.	126
Figure 46 : Observation microscopique (grossissement x 1000) du microorganisme sélectionné pour la bioaugmentation après coloration de Gram.	127
Figure 47 : Cinétique de croissance de Streptomyces globisporus par mesure d'absorbance à 620 nm dans un milieu de culture BH contenant 25 mg.L ⁻¹ de benzo(a)pyrène (n=3)	128
Figure 48 : Suivi de la dissipation du benzo(a)pyrène au cours du temps par spectrophotométrie (différence des valeurs d'absorbance obtenues à 405 et à 620 nm) dans les milieux de culture BH + BaP contenant Streptomyces globisporus (n=3)	129
Figure 49 : Evolution de la coloration des milieux de culture au cours du temps. Les erlenmeyers photographiés de gauche à droite représentent : le témoin sans bactéries et les 3 suivants : 3 milieux ensemencés avec Streptomyces globisporus.....	129
Figure 50 : Suivi de la dissipation du benzo(a)pyrène au cours du temps après extraction et dosage en HPLC dans les milieux de culture BH contenant 25 mg.L ⁻¹ de BaP avec bactéries : Streptomyces globisporus (n=3) et sans bactéries (Témoin) (n=1). Les concentrations en benzo(a)pyrène dans	

les milieux en présence de bactéries sont comparées avec le milieu témoin sans bactéries (test de conformité de Student), l'absence d'astérisque montre une absence de différence significative entre les conditions ($p > 0,05$).	130
Figure 51 : Pic détecté en HPLC après celui du benzo(a)pyrène avec son spectre d'absorption dans les milieux de culture BH+BaP ensemencés avec les bactéries <i>Streptomyces globisporus</i>	131
Figure 52 : Suivi de l'évolution de l'aire du deuxième pic détecté en HPLC au cours du temps dans les milieux de culture BH + BaP ensemencés avec <i>Streptomyces globisporus</i>	131
Figure 53 : Concentrations en HAP totaux (somme des 16 HAP), en benzo(a)pyrène et en HAP totaux excepté le benzo(a)pyrène dans le technosol (mg.kg^{-1} de sol sec) à T0 (rouge) et TF (jaune) de l'expérimentation "phytoremédiation assistée par bioaugmentation" en fonction des différentes conditions : non planté, bactéries (bioaugmentation), MxG, MxG + bactéries, co-culture et co-culture + bactéries. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives pour une modalité entre T0 et TF (test t pour échantillons appariés) alors que des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités à TF ($p < 0,05$, $n=3$).	133
Figure 54 : Concentrations des HAP (mg.kg^{-1} de sol sec) pour lesquels une dissipation significative après au moins une technique de bioremédiation a été montrée. Concentrations en phénanthrène, pyrène et benzo(b)fluoranthène à T0 (rouge) et TF (jaune) en fonction des différentes conditions : non planté, bactéries (bioaugmentation), MxG, MxG + bactéries, co-culture et co-culture + bactéries. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives pour une modalité entre T0 et TF alors que des lettres identiques indiquent une absence de différence significative entre les modalités à TF ($p > 0,05$; $n=3$).	135
Figure 55 : Valeurs de l'équivalence de la toxicité totale relative au benzo(a)pyrène (ETT) (graphique de gauche) et de l'indice de risque cumulatif de cancer (IRCC) (graphique de droite) calculées à T0 (gris) et à TF (jaune) pour les différentes modalités testées. Les barres de couleur rouge sur les graphiques indiquent la valeur seuil acceptable de chaque indice ($0,6 \text{ mg/kg}$ pour l'ETT et 1 pour l'IRCC). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions à TF ($p < 0,05$, $n=3$). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives pour l'indice calculé entre T0 et TF pour une condition considérée (test t pour échantillons appariés, $p < 0,05$, $n=3$).	136
Figure 56 : Longueur des racines d'avoine (mm) mesurées au début de l'expérimentation "Phytoremédiation assistée par bioaugmentation" à T0 (graphique de gauche) et à TF (graphique de droite) en fonction des différentes modalités testées. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions ($p < 0,05$, $n=3$).	140
Figure 57 : Evolution de la hauteur du rejet principal de MxG (cm) au cours du temps pour chacune des modalités. Les lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les modalités pour un même temps ($p < 0,05$; $n=3$)	141
Figure 58 : Evolution de la teneur en chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de MxG au cours du temps pour chacune des modalités. Pour chaque temps, aucune différence du temps de chlorophylle n'est observée entre les différentes conditions ($p > 0,05$; $n=6$).	142
Figure 59 : Masses sèches des feuilles et tiges de MxG pour chacune des conditions. Des lettres minuscules différentes indiquent des différences significatives pour les biomasses de feuilles entre les conditions alors que les lettres majuscules montrent les différences significatives pour les biomasses des tiges entre les différentes conditions ($p < 0,05$; $n=3$).	143

Figure 60 : Evolution de la teneur en chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de trèfle blanc au cours du temps en fonction des modalités "co-culture" et "co-culture + bactéries". Pour chaque temps, aucune différence n'est montrée entre les deux conditions ($p > 0,05$; $n = 9$).....	144
Figure 61 : Masse sèches des parties aériennes de trèfle blanc lorsqu'il se trouve en co-culture avec MxG ou alors en co-culture en présence de bioaugmentation. Les lettres identiques indiquent l'absence de différences significatives entre les conditions ($p > 0,05$; $n=3$).....	145
Figure 62 : Nombre de copies de l'ADNr 16S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en gris) et à TF (en jaune). Des lettres différentes montrent des différences statistiquement significatives à TF entre les différentes conditions. Les astérisques (*) montrent les différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$; $n=6$).	146
Figure 63 : Nombre de copies d'ADNr 18S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en bleu) et à TF (en rouge). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$; $n=6$).....	147
Figure 64 : Nombre de copies du gène PAH-RHD α GP par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en orange) et à TF (en bleu). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$; $n=6$).	148
Figure 65 : Concentration de CO ₂ produit par gramme de sol sec à T0 pour le technosol non planté (bleu) et pour le technosol bioaugmenté (orange). Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre les deux conditions pour un même temps ($p < 0,05$; $n = 3$).	150
Figure 66 : Concentration de CO ₂ produit par gramme de sol sec à TF pour les différentes modalités de bioremédiation sur le technosol. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions pour un même temps alors que les valeurs encadrées ne présentent pas de différences significatives entre elles ($p < 0,05$; $n = 3$).....	150
Figure 67 : Nombre d'UFC par gramme de sol déterminé sur un milieu BH + BaP tous les mois pour chacune des conditions de bioremédiation. Les lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les modalités pour un même temps alors qu'aucune différence n'est montrée entre les points encadrés pour un même temps ($p < 0,05$; $n=9$)...	153

Liste des Annexes

Annexe A : Article publié dans le journal "Journal of Soils and Sediments" en mai 2020. 165

**Annexe B : Article publié dans le journal "Environmental Science and Pollution Research" en
octobre 2019. 179**

Liste des tableaux

Tableau 1: Valeurs seuils (S1) relatives aux sédiments extraits de cours d'eaux ou de canaux selon l'arrêté du 9 août 2006 (en mg/kg ⁻¹ de sédiment sec analysé sur la fraction inférieure à 2 mm).....	4
Tableau 2 : Classification des 16 HAP prioritaires par le CIRC (cancer-environnement, 2018).....	9
Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP définis comme prioritaires par l'US EPA (INERIS, 2005)	12
Tableau 4: Liste non exhaustive des sources anthropiques des ETM dans l'environnement (D'après Nagajyoti et al., 2010).....	19
Tableau 5 : Liste non exhaustive des aliments pouvant contenir certains ETM (Mudgal et al., 2010).....	20
Tableau 6 : Résultats des dosages HAP et ETM réalisés sur les sédiments. Les valeurs en rouge indiquent un dépassement des valeurs seuils fixées par l'arrêté du 9 août 2006 (Legifrance, 2006)	52
Tableau 7 : Concentrations en ETM et HAP obtenus sur les 13 prélèvements de sol du site hôte	53
Tableau 8 : Valeurs moyennes et maximales des ETM et HAP dosés dans le fond pédogéochimique naturel (FPGN) de Thionville-Custines.	53
Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées en qPCR.....	68
Tableau 10 : Caractérisation physico-chimique initiale du technosol et du sol standard.....	81
Tableau 11 : Concentrations initiales en HAP (mg.kg ⁻¹) dans le sol standard et le technosol en comparaison avec les valeurs de référence du fond pédogéochimique naturel (FPGN) local (Darmendrail, 2000). Les valeurs en gras indiquent un dépassement de la valeur moyenne du FPGN local alors que les valeurs en gras et en rouge sont supérieures à la valeur maximale du FPGN local	82
Tableau 12 : Concentrations en ETM "totaux" et "biodisponibles" dans les sols à T0 en comparaison aux valeurs du fond pédogéochimique naturel local. Les valeurs en gras indiquent un dépassement de la moyenne du FPGN local.	84
Tableau 13 : Concentrations en ETM extraits au DTPA (mg.kg ⁻¹ de sol sec) dans le sol témoin après 263 jours de plantation de MxG ainsi que dans les différentes modalités du technosol (non planté, MxG, trèfle blanc et co-culture entre MxG et trèfle blanc) (n= 3)	90
Tableau 14: Nombre rejets supplémentaires de MxG (moyenne + écart type, n=3) pour chaque condition. Des lettres différentes montrent des résultats significativement différents (p < 0,05).	100
Tableau 15 : Concentrations en ETM (mg.kg ⁻¹ de matière sèche) mesurée dans les différentes parties de MxG en fonction des modalités testées. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les 3 conditions pour un ETM donné et une partie du végétal considérée (p < 0,05, n=3).....	106
Tableau 16 : Concentrations en ETM (mg.kg ⁻¹ de matière sèche) mesurée dans les parties aériennes et les racines du trèfle blanc en monoculture ou en co-culture dans le technosol. Des lettres identiques indiquent l'absence de différences statistiquement significatives entre les 2 conditions pour un ETM donné et une partie du végétal considérée (p < 0,05, n=3).	107
Tableau 17 : Facteurs de bioconcentration (BCF) calculés pour chacun des ETM étudiés dans les tiges, les feuilles, les racines et les rhizomes de MxG pour chaque modalité (dans le sol standard, en monoculture dans le technosol ou en co-culture dans le technosol). Les valeurs en rouge indiquent des ratios supérieurs à 1 alors que « ND : Non Déterminé » est utilisé pour indiquer que le BCF n'a pas pu être calculé en raison d'une concentration en ETM inférieure à une limite de quantification.....	109
Tableau 18 : Facteurs de bioconcentration (BCF) calculés pour chacun des 7 ETM étudiés dans parties aériennes et les racines de trèfle blanc en monoculture ou en co-culture dans le technosol. La mention	

« ND » est utilisée pour indiquer que le BCF n'a pas pu être calculé en raison d'une concentration en ETM inférieure à une limite de quantification.	109
Tableau 19 : Indices de combustion calculés à partir des analyses réalisées sur les tiges de MxG pour deux réplicas des 3 conditions. La couleur verte indique une tendance naturelle à l'encrassement faible, modérée en orange et élevée en rouge.	110
Tableau 20 : Abondance relative des différents phylums bactériens retrouvés à plus de 0,1% dans le sol standard et le technosol à T0 et à TF en fonction des différentes conditions de plantation	119
Tableau 21 : Indices de Shannon permettant de comparer la diversité bactérienne des sols en fonction des différentes conditions testées.....	120
Tableau 22 : Abondance relative des différents phylum fongiques dans le sol standard et le technosol à T0 et à TF en fonction des différentes conditions de plantation	122
Tableau 23 : Indices de Shannon permettant de comparer la diversité fongique des sols en fonction des différentes conditions testées à T0 et à TF	123
Tableau 24 : Concentrations en ETM (mg.kg^{-1} de sol sec) à TF dans les différentes modalités du technosol : non planté, bioaugmentation (bact.), MxG ; MxG + bioaugmentation, co-culture et co-culture + bioaugmentation. Des lettres identiques indiquent aucune différence significative entre les conditions pour un ETM considéré ($p > 0,05$; $n=3$).	138
Tableau 25 : Concentrations en ETM extraits au DTPA (mg.kg^{-1} de sol sec) à TF dans les différentes modalités du technosol : non planté, bioaugmentation (bact.), MxG ; MxG + bioaugmentation, co-culture et co-culture + bioaugmentation. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions pour un ETM considéré ($p < 0,05$; $n=3$).	139

Introduction

Chaque année, près de 50 millions de mètres cubes de sédiments sont excavés en France afin de maintenir la navigation, restaurer les cours d'eaux et limiter les inondations (AIDA, 2008; Hardy and Assié, 2002; Shneider, 2001; Touzé, 2013). Cependant, en raison des activités anthropiques, les sédiments peuvent être contaminés aussi bien en polluants organiques tels que les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), PCB (polychlorobiphényles), hydrocarbures, qu'en polluants inorganiques (éléments traces métalliques, ETM) (Shneider, 2001; Touzé, 2013).

En fonction de leur contamination, les sédiments excavés pourront être orientés vers la filière immersion, c'est-à-dire déposés en mer par exemple, ou, vers la filière terrestre où ils pourront être valorisés ou orientés vers un lieu de stockage spécifique. Les sédiments de curage valorisables sont utilisés de différentes manières : renforcement des berges, épandage sur des sols agricoles, remblais de carrières, produits de construction, etc. (RECORD et al., 2017). Quant aux sédiments non valorisables, ils seront soit stockés soit dépollués en fonction des besoins.

La phytoremédiation est une technique biologique de dépollution des sols, moins coûteuse et plus respectueuse de l'environnement que les techniques physico-chimiques, qui utilise des végétaux et leurs microorganismes associés pour extraire, stabiliser ou dégrader les contaminants du sol, des sédiments, de l'eau ou de l'air (Khan, 2005; Ma et al., 2016a). Parmi les nombreuses espèces utilisées en phytoremédiation, *Miscanthus x giganteus* (MxG) est une graminée pérenne qui permet d'induire une dissipation des HAP et de stabiliser les ETM dans les sols. Elle produit une biomasse valorisable en tant que combustible, biocarburant, paillage horticole, litière pour animaux, etc. (Nsanganwimana et al., 2014). L'intérêt d'utiliser MxG sur des sols contaminés tient donc à la fois à sa contribution à la dépollution des sols et à la fois à la production de biomasse valorisable, permettant de ne pas concurrencer les terres agricoles. Cependant, des études ont montré une diminution significative de la biomasse aérienne de MxG lorsque la plante se développe sur des sols contaminés comparé à des sols non contaminés (Técher, 2011; Wanat et al., 2013).

Dans cette étude, les sédiments contaminés excavés de deux cours d'eaux ont été mélangés au sol du site d'accueil lui-même contaminé en ETM et en HAP afin de créer un technosol. Il s'agira alors de dépolluer aussi bien les sédiments que le sol du site hôte par phytoremédiation. De plus, l'addition de sol aux sédiments excavés pourrait permettre d'améliorer leur structure et leur qualité agronomique pour un meilleur développement des végétaux.

L'objectif de ce travail de thèse consiste à étudier les voies d'amélioration de la phytoremédiation par MxG. Pour cela, les capacités de remédiation (dissipation des HAP, stabilisation des ETM, amélioration de la qualité du technosol, augmentation de la biomasse valorisable, etc.) de MxG en co-culture avec du trèfle blanc ou de MxG en bioaugmentation avec des microorganismes endémiques présentant un potentiel de dégradation des HAP seront comparées à l'évolution naturelle du technosol et à sa phytoremédiation par MxG seul.

Ce manuscrit de thèse est divisé en quatre parties. La première, consacrée à l'analyse bibliographique, présente l'état actuel des connaissances sur les sédiments et sols pollués par les HAP et les ETM, en s'intéressant à la toxicité de ces contaminants et leur devenir dans l'environnement, ainsi que leur dépollution par phytoremédiation en se focalisant sur *Miscanthus x giganteus*. Les associations végétales et la bioaugmentation y sont également développées. La deuxième partie présente les matériels et méthodes employés afin de répondre aux objectifs du travail de thèse. La troisième partie est ensuite consacrée aux résultats obtenus lors des deux expérimentations ainsi qu'à leur interprétation. Enfin, la dernière partie présente la conclusion générale quant aux hypothèses émises ainsi que des perspectives à donner à ce travail.

Synthèse bibliographique

1. Les sédiments de curage

1.1. Définitions et caractéristiques

Les sédiments sont « des dépôts de matériel meuble d'origine minéralogique ou biogénique, de nature très variée. Dans les écosystèmes aquatiques continentaux, leur nature et leur composition sont liées à la fois à la constitution pétrographique des bassins versants et à la structure de leur couvert végétal » (Ramade, 1998).

Les sédiments d'origine allochtone peuvent être distingués des sédiments d'origine autochtone. Les sédiments continentaux sont majoritairement d'origine allochtone (Ramade, 1998). L'apport de matières peut être d'origine naturelle, provenant de l'érosion des sols, de la décomposition de la matière végétale, ou d'origine anthropique comprenant des apports de matières organiques, de nutriments ou de polluants *via* des rejets agricoles, industriels et domestiques (Shneider, 2001). A l'inverse, les sédiments d'origine autochtone sont formés par la production primaire du milieu qui engendre des débris de végétaux aquatiques comme les macrophytes ou les microphytes (microalgues) et des cadavres d'animaux (Shneider, 2001).

Les sédiments sont constitués de matières minérales et organiques de taille très variables allant des blocs aux pierres, graviers, sables et vases. Sous l'action de la gravité, les matériaux solides vont se déposer au fond des biotopes aquatiques et vont s'accumuler au fil du temps. Ce phénomène naturel, qu'est la sédimentation, provoque l'envasement du lit des cours d'eau et est accentué par des topographies planes, de faibles débits et de rejets anthropiques (industriels, agricoles ou urbains). La sédimentation provoque un encombrement du lit des cours d'eaux, une réduction de ses capacités d'écoulement, engendre un risque d'inondation et peut empêcher la navigation (Shneider, 2001). Le maintien de la navigation et la lutte contre les inondations sont les principales causes de curage des sédiments (Hardy and Assié, 2002). L'entretien des cours d'eaux et la restauration du milieu peuvent également pousser à envisager le curage d'un cours d'eau lorsque par exemple son lit est envahi par la végétation, lors d'une prolifération d'algues et de plantes aquatiques ou encore lors de l'effondrement de berges (Shneider, 2001).

Ainsi en France, environ 50 millions de mètre cube de sédiments sont excavés par an (AIDA, 2008; Touzé, 2013) dont 90% concernent les dragages maritimes des ports (AIDA, 2008). Cependant, en raison des activités anthropiques, les sédiments peuvent être contaminés en aussi bien par des polluants organiques comme les HAP, PCB, hydrocarbures ainsi qu'en polluants inorganiques (ETM) (Shneider, 2001; Touzé, 2013).

1.2. Réglementation sur les sédiments de curages

Que ce soit pour les sédiments continentaux, portuaires ou marins, une évaluation de leur qualité physico-chimique doit être réalisée précédemment à l'opération de curage (RECORD et al., 2017). Les sédiments de dragage considérés comme non contaminés peuvent être déposés en mer ou plus loin dans les fleuves ou canaux : c'est la filière immersion.

Dans le cas des sédiments extraits de cours d'eaux ou de canaux, les valeurs seuils sont définies par l'article 1 de l'arrêté du 9 août 2006 modifié par l'arrêté du 17 juillet 2014 (Legifrance, 2006) (Tableau 1). Les sédiments concernés subissent également une première étape de classification selon leur potentiel de dangerosité (inerte / dangereux / non dangereux) et selon les définitions de l'article R. 541-8 du code de l'environnement (Legifrance, 2016), relatif à la classification des déchets.

Tableau 1: Valeurs seuils (S1) relatives aux sédiments extraits de cours d'eaux ou de canaux selon l'arrêté du 9 août 2006 (en mg/kg^{-1} de sédiment sec analysé sur la fraction inférieure à 2 mm).

Paramètres	Niveau S1
Arsenic	30
Cadmium	2
Chrome	150
Cuivre	100
Mercurure	1
Nickel	50
Plomb	100
Zinc	300
PCB totaux	0,68
HAP totaux	22,8

Lorsque la filière immersion n'est pas possible ou souhaitable, il faut alors s'orienter vers un traitement des sédiments à terre. Lorsque les sédiments excavés sont orientés vers la filière terrestre, ils sont considérés comme des déchets (RECORD et al., 2017) et sont donc soumis à la réglementation définie par le décret n°2002-540 du 18 avril 2002 -Nomenclature européenne des déchets (Legifrance, 2002).

En fonction de sa caractérisation, inerte, non inerte et dangereux ou non inerte et non dangereux, le sédiment sera orienté vers un lieu de stockage spécifique, pourra être dépollué ou valorisé. Les sédiments de curage peuvent être valorisés de différentes manières : renforcement des berges, épandage sur des sols agricoles si les sédiments curés présentent un intérêt agronomique pour le sol ou les cultures, utilisation pour des remblaiements de carrières ou pour la fabrication de produits de construction ou également en technique routière (RECORD et al., 2017). Chaque filière de valorisation est soumise à un cadre réglementaire spécifique. A ce jour, il n'existe cependant pas de législation spécifique aux sédiments pour les voies de valorisation.

2. Les sols et technosols

2.1. Définitions et caractéristiques

Le sol est défini comme « la couche supérieure de la croûte terrestre, provenant de l'altération du matériau-parent sous des processus climatiques, physiques, chimiques et biologiques, composée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes vivants » (AFNOR, 2015a). C'est le « compartiment à l'interface de la lithosphère, de l'hydrosphère, de l'atmosphère et de la biosphère » (Girard, 2011; Ruellan, 2010).

C'est un milieu évolutif organisé en horizons différents et un lieu de transferts (eau, énergie, air, vie, polluants) (Girard, 2005).

Les sols remplissent de nombreuses fonctions qui peuvent être qualifiées de services écosystémiques (Ruelan, 2010). Ils permettent d'assurer la production de biomasse végétale, essentielle pour l'alimentation des hommes et des animaux, pour la production de matériaux (bois, textiles) ou d'énergies (biocarburants). Ils jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques (cycles du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore) notamment grâce à la dégradation de la matière organique par les microorganismes. Ils abritent aussi une grande part de la biodiversité terrestre (Calvet, 2013; Ruellan, 2010). En effet, on estime qu'un quart des espèces décrites vivent dans le sol (Ruellan, 2010). Les sols influencent l'écoulement et la composition des eaux continentales. Ils agissent comme un filtre et vont pouvoir retenir les contaminants mais également les dégrader, dans le cas des contaminants organiques, *via* leurs microflore. Les sols assurent aussi la fonction de support pour la production végétale et pour les infrastructures (Calvet, 2013; Ruellan, 2010).

Ces diverses fonctions font des sols des éléments importants qu'il convient de préserver. Cependant, des exploitations inadaptées et excessives telles que certaines pratiques agricoles (utilisation excessives de fertilisants et de pesticides, monocultures, tassement du sol, .etc.), les constructions de routes, d'usines, de villes, conduisent à la dégradation des sols et altèrent leurs fonctions (Calvet, 2013; Ruellan, 2010).

Avec l'apparition des sols anthropisés, de nouvelles catégories de sol ont été créées. C'est le cas notamment des technosols. Les technosols sont définis par la Base de Référence Mondiale pour les Ressources du Sol (« World reference base for soils resources ») comme des sols dont les propriétés et la pédogénèse sont dominés par leur origine « technique », c'est-à-dire anthropique. Ils contiennent une quantité importante de matériaux fabriqués ou extraits de la Terre par des Hommes (définis comme des artefacts), ou sont scellés dans une roche « technique » c'est-à-dire dans un matériau créé par l'Homme et qui a des propriétés différentes de la roche naturelle. Ils comprennent les sols provenant de déchets (boues, cendres, décharges) et également les sols déposés sur des géo-membranes et les sols

construits avec des matériaux fabriqués par l'homme. Ces sols sont retrouvés surtout dans les zones urbaines et industrielles partout dans le monde.

Les technosols, fortement affectés par les activités anthropiques, sont plus susceptibles d'être contaminés que les autres groupes de sols. Ils peuvent contenir des substances toxiques à la fois organiques et/ou minérales résultants de processus anthropiques actuels ou antérieurs (IUSS, 2006).

2.2. Réglementation sur les sites et sols pollués

Un site pollué est « un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'une infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement » (BASOL, 2020).

Contrairement à l'air et à l'eau, le sol ne fait pas l'objet d'un régime réglementaire propre. Les dispositions le concernant sont dispersées dans le Code de l'Environnement. Cependant, la méthodologie de gestion des sites et sols pollués est décrite dans le guide du BRGM (BRGM, 2017) et synthétisés dans le guide « Présomption de la pollution d'un sol » (Branchu et al., 2018). La méthodologie en vigueur en France a été mise en place en 2007 puis actualisée en 2017. Elle repose sur deux démarches : l'interprétation de l'état des milieux (IEM) et le plan de gestion.

Ces démarches sont initiées par la réalisation d'un **schéma conceptuel** basé sur des études historiques et documentaires, des constats de terrain, des campagnes de prélèvement et d'analyses de sol, d'eaux superficielles et souterraines ainsi que de végétaux. Le schéma conceptuel a pour objectif d'identifier :

- **Les sources de pollution** : présence d'une seule ou de plusieurs sources, présence de produits ou de déchets en surface et/ou enterrés, etc.
- **Les milieux de transferts et leurs caractéristiques** : sol, cours d'eaux, nappes phréatiques
- **Les cibles à protéger** : les populations humaines, les ressources naturelles, la biodiversité

Le schéma conceptuel permet d'établir un bilan factuel de l'état des milieux du site. Il est évolutif et enrichi tout au long de la démarche.

Suite à la réalisation du schéma conceptuel, la démarche **d'Interprétation de l'État des Milieux** (IEM) est réalisée afin de vérifier que l'état actuel du site est compatible avec son usage. Elle s'intéresse prioritairement aux aspects sanitaires. Elle permet de distinguer 3 types de milieux :

- Les milieux qui ne nécessitent aucune **action particulière** : ceux compatibles avec les usages constatés et qui n'exposent pas les populations à des niveaux de risques excessifs
- Les milieux qui peuvent faire l'objet **d'actions simples de gestion** pour rétablir la compatibilité entre l'état des milieux et leurs usages constatés : par l'enlèvement des pollutions concentrées, le recouvrement de terre par exemple
- Les milieux qui nécessitent la **mise en œuvre d'un plan de gestion**

Lorsque l'état actuel du site n'est pas compatible avec son usage, un **plan de gestion** est mis en place. Ce dernier vise à étudier les différents scénarios de gestion d'une pollution en agissant sur une source, sur une voie de transfert, sur une exposition. Il s'agit alors de maîtriser les impacts des pollutions, de déterminer les mesures à réaliser, d'engager les travaux nécessaires et de réaliser une analyse des risques résiduels lorsque les voies de transfert subsistent pour déterminer si les risques sont acceptables en fonction des usages du site.

Des études de sols peuvent être réalisées par une demande administrative dans le cas des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE), lors d'une cessation d'activité d'une ICPE, d'une cession ou acquisition d'un site mais également par une démarche volontaire de l'exploitant du site.

3. Contamination par les HAP

3.1. Présentation et origine des HAP

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques hydrophobes constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène organisés en structures cycliques accolées et composés au minimum de deux cycles aromatiques liés de façon linéaire, angulaire ou groupé (Doyle et al., 2008; INERIS, 2005; Maliszewska-Kordybach, 1999) (Figure 1).

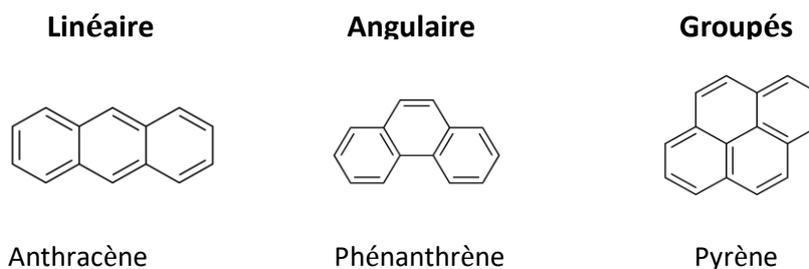


Figure 1: Arrangements moléculaires possibles des HAP

Les HAP sont formés principalement lors de la combustion incomplète de matières organiques (Maliszewska-Kordybach, 1999; Wild and Jones, 1995) et peuvent être d'origine :

- **Naturelle** : lorsqu'ils sont formés à la suite de processus naturels comme les activités volcaniques ou les feux de forêt (Maliszewska-Kordybach, 1999) ou encore synthétisés par les végétaux (INERIS, 2005).
- **Anthropique** : lorsqu'ils sont formés lors d'activités humaines impliquant la combustion de charbon, de bois, d'huile, de gaz et de déchets. Les domaines utilisant ces procédés sont les industries (production de coke, traitement du pétrole, production d'aluminium, etc.), le chauffage résidentiel (chauffage au bois, au gaz et au fioul), la production de chaleur ou d'électricité (centrales de charbons, de bois, de pétrole) et les transports (voitures, avions, trains, bateaux).

Les sources anthropiques représentent la part prédominante d'émission de HAP, alors que les sources naturelles sont minoritaires (Maliszewska-Kordybach, 1999).

Il a été estimé que la principale source anthropique d'émission de HAP en France correspond au chauffage résidentiel, qui représentait 66 % des émissions de HAP en 2010. Le transport routier était classé second et responsable d'environ 25 % des émissions. Les industries, l'agriculture/sylviculture suivies des domaines de transformation de l'énergie et les autres transports sont des sources minoritaires à l'échelle du pays (AIR PARIF, 2013).

3.2. Toxicité des HAP

Plus d'une centaine de HAP ont été identifiés (cancer-environnement, 2018; INERIS, 2005) mais 16 sont généralement suivis dans les études environnementales : il s'agit des 16 HAP définis comme prioritaires par l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (US EPA, « Environmental Protection Agency ») posant des problèmes environnementaux majeurs en raison de leur toxicité (INERIS, 2005). Certains d'entre eux sont cancérogènes et ont été classés comme produits à risque par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification des 16 HAP prioritaires par le CIRC (cancer-environnement, 2018)

Nom des HAP	Classification CIRC
Naphtalène	/
Acénaphylène	/
Acénaphène	3
Fluorène	3
Phénanthrène	3
Anthracène	3
Fluoranthène	3
Pyrène	3
Benzo(a)anthracène	2B
Chrysène	2B
Benzo(b)fluoranthène	2B
Benzo(k)fluoranthène	2B
Benzo(a)pyrène	1
Dibenzo(ah)anthracène	2A
Benzo(ghi)pérylène	3
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	2B

Légende des groupes du CIRC :

- **Groupe 1** : substance cancérigène
- **Groupe 2A** : substance probablement cancérigène
- **Groupe 2B** : substance possiblement cancérigène
- **Groupe 3** : substance inclassable quant à sa cancérigénicité

Le benzo(a)pyrène est considéré comme un des HAP cancérigène les plus importants. C'est le seul des 16 HAP classé comme substance cancérigène avéré (groupe 1). Cependant, d'autres parmi les 16 sont considérés comme des substances « probablement » ou « possiblement » cancérigène et n'en restent pas moins dangereux.

Par ailleurs, l'exposition aux HAP est classée comme cancérigène avérée (groupe 1) pour le cancer du poumon et le cancer de la peau. Il a aussi été rapporté que l'exposition à ces substances pouvait induire, en plus des effets génotoxiques et cancérigènes, de nombreux

effets sur la santé tels que des effets systémiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques) ainsi que des effets sur la reproduction (INERIS, 2005).

Le site de développement de tumeurs après exposition à des HAP a été lié au mode d'administration, avec par exemple, la formation de tumeurs gastriques après administration orale ou de tumeurs cutanées après application cutanée. Cependant, des tumeurs sur d'autres sites ont pu être observées comme pour le benzo(a)pyrène qui, administré par voie orale peut produire des tumeurs au niveau du tractus gastro-intestinal, du foie, des poumons et des glandes mammaires des souris et des rats (EFSA, 2008).

Les différentes voies d'exposition aux HAP et aux contaminants en général chez l'Homme sont : l'ingestion, l'inhalation et l'absorption par contact cutané.

- **L'ingestion de nourriture contaminée**

La principale voie d'exposition aux HAP est, pour un non-fumeur, l'ingestion de nourriture contaminée et la seconde l'inhalation d'air ambiant (intérieur ou extérieur) (cancer-environnement, 2018; Maliszewska-Kordybach, 1999).

La contamination des aliments peut se faire par dépôt de particules se trouvant dans l'air sur les végétaux, l'accumulation dans les espèces animales (viandes ou poissons) ou lors de la cuisson des aliments au charbon de bois (cancer-environnement, 2018). D'après Menzie et al. (1992), l'ingestion de nourriture contaminée pour une personne non-fumeuse représenterait environ 93 % de l'exposition totale aux HAP et représenterait environ 44,6 % pour une personne fumeuse alors que l'ingestion d'eau contaminée représenterait 0,2 % pour un non-fumeur et moins de 0,01 % pour un fumeur.

Les principaux aliments dans lesquels le plus de HAP sont retrouvés sont les céréales et les produits à base de céréales ainsi que les produits de la mer et leurs dérivés (EFSA, 2008).

- **L'inhalation**

La majorité des HAP inhalés provient de la fumée de tabac. Il s'agit de la principale voie d'exposition aux HAP pour des fumeurs, devant l'alimentation. L'inhalation de fumée de cigarette représente, pour une personne fumeur, 52% de la part d'exposition totale à ces polluants (Menzie et al., 1992). La fumée de cigarette est classée comme substance cancérigène (catégorie 1) par le CIRC (cancer-environnement, 2018).

Une personne fumant 20 cigarettes par jour absorbe en moyenne 105 ng de benzo(a)pyrène quotidiennement et 40 ng pour une personne exposée au tabagisme passif (cancer-environnement, 2018).

A l'extérieur, les concentrations en HAP sont très variables mais les gaz d'échappement émis par les véhicules représentent la source principale d'exposition aux HAP. Les émissions moyennes de benzo(a)pyrène dans les villes varient de 1 à 10 ng.m⁻³, les valeurs les plus élevées étant mesurées à proximité des routes à fort trafic et d'émissions industrielles. En

milieu rural, les émissions de benzo(a)pyrène sont en moyenne de $0,2 \text{ ng.m}^{-3}$ (cancer-environnement, 2018).

Ces données peuvent varier lors d'expositions professionnelles aux HAP. Il a ainsi été démontré que le risque de cancer du poumon lié à une exposition professionnelle aux HAP est 2 à 3 fois supérieur à celui lié à l'exposition environnementale à ces substances (cancer-environnement, 2018). Parmi les différents secteurs d'activités concernés, on peut citer les cokeries, la production d'aluminium, la gazéification du charbon, la fonderie de fer et d'acier qui sont classés comme cancérogènes avérés (catégorie 1) par le CIRC (cancer-environnement, 2018).

3.3. Propriétés physico-chimiques des HAP

Quelques propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires sont présentées dans le Tableau 3. Elles permettent de comprendre le comportement des HAP dans l'environnement.

Les HAP sont généralement divisés en deux groupes : les composés de faible poids moléculaire pour les HAP comptant jusqu'à trois cycles aromatiques, et les composés de haut poids moléculaire pour les HAP composés de 4 cycles et plus (Doyle et al., 2008).

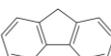
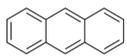
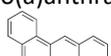
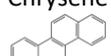
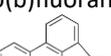
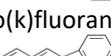
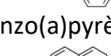
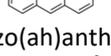
Les HAP sont des composés très peu solubles dans l'eau et leur solubilité décroît avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques. Leur caractère hydrophobe peut être estimé par le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}). Ce paramètre représente l'affinité d'une molécule pour une phase organique, l'octanol. Une substance est définie comme liposoluble lorsque le logarithme de son K_{ow} est supérieur à 3 (Tissier et al., 2005). Les 16 HAP sont donc liposolubles et ce, d'autant plus que le nombre de cycles augmente.

La constante de Henry (K_H) permet de déterminer la volatilité des HAP puisque ce coefficient permet de caractériser la capacité d'une substance à se partager entre les deux phases d'un système air/eau. Une substance est considérée comme volatile si sa constante de Henry est nettement supérieure à $1 \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ (Tissier et al., 2005). Les HAP de faibles poids moléculaires sont volatils contrairement aux HAP composés de 4 cycles et plus. De manière générale, la volatilité de ces composés décroît avec l'augmentation du nombre de cycles.

Le K_{oc} est le coefficient de partage entre la fraction de carbone organique et l'eau dans le sol ou le sédiment. Il indique approximativement le degré d'adsorption d'une substance sur un milieu considéré. A partir d'un logarithme de K_{oc} supérieur à 3, la substance peut être considérée comme significativement adsorbable (Tissier et al., 2005). Excepté l'acénaphthylène, tous les autres HAP peuvent être considéré comme facilement adsorbables à la matière organique des sols et sédiments.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

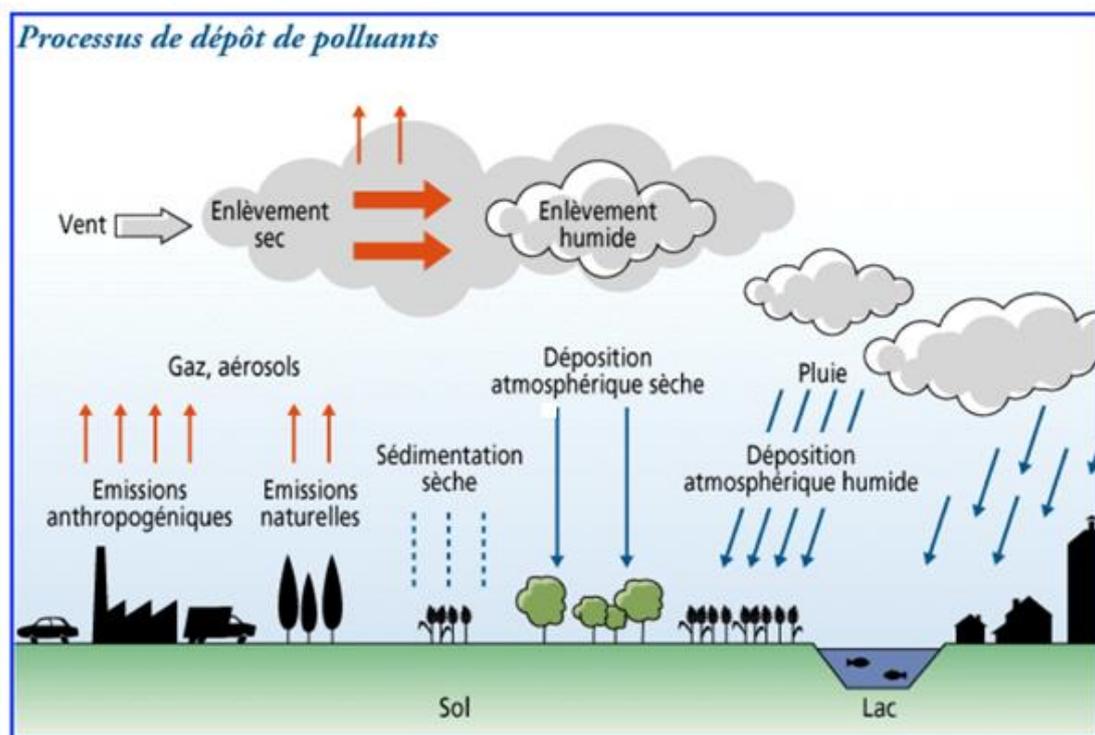
Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP définis comme prioritaires par l'US EPA (INERIS, 2005)

Nom des HAP	Cycles	Formule	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.L ⁻¹)	KH (Pa.m ³ .mol ⁻¹)	log K _{ow}	log K _{oc}
Naphtalène 	2	C ₁₀ H ₈	128,2	32	48,9	3,3	3,15
Acénaphthylène 		C ₁₂ H ₈	152,2	3,93	11,5	4,07	1,4
Acénaphthène 		C ₁₂ H ₁₀	154,2	3,42	14,7	3,98	3,66
Fluorène 	3	C ₁₃ H ₁₀	166,2	1,9	9,2	6,58	6,2
Phénanthrène 		C ₁₄ H ₁₀	178,2	1	3,98	4,45	4,15
Anthracène 		C ₁₄ H ₁₀	178,2	0,07	5,04	4,45	4,15
Fluoranthène 		C ₁₆ H ₁₀	202,3	0,27	1,5	4,9	4,58
Pyrène 		C ₁₆ H ₁₀	202,3	0,16	1,25	4,88	4,58
Benzo(a)anthracène 	4	C ₁₈ H ₁₂	228,3	0,0057	0,76	5,61	5,3
Chrysène 		C ₁₈ H ₁₂	228,3	0,06	0,26	5,16	5,3
Benzo(b)fluoranthène 		C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,001	0,051	6,04	5,74
Benzo(k)fluoranthène 		C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,0008	0,069	6,06	5,74
Benzo(a)pyrène 	5	C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,0038	0,04	6,06	6,74
Dibenzo(ah)anthracène 		C ₂₂ H ₁₄	278,3	0,0005	0,0048	6,84	6,52
Benzo(ghi)pérylène 		C ₂₀ H ₁₂	276,3	insoluble	0,014	6,5	6,2
Indeno(1,2,3-cd)pyrène 	6	C ₂₂ H ₁₂	276,3	0,0008	0,029	6,58	6,2

D'une manière générale, les HAP sont hydrophobes, très peu solubles dans l'eau, lipophiles et ont tendance à s'adsorber naturellement sur la matière organique des sols et des sédiments. Leur hydrophobicité, leur affinité pour une phase organique et leur tendance à s'adsorber sur des matières organiques croissent avec l'augmentation du nombre de cycles alors que leur solubilité et leur volatilité décroissent avec l'augmentation du nombre de cycles (Doyle et al., 2008; INERIS, 2005; Lu et al., 2011; Maliszewska-Kordybach, 1999; Wild and Jones, 1995).

3.4. Les HAP dans l'environnement

Les HAP sont des composés ubiquitaires dans l'environnement. Bien qu'émis dans l'atmosphère, ils peuvent être retrouvés dans l'eau, dans le sol et dans les sédiments par retombées atmosphériques (Maliszewska-Kordybach, 1999). Les processus de dépôt des polluants sont schématisés sur la Figure 2.



"Santé et pollution de l'air", Jean Martin, Lucien Yves Maystre *et al.*, copyright 1988, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

Figure 2: Processus de dépôts des polluants

La répartition des HAP diffère selon les compartiments de l'environnement, ce qui peut s'expliquer par les propriétés physico-chimiques des composés (Tableau 3). Il a été estimé que plus de 90 % des HAP sont contenus dans les sols et approximativement 5 % dans les

sédiments. Du fait de leur caractère hydrophobe, ils sont très peu retrouvés en phase aqueuse. Lorsqu'ils sont retrouvés dans les eaux, ils ont tendance à s'accumuler dans les sédiments ou s'adsorber à la matière organique en suspension (Maliszewska-Kordybach, 1999; Wild and Jones, 1995; Zhu et al., 2006).

En étant le compartiment principal à contenir les HAP, le sol constitue un réservoir de ces polluants. Les concentrations en HAP « naturellement » présentes dans les sols, c'est-à-dire celles qui sont liées aux sources naturelles de formation de ces composés, sont de l'ordre de 0,1 à 1 mg.kg⁻¹ de sol pour la somme des 16 HAP (INERIS, 2005). En revanche, des teneurs plus importantes peuvent être retrouvées en raison de sources anthropiques. Des concentrations plus élevées peuvent être retrouvées dans les sols urbains ainsi qu'en bordure de route, à proximité de sources d'émission de HAP. Cette élévation peut être encore plus importante sur des sols où se situaient des activités industrielles. Elles dépendent alors de l'activité industrielle exercée et également de la distance de la source d'émission. Les concentrations en HAP sur des sites contaminés sont très hétérogènes d'un site à l'autre et même sur le même site, d'un point de prélèvement à un autre (Juhasz and Naidu, 2000).

Des sites peuvent être contaminés par des concentrations en HAP à peine supérieures aux concentrations retrouvées naturellement dans le sol (0,1 à 1 mg.kg⁻¹), mais également des concentrations beaucoup plus élevées, pouvant atteindre 70 g.kg⁻¹ pour la somme des 16 HAP (Juhasz and Naidu, 2000). Une concentration de 70 633 mg.kg⁻¹ a, par exemple, été mesurée dans le sol d'une usine de traitement de traverses de chemins de fer au Minnesota (USA) qui utilisait un mélange de créosote et de fioul chauffé comme traitement (US EPA, 1997).

Les HAP peuvent également contaminer la faune et la flore. Ils vont pouvoir s'accumuler tout le long de la chaîne trophique du fait de leur caractère hydrophobe. Une partie pourra tout de même être éliminée par les organismes par diffusion passive ou par excrétion de métabolites polaires (Juhasz and Naidu, 2000). Pour les végétaux, la principale source de transfert des HAP correspond aux retombées atmosphériques. Bien que l'accumulation à partir d'un sol contaminé puisse être observée dans certains cas, cette voie reste négligeable (Juhasz and Naidu, 2000). En ce qui concerne la faune du sol, les HAP peuvent être transférés soit directement par ingestion de sol contaminé ou par contact dermique, soit indirectement par ingestion de nourriture contaminée comme les végétaux (Rudolf and Cornelis, 2003). Les HAP peuvent également s'accumuler dans les organismes marins comme les poissons, mollusques, crustacées, éponges de mer, algues, diatomées, etc. (Juhasz and Naidu, 2000).

3.5. Le devenir des HAP dans les sols et technosols

Lorsque les HAP entrent dans les sols, ils peuvent être soumis à différents processus physiques, chimiques ou biologiques qui vont influencer leur transport, leur dégradation, leur séquestration ainsi que leur biodisponibilité.

3.5.1. La volatilisation, le lessivage et la photodégradation

Parmi les différents processus qui peuvent intervenir dans un sol, la volatilisation, le lessivage et la photo-dégradation sont considérés comme minoritaires (Wilson and Jones, 1993). Bien que les HAP puissent être dégradés sous l'action des rayons UV, cela ne concerne que les composés en surface dans les sols.

3.5.2. Le transfert dans les différentes phases du sol

Par des phénomènes de volatilisation, adsorption/désorption et dissolution, les HAP vont pouvoir passer dans les différentes phases du sol : liquide, solide et gazeuse, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Peu d'entre eux vont se retrouver dans la fraction gazeuse du sol du fait de leur faible volatilité et puisqu'ils sont hydrophobes et peu solubles, peu d'entre eux vont être présents dans la phase liquide du sol. Les HAP vont donc majoritairement s'associer à la phase solide du sol, où ils auront tendance à s'adsorber à la matière organique. Ils seront alors peu mobiles (Ahangar, 2010).

Des études ont montré qu'en plus de la matière organique, la texture du sol pouvait influencer l'adsorption des HAP puisque ces composés sont préférentiellement associés à sa fraction fine (Amellal et al., 2001). En plus du mécanisme d'adsorption, les polluants se retrouvent également physiquement séquestrés dans les micropores du sol (Luo et al., 2012).

Les HAP sont donc principalement localisés dans la phase solide du sol, surtout ceux à haut poids moléculaire, où ils seront peu mobiles et peu biodisponibles.

3.5.3. La biodégradation

La principale voie de dissipation des HAP dans les sols est la biodégradation (Haritash and Kaushik, 2009). Les HAP sont des composés organiques pouvant être dégradés par différents microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les algues. Toutefois, les bactéries sont considérées comme étant les plus actives pour les métaboliser (Haritash and Kaushik, 2009).

Dans un sol contaminé, une partie de la microflore endémique est adaptée à la pollution et une partie est potentiellement capable d'utiliser les HAP comme source de carbone et/ou d'énergie pour se développer. La biodégradation des HAP dans les sols dépend des

caractéristiques du polluant lui-même mais également des conditions environnementales, des propriétés du sol, de leur biodisponibilité et également du potentiel de dégradation des microorganismes endémiques (Okere, 2011). La Figure 3 illustre les différents facteurs pouvant influencer la dégradation des HAP.

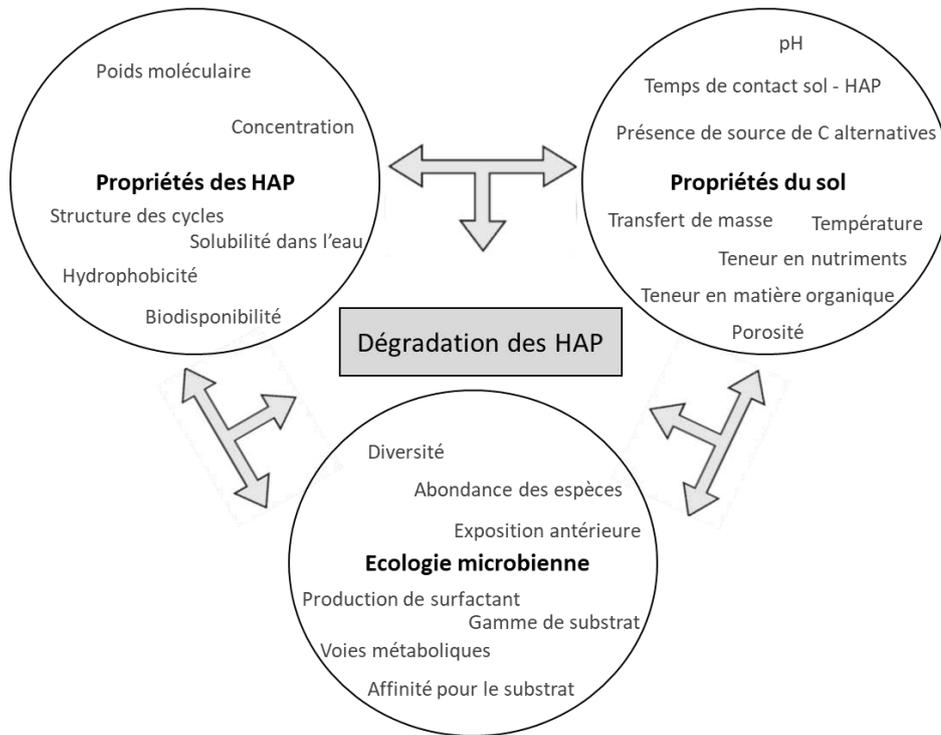


Figure 3 : Facteurs biotiques et abiotiques influençant la dégradation des HAP dans le sol (Doyle et al., 2008)

Parmi ces différents facteurs, la biodisponibilité est un facteur limitant majeur de la dégradation des polluants par des microorganismes (Volkering, 1996; Wenzel, 2009). En effet, les HAP de haut poids moléculaire sont généralement fortement liés à la matrice du sol et ne se retrouvent pas dans la phase aqueuse en raison de leur hydrophobicité. Cependant, la plupart des processus microbiologiques se déroulent dans la phase aqueuse (Volkering, 1996), c'est pourquoi, une large proportion des HAP est souvent difficilement accessible pour les microorganismes dégradeurs (Wenzel, 2009).

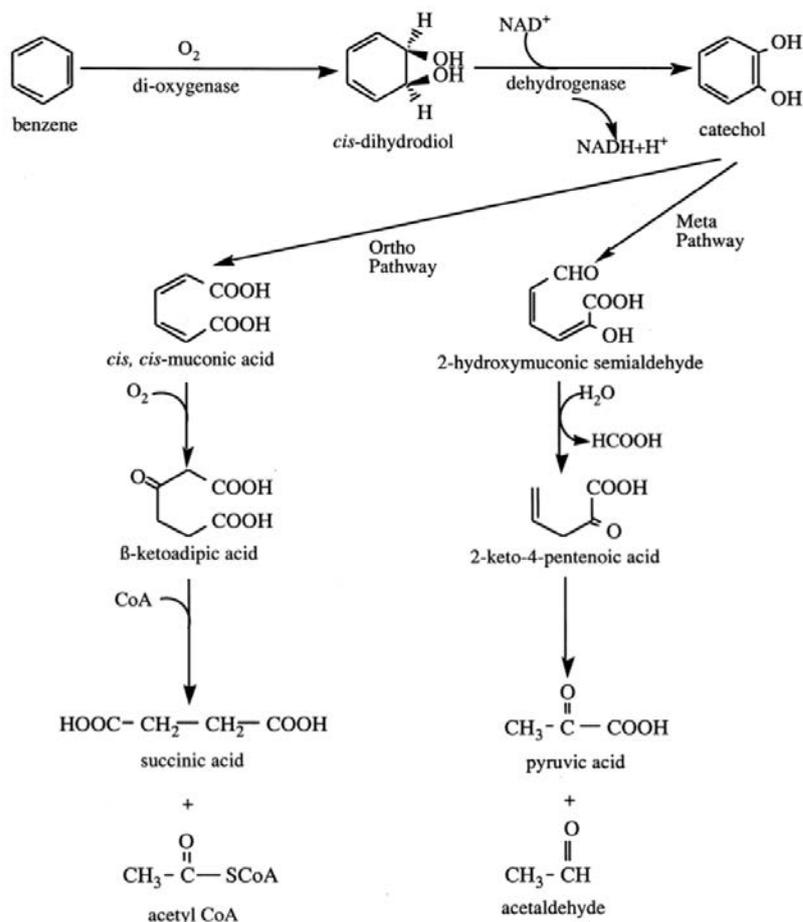


Figure 4 : Processus de dégradation d'un cycle aromatique par les bactéries en condition aérobie (Juhasz and Naidu, 2000)

Les principales étapes de dégradation des HAP par les bactéries en condition aérobie sont illustrées par l'exemple de la dégradation du benzène présenté dans la Figure 4. Dans ce cas, la première étape de dégradation par les bactéries consiste en l'oxydation du cycle aromatique en *cis*-dihydrodiol, ce qui se traduit par l'incorporation de deux molécules d'oxygène sous l'action d'enzymes bactériennes : les dioxygénases. Une oxydation supplémentaire des *cis*-dihydrodiols par les déhydrogenases conduit à la formation de catéchols. Des clivages selon la voie *ortho* ou *méta* des catéchols vont conduire à la production d'acides succiniques, fumariques, pyruviques et acétiques qui seront utilisés par les microorganismes pour la synthèse de constituants cellulaires et d'énergie. Un sous-produit de ces réactions est la formation de dioxyde de carbone et d'eau. Pour les molécules possédant plusieurs cycles, une fois le premier cycle dégradé, le second sera attaqué de la même manière et ainsi de suite (Juhasz and Naidu, 2000).

De nombreux microorganismes ont été isolés de sols contaminés et ont montré leur capacité à dégrader les HAP. Les HAP de faibles poids moléculaires sont, toutefois, plus facilement biodégradés que les HAP de haut poids moléculaire. La plupart des études réalisées concernent des HAP à faibles poids moléculaires. Peu de bactéries ayant été isolées du sol

sont capables d'utiliser directement les HAP à 4 cycles et plus, comme source de carbone et d'énergie (Doyle et al., 2008). Les HAP à haut poids moléculaires sont davantage dégradés par co-métabolisme (Juhász and Naidu, 2000). La dégradation par co-métabolisme consiste en l'utilisation de sources de carbone supplémentaires, plus facilement dégradables, nécessaires pour l'énergie et la croissance des microorganismes (Rentz et al., 2008).

Parmi les bactéries les plus étudiées pour la biodégradation des HAP, on retrouve les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas* *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Zhang et al., 2006).

4. Contamination par des ETM

4.1. Présentation et origine des ETM

Les éléments traces sont les « 80 éléments chimiques, constituants de la croûte terrestre, dont la concentration est pour chacun d'entre eux inférieure à 0,1 % ». Certains éléments traces sont des métaux, les éléments traces métalliques (ETM) comme le cadmium, le chrome, le zinc, le plomb, le cuivre, etc. (Baize, 2007).

Certains ETM, considérés comme à risque pour la santé humaine, sont généralement surveillés dans les études environnementales. Il s'agit du cadmium (Cd), du plomb (Pb), du mercure (Hg), de l'arsenic (As), du nickel (Ni) et du zinc (Zn) (Burnol et al., 2006).

Les ETM peuvent provenir de sources naturelles comme de sources anthropiques. La principale source naturelle est la roche mère, qui est la couche minérale superficielle de la croûte terrestre, dont l'altération va participer à la constitution des sols. Elle contient les ETM responsables des concentrations « naturellement » présentes dans les horizons de sol, appelé fond pédo-géochimique naturel local (Nagajyoti et al., 2010).

Il existe d'autres sources naturelles telles que les éruptions volcaniques qui émettent des niveaux élevés d'Al, Zn, Mn, Pb, Ni, Cu et Hg (Seaward and Richardson, 1989) ou encore les feux de forêts (Nagajyoti et al., 2010).

Les sources anthropiques sont généralement divisées en plusieurs catégories. Les sources agricoles, peuvent, par l'utilisation de fertilisants, enrichir le sol en divers ETM en fonction du produit utilisé ou, par le biais de l'épandage de boues de stations d'épurations (Seaward and Richardson, 1989). Les sources industrielles comprennent l'exploitation minière, le traitement à haute température de métaux, la combustion de charbon et de pétrole, le traitement des plastiques et des textiles, le traitement du bois et du papier (Nagajyoti et al., 2010). Les ETM sont également émis lors de l'incinération des ordures ménagères, par les moyens de transport tels que le transport routier ou aérien et par les effluents domestiques (Nagajyoti et al., 2010).

Tableau 4: Liste non exhaustive des sources anthropiques des ETM dans l'environnement (D'après Nagajyoti et al., 2010)

ETM	Sources anthropiques
As	Activités minières, métallurgies, industries chimiques, textiles, fertilisants, raffinerie de pétrole, préservateur de bois, production de peinture et pigments
Cd	Activités minières, métallurgie, industries chimiques, textiles, fertilisants, raffineries de pétrole
Cr	Métallurgie, industries chimiques, papeteries, fertilisants, raffineries de pétrole, production de peinture et pigments
Cu	Métallurgie, industries chimiques, papeteries, fertilisants, raffineries de pétrole
Hg	Activités minières, métallurgie, industries chimiques, papeteries, textiles, fertilisants, raffineries de pétrole
Ni	Métallurgie, textiles, fertilisants, raffineries de pétrole, activités minières, batteries d'automobiles
Pb	Activités minières, métallurgie, industries chimiques, raffinerie de pétrole, essence, production de peinture et pigments
Zn	Métallurgies, industries chimiques, fertilisants, raffineries de pétrole, production de peinture et pigments

4.2. Toxicité des ETM – Propriétés physico-chimiques des ETM

Certains ETM sont dits « essentiels » puisqu'ils sont nécessaires à diverses fonctions biochimiques et physiologiques pour les organismes vivants. Ils sont des constituants importants de plusieurs enzymes clés et jouent un rôle fondamental dans diverses réactions d'oxydoréduction. C'est le cas notamment du cuivre, du zinc, du nickel et du chrome. Ils sont également appelés oligo-éléments (Nagajyoti et al., 2010; Sarwar et al., 2017; Tchounwou et al., 2012). Un apport insuffisant en ces oligo-éléments entraîne divers syndromes de carence ou de maladies (Tchounwou et al., 2012). Au contraire, ils peuvent devenir toxiques à des concentrations excessives (Burnol et al., 2006; Mudgal et al., 2010; Saha et al., 2016a).

D'autres ETM, en revanche, n'ont pas de fonction biologique connue, c'est le cas du mercure, du cadmium et du plomb. Ce sont des métaux non-essentiels (Nagajyoti et al., 2010; Sarwar et al., 2017).

Au-delà d'un certain seuil, tous les ETM peuvent entraîner des effets néfastes sur les êtres vivants. Leur toxicité dépend de plusieurs facteurs, notamment la concentration, la voie d'exposition, l'état d'oxydation, ainsi que l'individu exposé (l'âge, le sexe, la génétique et l'état nutritionnel) (Ali et al., 2013; Tchounwou et al., 2012).

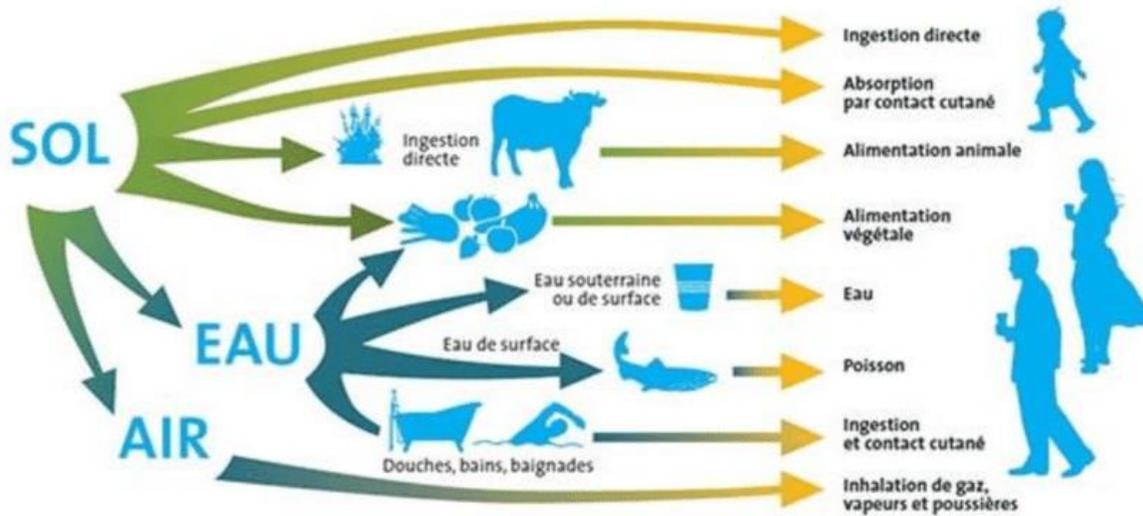


Figure 5 : Voies d'exposition des ETM sur les Hommes (www.bretagne.ars.sante.fr/sites-et-sols-pollues-0)

Les principales voies d'expositions aux ETM sont représentées sur la Figure 5. L'exposition aux ETM par contact cutané peut être considérée comme minime, tout comme l'inhalation, exceptée lors d'expositions professionnelles, ou pour les individus vivant à proximité de sites pollués et pour les fumeurs (la cigarette est, par exemple, une source importante en cadmium). La principale voie d'exposition des Hommes aux ETM est due, à plus de 90 %, à la consommation de nourriture contaminée (Laurent et al., 2005; Saha et al., 2016a). En effet, certains ETM, peuvent s'accumuler dans les tissus de végétaux ou d'animaux, dont ceux des Hommes (Bourrelier et al., 1998; Islam et al., 2015; Saha et al., 2016a). De plus, certains ETM comme le mercure (sous forme de méthyl-mercure notamment), ont la capacité d'être stockés de façon cumulative au fur et à mesure de leur progression dans la chaîne alimentaire. Ce phénomène est appelé bioamplification (Mudgal et al., 2010). Le Tableau 5 présente une liste non exhaustive d'aliments pouvant contenir certains ETM comme le cadmium, le plomb, l'arsenic et le mercure.

Tableau 5 : Liste non exhaustive des aliments pouvant contenir certains ETM (Mudgal et al., 2010)

ETM	Aliments
Cd	Œufs, poissons, champignons, ail, blé, riz, avoine, maïs, graines de soja, cacahuètes
Pb	Œufs, poudres de cacao, riz, blé, pommes de terre, aliments fumés, vin, bière, lait, carottes, raisins
As	Riz, tomates, carottes, produits de la mer, viande bovine et de poulet, vin, lait
Hg	Œufs, Champignons, produits de la mer, huile de poisson

En fonction des habitudes alimentaires d'un pays à un autre, la contribution d'un aliment à l'exposition humaine d'un ETM donné fluctue. Par exemple, les céréales contribueraient à 73 % de l'exposition totale en cadmium en Inde contre 9 % en France. Ces variations peuvent aussi être attribuées aux différences de concentrations dans les aliments en fonction des pays (Laurent et al., 2005). En France, l'exposition humaine au plomb et au cadmium est due principalement à l'ingestion de fruits et légumes contaminés pour 49 % et 35 % respectivement, alors que les produits de la mer contribuent à 34 % de l'exposition humaine au mercure (Laurent et al., 2005).

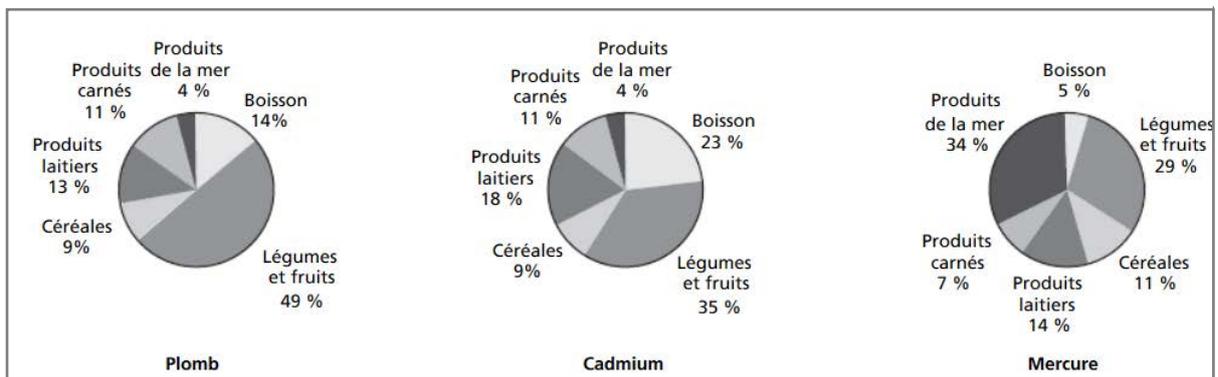


Figure 6 : Contribution des différents types d'aliments à l'exposition des Hommes aux ETM en France

L'exposition des êtres humains aux ETM peut se traduire par une gamme étendue de symptômes et de maladies. L'ingestion d'ETM peut provoquer une déplétion de certains nutriments essentiels, entraînant tour à tour une diminution des défenses immunologiques, des dysfonctionnements psychosociaux, des handicaps associés à la malnutrition (Islam et al., 2015). Les ETM peuvent également être responsables de vertiges (Zn), de pertes de cheveux (Cr, Ni), de lésions hépatiques (Cu, Ni), d'altérations des fonctions rénales (Cu, Hg), de dommages cérébraux (Cu, Hg), d'altérations du développement chez les enfants (Pb), etc. (Ali et al., 2013).

Certains ETM sont également classés comme cancérigènes. Chez l'Homme, l'arsenic a été identifié comme étant à l'origine de cancers de la peau, des poumons et de la vessie ; le cadmium et le chrome VI peuvent induire des cancers des poumons et le nickel peut être responsable de cancers de poumons, des fosses nasales et des sinus (Carretier and Fervers, 2017).

De plus, les concentrations élevées en Cd, Cu et Pb dans les aliments peuvent être liées à une prévalence élevée de cancer gastro-intestinal supérieur (Islam et al., 2015).

4.3. Toxicité des ETM

Dans l'environnement, les ETM sont principalement associés à d'autres molécules (organiques ou inorganiques). Les complexes ainsi formés possèdent des propriétés physico-chimiques extrêmement variables (Laurent et al., 2005). Par exemple, le zinc complexé au phosphate (phosphate de zinc, $Zn_3(PO_4)_2$) est insoluble alors que lorsqu'il est sous forme de sulfate de zinc ($ZnSO_4$), il est fortement soluble (220 g.L^{-1} à 20°C) (Pichard, 2005).

De plus, selon le compartiment de l'environnement considéré (sol, air, eau) ou même les organismes, les formes complexées majoritaires diffèrent. C'est pourquoi, contrairement aux HAP, aucune généralité ne peut être énoncée (Laurent et al., 2005).

4.4. Contamination des sols par les ETM

Les ETM représentent la deuxième famille de polluants identifiés dans les sols et les eaux après les hydrocarbures. Ils sont responsables de près de 48 % de la contamination des sols des sites pollués en France et de 44 % des eaux (nappes, rivières, etc.) (Figure 7) (Antoni, 2013).

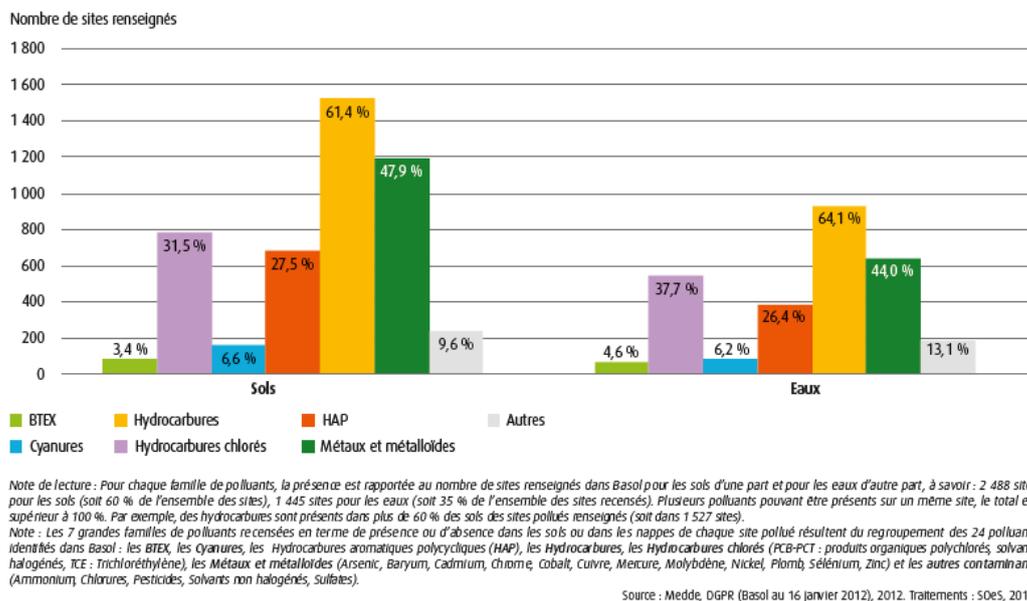


Figure 7 : Répartition des sept familles de polluants identifiés dans les sols ou dans les nappes des sites pollués évalués en 2012 (Antoni, 2013)

Dans le sol, les ETM sont naturellement présents sous forme relativement peu mobile et à faible voire très faible concentration. Cependant, les activités anthropiques contribuent significativement à enrichir les sols en ETM (Bourrelier et al., 1998). Les sources anthropiques

les plus importantes pour les sols comprennent l'utilisation d'engrais commerciaux, l'épandage de boues d'épuration ou d'autres déchets utilisés comme amendements, les eaux d'irrigation et les dépôts atmosphériques provenant des émissions industrielles, urbaines et routières (Senesil et al., 1999).

Les ETM émis dans l'atmosphère, principalement par des activités anthropiques, sont dispersés par les vents, parfois sur des distances considérables (Seaward and Richardson, 1989) avant d'être déposés sur les sols, les eaux et les végétaux (Laurent et al., 2005; Senesil et al., 1999). La distance de transport dépend de plusieurs facteurs, incluant le type de source émettrice, la forme physique et les propriétés de l'élément (e.g. sa taille et sa densité) ainsi que les modifications physiques et chimiques pendant le transport et les conditions météorologiques (Senesil et al., 1999). Certains ETM comme le plomb ou le mercure peuvent atteindre des parties du monde très éloignées des sites d'émission. Par exemple, du plomb a été retrouvé dans les neiges de l'Arctique (Robert, 1996).

Il est ainsi possible de distinguer les sources de contamination ponctuelles des sources diffuses. En effet, les sources sont qualifiées de diffuses quand elles sont dues à de nombreuses sources souvent mal identifiées et à des sources portant sur de longues distances (dizaines, centaines à milliers de kilomètres) alors que les sources ponctuelles touchent une aire relativement faible et sont généralement dues à une source bien identifiée et souvent proche (Girard, 2005). Les dépôts atmosphériques peuvent donc contribuer significativement à augmenter les concentrations en ETM dans les sols et représentent une source importante puisqu'ils sont cumulatifs et difficiles à limiter ou à contrôler (Senesil et al., 1999).

4.5. Devenir des ETM dans les sols

4.5.1. Facteurs influençant le devenir des ETM dans les sols

La concentration « totale » en ETM n'est pas une indication suffisante pour prévoir les risques de mobilité, de biodisponibilité ou d'impact sur le fonctionnement du sol. C'est la forme sous laquelle se trouve les éléments qui est déterminante : en solution, sous forme dissoute, colloïdale, libre ou complexé, ou sous forme solide ou de précipité, lié à des phases minérales ou organiques (Girard, 2005). Dans le sol, les ETM se répartissent entre la phase solide, la phase liquide et la phase gazeuse. Cette répartition n'est pas figée au cours du temps. Les éléments passent d'une forme à une autre en permanence, sous l'influence de modifications externes naturelles ou anthropiques (Baize, 2007) (Figure 8).

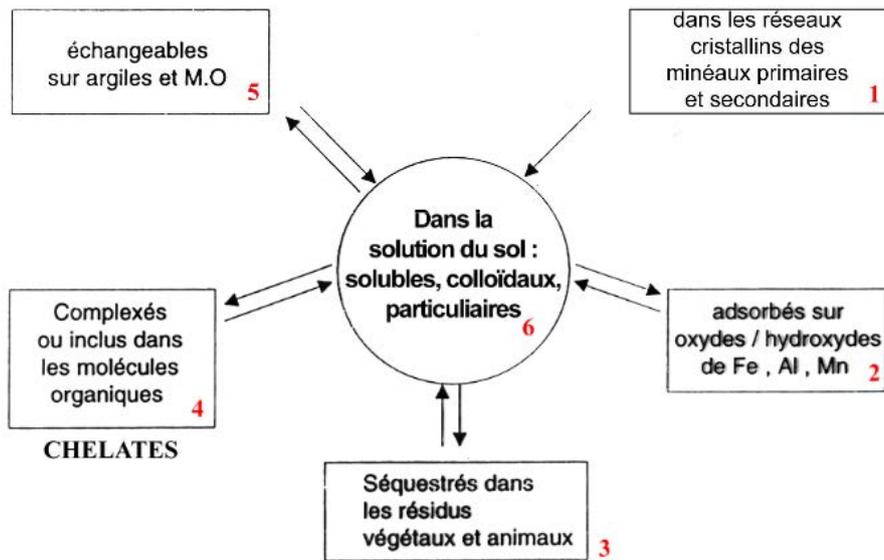


Figure 8 : Différentes formes et localisations des ETM dans les sols (Baize, 2007)

En effet, de nombreux paramètres influencent la disponibilité des ETM dans le sol et donc leur devenir dans cette matrice. Il s'agit principalement des caractéristiques du sol, c'est-à-dire les teneurs en matière organique, en acide humique, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la capacité d'échange cationique (CEC), la teneur en argile (Bourrelrier et al., 1998; Laurent et al., 2005; Prasad, 1999), auxquels s'ajoutent les propriétés physico-chimiques de ces substances, qui sont fonction de leur spéciation, et les facteurs environnementaux (température, précipitations, etc.) (Laurent et al., 2005).

De manière générale, la majorité des ETM est plus mobile en conditions acides qu'en condition alcaline. L'abaissement du pH favorise la mobilité des ETM, par la mise en solution des sels métalliques notamment. Ce phénomène s'explique par le fait que, en pH acide, les ions hydrogène ont une affinité plus élevée pour les charges négatives sur les colloïdes, et rivalisent ainsi avec les ions métalliques de ces sites, libérant les ETM (Prasad, 1999). Au contraire, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation des ETM par la formation de composés insolubles. Une teneur élevée en matière organique peut également engendrer une immobilisation des métaux qui se lie par exemple aux acides fulviques ou humiques (Prasad, 1999). Généralement, plus la teneur en argile ou en matière organique et le pH sont élevés, plus les ETM sont fermement liés et plus leurs temps de résidence dans le sol est long (Prasad, 1999).

Une différence de mobilité peut également être constatée entre les ETM puisque dans le sol, certains sont plus mobiles comme le Cd et le Zn tandis que d'autres, tels le Cu et le Pb, le sont moins car ils forment plus facilement un complexe organique avec des acides fulviques (Prasad, 1999).

Un autre facteur peut également influencer le devenir des ETM dans les sols, il s'agit de la microflore. Contrairement aux HAP, les ETM ne sont pas biodégradables. En revanche,

certaines microorganismes du sol peuvent intervenir directement ou indirectement sur leur spéciation, notamment sur leur degré d'oxydation, ce qui peut conduire à une variation de leur biodisponibilité (Bertrand et al., 2011; Bourrelier et al., 1998).

Certains microorganismes sont capables de solubiliser les ETM par production d'acides et de composés complexant entraînant la dissolution de silicates, phosphates, oxydes, sulfures, carbonates, porteurs d'ETM. Ils peuvent également modifier les conditions du milieu par acidification, alcalinisation, changement des conditions d'oxydo-réduction (consommation d'oxygène, production d'hydrogène). Au contraire, certains processus microbiens peuvent entraîner l'insolubilisation des ETM par précipitation ou par formation de sulfures métalliques insolubles dans un processus entraînant la réduction de sulfates (Bourrelier et al., 1998).

D'autres processus microbiens peuvent être à l'origine de la volatilisation de certains ETM suite à des réactions enzymatiques de méthylation (concernant l'arsenic, le mercure, le sélénium, l'antimoine) ou également par réduction pour le mercure (Bourrelier et al., 1998).

4.5.2. Les transferts d'ETM des sols vers les autres compartiments de l'environnement

Les ETM présents dans les sols sont susceptibles, en fonction de leur spéciation, d'être transférés vers les eaux (souterraines ou de surface), les sédiments, l'atmosphère et également vers les végétaux. Ces transferts sont schématisés dans la Figure 9.

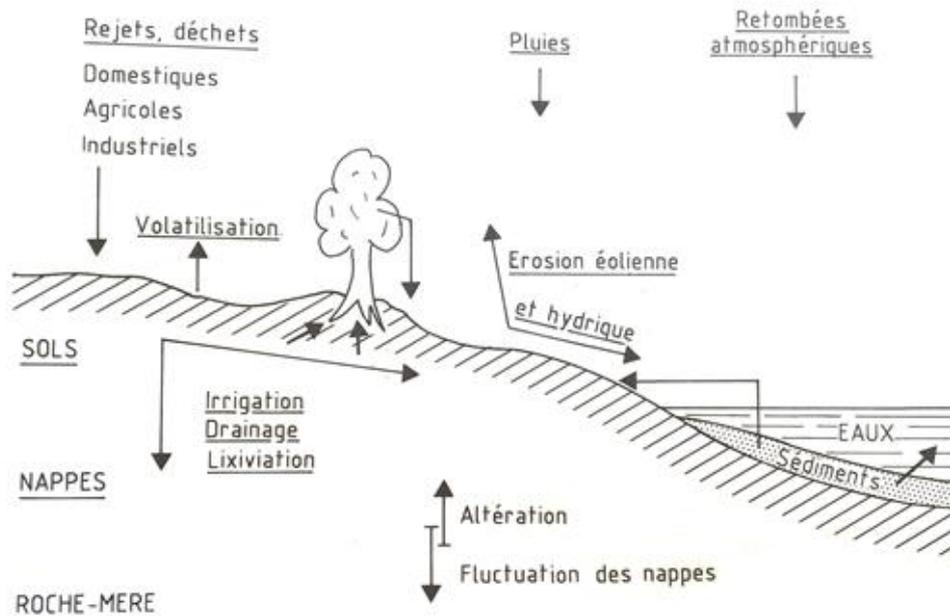


Figure 9: Transferts d'ETM entre les différents compartiments de l'environnement (Bourrelier et al., 1998)

- **Volatilisation** : certains ETM du sol peuvent être volatilisés dans l'atmosphère. Seuls l'arsenic, le mercure, le sélénium et l'antimoine seraient concernés. Les formes gazeuses de ces ETM résultent principalement de l'action de microorganismes (Laurent et al., 2005)
- **Érosion éolienne et hydrique** : associés aux particules du sol (argile et matière organique), les ETM peuvent être disséminés par érosion éolienne et hydrique (Laurent et al., 2005) et se retrouver dans les eaux ou l'atmosphère
- **Lessivage** : les ETM, lorsqu'ils sont dans la solution du sol, peuvent être lessivés vers les nappes phréatiques sous l'action de la gravité (Baize, 2007; Bourrelier et al., 1998)

4.5.3. Les transferts d'ETM vers les végétaux

Le transfert d'ETM des sols vers les végétaux dépend des paramètres physico-chimiques du sol, des concentrations en ETM, de leur biodisponibilité et de leur spéciation, ainsi que de l'espèce végétale considérée (Aihemaiti et al., 2018; Ali et al., 2013; Prasad, 1999; Wu et al., 2007). En effet, les capacités de prélèvement d'ETM par les espèces végétales diffèrent d'une espèce à l'autre et d'un ETM à un autre. Les végétaux peuvent être catégorisés en fonction de leur stratégie d'absorption des ETM vis-à-vis d'un sol contaminé (Baker, 1981) (Figure 10).

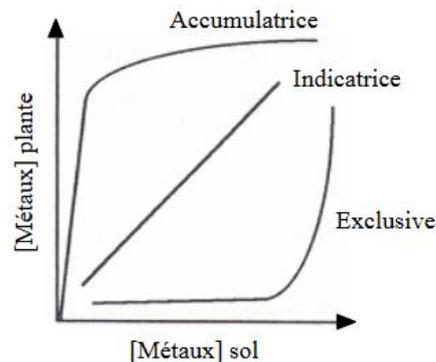


Figure 10 : Réponses des végétaux vis-à-vis d'un sol contaminé aux ETM (Baker, 1981)

- **Les exclusives** : certaines espèces vont pouvoir maintenir des concentrations en ETM faibles et constantes dans leurs parties aériennes jusqu'à une concentration critique dans le sol. Au-dessus de cette concentration, des ETM vont tout de même être transportés dans les parties aériennes. Ces plantes sont nommées « exclusives ».
- **Les indicatrices** : pour ces plantes, l'absorption et le transport d'un ETM dans les parties aériennes sont équilibrées de sorte que la concentration interne reflète les concentrations du sol.

- **Les accumulatrices** : sont capables de concentrer des ETM dans leurs parties aériennes, que la concentration dans le sol soit faible ou élevée. Au sein des plantes accumulatrices, il est possible de distinguer un sous-groupe : il s'agit des plantes **hyperaccumulatrices**. Ces espèces sont définies comme étant capables d'accumuler plus de 100 mg.kg⁻¹ de masse sèche de Cd, plus de 1 000 mg.kg⁻¹ de masse sèche de Ni, Cu et Pb ou plus de 10 000 mg.kg⁻¹ de masse sèche de Zn et Mn lorsqu'elles se développent sur des sols contaminés (A. J. M. Baker and Brooks, 1989).

Chaque plante réagit de manière particulière à chaque ETM. Ainsi, une espèce peut être accumulatrice pour un ETM et exclusive pour un autre.

Afin de déterminer le potentiel de bioaccumulation d'une espèce végétale, le facteur de bioconcentration est calculé. Il est défini comme le ratio de la concentration en un ETM dans les parties aériennes de la plante sur la concentration en ce même ETM dans le sol. Un ratio supérieur à 1 signifie que la concentration en métal dans la plante est supérieure à celle du sol, la plante est ainsi capable d'accumuler cet ETM dans ses parties aériennes. Il peut même atteindre 50 voire 100 dans certains cas, pour les hyperaccumulateurs (Cluis, 2004; McGrath and Zhao, 2003).

Outre la voie racinaire, les ETM peuvent également entrer dans les végétaux par absorption foliaire, à travers les stomates, lorsqu'ils sont sous forme gazeuse (ex : mercure), ou à travers la cuticule foliaire lorsqu'ils sont sous forme ionique. L'absorption varie alors en fonction de l'espèce végétale mais également en fonction des ETM impliqués. Par exemple, le Cd, le Zn et le Cu ont montré une plus grande pénétration foliaire que le Pb, qui est principalement adsorbé aux lipides épicuticulaires à la surface (Prasad, 1999).

5. Les techniques de dépollution des sols

5.1. Généralités

Lorsqu'un site contaminé n'est pas compatible avec son usage et présente des risques pour la population ou l'environnement, des techniques de dépollutions ou de confinement doivent être mises en œuvre.

Il n'y a pas de technique « universelle » de gestion des sols contaminés puisque chaque site est spécifique. Un diagnostic préalable doit être réalisé pour choisir la ou les techniques les mieux adaptées à l'objectif fixé. De nombreux paramètres sont à prendre en compte comme des critères techniques et organisationnels propres aux polluants (nature, concentration, toxicité), propres au milieu (nature du sol, profondeur de la nappe phréatique), propres au site (accessibilité, nature et type d'activité pratiquée sur le site, présence de structures ou de

réseaux enterrés) et propre à l'objectif fixé « pourquoi dépolluer, et jusqu'où dépolluer ? ». Ces paramètres permettront de définir les objectifs de concentrations résiduelles à atteindre et dans quels délais. Il faut également prendre en compte le critère économique puisque le coût est variable en fonction de la technique choisie, les critères environnementaux avec l'utilisation d'un procédé destructif du sol ou non, l'impact du procédé sur les fonctionnalités du sol et également ses nuisances que ce soit des nuisances sonores visuelles ou olfactives (Colombano et al., 2010).

Enfin, certaines techniques nécessitent d'être appliquées « sur site » (*in situ*) soit directement sur le sol en place, soit en traitant le sol excavé sur le site même, alors que d'autres seront « hors site » (*ex situ*), impliquant l'excavation du sol vers un centre de traitement.

Parmi les différentes techniques de dépollution, on retrouve les techniques physiques, chimiques et biologiques. Elles peuvent être définies de manière générale comme suit (Colombano et al., 2010) :

- **Les procédés physiques** consistent à utiliser des fluides (eau ou gaz) ou la chaleur pour traiter la pollution. Les fluides, présents dans le sol ou injectés, sont utilisés comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser. La chaleur est, quant à elle, utilisée afin de détruire les polluants (incinération), les isoler (désorption thermique) ou les inérer (vitrification).
- **Les procédés chimiques** utilisent les propriétés chimiques des polluants pour, à l'aide de réactions appropriées, les inérer (précipitation), les détruire (oxydation), ou les séparer du milieu pollué (dissolution)
- **Les procédés biologiques** consistent à utiliser des micro-organismes, le plus souvent des bactéries, ou des végétaux pour favoriser la dégradation des polluants. Certains bioprocédés permettent aussi de fixer, de solubiliser ou d'extraire les polluants.

La gestion de sol contaminé est dominée par des méthodes de confinement et de stockage qui représentent environ 50 % des tonnages de sol gérés (Cadière and Masselot, 2012). En prenant en considération uniquement les techniques de dépollutions, les procédés biologiques représentent la voie principale devant les procédés physiques et chimiques. En 2010, près de 80 % des terres traitées (en tonnage) ont été dépolluées par des techniques biologiques (Cadière and Masselot, 2012).

5.2. La phytoremédiation

Il existe de nombreuses techniques biologiques de dépollution des sols. Contrairement aux techniques physico-chimiques, les techniques biologiques sont moins coûteuses et plus respectueuses de l'environnement (Khan et al., 2004). Seule la phytoremédiation sera développée dans cette partie.

5.2.1. Les différents procédés de phytoremédiation

La phytoremédiation utilise des végétaux et leurs microorganismes associés pour extraire, stabiliser ou dégrader les contaminants du sol, des sédiments, de l'eau ou de l'air (Khan, 2005; Ma et al., 2016a). La phytoremédiation repose sur différents processus, présentés dans la Figure 11.

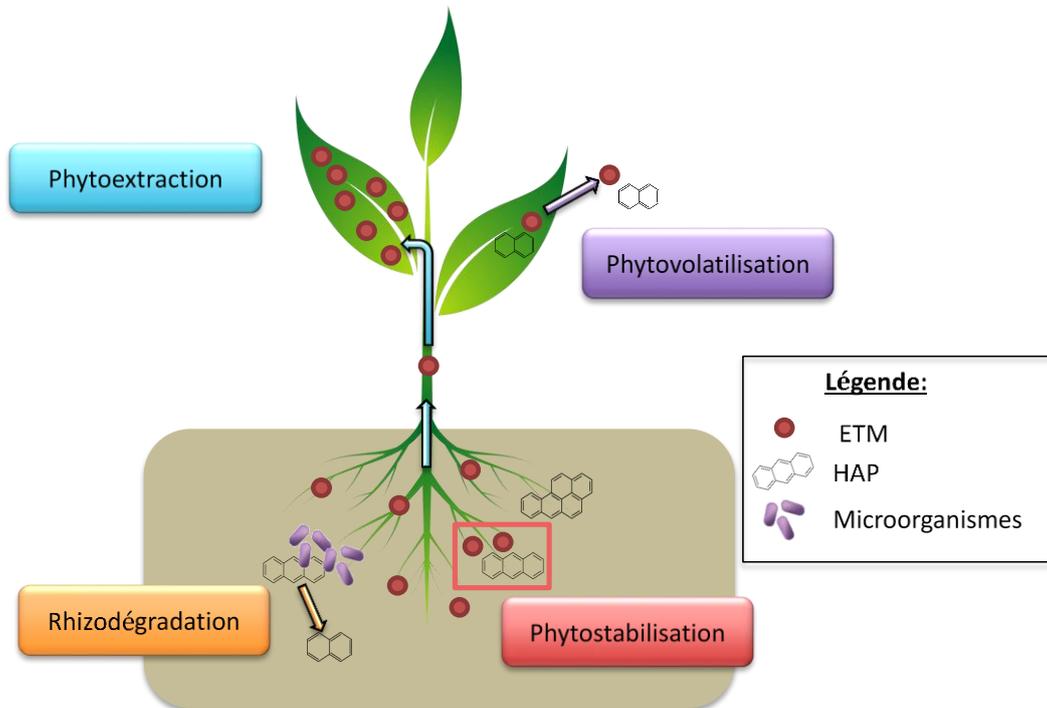


Figure 11 : Les différentes techniques de phytoremédiation

- **La phytoextraction**

La phytoextraction consiste à utiliser les capacités de certains végétaux à extraire les polluants du sol et à les transférer *via* le xylème dans les parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs, graines, fruits), qui pourront être récoltées (Khan, 2005; Nsanganwimana et al., 2014; Oyuela et al., 2017). Les polluants concernés par ce procédé sont les ETM. L'efficacité de la phytoextraction repose sur la capacité de la plante choisie à concentrer des teneurs importantes en polluants dans ses parties aériennes et à produire une forte biomasse (Bert et al., 2012). La catégorie des hyperaccumulateurs possède ainsi de fortes capacités de concentration en métaux lorsque les végétaux se développent sur des sols contaminés (A. J. M. Baker and Brooks, 1989) (cf. chapitre 4.5.3).

Après récolte, la biomasse contaminée peut être incinérée dans le but de produire des cendres dans lesquelles le métal d'intérêt est concentré. Les cendres peuvent ensuite être mise dans des décharges adaptées (Padmavathiamma and Li, 2007) ou traitées par hydrométallurgie afin d'obtenir des produits métalliques de grande valeur, comme c'est le cas pour le nickel notamment. On pourra alors parler d'agromine (Simonnot et al., 2016).

- **La rhizodégradation**

La rhizodégradation consiste en la stimulation de la dégradation de contaminants organiques par des microorganismes dans la rhizosphère, qui est la zone de sol directement influencée par les racines de végétaux (Gerhardt et al., 2009; Steckerman et al., 2011).

Les HAP peuvent être dégradés par les microorganismes rhizosphériques stimulés par l'exsudation racinaire. Les exsudats racinaires produits par les végétaux confèrent une source de carbone et d'énergie aux microorganismes rhizosphériques (Gerhardt et al., 2009). En contrepartie, les microorganismes fournissent de nombreux bénéfices aux végétaux comme la synthèse de composés visant à diminuer le niveau de ses hormones de stress, une protection vis-à-vis de phytopathogènes et également la dégradation des contaminants avant qu'ils ne nuisent à la plante (Gerhardt et al., 2009). La dégradation des HAP peut également être influencée par la présence de certaines molécules exsudées présentant des analogies structurales avec certains HAP ou leurs métabolites de dégradation, conduisant à l'induction de gènes enzymatiques impliqués dans la dégradation des HAP. Ceci explique le fait que la rhizosphère peut contenir des populations diversifiées en microorganismes capables de dégrader les HAP (Singer et al., 2003).

- **La phytovolatilisation**

La phytovolatilisation consiste en l'utilisation de végétaux pour extraire certains contaminants organiques ou métalliques du sol et de libérer le polluant ou ses métabolites dans l'atmosphère. Cette volatilisation est réalisée dans les feuilles de certains végétaux par évapotranspiration (Gerhardt et al., 2009; Padmavathiamma and Li, 2007; Sterckeman et al., 2011).

Les contaminants concernés par ce procédé sont certains ETM tels que l'arsenic, l'antimoine, le mercure et le sélénium (Padmavathiamma and Li, 2007; Sterckeman et al., 2011) ainsi que certains polluants organiques comme les HAP de faibles poids moléculaire et volatiles (Gerhardt et al., 2009) tel que le naphthalène (Watkins et al., 1994).

Ce procédé comporte cependant peu d'intérêt dans la gestion des sites contaminés puisqu'il ne traite pas la pollution d'un sol mais la déplace dans l'atmosphère (Sterckeman et al., 2011).

- **La phytostabilisation**

La phytostabilisation consiste en l'empêchement ou la limitation de la mobilité des polluants, évitant ainsi leur transfert vers la chaîne alimentaire et également vers d'autres compartiments de l'environnement. Ce n'est donc pas une technique de dépollution mais plutôt un mode de gestion des sites contaminés (Bert et al., 2012).

La présence d'un couvert végétal dense et bien enraciné permet de réduire la dispersion des contaminants du sol. Les végétaux utilisés peuvent stabiliser les polluants au niveau racinaire par accumulation ou adsorption dans ou près des racines ou également par précipitation dans le cas des ETM (Sterckeman et al., 2011).

Cette technique est fréquemment appliquée à des sols contaminés par des ETM mais peut également s'appliquer à des polluants organiques comme les HAP bien qu'il puisse être difficile, dans ce cas, de la dissocier de la rhizodégradation (Sterckeman et al., 2011).

5.2.2. Les avantages de la phytoremédiation

L'utilisation de la phytoremédiation comme technique de réhabilitation de sites contaminés présente de nombreux avantages. C'est une technique peu coûteuse qui est donc adaptée à la réhabilitation de sites pollués sur de grandes superficies (Khan et al., 2004; Padmavathiamma and Li, 2007). Cette technique ne nécessite pas d'excavation préalable du milieu contaminé, elle se pratique directement *in situ* (Gerhardt et al., 2009), et permet donc de limiter le risque de dispersion des contaminants (Cristaldi et al., 2017). Elle est par ailleurs adaptée à une large gamme de contaminants tels que les HAP, les ETM mais aussi les PCB (polychlorobiphényles), les hydrocarbures, les pesticides organophosphorés et les explosifs (Khan et al., 2004).

Contrairement aux techniques physico-chimiques qui entraînent la destruction des fonctionnalités du sol, la phytoremédiation est une technique « passive » permettant l'apport de matière organique, de nutriments et d'oxygène dans le sol *via* les processus métaboliques des végétaux et des microorganismes rhizosphériques, ce qui permet d'améliorer la qualité globale du sol mais également sa biodiversité et sa texture (Gerhardt et al., 2009). Enfin, la phytoremédiation peut être utilisée dans n'importe quelle zone géographique, il faudra juste s'assurer de la capacité de la plante sélectionnée à se développer sous les conditions environnementales du site.

C'est une technique jugée comme « esthétique », n'entraînant pas de pollution visuelle, qui est seulement alimentée par l'énergie solaire et est très bien acceptée par le public (Gerhardt et al., 2009; Khan et al., 2004).

De plus, il est parfois possible, selon l'espèce végétale sélectionnée, de valoriser sa biomasse produite dans le domaine des énergies renouvelables comme la production de biocarburants, la combustion (Cristaldi et al., 2017; Nsanganwimana et al., 2014).

5.2.3. Les limites de la phytoremédiation

La phytoremédiation comporte tout de même quelques inconvénients.

Le premier qui peut être cité est le temps de traitement. La phytoremédiation est une technique biologique qui nécessite généralement plusieurs années avant que le site soit réhabilité, et ce d'autant plus que ce mode de gestion est tributaire des conditions climatiques qui affectent la vie des végétaux (sécheresse, inondation) (Khan et al., 2004).

La remédiation des polluants est également limitée à la profondeur atteinte par les racines, ce qui est spécifique à l'espèce végétale choisie (Khan et al., 2004). Il est donc préférable de

choisir une espèce végétale possédant un réseau racinaire dense et dont la profondeur du développement est adaptée au profil de contamination.

La phytoremédiation est plutôt une technique s'appliquant à de grandes surfaces faiblement à moyennement contaminées (Padmavathiamma and Li, 2007). En effet, des teneurs élevées en polluants peuvent entraîner un stress oxydant par la plante et ainsi inhiber son développement aérien mais aussi racinaire, limitant par la même l'efficacité de la phytoremédiation (Gerhardt et al., 2009).

Enfin, l'utilisation de la phytoremédiation peut également présenter un risque lié à l'entrée des polluants dans la chaîne alimentaire *via* la consommation des végétaux contaminés par les animaux. La biomasse végétale contaminée doit donc être récoltée et traitée spécifiquement de manière à ne pas redistribuer dans l'environnement les polluants ayant été accumulés.

6. Choix de *Miscanthus x giganteus* en phytoremédiation

6.1. Origine de *Miscanthus x giganteus*

Miscanthus x giganteus (MxG) est une graminée pérenne, de la famille des Poacées, originaire d'Asie du Sud-Est (Chung and Kim, 2012; Figala et al., 2015). Il s'agit d'un hybride naturel stérile triploïde (3 n chromosomes) entre *M. sinensis* et *M. sacchariflorus* (Hodkinson, 2002; Linde-Laursen, 1993).

Cette espèce a été introduite au Danemark en 1935 par le pépiniériste danois Asken Olsen en tant que plante ornementale provenant du Japon (Linde-Laursen, 1993).

Elle était considérée comme une « mauvaise herbe » en Asie et ce n'est qu'à partir des années 1983 qu'elle a commencé à être étudiée comme culture bioénergétique potentielle en Europe, principalement en combustion pour la production de chaleur et d'électricité. Ce n'est que lorsque les européens ont commencé à la planter, que les asiatiques s'y sont intéressés comme culture bioénergétique (Chung and Kim, 2012).

En plus de *Miscanthus x giganteus*, d'autres espèces de *Miscanthus* présentent un intérêt pour la production de biomasse comme *Miscanthus sacchariflorus*, *Miscanthus sinensis* et *Miscanthus floridulus*. Ces espèces sont toutes originaires de la région de l'Asie de l'Est et du Sud Est, notamment de Corée, du Japon et de Chine. Cependant, MxG est la seule à être cultivée commercialement pour sa production de biomasse en raison de son rendement important (Chung and Kim, 2012). En effet, MxG s'avère être l'une des plantes terrestres les plus, sinon la plus, productive aux climats des latitudes moyennes de l'hémisphère nord (35-60° N) (Heaton et al., 2010).

6.2. Présentation de *Miscanthus x giganteus*

MxG est une espèce non invasive, vivace et à rhizome (Anderson et al., 2011; Beale and Long, 1997, 1995; Chung and Kim, 2012; Heaton et al., 2010; Linde-Laursen, 1993). Chaque année, au printemps, de nouvelles pousses, appelées également rejets, émergent des bourgeons des rhizomes (Anderson et al., 2011). Ces pousses utilisent les réserves de nutriments stockés dans le rhizome pour initier leur développement (Anderson et al., 2011). La morphologie de MxG est schématisée dans la Figure 12.

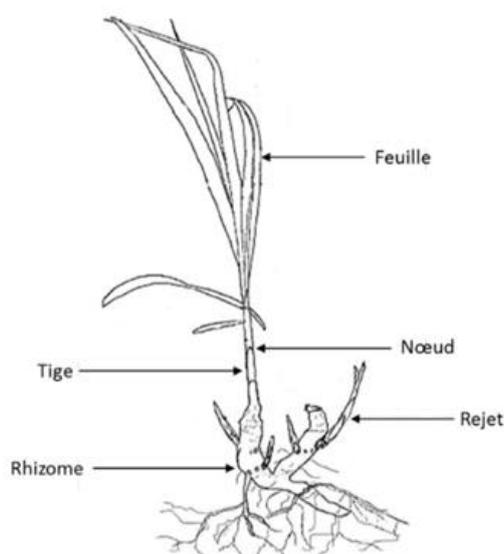


Figure 12 : Schéma morphologique d'un plant de *Miscanthus x giganteus* (D'après Mazziotti, 2017)

MxG est une espèce végétale à fort développement, aussi bien aérien que racinaire. A maturité, elle peut atteindre 3,5 à 4 m de haut (Anderson et al., 2011; Lewandowski et al., 2003) et ses racines peuvent atteindre jusqu'à 2,5 m de profondeur (Neukirchen et al., 1999). La floraison intervient entre septembre et octobre (Anderson et al., 2011). L'inflorescence formée est décrite comme un panicule en éventail avec un axe long et de nombreux racèmes (Figure 13) (Lewandowski et al., 2003). Les graines produites ne sont pas viables, elles sont stériles (Lewandowski et al., 2003; Linde-Laursen, 1993), c'est pour cette raison que la multiplication de la plante doit se faire par voie végétative (Lewandowski et al., 2003).



Figure 13 : Photographie d'une inflorescence de *Miscanthus x giganteus* (source : www.france-miscanthus.org)

MxG possède un métabolisme photosynthétique en C4 (Anderson et al., 2011; Beale and Long, 1997, 1995; Chung and Kim, 2012; Heaton et al., 2010).

De manière générale, le mécanisme de photosynthèse des végétaux est dit « en C3 », signifiant qu'ils convertissent le CO₂ en composés à trois atomes de carbones (l'acide phosphoglycérique) alors que les plantes en C4 convertissent le CO₂ en composé à 4 atomes de carbones (oxaloacétate, malate) (Meyer et al., 2008). Les plantes en C4, comme MxG, ont l'avantage d'avoir un meilleur rendement photosynthétique que les plantes en C3 car elles utilisent de façon plus efficace les radiations lumineuses (Beale and Long, 1995). Elles utilisent également plus efficacement l'eau et les nutriments tels que l'azote (Anderson et al., 2011; Beale and Long, 1997; Chung and Kim, 2012; Heaton et al., 2010). Généralement, les plantes en C4 nécessitent des températures chaudes pour avoir un rendement photosynthétique plus élevé que les plantes en C3 (Meyer et al., 2008). Ce n'est cependant pas le cas de MxG puisque son mécanisme photosynthétique est adapté aux conditions tempérées fraîches (Beale and Long, 1995). Cette caractéristique particulière pourrait être expliquée par le fait que *Miscanthus sinensis* ait fourni au génome de MxG des ressources génétiques pour les régions les plus froides alors que son adaptation aux climats chauds proviendrait de *Miscanthus sachariflorus* (Jørgensen, 1997).

6.3. Caractéristiques agronomiques

Miscanthus x giganteus se développe sur une large gamme de sols, des sols sableux à argileux, des sols pauvres aux sols très riches en matières organiques et dans une large gamme de valeur de pH, et également sur des sols contaminés (Figala et al., 2015; Gauthier and Somer, 2013; Techer et al., 2012c; Wanat et al., 2013). Il préfère cependant les sols avec une réserve en eau importante (Gauthier and Somer, 2013; Heaton et al., 2010). Dans des conditions limitées en eau, MxG se développe mieux sur des sols argileux que sur des sols sableux en raison de la plus forte capacité de rétention en eau des sols argileux (Heaton et al., 2010).

Il est également possible de le cultiver dans des climats variés, allant des régions tropicales aux régions tempérées (Nsanganwimana et al., 2014). Ce qui peut expliquer le fait que MxG soit cultivé aussi bien en Asie, qu'en Europe et également aux Etats-Unis (Nsanganwimana et al., 2014).

En raison de sa stérilité, il n'est pas possible de planter MxG à partir de graines (Linde-Laursen, 1993), il faut le multiplier par voie végétative par divisions de rhizomes ou par micro-propagation (Anderson et al., 2011; Lewandowski et al., 2003). La division de rhizomes, également appelée macro-propagation, consiste à couper un rhizome en morceaux. Pour cela, un cultivateur rotatif est passé dans une plantation de MxG âgée de 2 à 5 ans (Anderson et al., 2011; Lewandowski et al., 2003) après la période de sénescence des plants et avant l'émergence des nouveaux plants au printemps de l'année suivante. Les morceaux de rhizomes sont récoltés et peuvent être replantés. Le stockage des rhizomes peut se faire à 4°C mais il est préférable de replanter les rhizomes rapidement après la récolte pour avoir un meilleur taux d'émergence à la plantation. En effet certaines études ont mis en évidence un déclin de la viabilité des rhizomes après le stockage (Anderson et al., 2011; Lewandowski et al., 2003).

La micro-propagation, en revanche, consiste à utiliser plusieurs tissus de MxG afin d'initier des cultures *in vitro*, qui peuvent ensuite être multipliés et régénérés en plante entière. Cette méthode permet d'obtenir des taux de multiplication supérieurs à celle de la division du rhizome mais présentent un faible taux de survie lors du premier hiver (Lewandowski et al., 2003, 2000). La méthode de division des rhizomes est la méthode la plus utilisée actuellement pour la plantation de nouvelles cultures de MxG et c'est également la moins coûteuse (Anderson et al., 2011; Gauthier and Somer, 2013).

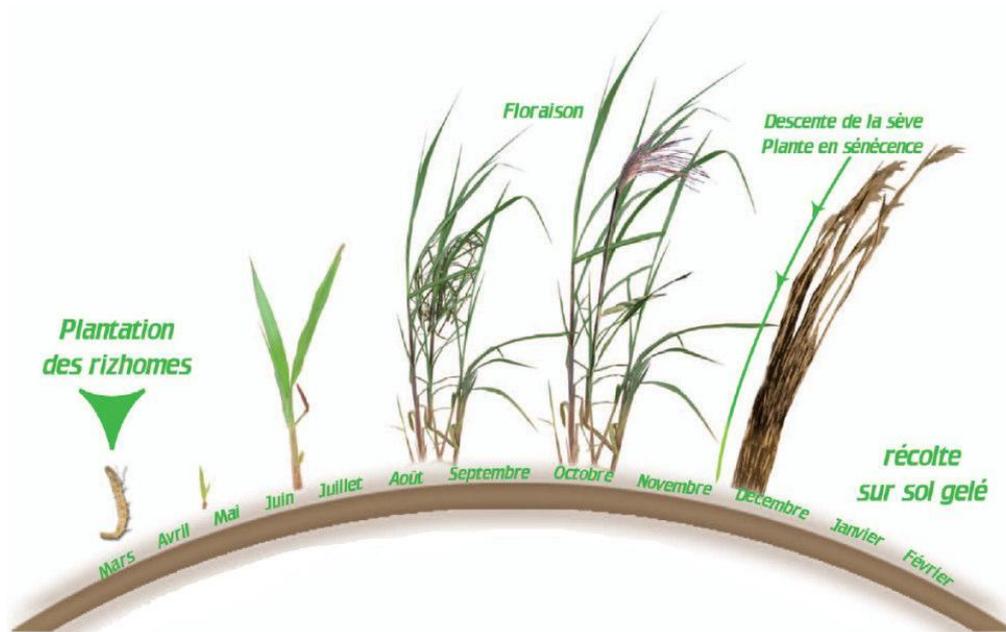


Figure 14 : Cycle de développement d'une culture de MxG (D'après Técher, 2011)

La plantation des rhizomes de MxG est réalisée préférentiellement au mois de mars ou avril, dès que le risque de fortes gelées est passé. La température du sol sera de préférence comprise entre 8 et 10°C pour favoriser une émergence rapide des plantules (Gauthier and Somer, 2013). Une densité de plantation de 1 à 2 plants rhizomes au mètre carré est considérée comme idéale (Lewandowski et al., 2003).

L'émergence des pousses à partir des bourgeons des rhizomes a lieu à partir du mois d'avril. Les végétaux vont continuer à croître jusqu'au mois d'août, c'est à cette période que le maximum de croissance est généralement atteint (Anderson et al., 2011). Des hauteurs de 3,5 à 4 m peuvent être atteintes à partir de la 2^{ème} ou 3^{ème} année de culture. En effet, durant la première année, MxG n'atteint pas son rendement maximal (Anderson et al., 2011; Lewandowski et al., 2003).

La floraison de MxG a ensuite lieu entre septembre et octobre bien qu'aucune graine viable ne soit produite et le cycle végétal finit par la sénescence des plantes, en automne, qui débute après une gelée (Anderson et al., 2011). A ce moment, les nutriments présents dans les parties aériennes des végétaux sont remobilisés vers le rhizome pour y être stockés durant l'hiver (Anderson et al., 2011; Heaton et al., 2010).

La récolte de MxG est réalisée une fois par an, sauf la première année puisque la productivité n'est pas à son maximum (Gauthier and Somer, 2013). Il est conseillé de récolter après la chute des feuilles et juste avant la reprise de la végétation suivante, à la fin de l'hiver (récolte « en sec »). Plus la récolte est effectuée tardivement, plus la teneur en eau et la teneur en minéraux diminuent dans les tiges et plus la qualité de la combustion s'améliore (Beale and Long, 1997; Lewandowski et al., 2003).

L'année suivante, de nouvelles pousses émergent des rhizomes, lorsque la température du sol atteint 10 – 12°C, en utilisant les nutriments stockés (Anderson et al., 2011; Chung and Kim, 2012). Le cycle végétal de MxG recommence, et ce, pendant 20 à 25 ans, temps correspondant à l'estimation de la durée d'une plantation (Lewandowski et al., 2003).

Quelques recommandations ont été reportées pour que la culture de MxG s'installe au mieux, la première année. Il faut notamment contrôler le développement des adventices après la plantation car les plants sont peu concurrents lors du démarrage de la culture (Lewandowski et al., 2003) et les adventices, en compétition avec MxG pour les ressources et notamment l'eau, les nutriments, la lumière et l'espace, peuvent limiter sa croissance (Anderson et al., 2011).

Ce « désherbage » peut être réalisé mécaniquement, manuellement ou par l'application de divers herbicides, généralement adaptés au maïs. Il a également été reporté qu'une irrigation durant la première année de culture améliore les taux d'établissement (Lewandowski et al., 2003). Le contrôle des adventices n'est plus nécessaire quand la culture de MxG est bien établie puisque, après la sénescence, les feuilles tombent au sol formant un paillage limitant ainsi le développement des espèces adventices. De plus, la canopée de MxG se ferme assez

tôt dans l'année, réduisant ainsi la compétition avec les adventices (Anderson et al., 2011; Chung and Kim, 2012).

Un avantage de la culture de MxG est son faible impact environnemental. Cette espèce végétale ne nécessite que peu voire pas de fertilisants pour son développement (Christian et al., 2008; Chung and Kim, 2012; Lewandowski et al., 2003; Wanat et al., 2013). Christian et ses collaborateurs (2008) ont testés 3 doses d'engrais (0, 60 et 120 kg d'azote par hectare) sur une plantation de MxG pendant 14 ans : il s'est avéré que l'apport d'azote n'avait pas d'influence sur le rendement, mais, selon les auteurs, l'ajout d'azote pourrait éviter l'épuisement des ressources du sol (Christian et al., 2008). Cette faible demande en fertilisants peut s'expliquer par la remobilisation des nutriments dans le rhizome après la sénescence des plants (Lewandowski et al., 2003).

De plus, peu de ravageurs infestent les plantations de MxG. A ce jour, aucune étude n'a été reportée sur une réduction de rendement causée par des maladies ou ravageurs (Anderson et al., 2011; Christian et al., 2008; Lewandowski et al., 2003).

6.4. Productivité

MxG est une espèce à forte productivité, qui s'avère être l'une des plantes terrestres les plus, si ce n'est la plus, productive dans les latitudes moyennes des climats du Nord (35-60°N) (Heaton et al., 2010). En comparaison avec le maïs, plante en C4 également et utilisée en bioénergie et qui représente la plus importante récolte de céréales en C4 au monde en termes de tonnes annuelles mondiales produites, MxG est environ 60 % plus productive (Dohleman and Long, 2009).

La productivité peut varier en fonction de la région considérée, dépendant des radiations lumineuses et de la température moyenne. Elle peut également varier en fonction de la disponibilité en eau ou de la présence ou absence d'irrigation et du type de sol (Lewandowski et al., 2000).

Un autre facteur influençant le rendement est la période de récolte. Lorsque les plants sont récoltés en « vert », c'est-à-dire en automne, juste après la sénescence, les biomasses sont plus élevées que lorsque MxG est récolté à la fin de l'hiver (Anderson et al., 2011; Lewandowski et al., 2000). En effet, le taux d'humidité de la biomasse de MxG décroît de près de 50 % en octobre, à moins de 10 % en février (Anderson et al., 2011).

En Europe du Sud et plus précisément dans le Sud du Portugal, des rendements supérieurs à 30 tonnes de matières sèches par hectare ont été reportés en présence d'irrigation (Chung and Kim, 2012; Lewandowski et al., 2000). En Europe centrale, où les températures moyennes et les radiations lumineuses sont plus faibles, les rendements obtenus sont généralement de l'ordre de 10 à 25 tonnes de matières sèches par ha, sans irrigation (Lewandowski et al., 2000).

Les données de productivités énoncés ci-dessus ont été établis sur des sols non contaminés et concernent des cultures de plus de 3 ans, lorsque l'implantation de MxG est bien établie (Chung and Kim, 2012; Lewandowski et al., 2000).

6.5. Valorisation de la biomasse de MxG

- **Combustion**

Grâce à son pouvoir calorifique (18-20 MJ.kg⁻¹ (Baxter et al., 2014)), sa composition chimique, son taux de cendres réduit et sa forte productivité, MxG peut être utilisé en combustion (Gauthier and Somer, 2013; Lewandowski et al., 2000; Nsanganwimana et al., 2014). Il peut être valorisé dans des chaudières poly-combustibles, en vrac ou sous forme de pellet (Gauthier and Somer, 2013), seul ou en co-combustion avec du bois ou du charbon (Nsanganwimana et al., 2014).

Il est préférable de valoriser les tiges de MxG, qui sont de meilleure qualité pour la combustion que ses feuilles. En effet, les tiges de MxG produisent des taux de cendres beaucoup plus faible que les feuilles, elles contiennent des concentrations en azote et en soufre plus faibles, des concentrations en carbone plus élevées et par conséquent un pouvoir calorifique supérieur à celui des feuilles (Baxter et al., 2014).

La qualité de la combustion peut être affectée par différents paramètres, notamment la période de récolte ou encore le recours à la fertilisation. Il a été montré que plus les tiges sont récoltées tard, meilleure sera la qualité de la combustion avec des teneurs en azote, en chlore et des cendres plus faibles ainsi que des concentrations en carbone plus élevées (Baxter et al., 2014). C'est pourquoi, il est préférable de récolter les tiges après la chute des feuilles et juste avant la reprise de la végétation, à la fin de l'hiver (Gauthier and Somer, 2013).

L'influence de la fertilisation azotée a également été testée. Les résultats montrent que les cultures de MxG sans ajout de fertilisation azotée semblent être des carburants de meilleure qualité que les cultures avec ajout de fertilisants (Baxter et al., 2014).

Des essais de combustion des tiges de MxG ont été réalisés lorsque ces derniers se sont développées sur une friche industrielle contaminé avec des ETM (Laval-Gilly et al., 2017). Les résultats ont montré de faibles concentrations en ETM dans les parties aériennes, ce qui facilite son utilisation pour la combustion. En revanche, les concentrations en potassium étaient significativement supérieures dans les tiges et les feuilles lorsque MxG s'était développé dans le sol provenant de la friche industrielle comparé au sol témoin, à la fin de l'automne. Ce phénomène pourrait être causé par une absence de remobilisation du potassium dans les rhizomes à la sénescence de la plante. Cependant, la présence de potassium pourrait être un facteur limitant à la combustion en raison des problèmes de

scories et d'encrassement qu'il peut engendrer dans les unités de combustions (Laval-Gilly et al., 2017).

- **Litière pour animaux**

La paille de MxG peut être utilisée comme litière pour animaux, notamment pour la volaille, le bétail, les cochons, les chevaux et les animaux de compagnie comme les chats ou les lapins par exemple (Nsanganwimana et al., 2014). Elle possède un grand pouvoir absorbant et la propreté des animaux est comparable entre la paille de MxG et la paille de froment (Gauthier and Somer, 2013). Elle a l'avantage de diminuer la formation d'ammoniac et absorbe les mauvaises odeurs (France-Miscanthus, 2020).

Cette litière naturelle peut se présenter en vrac, sous forme brute ou dépoussiérée, ou sous forme de granulés. Sa durée de vie est supérieure à de la paille, ce qui en fait une solution économique (France-Miscanthus, 2020).

Des retours positifs d'éleveurs de volailles et de chevaux notamment ont été recensés (Gauthier and Somer, 2013). La litière de MxG possède une structure sèche, aérée et souple qui convient aux pieds sensibles des chevaux. Dépoussiérée, elle prévient les maladies respiratoires des équidés. De plus, en raison de la non appétence de ses tiges liée à leur richesse en silice, la ration de l'animal reste parfaitement contrôlée (France-Miscanthus, 2020).

Cette litière est biodégradable et peut être réutilisée sous forme de compost ou de paillis horticole dans les jardins ou épandue sur les terres agricoles dans le cas du fumier puisqu'elle a l'avantage de ne pas acidifier les sols (France-Miscanthus, 2020).

- **Paillage horticole**

La biomasse de MxG peut également être valorisée en tant que paillage horticole, en vrac ou sous forme de granulés (Gauthier and Somer, 2013). Ce paillis permet de lutter contre la repousse des espèces adventices et se substitue ainsi à l'usage de désherbants chimiques (France-Miscanthus, 2020; Gauthier and Somer, 2013; Nsanganwimana et al., 2014). Grâce à sa capacité de rétention en eau élevée, le paillis de MxG permet de maintenir l'humidité du sol et ainsi de limiter les arrosages (Gauthier and Somer, 2013; Nsanganwimana et al., 2014). Il empêche notamment l'érosion superficielle du sol (Nsanganwimana et al., 2014) et a l'avantage d'avoir une durée de vie longue, comprise entre 12 et 36 mois. Il permet en plus d'apporter de la matière organique au sol et son pH neutre ne provoque pas d'acidification des sols (France-Miscanthus, 2020).

- **Biomatériaux de construction**

MxG peut être utilisé, en combinaison avec d'autres produits, pour la production de matériaux de construction (Gauthier and Somer, 2013). Il était utilisé depuis des siècles en tant que couverture des toits en chaume au Japon (Chung and Kim, 2012). Il résisterait plus longtemps à la putréfaction que les autres pailles (Gauthier and Somer, 2013).

Ces dernières années, il a été testé dans la réalisation de biomatériaux, et notamment pour la production de béton biosourcé. Les entreprises Ciment Calcia et Alkern ont conçu un prototype de parpaing en béton constitué à 60 % de MxG en moyenne, permettant de réduire le bilan carbone et la consommation de granulats de construction. Le matériau obtenu est trois fois plus isolant que le béton classique. Il est également intéressant du point de vue phonique puisqu'il atténue des bruits de 54 décibels lorsqu'un mur est enduit sur une face. Les performances de résistance au feu de ce produit se révèlent également excellentes avec une tenue au feu affichée de 4 heures (Combe, 2017).

- **Autres voies de valorisation**

Avec un contenu en lignocellulose élevé, MxG pourrait être une culture prometteuse pour produire du bioéthanol de seconde génération (Nsanganwimana et al., 2014).

Il pourrait également être valorisé dans des unités de biométhanisation. Le pouvoir méthanogène de MxG récolté « en vert » a été évalué à plus de 200.000 MJ.ha⁻¹ par le centre Gabriel Lippmann (Luxembourg). Cependant sa cinétique de dégradation est très lente, son utilisation devrait être limitée à des installations de taille importante (Gauthier and Somer, 2013).

Des études ont également montré que MxG pouvait être utilisé pour la production de pâte à papier (Nsanganwimana et al., 2014).

6.6. Miscanthus x giganteus en phytoremédiation

MxG est capable de croître sur une large gamme de sols dont ceux contaminés par des ETM (Al Souki et al., 2017; Hedde et al., 2013; Wanat et al., 2013) et des HAP (Techer et al., 2012c) et également des sols multi-contaminés, par la présence à la fois d'ETM et de HAP (Techer et al., 2012c).

En ce qui concerne les ETM, des études ont montré la capacité de MxG à se développer sur des sols extrêmement contaminés. En effet, le développement de cette espèce a été observé sur des sols contenant de 83 000 mg.kg⁻¹ d'As et 15 200 mg.kg⁻¹ de Pb (Wanat et al., 2013) ou encore 16 mg.kg⁻¹ de Cd, 898,6 mg.kg⁻¹ de Pb et 1 116 mg.kg⁻¹ de Zn (Al Souki et al., 2017).

Les études concernant MxG sur des sols contaminés aux ETM ont mis en évidence une faible présence de ces contaminants dans ses parties aériennes, ceux-ci étaient préférentiellement accumulés dans les racines (Laval-Gilly et al., 2017; Wanat et al., 2013). Cette plante pourrait donc être classée comme « exclusive » selon la définition de Baker (1981) (Wanat et al., 2013). Les concentrations plus importantes dans les racines que dans les parties aériennes démontrent la capacité de MxG à contenir les ETM dans le sol (Nsanganwimana et al., 2014). De plus, des études ont montré la capacité de cette plante à diminuer la biodisponibilité et la mobilité des ETM tels que l'As, le Pb (Nsanganwimana et al., 2014) ou encore le Zn et le Cd (Al

Souki et al., 2017) dans les sols. Ces caractéristiques font de MxG un bon candidat pour la phytostabilisation des ETM sur des sols contaminés.

Les résultats de Wanat et ses collaborateurs révèlent une absence de stress et une bonne adaptation physiologique de MxG sur des sols contaminés avec de fortes concentrations en ETM (Wanat et al., 2013). Ces résultats sont confirmés par Techer et ses collaborateurs qui n'ont observés aucune chlorose ni nécrose sur les parties aériennes de la plante qui se développaient sur un technosol contaminé à la fois par des ETM et des HAP (Techer et al., 2012c), suggérant une bonne adaptabilité de la plante aux sols contaminés.

Concernant les HAP, peu de recherches ont été publiées concernant la phytoremédiation de ces contaminants organiques par MxG (Pidlisnyuk et al., 2014). Técher et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence un développement de MxG sur des sols contaminés artificiellement avec des concentrations de 100 mg.kg⁻¹ de pyrène et de phénanthrène (Techer et al., 2012b) et également sur des technosols prélevés sur le site d'une ancienne cokerie du Nord de la France, qui contenaient des teneurs en HAP totaux égales à 26 mg.kg⁻¹ et à 364 mg.kg⁻¹ (Techer et al., 2012c).

La présence de MxG a entraîné une dissipation du pyrène dans les sols artificiellement contaminés (Techer et al., 2012b). Cependant, MxG n'a eu aucun effet « clair » sur la dissipation des HAP présents dans les technosols, ce qui a été expliqué par les auteurs de l'article par un temps d'expérimentation trop court (17 semaines). En effet la phytoremédiation est une technique longue, qui doit rester en place sur plusieurs cycles végétaux. De plus, lorsqu'un site est pollué depuis plusieurs années, la biodisponibilité des HAP diminue et ces contaminants sont moins biodisponibles pour la dégradation, ce processus est appelé « vieillissement » (Hatzinger and Alexander, 1995; Semple et al., 2003). Cette diminution de la biodisponibilité peut donc également expliquer l'absence de dissipation dans le technosol contrairement au sol artificiellement contaminé.

La dissipation d'un HAP à 4 cycles, le benzo(a)anthracène, a également été étudiée en présence de MxG sur un sol artificiellement contaminé avec une concentration de 50 mg.kg⁻¹ de sol sec de ce HAP. Une dissipation significative du benzo(a)anthracène a été observée après 12 mois de culture en mésocosme (Mazziotti, 2017).

Une analyse des exsudats racinaires de MxG a mis en évidence que les flavonoïdes libérés par les racines de la plante et notamment la rutine et la quercétine ont permis de favoriser sélectivement la croissance de consortiums bactériens dégradants les HAP (Técher et al., 2011). La quercétine a ainsi été identifiée comme le principal contributeur aux processus de biostimulation bactérienne (Techer et al., 2012a).

En résumé, MxG présente de nombreux avantages à être utilisé en phytoremédiation. Cette espèce végétale peut être plantée sur des sols contaminés en ETM pour être utilisé en

phytostabilisation et peut également être utilisée en rhizodégradation pour promouvoir la dissipation des HAP.

De plus, cette espèce produit une biomasse aérienne importante et ses racines peuvent descendre jusqu'à 2,5 m de profondeur (Neukirchen et al., 1999), ce qui permet à MxG d'atteindre les contaminants même en profondeur dans les sols, d'autant plus que Techer et ses collaborateurs n'ont observé aucune différence significative du développement racinaire de la plante se développant un sol contaminé comparé à un sol non contaminé (Techer et al., 2012c).

La culture de MxG permet également d'améliorer la qualité du sol avec notamment une augmentation des teneurs en carbone organique dans le sol (Al Souki et al., 2017), une augmentation de la densité et de la diversité des invertébrés dans des sols contaminés avec des ETM (Hedde et al., 2013) et une augmentation de la respiration basale du sol, indiquant une augmentation de l'activité microbienne du sol (Al Souki et al., 2017).

MxG permet également de produire une biomasse aérienne valorisable chaque année, qui n'est pas compromise par l'accumulation d'ETM dans ses parties aériennes.

L'intérêt de l'utilisation de MxG sur des sols contaminés tient donc à la fois à sa contribution à la dépollution des sols et à la fois à la production de biomasse valorisable. L'enjeu actuel est la production de biomasse à vocation énergétique sans concurrencer les terres agricoles servant à la production alimentaire. Cependant, des études ont mis en évidence une diminution significative de la biomasse aérienne de MxG lorsque ce dernier se développe sur des sols contaminés comparé à des sols non contaminés (Wanat et al., 2013). C'est pour cette raison que, dans cette étude, nous allons nous intéresser à l'amélioration de la phytoremédiation des sols avec MxG et de la biomasse produite. Pour cela, deux méthodes sont envisagées : la co-culture et la phytoremédiation assistée par bioaugmentation.

7. Voies d'amélioration de la phytoremédiation par *Miscanthus x giganteus*

7.1. La co-culture

Le développement de la co-culture végétale est envisagé dans le but de limiter les intrants propres aux monocultures en trouvant des combinaisons d'espèces trouvant l'avantage l'une de l'autre. Ces associations « gagnant – gagnant » ont surtout été développées afin de favoriser la production ou protéger les cultures. En effet, certaines associations végétales peuvent entraîner, par rapport aux monocultures, une augmentation de la biomasse végétale et donc de la productivité (Tilman et al., 1996; Vergara Cid et al., 2020) ainsi qu'une amélioration de la biodiversité du sol (macrofaune, mésofaune et microfaune) (Schneider, 2015). La diversité des espèces végétales cultivées contribue également à une

augmentation de la diversité des microorganismes du sol (Gao et al., 2012) et à une augmentation de l'activité microbienne (Lange et al., 2015). De plus, certaines associations permettent de limiter la présence de ravageurs et de maladies, d'augmenter la couverture végétale du sol et la présence de racines, diminuant ainsi l'érosion et le ruissellement (Malézieux et al., 2009).

D'un point de vue phytoremédiation, des co-cultures entre différentes espèces végétales ont montré une amélioration de la phytoextraction des ETM (Vergara Cid et al., 2020) ou de la dissipation des HAP (Meng et al., 2011; Wei and Pan, 2010; Xu et al., 2006), comparé aux monocultures et, dans certains cas, une augmentation de la biomasse végétale (Vergara Cid et al., 2020).

Avec comme objectif d'améliorer la dissipation des HAP et la biomasse de MxG, le choix de l'espèce végétale à associer en co-culture avec MxG s'est porté sur le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Ce dernier a été sélectionné pour ses capacités phytoremédiatrices à la fois sur les HAP et sur les ETM mais également car il possède d'autres avantages, et notamment sa petite taille qui permettrait de ne pas gêner la récolte de MxG ni d'entrer en compétition avec ce dernier pour la lumière lors des phases initiales de son développement. Un autre intérêt du trèfle blanc est sa capacité à former une couverture végétale, ce qui s'avèrerait être intéressant pour limiter le développement des adventices lors de la plantation de MxG. La couverture végétale rapide du trèfle blanc permettrait également de réduire l'érosion du sol, le lessivage des polluants durant les premières années de culture jusqu'à ce que MxG atteigne une croissance optimale.

De plus, le trèfle est une légumineuse capable de fixer l'azote atmosphérique dans le sol. Ainsi, il peut être utilisé comme engrais vert et enrichir les sols appauvris en cet élément.

7.1.1. Présentation de *Trifolium repens* L.

Le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) est une dicotylédone de la famille des Fabacées (Floraine, 2013; Lauber et al., 2007; Muratet et al., 2017; Schneider, 2015). C'est une espèce vivace pouvant mesurer entre 10 et 25 cm de haut (Floraine, 2013) voir jusqu'à 45 cm (Schauer and Caspari, 2008) en fonction des variétés.

La Figure 15 illustre la morphologie du trèfle blanc. Aussi appelé trèfle rampant, sa tige rampante et radicante porte à chaque nœud des feuilles et des racines adventices permettant la reproduction végétative de la plante et sa colonisation rapide des espaces (Schauer and Caspari, 2008). Ses feuilles sont composées de 3 larges folioles ovales, finement dentées, souvent marbrées de vert clair. Ses fleurs de couleur blanches parfois rosâtres mesurent entre 2 et 5 mm (Schauer and Caspari, 2008) et forment des inflorescences globuleuses mesurant de 1 à 4 cm de diamètre (Muratet et al., 2017). Elles sont portées par un pédoncule pouvant atteindre 40 cm de hauteur (Muratet et al., 2017). La floraison a lieu de mai à septembre

(Muratet et al., 2017) et peut s'étendre jusqu'à novembre (Floraine, 2013). Après floraison, les fleurs deviennent brunâtres et pendantes (Floraine, 2013; Lauber et al., 2007; Muratet et al., 2017; Schauer and Caspari, 2008). Les fruits sont inclus dans le calice et masqués par les fleurs séchées. Ils comprennent 1 à 4 graines (Muratet et al., 2017).

Le trèfle blanc est entièrement glabre (Lauber et al., 2007; Muratet et al., 2017), c'est-à-dire dépourvu de poils et d'épines.



Figure 15: Schéma morphologique du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) d'après (Thomé, 1885) (http://www.biolib.de/thome/band3/tafel_115.html). Les légendes de cette figure correspondent à 1 : feuille, 2 : fleur avant la floraison, 3 : fleur pendant la floraison, 4 : calice, 5 : Fleurs après floraison, 6 : gousse, 7 : akène.

Originnaire de la région méditerranéenne, cette espèce s'est dispersée naturellement en Europe et Asie occidentale (Schneider, 2015). Commune en Europe, elle se développe aussi bien dans les prairies, les gazons, les bords de chemin, les friches que dans les cultures (Floraine, 2013; Muratet et al., 2017; Schauer and Caspari, 2008).

7.1.2. Caractéristiques agronomiques

Le trèfle blanc est une légumineuse. Contrairement aux autres végétaux, les légumineuses sont capables de fixer l'azote de l'air (N_2) grâce à une relation symbiotique avec des bactéries du genre *Rhizobium* naturellement présentes dans le sol. Ces bactéries sont hébergées dans des nodosités au niveau des racines de la plante (Schneider, 2015). Ces

bactéries sont capables de convertir le diazote (N_2) provenant de l'air contenu dans le sol en une forme assimilable par les végétaux : l'ammonium (NH_4^+) grâce aux micronutriments et à l'énergie apporté par la plante hôte (sucres issus de la photosynthèse). Les légumineuses peuvent ainsi, grâce à cette symbiose, utiliser directement l'azote atmosphérique pour constituer des molécules organiques telles que les protéines et se développer. L'intérêt de cette fixation biologique est que l'azote minéral présent dans le sol est en quantité limitée et peut être limitant contrairement à l'azote atmosphérique. Cependant, ce processus biologique est coûteux en énergie pour la plante, et se mettra en place uniquement lorsque la quantité d'azote dans le sol sera rare (Schneider, 2015).

Grâce à cette capacité à fixer l'azote, le trèfle blanc est cultivé avec des graminées fourragères, principalement le Ray-grass anglais, dans le but de limiter l'apport en engrais azoté (Schneider, 2015). Étant une légumineuse fourragère, le trèfle blanc est cultivé pour nourrir les animaux d'élevage et principalement les ruminants. Il fait partie des principales légumineuses cultivées en France avec la luzerne, le trèfle violet, le sainfoin et le lotier corniculé (Schneider, 2015). Le trèfle blanc est la légumineuse de pâturage la plus importante dans les zones tempérées du monde (Frame and Newbould, 1986). C'est la légumineuse fourragère la mieux adaptée au pâturage, elle résiste au piétinement et subit des défoliations sans que ses tiges ne soient sectionnées (Schneider, 2015). Elle possède une haute qualité nutritionnelle (Frame and Newbould, 1986) puisque ses feuilles sont riches en protéines (Schneider, 2015), ainsi qu'une grande digestibilité (Frame and Newbould, 1986; Schneider, 2015) puisque seules ses feuilles sont consommées et non ses tiges (Schneider, 2015).

7.1.3. Le trèfle blanc en phytoremédiation

Le trèfle blanc croît sur une large gamme de sols (Floraine, 2013; Muratet et al., 2017; Schauer and Caspari, 2008) dont des sols contaminés par des ETM (Bidar et al., 2007) ou des HAP (Meng et al., 2011; Wei and Pan, 2010; Xu et al., 2009). Bidar et ses collaborateurs (2007) ont montré que cette espèce est capable de croître et de former une couverture végétale sur des sols contaminés avec $25,86 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Cd, 1222 mg.kg^{-1} de Pb et 1301 mg.kg^{-1} de Zn. Sur ce sol, une accumulation de Cd et de Zn a été montrée dans ses racines (facteur de bioconcentration de 4,91 et 1,21 respectivement) mais le transfert dans ses parties aériennes est limité. Des facteurs de bioaccumulation de 0,35 ; 0,03 et 0,07 ont été calculés pour Cd, Pb et Zn respectivement (Bidar et al., 2007).

Étant une espèce pérenne capable de croître sur des sols pollués par les ETM sans les accumuler dans ses parties aériennes et capable de former un couvert végétal rapidement permettant de réduire l'érosion du sol, l'envol de poussières et le lessivage des polluants, le trèfle blanc remplit les critères énoncés par l'ADEME dans le guide « les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués » (Bert et al., 2012) pour être utilisé en phytostabilisation sur des sols contaminés par des ETM.

En ce qui concerne les polluants organiques, des études ont montré la tolérance du trèfle à des concentrations extrêmement élevées en HAP. Wei and Pan (2010) ont testé des concentrations allant jusqu'à 322 mg.kg⁻¹ de phénanthrène et de pyrène et Xu et al., (2009) des concentrations en pyrène allant jusqu'à 365,38 mg.kg⁻¹. Pour cette dernière étude, aucune différence significative n'a été observé entre la biomasse racinaire et aérienne du trèfle dans le sol contaminé avec 365,38 mg.kg⁻¹ de pyrène en comparaison avec le sol témoin non pollué. Plusieurs études ont montré une dissipation du pyrène, du phénanthrène ou encore la somme des 16 HAP prioritaires (Meng et al., 2011; Xu et al., 2009, 2006). Xu et al. (2006) ont montré une dissipation du pyrène de 62,33 à 88,12 % après 60 jours de culture du trèfle blanc dans un sol contaminé avec des concentrations allant de 4,32 à 365,38 mg.kg⁻¹. Wei and Pan (2010) ont montré une dissipation de 54,36 % de ce même polluant dans un sol contaminé artificiellement avec 80 mg.kg⁻¹ de pyrène. Des résultats similaires ont été rapportés par (Xu et al., 2009) avec un pourcentage de dissipation moyen de 77 %. Meng et al. (2011) ont montré une dissipation des 16 HAP prioritaires d'environ 50 % après 75 jours de culture de trèfle blanc sur un sol contaminé avec 23,07 mg.kg⁻¹ de HAP.

Ces études montrent la capacité du trèfle blanc dans la dissipation et plus particulièrement la rhizodégradation des HAP. En effet, Meng et al. (2011) ont calculé la contribution du trèfle blanc dans la rhizodégradation des HAP à plus de 99,99 % alors que l'absorption par la plante représente moins de 0,01 %. Ces résultats prouvent que la dégradation microbienne est la voie de dissipation principale des HAP alors que l'accumulation de ces polluants dans les végétaux est une voie négligeable.

Le trèfle blanc peut donc être utilisé en phytoremédiation et particulièrement en phytostabilisation sur des sols pollués par des ETM et en rhizodégradation sur des sols pollués par des HAP seul ou en complément avec d'autres cultures.

7.2. Phytoremédiation assistée par bioaugmentation

7.2.1. Généralités sur la bioaugmentation

Un second moyen sera testé dans le but d'améliorer la phytoremédiation des polluants, il s'agit de coupler la phytoremédiation (MxG / MxG + trèfle blanc) avec la bioaugmentation. Cette technique est appelée phytoremédiation assistée par bioaugmentation.

La bioaugmentation peut être définie comme une technique visant à améliorer la capacité de dépollution d'une matrice contaminée (sol, sédiment) par l'introduction de microorganismes spécifiques compétents (El Fantroussi and Agathos, 2005). Il s'agira dans ce cas d'utiliser soit des microorganismes indigènes (ou endémiques) isolés à partir de la matrice contaminée et sélectionnés pour leur capacité de dégradation, soit d'utiliser des souches exogènes, ne

provenant donc pas de la matrice contaminée, mais connues pour leur capacité de dégradation (El Fantroussi and Agathos, 2005; Sterckeman et al., 2011).

Lors d'un ajout de microorganismes exogènes dans une matrice comme le sol, un déclin rapide de la population de microorganismes ajoutée peut être observée peu de temps après l'inoculation et peut s'expliquer par divers facteurs biotiques et abiotiques. Les stress abiotiques peuvent comprendre des fluctuations de températures, de teneur en eau, de pH, de biodisponibilité des nutriments ainsi que des concentrations en polluants potentiellement toxiques pour les microorganismes exogènes. En ce qui concerne les stress biotiques, les populations exogènes sont la plupart du temps confrontées à la concurrence des populations indigènes pour des nutriments limités, ainsi qu'à la prédation par les protozoaires et les bactériophages (El Fantroussi and Agathos, 2005; Gentry et al., 2004).

L'avantage d'utiliser des microorganismes indigènes est la réduction des risques exposés ci-dessus, puisque les microorganismes proviennent de la même niche écologique que le site à traiter et y sont déjà adaptés.

Pour des milieux contaminés en HAP, la bioaugmentation va consister à introduire des microorganismes qui ont la capacité de dégrader ces polluants organiques. En revanche, puisque les ETM ne peuvent pas être biodégradés, les microorganismes sélectionnés seront choisis pour leur capacité de faire varier la spéciation des ETM et ainsi leur biodisponibilité.

Pour la mise en place d'un procédé de phytoextraction, des microorganismes connus pour rendre plus biodisponibles les ETM seront ajoutés, ce qui permettra une facilitation de l'accumulation des ETM dans les végétaux (Janssen et al., 2015). Au contraire, pour de la phytostabilisation des microorganismes pouvant réduire la biodisponibilité des ETM pourront alors être utilisés.

Dans cette étude, nous avons choisi de se concentrer sur la dissipation des HAP. Le choix des microorganismes s'est porté sur des bactéries endémiques possédant la capacité de dégrader un HAP particulier, le benzo(a)pyrène, dans le but d'améliorer leur survie lorsqu'ils seront inoculés dans le technosol.

7.2.2. Choix de la bioaugmentation

L'emploi simultané de la bioaugmentation et de la phytoremédiation a été choisi dans le but d'augmenter l'efficacité de la dissipation des HAP et l'augmentation de la biomasse de MxG puisque la combinaison de ces deux techniques de remédiation pourrait optimiser l'effet synergique des plantes et des microorganismes (García-Sánchez et al., 2018).

En effet, l'inoculation de microorganismes dégradants permet d'améliorer la dissipation des HAP et certains peuvent également améliorer la tolérance aux stress des plantes et améliorer leur croissance (Lin et al., 2008). En même temps, la présence de végétaux peut améliorer, *via* l'exsudation racinaire, la dégradation des HAP (cf. paragraphe 5.2.1) et fournir des conditions idéales pour stimuler la croissance de populations microbiennes (García-Sánchez et al., 2018).

De plus, le développement racinaire des végétaux permet une augmentation de l'aération du sol et une meilleure infiltration d'eau (Lin et al., 2008) permettant une dégradation aérobie plus en profondeur (García-Sánchez et al., 2018). Les racines peuvent également casser des agrégats du sol et permettre ainsi d'améliorer la biodégradation des contaminants hydrophobes piégés (Lin et al., 2008).

Bien que les résultats puissent être contrastés, cette technique a pu mettre en évidence de meilleurs taux de dissipation des polluants organiques lors de la mise en place de phytoremédiation assistée par bioaugmentation comparée à de la phytoremédiation seule, de la bioaugmentation seule ou encore de l'atténuation naturelle (Agnello et al., 2016; García-Sánchez et al., 2018; Glick, 2010).

8. Objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail de thèse consiste donc à améliorer la phytoremédiation d'un technosol contaminé à l'aide de MxG dans le but d'améliorer la qualité du sol et également d'augmenter la production de biomasse aérienne de MxG en perspective d'une valorisation économique. Pour cela, deux expérimentations en mésocosme sont proposées :

- **Une co-culture entre MxG et le trèfle blanc**

Le trèfle blanc a été sélectionné pour réaliser une co-culture avec MxG principalement parce que c'est une légumineuse, capable de fixer l'azote atmosphérique dans le sol, qui pourra être bénéfique aux sols pauvres en cet élément nutritif essentiel au développement des espèces végétales. De plus, il pourra constituer un couvert végétal intermédiaire protégeant les sols de l'érosion en attendant que MxG soit parvenu à maturité. C'est également une espèce vivace, naturellement présente en France, et de petite taille, ce qui devrait permettre de ne pas entrer en compétition avec MxG pour la lumière ni de gêner la récolte de sa biomasse. Enfin, grâce à ses capacités en phytoremédiation et notamment en rhizodégradation des HAP et en phytostabilisation des ETM, elle participera à la remédiation du technosol.

- **Coupler la phytoremédiation à de la bioaugmentation**

Des microorganismes endémiques du technosol ont été sélectionnés pour leur potentiel de dégradation des HAP, du benzo(a)pyrène notamment afin de réaliser la bioaugmentation dans l'objectif d'améliorer la dissipation des HAP. Les microorganismes sont tout d'abord produits au laboratoire dans un milieu de culture contenant du benzo(a)pyrène comme pression de sélection avant d'être inoculés au technosol en présence ou en absence de MxG en monoculture ou en co-culture avec le trèfle blanc.

Afin d'évaluer l'efficacité de ces deux méthodes, plusieurs paramètres sont suivis au cours du temps, notamment : l'évolution des teneurs en HAP et en ETM dans le technosol et son écotoxicité, le développement et la biomasse des espèces végétales ainsi que la caractérisation et l'évolution de la microflore. Les deux méthodes seront ensuite comparées afin de déterminer celle qui se révèle être la plus intéressante pour répondre à l'objectif de recherche et qui sera donc déployée *in situ*.

Matériels et méthodes

1. Présentation du site d'étude

1.1. Caractérisation de la contamination des sédiments excavés

Les sédiments de deux cours d'eau, le Nachtweidgraben et le Warpich, situés à proximité de la ville de Thionville (Moselle, Grand-Est), ont été excavés dans le but de restaurer leurs capacités d'écoulements et de limiter les risques d'inondations.

Avant leur excavation, leur contamination a été évaluée par un bureau d'étude (Aspect) en 2010, conformément à la réglementation. Cinq points de prélèvements ont été réalisés : deux sur le Nachtweidgraben et 3 sur le Warpich (Figure 16).

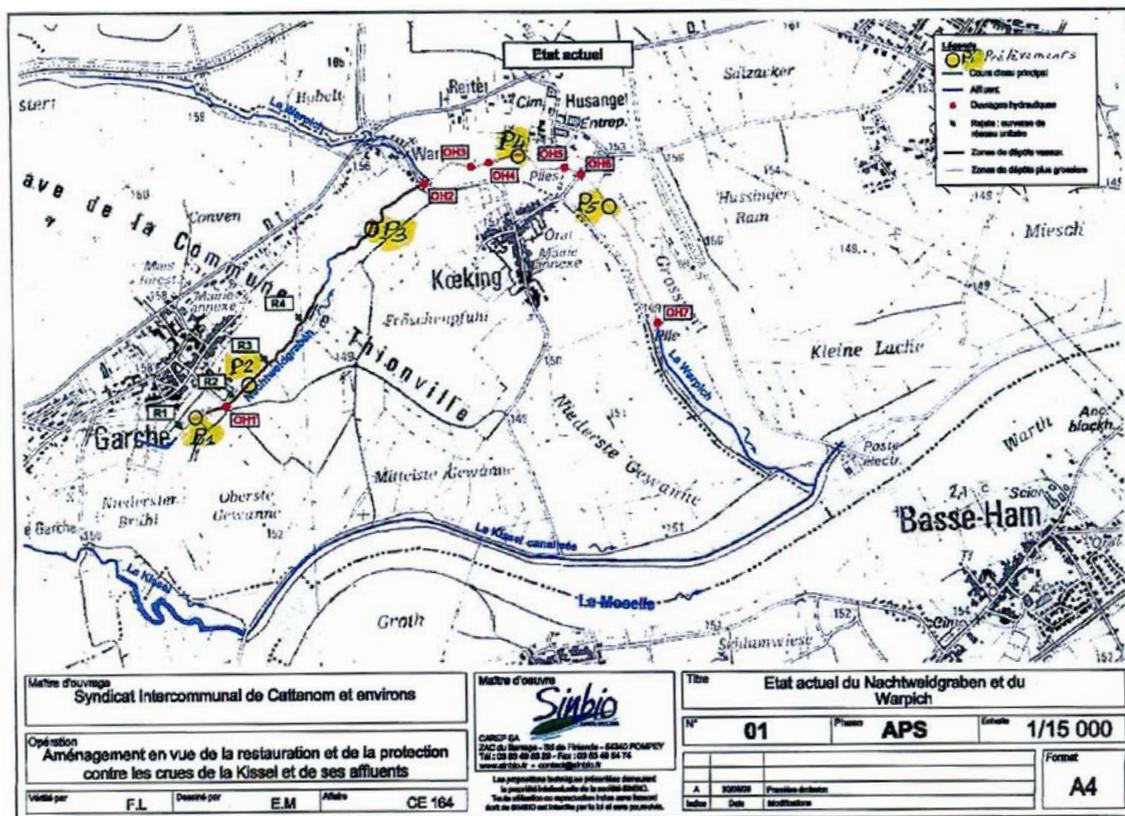


Figure 16 : Carte représentant les points de prélèvements réalisés sur le Nachtweidgraben et le Warpich

Tableau 6 : Résultats des dosages HAP et ETM réalisés sur les sédiments. Les valeurs en rouge indiquent un dépassement des valeurs seuils fixées par l'arrêté du 9 août 2006 (Legifrance, 2006)

		Nachtweidgraben			Warpich	
		P1	P2	P3	P4	P5
HAP ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Benzo(a)pyrène	330	1000	180	100	600
	Benzo(b)fluoranthène	390	1000	180	110	610
	Fluoranthène	520	1600	290	150	930
ETM (mg.kg^{-1})	Cadmium	0,63	0,09	< 0,05	0,15	0,23
	Chrome	49	61	39	57	62
	Cuivre	78	4,6	24	38	87
	Mercure	0,21	0,18	0,9	0,16	0,15
	Nickel	38	49	38	54	45
	Plomb	63	50	23	32	45
	Zinc	570	300	130	240	360

Les résultats des dosages en HAP et en ETM des sédiments sont présentés dans le Tableau 6. Ils ont mis en évidence une contamination des sédiments par du Zinc et du Nickel, pour les ETM. En ce qui concerne les HAP, seuls 3 ont été mesurés : le benzo(a)pyrène, le benzo(b)fluoranthène et le fluoranthène. Or, dans la réglementation concernant les sédiments excavés, une valeur seuil de $22,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ est indiquée pour les HAP totaux (Legifrance, 2006), nous ne pouvons donc pas conclure quant à la contamination des sédiments par les HAP à partir des résultats fournis.

1.2. Caractérisation de la contamination du site hôte

Le site choisi pour accueillir les sédiments excavés est le site d'un ancien atelier de réparation de véhicules situé à Thionville, d'une superficie d'approximativement 83 ares. Un diagnostic de la contamination du sol de ce site a également été réalisé par un bureau d'études (HPC Envirotec) en 2015, avant le démarrage du projet et l'accueil des sédiments excavés. Pour cela, 13 points de prélèvements ont été échantillonnés sur des profondeurs variables, entre 0 – 0,1 m ; 0,3 – 0,4 m ; 0,5 – 0,6 m et 1 – 2m.

Les résultats des dosages en ETM et HAP obtenus sont présentés dans le Tableau 7 et ont été comparés au fond pédogéochimique naturel local (FPGN), qui est celui de Thionville-Custines (Darmendrail, 2000) (Tableau 8).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 7 : Concentrations en ETM et HAP obtenus sur les 13 prélèvements de sol du site hôte

	Concentrations en mg.kg ⁻¹												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
As	60,9	20,4	15,2	20,7	20,4	20,9	21,3	21,7	7,58	23,1	44,6	12,7	15,7
Cd	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	0,61	<0,40	0,73
Cr	266	42,3	38,6	74,6	48	84,3	42,2	45,5	37,9	44,6	67,8	32,9	46,3
Cu	28,9	26,5	27,3	23	24,8	24,3	29,2	21,2	11,9	21,9	113	31,1	56,5
Ni	44,8	43,2	45,9	41,3	39,1	38,3	50,5	43,3	7,58	44,6	47,5	25,6	49,8
Pb	25,7	24,1	20,5	55,9	21,4	23,7	70,2	22,6	18,6	20,4	233	86,9	236
Zn	117	110	117	285	108	119	110	107	70,3	104	1000	273	312
Hg	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	0,39	0,16	0,34
Benzo(a)pyrène	<0,05	0,16	<0,05	<0,05	0,27	0,082	0,1	<0,05	0,14	0,39	0,41	0,38	0,4
Benzo(b)fluoranthène	<0,05	0,2	<0,05	0,073	0,38	0,1	0,1	<0,05	0,3	0,6	0,74	0,65	0,65
Fluoranthène	<0,05	0,13	<0,05	0,057	0,37	0,098	0,18	<0,05	0,23	0,5	0,49	0,43	0,71

Les cases surlignées en jaunes indiquent un dépassement de la valeur moyenne du FPGN local alors que les cases surlignées en rouge montrent un dépassement des valeurs maximales du FPGN.

Tableau 8 : Valeurs moyennes et maximales des ETM et HAP dosés dans le fond pédogéochimique naturel (FPGN) de Thionville-Custines.

		FPGN (mg.kg ⁻¹)	
		Moyenne	Maximum
ETM	As	20	50
	Cd	2	5
	Cr	75	200
	Cu	30	100
	Ni	40	100
	Pb	30	100
	Zn	120	500
	Hg	1	2
HAP	Benzo(a)pyrène	0,09	0,15
	Benzo(b)fluoranthène	0,17	1
	Fluoranthène	0,33	3

Ces résultats (Tableau 7 et Tableau 8) montrent une contamination du sol du site en ETM, avec notamment un dépassement du fond pédogéochimique en Arsenic, Chrome, Cuivre, Nickel, Plomb et Zinc sur certains des points de prélèvements et également en HAP, notamment en benzo(a)pyrène.

De manière générale, les contaminations les plus importantes ont été relevées sur les points 10 à 13, se situant sur la partie Sud-Est du site.

Ce site hôte a été choisi comme site de traitement des sédiments puisqu'il présente également une contamination. L'intérêt est alors de créer un technosol en mélangeant le sol du site hôte avec les sédiments excavés des deux cours d'eaux afin de traiter la contamination des deux

matrices par phytoremédiation. L'addition du sol aux sédiments devrait par ailleurs permettre d'une part de corriger la texture colmatante des sédiments et d'apporter des nutriments au sol du site récepteur.

1.3. Création du technosol étudié

Les différentes étapes de la création du technosol étudié sont présentées sur la Figure 17.



Figure 17 : Les différentes étapes de création du technosol

Premièrement, le sol du site hôte a été « excavé » sur les 30 premiers centimètres de profondeur à l'aide d'une pelleteuse et a été déposé en tas (Photo 1 de la Figure 17). La deuxième étape a consisté, toujours à l'aide d'une pelleteuse, à mélanger le sol du site « excavé » avec les sédiments (Photo 2 de la Figure 17). Les sédiments ont été directement excavés des cours d'eau et mélangés au sol du site, sans séchage préalable, dans des

proportions approximatives de 2/3 de sédiments et 1/3 de sol. C'est ce mélange qui est identifié dans la suite du document comme « technosol ». Une fois le technosol créé, ce dernier a été déposé sur une géomembrane pour former deux parcelles (Photo 3 de la Figure 17). La géomembrane permet d'éviter les transferts de contaminants entre le technosol et l'environnement (eaux, sol des sites voisins). Des canaux ont été créés, permettant de recueillir l'eau de percolation et de ruissellement du technosol afin de la diriger vers le bassin de rétention en eau du site (Figure 18).

Ce bassin de rétention d'une contenance de 700 m³ a été créé afin d'éviter la contamination éventuelle des milieux par diffusion des polluants par percolation ou ruissellement. L'eau qu'il contient servira pour l'irrigation des végétaux sur le technosol, et ainsi si des contaminants sont présents dans l'eau, ils seront redistribués sur le technosol et pourront alors être traités par phytoremédiation. La contamination de l'eau sera surveillée et des traitements spécifiques pourront être mis en place si nécessaire.



Figure 18 : Photographie du bassin de rétention en eau du site d'étude

2. Amélioration de la phytoremédiation par co-culture

2.1. Mise en place de l'expérimentation

2.1.1. Préparation des rhizomes de *Miscanthus x giganteus*

Des rhizomes de *Miscanthus x giganteus* ont été récupérés au Lycée agricole de Courcelles-Chaussy (57, Moselle, Grand Est). Ils ont tout d'abord été lavés à l'eau du robinet afin d'éliminer toutes les particules de terre puis rincés à l'eau distillée. Les rhizomes ont ensuite été plantés dans du sable de quartz humide pendant 3 semaines dans une chambre phytotronique (Fitoclima 10000 EHFF, aralab) à 22°C, 70 % d'humidité et une photopériode jour/nuit de 16h/8h à 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Le sable a été régulièrement humidifié pendant cette période.

Cette étape a permis de s'assurer de la viabilité des rhizomes avant la plantation. Les rhizomes ont été pesés à T0 (jour de la plantation), de façon à s'assurer que leur masse et donc les réserves nutritives employées pour les premières phases de croissance de MxG sont comparables entre les différentes modalités (Test T de Student, $p > 0,05$).

2.1.2. Préparation des sols et plantation

Dans cette expérimentation, deux sols ont été préparés : le technosol provenant du site d'étude et un sol standard constitué artificiellement servant de sol témoin non contaminé. Le technosol a été prélevé sur le site d'étude puis séché à l'air. Il a ensuite été tamisé à 2 mm pour les analyses ainsi que pour l'expérimentation de phytoremédiation en mésocosme. Le sol standard a été constitué avec 15 % de tourbe, 20 % d'argile kaolinite et 65 % de sable de quartz (modifié d'après les normes ISO 11269-1, 11269-2 et 29 200 en augmentant de 5 % la quantité de tourbe et en réduisant d'autant la quantité de sable). Des échantillons de technosol et de sol standard ont été conservés à -20°C jusqu'à analyse.

Les pots (35,5 cm de haut et 28,5 cm de diamètre) ont été remplis avec 9 kg de technosol ou 9 kg de sol standard, tamisés à 2 mm, en fonction des modalités présentés dans la Figure 19. Cinq modalités ont été testés : sol standard + MxG ; technosol + MxG ; technosol + trèfle blanc ; technosol + co-culture (MxG + trèfle blanc) et technosol non planté. Trois réplicas ont été réalisés pour ces différentes modalités, excepté pour le technosol non planté, pour lequel un seul réplica a été préparé.

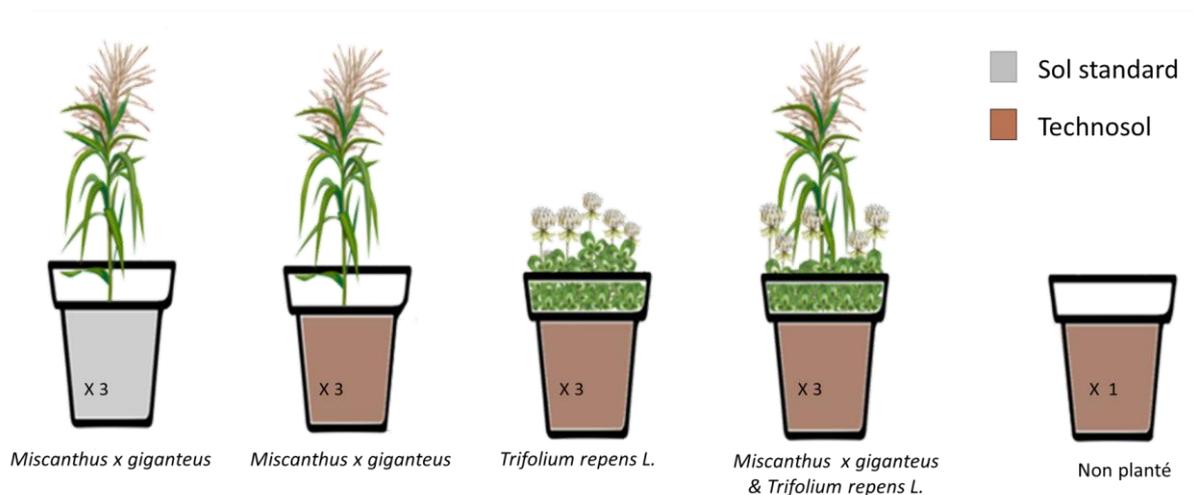


Figure 19 : Présentation des différentes modalités testées pour l'expérimentation "Amélioration de la phytoremédiation par co-culture"

Dans les pots, un rhizome de MxG a été planté et/ou 144 mg de graines de trèfle blanc, soit approximativement 200 graines, correspondant à une densité de 5 kg/ha, excepté pour le technosol non planté pour lequel aucune espèce végétale n'a été plantée.

La densité de plantation du trèfle a été choisie en fonction des usages agricoles et des références de la littérature (Lowther, 1975; Newbould and Rangeley, 1984).

Le jour de plantation des végétaux est considéré comme le premier jour de l'expérimentation (T0). Les rhizomes de MxG et les graines de trèfle blanc ont été plantés en même temps. Les pots contenant les sols et les végétaux ont ensuite été placés dans la chambre phytotronique (Fitoclima 10000 EHFF, aralab) à 22°C, 70 % d'humidité et une photopériode jour/nuit de 16h/8h à 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant 263 jours, correspondant à un cycle végétal complet de MxG jusqu'à sa sénescence.

Un arrosage automatique a été mis en place permettant une irrigation journalière des sols afin de maintenir leur capacité de rétention en eau à 60 % de leur capacité de rétention en eau maximale (Annexe 1 de la norme NF EN ISO 11268-1 (AFNOR, 2015b)).

2.2. Paramètres étudiés

Plusieurs paramètres ont été analysés en ce qui concerne les sols, les végétaux et la microflore du sol (bactéries et champignons) (Figure 20).

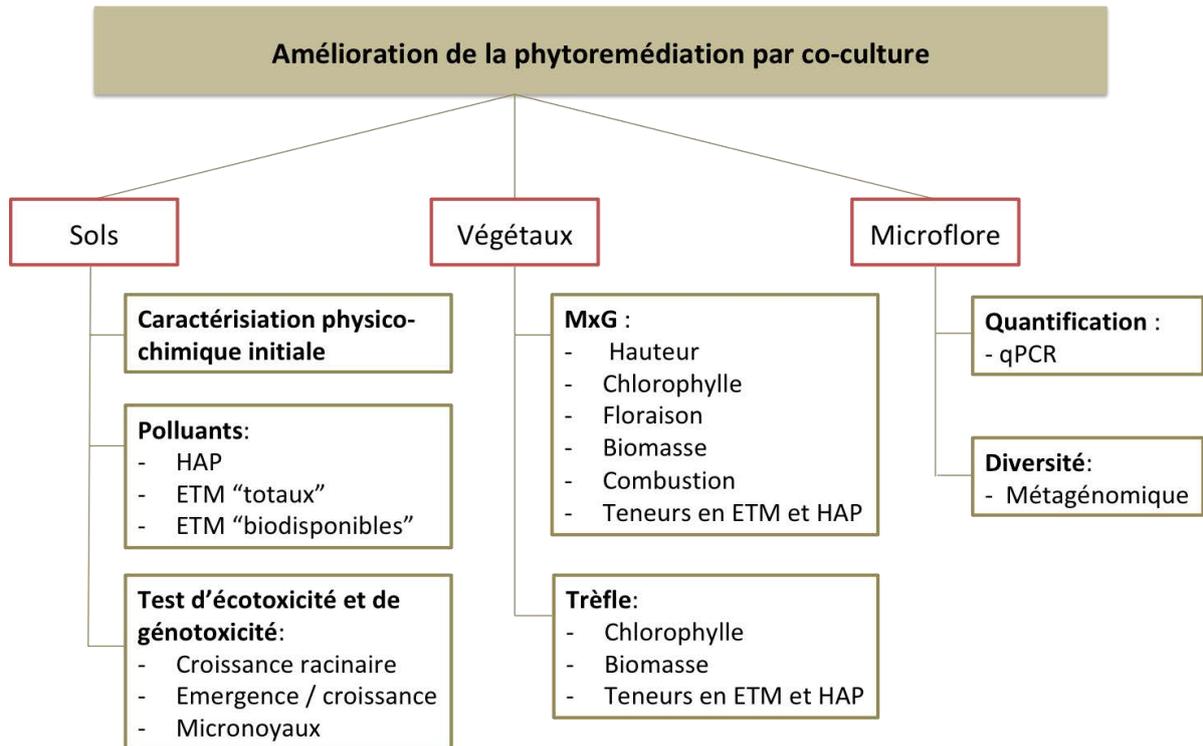


Figure 20 : Paramètres étudiés pour l'expérimentation "Amélioration de la phytoremédiation par co-culture"

Toutes ces analyses ont été effectuées avant la plantation des végétaux (T0) et à la fin de l'expérimentation (TF), soit au bout de 263 jours. En ce qui concerne le suivi des végétaux, la hauteur, les teneurs en chlorophylle ainsi que la présence de fleurs ont été suivis tous les mois pour MxG ainsi que la teneur en chlorophylle, le taux de couverture et la floraison du trèfle blanc.

Pour évaluer l'influence de MxG et du trèfle blanc en mono et en co-culture sur le technosol et le sol standard, les teneurs en polluants ainsi que des tests d'écotoxicité et de génotoxicité ont été effectués. L'influence des végétaux a également été analysée au niveau de la microflore des sols (bactéries et champignons) en déterminant la diversité des microorganismes ainsi que la densité du nombre de gènes « totaux » des bactéries et des champignons et un gène bactérien spécifique intervenant dans la dégradation des HAP, le gène PAH-RHD α GP.

2.2.1. Caractérisation physico-chimiques des sols

Une caractérisation physico-chimique du technosol et du sol standard, a été réalisée à T0 afin de pouvoir comparer leurs caractéristiques. Plusieurs paramètres ont été déterminés :

- le pH (pH KCl et pH H₂O), conformément à la norme NF ISO 10390 (AFNOR, 2005)
- la granulométrie, conformément à la norme NF X31-107 (AFNOR, 2003)
- la Capacité d'Échange Cationique (CEC) en utilisant la méthode Metson (AFNOR, 1999)
- l'azote total conformément à la norme NF ISO 11261 (AFNOR, 1995a)

- le carbone organique conformément à la norme NF ISO 14235 (AFNOR, 1998a)

Excepté les mesures de pH, ces analyses ont été effectuées par le LANO, laboratoire agronomique de Normandie, accréditation COFRAC pour l'ensemble des mesures mentionnées.

2.2.2. Dosage des HAP

Afin de suivre l'évolution des concentrations en HAP dans les sols, leur dosage a été réalisé au début (T0) et à la fin (TF) de l'expérimentation. Pour cela, les HAP ont été extraits des sols au micro-ondes (MarsXpress, CEM) conformément à la méthode 3546 de l'US EPA (US EPA, 2007). Ainsi, environ 10 g de sol (standard ou technosol) tamisé à 2 mm ont été mélangés à 12,5 mL de n-heptane et 12,5 mL d'acétone dans des réacteurs d'extraction spécifiques. La température du mélange a été portée à 110°C en 20 minutes et maintenue à 110°C pendant 15 minutes. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, ces derniers ont été filtrés et les solvants ont été évaporés sous Sorbonne pour concentrer les polluants dans un volume de 2 mL. Les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur dosage qui a été réalisé dans la semaine suivant l'extraction.

Les HAP extraits des sols ont été dosés en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à l'aide d'un système (pompe WatersTM 626) équipé d'un détecteur à barrette de photodiodes (Waters 996) et d'une colonne STABILITY[®]HAP-5 μ (250 mm, 4 mm, 5 μ m). La phase mobile utilisée était constituée d'acétonitrile et d'eau avec le gradient en acétonitrile suivant : 0 - 5 min : 50 %, 5 - 15 min : 50 % à 85 %, 15 - 20 min : 85 à 100 % et 20 - 46 min : 100 % d'acétonitrile, avec un débit de 1,5 mL/min. Pour chaque analyse, 20 μ L d'échantillon a été injecté dans l'HPLC.

Les HAP ont été détectés à la longueur d'onde de 254 nm et ont été identifiés grâce à leur spectre d'absorption spécifique et leur temps de rétention en utilisant le logiciel Empower Pro (Waters).

Une gamme étalon a été préalablement réalisée à l'aide d'un standard de référence contenant les 16 HAP de l'US-EPA à une concentration connue dans un mélange d'acétonitrile/méthanol (9 : 1) (EPA TCL PAH Mix, Sigma-Aldrich) afin de déterminer les concentrations des échantillons en chacun des 16 HAP en fonction de l'aire des pics obtenus sur le chromatogramme.

2.2.3. Dosage des ETM dans les sols

2.2.3.1. ETM « Totaux »

Les concentrations « pseudo-totales » des ETM présents dans les sols ont été dosées à T0 et à TF. Pour cela, environ 0,5 g d'échantillon de sol préalablement broyé et tamisé à 0,25 mm ont été digérés à l'eau régale, un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique (6 mL d'HCl (37 %) et 2 mL de HNO₃ (65 %) par échantillon) en utilisant un micro-ondes (MarsXpress,

CEM). La température du mélange est portée à 170°C en 15 minutes puis maintenue à 170°C pendant 10 minutes (NF ISO 12914) (AFNOR, 2012). Après refroidissement, les échantillons obtenus ont été filtrés et dilués à 50 mL avec de l'eau distillée. La concentration en ETM a été mesurée en utilisant un ICP-OES (Inductive Current Plasma- Optical Emission Spectrometry) (ThermoFisher, ICAP GUO 6000).

2.2.3.2. ETM « Biodisponibles »

La fraction biodisponible en ETM dans les sols a été estimée en réalisant une extraction à partir d'une solution tamponnée d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA), conformément à la norme NF ISO 14870 (AFNOR, 2002). Le dosage des ETM « biodisponibles » a également été réalisé à T0 et à TF.

Pour ce faire, 5 g de sol tamisé à 2 mm sont pesés dans un tube à fond conique, dans lequel est ajouté 10 mL de solution d'extraction (5 mmol.L⁻¹ DTPA, 0,01 mol.L⁻¹ CaCl₂ et 0.1 mol.L⁻¹ triéthanolamine). Après 2 h d'agitation, les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 3000 x g. Le surnageant est récupéré et filtré puis le dosage est réalisé à l'ICP-OES dans les 48h suivant l'extraction.

2.2.4. Tests d'écotoxicité et de génotoxicité

Afin d'évaluer l'écotoxicité et la génotoxicité du technosol, des tests standardisés sont réalisés en triplicatas (n=3) à T0 ainsi qu'à TF pour chacune des modalités.

2.2.4.1. Test « Inhibition de la croissance racinaire », ISO 11269-1

Le premier test utilisé est intitulé « Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 1 : Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines » (AFNOR, 2013a). Le principe de ce test consiste à évaluer la qualité d'un sol d'essai en exposant des semences de végétaux terrestres au sol à tester et de déterminer son impact sur la croissance racinaire. Ainsi, six semences d'avoine (*Avena sativa* L.) pré-germées sont exposées aux sols d'essai et aux sols témoins dans des conditions contrôlées (70 % d'humidité, 22°C le jour et 18°C la nuit, photopériode de 16h / 8h à une intensité lumineuse de 7140 lux) dans une enceinte phytotronique (Fitoclima S600, Aralab). Après 4 jours d'exposition, la longueur des racines des végétaux s'étant développées sur le sol d'essai est comparée à la longueur des racines des végétaux témoins (Figure 21). Les différences statistiquement significatives entre la longueur des racines des végétaux cultivés dans un sol d'essai et celle des témoins sont indicatives d'un effet.

Le sol témoin utilisé est un sol standard, non contaminé, composé de 69 % de sable de quartz, 10 % de tourbe de sphaigne et 20 % d'argile kaolinite et 1 % de CaCO₃. Un témoin positif,

constitué d'un sol standard contaminé avec de l'acide borique (500 mg.kg^{-1}) est également testé.

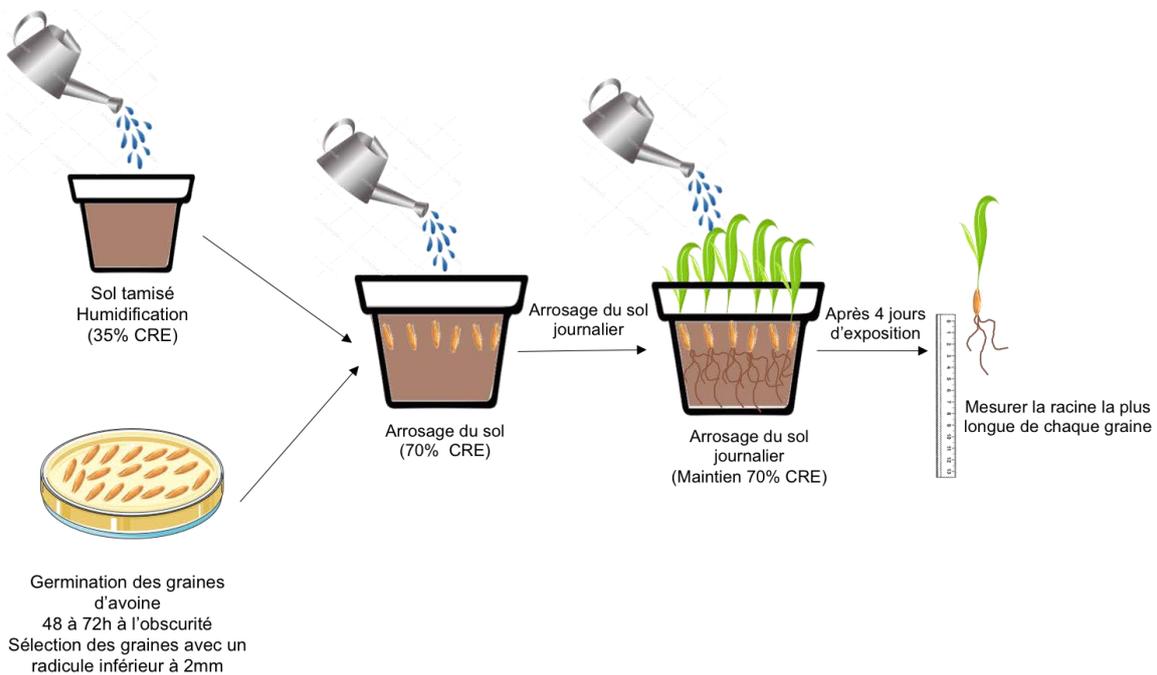


Figure 21 : Principales étapes de réalisation du test « Inhibition de la croissance racinaire » (ISO 11269-1)

2.2.4.2. Test « Émergence – Croissance », ISO 11269-2

Ce deuxième essai intitulé « Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance de végétaux supérieurs » a pour objectif d'évaluer la qualité d'un sol sur les premiers stades de croissance de végétaux terrestres. Ce test est réalisé sur deux espèces végétales, une monocotylédone : l'avoine (*Avena sativa* L.) et une dicotylédone : la navette (*Brassica rapa oleifera*). Dix graines de chacune des deux espèces végétales sont directement exposées aux sols d'essai ou aux sols témoins (témoin négatif : sol standard, témoin positif : sol standard contaminé avec 1g.kg^{-1} d'acide borique). Les pots sont ensuite placés dans une enceinte phytotronique (Fitoclima S600, Aralab), dans des conditions contrôlées (70 % d'humidité, 23°C , photopériode de 16h / 8h à une intensité lumineuse de 7140 lux). Après 50 % d'émergence dans les témoins négatifs (soit 4 jours pour l'avoine et 5 jours pour la navette), le nombre de plantules dans chaque pot est réduit à 5 et l'essai est continué pendant 17 jours supplémentaires. Les sols sont arrosés quotidiennement afin de maintenir leur humidité constante à 70 % de leur CRE, avec de l'eau distillée, excepté pour la navette où l'eau distillée est remplacée, à partir du 5^{ème} jour d'exposition, par une solution fertilisante composée de 220 mg.L^{-1} de potassium, 150 mg.L^{-1} d'azote, 60 mg.L^{-1} de potassium, $30,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de phosphore, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de manganèse, $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de bore, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinc, $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de molybdène, $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobalt et $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de cuivre, diluée au 1/1000 comme préconisé dans la norme.

Au terme de l'essai, les critères d'effet mesurés sont l'émergence des plantules, la masse sèche des parties aériennes des végétaux ainsi que l'évaluation des effets nocifs visibles sur les parties aériennes de la plante (chlorose, nécrose) (Figure 22).

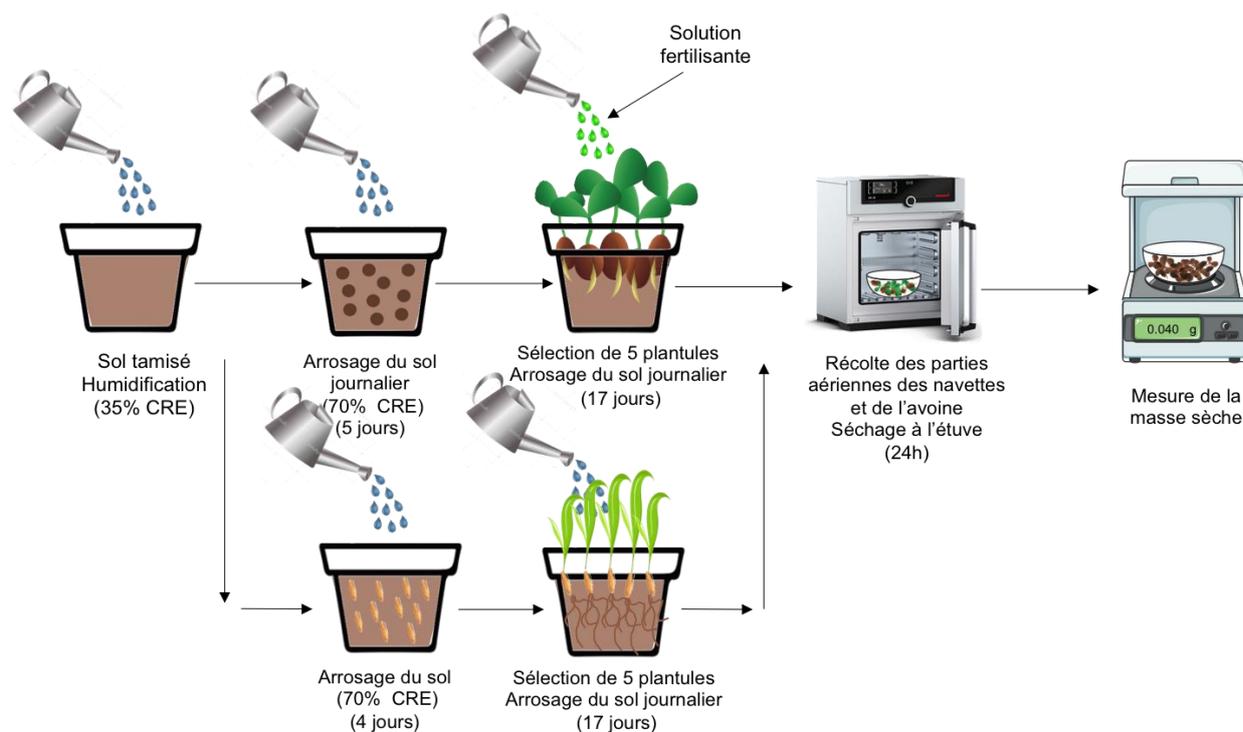


Figure 22 : Principales étapes de réalisation du test " Émergence - croissance"

2.2.4.3. Test « *Vicia faba micronoyaux* », ISO 29200

Le test « Essai de micronoyaux sur *Vicia faba* » (AFNOR, 2013b) est un test de génotoxicité. Il permet de mettre en évidence des effets à court terme tels qu'une altération du génome, qui peut impacter les générations futures. Son principe consiste à évaluer *in vivo* le taux de micronoyaux dans les cellules racinaires de fèves (*Vicia faba*) qui résultent d'une cassure chromosomique ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique. La fréquence des micronoyaux dans les matrices d'essai est comparée à celle des matrices témoins. Ce test est réalisé à la fois en phase solide, en exposant les graines directement aux différents sols après germination pendant 5 jours, et à la fois en phase liquide, en mettant en contact les racines de fèves avec les lixiviats de sol obtenus avec de l'eau distillée (rapport de 2 L d'eau pour un kg de sol) conformément à la norme NF EN ISO 21268-1 (AFNOR, 2019). Le mode d'exposition en phase liquide nécessite une étape supplémentaire qui est la germination des racines secondaires dans du milieu d'Hoagland (5 mmol.L⁻¹ KNO₃, 5 mmol.L⁻¹ Ca(NO₃)₂ 4H₂O, 5 mmol.L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, 1 mmol.L⁻¹ KH₂PO₄ et 9 μmol.L⁻¹ de tartrate de fer) pendant 4 jours avant exposition aux lixiviats pendant 48h. Les témoins négatifs utilisés sont un sol standard pour la phase solide et le milieu d'Hoagland pour la phase liquide alors que les témoins positifs sont la même matrice respective contaminée avec 1,12 mg.L⁻¹ d'hydrazide maléique.

En phase liquide comme en phase solide, les essais se déroulent dans une enceinte phytotronique à 24°C, 70% d'humidité et une photopériode de 16h/8h à une intensité lumineuse de 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ excepté pour les témoins positifs contenant l'hydrazide maléique qui sont préparés et exposés à l'abri de la lumière.

Les principales étapes de la réalisation de l'essai sont schématisées pour le mode d'exposition solide (Figure 23) ainsi que pour le mode d'exposition liquide (Figure 24).

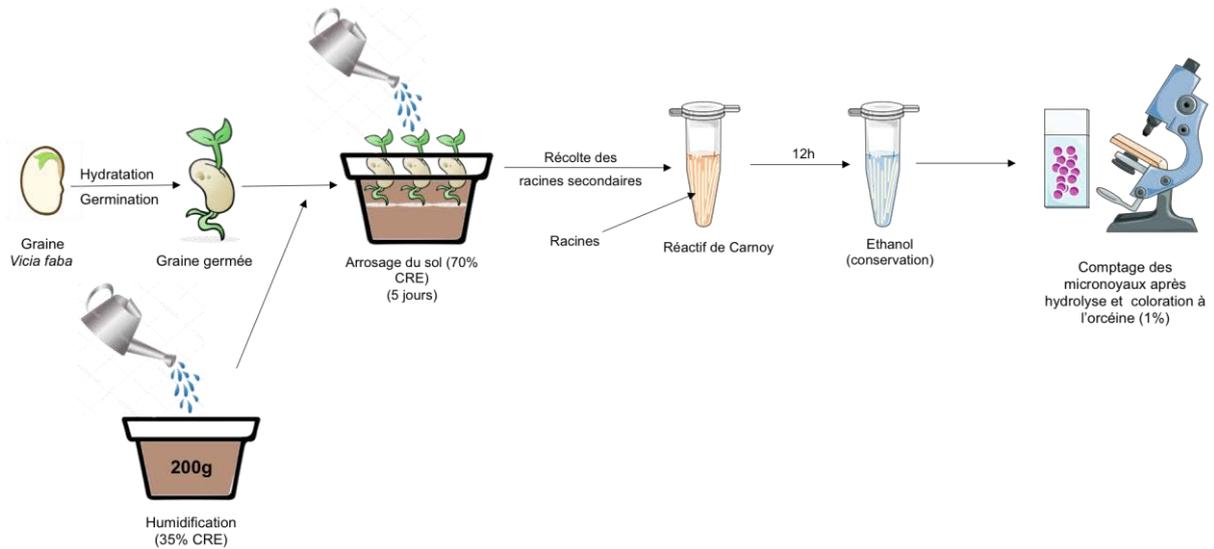


Figure 23 : Principales étapes de la réalisation du test *Vicia faba* micronoyaux en phase solide

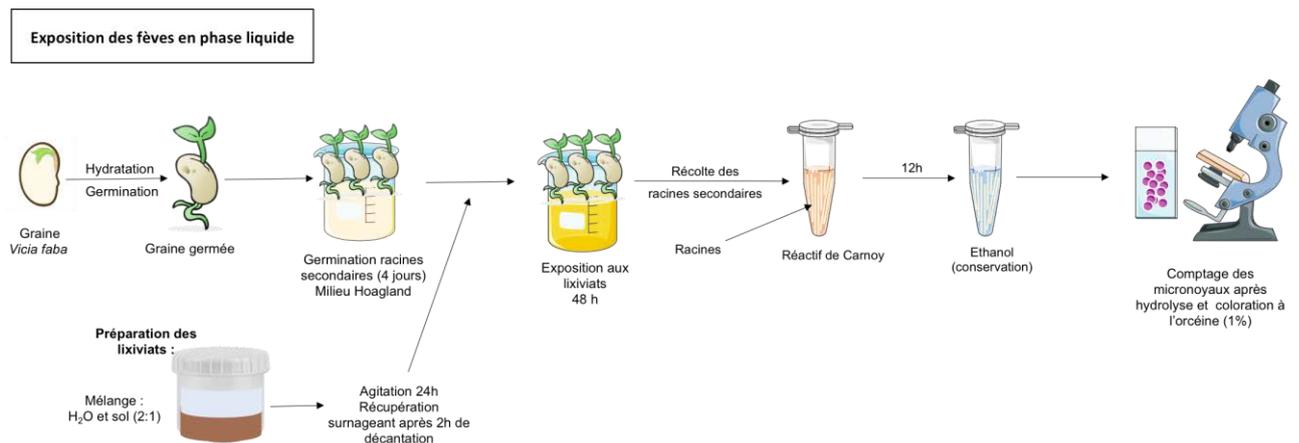


Figure 24 : Principales étapes de réalisation du test *Vicia faba* micronoyaux en phase liquide

2.2.5. Paramètres suivis chez MxG

2.2.5.1. Suivi du développement de MxG

- **Hauteur**

Afin de suivre la croissance des plants de MxG dans les différentes conditions de culture, leur hauteur, à la pointe de la plus longue feuille, a été mesurée chaque mois.

- **Teneur en chlorophylle**

La teneur en chlorophylle des feuilles a également été mesurée à ce même pas de temps, sur les 3 dernières feuilles (n=3) dans le but de suivre l'état de la plante. En effet, la teneur en chlorophylle est un indicateur physiologique de la plante pouvant mettre en évidence une carence en éléments nutritifs tels que l'azote, le magnésium, le zinc ou le fer (Jones, 2012a). Cet indicateur a été mesuré par une mesure directe et non destructive en utilisant un « chlorophyll meter » (SPAD-502 Plus, KONICA MINOLTA). Cet appareil mesure deux valeurs d'absorbance dans les régions rouge et proche infrarouge, avec lesquelles il calcule une valeur numérique en unité arbitraire (unité SPAD) pouvant aller jusqu'à 199,9 et qui est proportionnelle à la quantité de chlorophylle présente dans la feuille. Trois mesures par pot ont été réalisées.

- **Taux de floraison**

A la fin de l'expérimentation, le taux de floraison de MxG est calculé avec la formule suivante :

$$\text{Taux de floraison (\%)} = \frac{\text{Nombre de tiges fleuries}}{\text{Nombres de tiges totales}} \times 100$$

- **Biomasse**

La biomasse produite à TF est également mesurée après avoir séparé les tiges, les feuilles et les fleurs. Les résultats sont exprimés en gramme de matière sèche après avoir retiré le pourcentage d'humidité des végétaux mesuré après séchage des végétaux 24 h dans une étuve à 80°C.

2.2.5.2. Teneurs en ETM

Les concentrations en ETM dans les différentes parties de MxG (racines, rhizomes, tiges et feuilles) ont été mesurées à TF afin de déterminer le comportement de la plante quant à l'accumulation de ces éléments dans ses tissus et de comparer ces teneurs entre les végétaux s'étant développés sur le technosol contaminé par rapport aux végétaux s'étant développés sur un sol standard non contaminé.

A la fin de l'expérimentation, les végétaux ont été sacrifiés et leurs différentes parties ont été séparées, rincées à l'eau du robinet afin d'enlever les particules de sol puis rincées à l'eau distillée. Elles ont ensuite été séchées sur paillasse et broyées à 1 mm en utilisant un broyeur à végétaux (MF 10 basic, IKA WERKE). Les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse.

Les concentrations en ETM dans les végétaux ont été mesurées avec une prise d'essai de 0,5 g de végétaux (n=3) mis en solution dans un mélange de 5 mL d'acide nitrique (HNO₃ à 65 %) et 3 mL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 30 %). L'extraction a été réalisée au micro-ondes (MARSXpress, CEM). Pour cela, la température du mélange a été portée à 170°C en 5 min et maintenu à cette température pendant 13 min. Après refroidissement, les échantillons ont été filtrés et dilués à 25 mL avec de l'eau distillée. Les concentrations en ETM ont été mesurées en utilisant un ICP-OES (ICAP GUO 6000, ThermoFisher).

La répétabilité des résultats a été vérifiée en utilisant standard de plante interne au laboratoire (n=3) pour chaque analyse.

Le pourcentage d'humidité des échantillons de végétaux a également été mesuré afin d'exprimer les résultats en mg.kg⁻¹ de matière sèche.

2.2.5.3. Teneurs en HAP

Les concentrations en HAP dans les différentes parties de MxG ont été déterminées selon la même méthode que celle utilisée pour les sols (cf. paragraphe 2.2.2 Dosage des HAP) en réduisant la prise d'essai à 5 g d'échantillon végétal.

2.2.5.4. Combustion

Afin de déterminer si le développement de MxG dans le technosol est compatible avec une valorisation de sa biomasse par combustion, des échantillons de tiges de MxG ont été envoyés au laboratoire SOCOR accrédité COFRAC pour l'analyse de leur combustion. Deux échantillons par condition (MxG dans le sol standard, MxG dans le technosol et MxG en co-culture dans le technosol) ont été analysés. Les paramètres suivants ont été mesurés : le taux de cendres après calcination à 815°C, les teneurs en carbone et hydrogène total, le pouvoir calorifique supérieur (PCS), le pouvoir calorifique inférieur (PCI), les teneurs en phosphore et potassium, les concentrations en ETM (Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, As) ainsi que les concentrations en silicium.

Ces paramètres permettent de déterminer la qualité de la biomasse utilisée qui influence la qualité de la combustion. En effet, un problème inhérent à la combustion de la biomasse provient des cendres générées par le processus pouvant générer des problèmes d'encrassement de chaudières ou de scories. La génération de cendres est conditionnée non

seulement pas par la quantité mais par la qualité de la biomasse (Garcia-Maraver et al., 2017). Ainsi, les paramètres suivants sont généralement calculés :

- **Le taux de dioxyde de silicium (SiO₂)**

La silice est l'élément prédominant dans les échantillons de scories provenant de combustibles issus de biomasse végétale. Puisqu'il existe une bonne corrélation entre la teneur en silice dans les cendres et la fraction de cendres combustibles qui forme des scories dans les brûleurs, la teneur en silice de la biomasse peut être utilisée comme indicateur de scories (Garcia-Maraver et al., 2017).

Ainsi, pour un pourcentage de dioxyde de silicium (SiO₂) inférieur à 20 %, la tendance à l'encrassement et à la scorification peut être catégorisée comme faible, lorsque ce pourcentage est compris entre 20 et 25 % la tendance est catégorisée comme moyenne et lorsque le pourcentage de SiO₂ est supérieur à 25 %, la tendance est catégorisée comme élevée (Garcia-Maraver et al., 2017).

- **Ratio B/A (Basic to acidic compounds ratio)**

Le rapport des composés basiques aux composés acides (B/A) est un indice utilisé pour prédire le comportement de dépôt des cendres. Il est calculé en utilisant la formule suivante :

$$B/A = \frac{Fe_2O_3 + CaO + MgO + Na_2O + K_2O + P_2O_5}{SiO_2 + Al_2O_3 + TiO_2}$$

Ainsi, pour un ratio B/A inférieur à 0,5, la tendance à l'encrassement et à la scorification peut être catégorisée comme faible, lorsque ce ratio est compris entre 0,5 et 1, la tendance est catégorisée comme moyenne et lorsque le ratio est compris entre 1 et 1,75, la tendance est catégorisée comme élevée (Garcia-Maraver et al., 2017).

2.2.6. Paramètres suivis chez le trèfle

Plusieurs paramètres ont été suivis chez le trèfle. Tous les mois, la teneur en chlorophylle des feuilles de trèfle a été mesurée en utilisant également le « chlorophyll meter ». Neuf mesures de chlorophylle par pot ont été réalisés de façon aléatoire.

A la fin de l'expérimentation, le pourcentage de couverture du pot par le trèfle a été estimé et sa biomasse aérienne a été déterminée et exprimée en gramme de matière sèche après séchage à l'étuve.

2.2.7. Analyses de la microflore des sols

2.2.7.1. Extraction ADN des sols

Afin d'étudier la densité et la diversité de la microflore des sols, il est tout d'abord nécessaire d'extraire l'ADN des sols. L'extraction a été effectuée à T0 ainsi qu'à TF selon le protocole Martin-Laurent et al. (2001) modifié par Petric et al. (2011) et par Mazziotti et al. (2018).

Pour cela, 300 à 350 mg de sol tamisé à 2 mm ont été broyés (Disruptor Genie, Scientific Industries) pendant 5 min dans des tubes de 2 mL en présence de billes de verre (300 mg de billes de 106 µm de diamètre et de 2 billes d'un diamètre de 2 mm, SIGMA-ALDRICH) et de 800 µL de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % w/v SDS). Les échantillons ont ensuite été incubés à 70°C pendant 30 min avec une agitation au vortex toutes les 10 min pour remettre le sol en suspension. Les tubes ont ensuite été centrifugés (5 min, 14 000 x g) afin d'éliminer le sol et les débris cellulaires se trouvant dans le culot. Après avoir récupéré le surnageant, 1/10^e du volume d'acétate de potassium 3M pH 5,5 a été ajouté, permettant la précipitation des protéines après 10 min d'incubation dans la glace. Les tubes ont ensuite été centrifugés (10 min, 14 000 x g à 4°C) afin d'éliminer les protéines précipitées se retrouvant dans le culot. Le surnageant a été récupéré et 1 volume d'isopropanol stocké à -20°C a été ajouté dans le but de précipiter l'ADN après une incubation de 30 min à -20°C. Le surnageant a été éliminé à l'issue d'une nouvelle centrifugation (10 min, 14 000 x g à 4°C). Le culot contenant l'ADN a été lavé avec 200 µL d'éthanol 70 % stocké à -20°C. Après centrifugation (5 min, 14 000 x g à 4°C), l'éthanol contenu dans le surnageant a été éliminé et le culot a été mis à sécher sous sorbonne pendant 15 minutes environ. Le culot a ensuite été mis en suspension dans 100 µL d'eau ultra pure.

L'ADN extrait a ensuite été purifié sur des colonnes de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et sur des colonnes de sépharose 4B. Pour cela, des colonnes (Micro Bio-Spin, Bio-Rad) placées dans des tubes de 2 mL et remplies de PVPP ont été conditionnées après ajout de 400 µL d'eau ultra pure et centrifugation (2 min, 1 000 x g à 10°C). Après les avoir vidées, cette dernière opération a été renouvelée une fois puis une centrifugation à vide a été réalisée (4 min, 1 000 x g à 10°C). Les colonnes de sépharose 4B ont également été placées dans des tubes de 2 mL et remplies avec 1 mL de sépharose 4B. Après centrifugation (2 min, 1 100 x g), les colonnes ont été lavées avec 500 µL de tampon Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) puis centrifugées 2 fois (2 min, 1 100 x g) en vidant le tube.

Afin de purifier les ADN extraits, les échantillons ont été placés au centre des colonnes de PVPP et centrifugés (4 min, 6 000 rpm à 10°C). L'ADN a ensuite été récupéré après dépôt de 50 µL d'eau ultra pure et centrifugation (4 min, 1 000 x g à 10°C).

Les échantillons élués dans les tubes ont été récupérés et placés au centre des colonnes de Sépharose 4B. Après 5 min, une centrifugation (4 min, 1 500 x g à 10°C) a permis d'éluier les échantillons d'ADN purifiés.

Les échantillons d'ADN extraits et purifiés ont ensuite été dosés par spectrophotométrie au BioSpec-nano (BioSpec-nano, SHIMADZU) afin de déterminer leur concentration en ADN et déposés sur gel d'Agarose (0,75 g d'agarose, 5 mL de TBE 10X, 45 mL H₂O). Les échantillons d'ADN ont été stockés à -20°C jusqu'à analyses de la densité et de la diversité des microorganismes (bactéries et champignons) du sol.

2.2.7.2. Analyse de la densité microbienne

La densité bactérienne et fongique ainsi que la densité spécifique de bactéries intervenant dans la dégradation des HAP ont été analysées par PCR quantitative (qPCR). Cette technique se base sur le principe de la PCR (« Polymerase Chain Reaction », ou réaction de polymérisation en chaîne), associée à la mesure en continue de la quantité de produits formés (amplicons) grâce à un marqueur fluorescent : le SYBRGreen.

La qPCR permet ainsi de quantifier les amplicons obtenus après chaque étape, le but étant de quantifier un nombre de gènes ciblés initialement présents dans un échantillon.

Le SYBRGreen, agent intercalant de l'ADN ne fluoresce que lorsqu'il s'intercale dans une molécule d'ADN double brin. Il permet de suivre l'augmentation du nombre d'amplicons en mesurant l'augmentation de la fluorescence.

Des qPCR ont été réalisées en utilisant 3 paires d'amorces (Tableau 9). Afin de quantifier la densité bactérienne, les amorces universelles 341F et 534R ont été utilisées pour cibler la région variable V3 du gène de l'ADNr 16S, présent chez les bactéries. Les amorces Fung5F et FF390R ont été choisies pour cibler l'ADNr 18S et les amorces PAH-RHD α GP F et PAH-RHD α GP R ont été choisies pour estimer la densité de bactéries Gram positives dégradantes. Ces amorces ciblent le gène codant pour une dioxygénase, une enzyme généralement impliquée dans la première étape de dégradation en aérobie (Cébron et al., 2008).

Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées en qPCR

Communauté ciblée	Gène	Amorces	Séquence 5' -> 3'	Références
Bactéries	ADNr 16S	341 F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	(Muyzer et al., 1993; López-Gutiérrez et al., 2004)
		534 R	ATT ACC GCG GCT GCT GGC A	
Champignons	ADNr 18S	Fung5 F	GGG AAC CAG GAC TTT TAC	(Smit et al., 1999)
		FF390 R	GAG GTC TCG TTC GTT ATC G	(Vainio and Hantula, 2000)
Bactéries dégradantes Gram +	Gram positif PAH-RHD	PAH-RHD α GP F	CGG CGC CGA CAA YTT TGT NGG	(Cébron et al., 2008)
		PAH-RHD α GP R	GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA	

Il existe également un couple d'amorces pour cibler les bactéries Gram négatif mais aucune amplification n'a été obtenue à partir des différents extraits d'ADN à disposition au laboratoire.

Les qPCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 20 μL comprenant 5 ng d'ADN, du tampon SYBRGreen Supermix 1X (Sso Advanced, Biorad) et 2 μM de chaque amorce.

Les conditions d'amplifications pour le gène de l'ADNr 16S étaient les suivantes : dénaturation initiale de l'ADN par chauffage à 98°C pendant 2 min, suivi de 35 cycles de 3 étapes comprenant une étape de dénaturation à 98°C pendant 5 secondes, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes pendant laquelle les amorces s'hybrident spécifiquement avec leur séquence complémentaire ainsi qu'une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes correspondant à la synthèse d'un nouveau brin d'ADN complémentaire à partir de l'amorce.

A la fin de la qPCR, une courbe de fusion (« melting curve ») a été programmée. Pour cela, une augmentation de la température de 0,5°C de 60 à 98°C toutes les 5 secondes a été réalisée en faisant acquisition de l'intensité de fluorescence du SYBRGreen en continu afin de d'assurer qu'il n'y a qu'un seul produit de qPCR amplifié.

En ce qui concerne l'ADNr 18s, une première étape de dénaturation d'ADN à 98°C pendant 2 min a été effectuée, suivi de 35 cycles de 3 étapes : une dénaturation à 98°C pendant 5 secondes, une hybridation à 50°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes. Une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min a ensuite été effectuée.

Pour finir, une courbe de fusion a été programmée en augmentant la température de 0,5°C de 50 à 98°C toutes les 6 secondes.

Concernant le gène PAH-RHD α GP, les conditions d'amplifications programmées étaient les suivantes : une étape de dénaturation à 98°C pendant 2 min, 40 cycles comprenant 4 étapes : une étape de dénaturation à 98°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à 54°C pendant 30 secondes, une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes ainsi qu'une étape de dissociation des dimères d'amorces à 80°C pendant 10 secondes. Ces étapes ont été suivies d'une élongation finale à 72°C pendant 7 min. Enfin, une courbe de fusion a été réalisée en augmentant la température de 51 à 98°C de 0,5°C toutes les 10 secondes.

Afin de pouvoir déterminer un nombre de copies de gènes par gramme de sol, une gamme étalon est réalisée à partir d'un plasmide linéarisé pour lequel le nombre de copies du gène d'intérêt est connu. Ce plasmide linéarisé a été obtenu par clonage du gène d'intérêt à partir d'un produit PCR (Mazziotti, 2017). Des dilutions en cascade de facteur 10 ont été réalisées à partir d'une solution d'ADN à 1.10^{10} copies. μL^{-1} du gène jusqu'à obtenir une dilution à 1.10^0 copies. μL^{-1} . Les points de gamme ont été déposés sur les plaques qPCR en même temps et dans les mêmes conditions que les échantillons.

Ainsi, à la fin de chaque série de qPCR, une ligne seuil supérieure au bruit de fond est définie automatiquement dans la phase exponentielle d'amplification. La quantification se fait en déterminant le nombre de cycles d'amplifications nécessaires pour croiser la ligne seuil. Ces

cycles appelés Ct (« cycle threshold ») ont été déterminés pour chaque échantillon et ont permis de déduire le nombre initial de copies du gène cible dans les sols *via* des courbes d'étalonnage. Ces courbes ont été réalisées en utilisant les points de gamme dont les nombres de copies de gènes sont connus et en traçant la droite d'étalonnage $Ct = f(\log(\text{quantité de gène}))$.

2.2.7.3. Analyse de la diversité

Dans le but de caractériser les communautés bactériennes et fongiques présentes dans les échantillons d'ADN extraits des sols à T0 et TF, les échantillons ont été envoyés pour séquençage métagénomique en ciblant l'ADNr 18S (champignons) et les régions variables V4 et V5 de l'ADNr 16S (bactéries) dans un laboratoire spécialisé (Genoscreen).

La méthodologie utilisée repose sur 4 étapes. La première consiste à préparer les bibliothèques d'amplicons afin de limiter les biais d'amplification entre échantillons et incluant un contrôle positif de composition connue ainsi qu'un contrôle négatif. La préparation des bibliothèques consiste à fixer des courtes séquences appelées « étiquettes » à l'extrémité des fragments afin de définir leur origine lors du séquençage simultané de plusieurs échantillons.

Une fois cette première étape terminée, le séquençage des bibliothèques d'amplicons est réalisé sur un « run » unique dans un séquenceur (Illumina MiSeq) en chimie 2x250 bases. La troisième étape consiste à trier les séquences par échantillons et de réassembler les lectures permettant d'obtenir des lectures d'ADNr 16S et 18S pleine longueur. Enfin, l'affiliation taxonomique des séquences d'ADNr 16S et 18S est réalisée par comparaison aux bases de données. L'indice de diversité de Shannon est ensuite calculé pour chaque condition de culture.

L'indice de Shannon reflète le nombre d'OTU (Unité Taxonomique Opérationnelle) retrouvées dans la communauté bactérienne ou fongique du sol, tout en prenant en compte la fréquence de ces entités. Il est calculé en utilisant la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

ou:
 H = est l'index de Shannon
 Pi = proportion dans la population représentée par OTU i
 S= nombre total d'OTUs dans l'échantillon

3. Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation

3.1. Isolement des microorganismes

Pour cette partie, le choix a été fait de se concentrer sur l'amélioration de la dissipation des HAP et notamment du benzo(a)pyrène (BaP) qui est le polluant organique dépassant le plus les valeurs maximales du fond pédogéochimique naturel local pour le sol du site hôte ainsi que pour les sédiments. Ce HAP est, de plus, classé comme CMR et présente un danger pour la santé humaine et l'environnement.

Des microorganismes capables de se développer sur des milieux pauvres ne contenant pas de source de carbone et enrichis avec de fortes concentrations en BaP dans le but de sélectionner des microorganismes capables de dégrader ce polluant ont été sélectionnés.

Pour cela, du technosol a été prélevé sur le site d'étude, séché à l'air et tamisé à 2 mm. Une dilution du technosol au 1/10^{ème} a été réalisée dans de l'eau physiologique (0,85 % NaCl). Après mélange au vortex et sédimentation du technosol, le surnageant a été utilisé pour faire des dilutions en cascades successives de facteur 10. Ces dilutions ont été utilisées pour réaliser des étalements sur boîte de Pétri, sur un milieu Bushnell-Haas (BH) (Bushnell Haas Broth, Sigma-Aldrich). Ce milieu ne contient pas de source de carbone, qui est apportée par l'ajout de BaP à une concentration de 50 mg.L⁻¹. Le BaP est préalablement dissous dans de l'acétone dans une solution stock de 1g.L⁻¹. Les boîtes de Pétri ont été incubées dans une étuve à 30°C à l'obscurité jusqu'au développement de colonies.

Chaque colonie obtenue a ensuite été repiquée sur une nouvelle boîte de Pétri contenant le même milieu de culture (BH + BaP) et ce jusqu'à l'obtention de colonies identiques dans chaque boîte de Pétri.

Les colonies isolées sur milieu solide ont ensuite été ensemencées en milieu liquide (30 mL) en utilisant ce même milieu (BH) dans lequel 50 mg.L⁻¹ de BaP a été ajouté. Afin de dissoudre le BaP dans le milieu de culture liquide afin qu'il ne forme pas de précipités, le milieu de culture contenant le HAP a d'abord été chauffé à 70°C au bain marie pendant 1 h puis immergé dans un bain de sonication pendant 1 h. Les microorganismes sont ajoutés 72 h plus tard, le temps que l'acétone s'évapore et de s'assurer que le BaP ne précipite pas.

Les microorganismes ayant induit un changement de couleur du milieu de culture ont été sélectionnés pour la suite de l'expérimentation puisqu'une brunification du milieu de culture est caractéristique de l'apparition de métabolites de HAP et donc de la présence de microorganismes dégradants (Joner et al., 2002).

3.2. Suivi de la croissance bactérienne dissipation du benzo(a)pyrène dans le milieu de culture

Afin de suivre la croissance et la dissipation du BaP dans le milieu de culture, des erlenmeyers contenant 450 mL de milieu BH contaminés avec 25 mg.L⁻¹ de BaP ont été préparés. Les microorganismes sélectionnés ont étéensemencés et incubés à 30°C pendant 20 semaines dans 3 erlenmeyers (n=3) et une condition témoin sans microorganisme a également été réalisée.

La croissance des microorganismes a été suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm chaque semaine. Le suivi de la dissipation du BaP a également été déterminée par mesure spectrophotométrique en faisant la différence de la valeur d'absorbance obtenue à 405 nm avec celle obtenue à 620 nm. Cette mesure permet de suivre l'apparition de métabolites de HAP *via* un jaunissement ou un brunissement du milieu de culture (Binet et al., 2000; Joner et al., 2002).

La concentration en BaP dans les milieux de culture a également été suivie au cours du temps par dosage HPLC. Pour cela, 5 mL de milieu de culture ont été prélevés et mélangés à 5 mL de dichlorométhane. Après mélange pendant 30 min, la phase organique contenant le BaP a été prélevée et injectée directement dans l'HPLC pour dosage.

L'évaporation a été compensée toutes les 3 semaines environ et avant chaque prélèvement servant aux dosages en HPLC, par l'ajout de milieu BH stérile.

3.3. Identification des microorganismes

L'identification des microorganismes sélectionnés a été réalisée par des techniques microbiologiques traditionnelles, c'est-à-dire par description macroscopique de la colonie sur boîte de Pétri ainsi que par sa description au microscope après coloration de Gram qui permet de distinguer les bactéries Gram positif des bactéries Gram négatif à partir d'une colonie (77730 Gram Staining kit, Sigma-Aldrich). Une description morphologique des bactéries ainsi que leur mode de regroupement ont été déterminés au microscope.

Afin d'obtenir une identification précise, l'ADN des microorganismes a été extrait en utilisant le kit « DNeasy Blood and Tissue Kit » (QIAGEN). Une PCR ciblant l'ADNr 16S a été réalisée afin de vérifier s'il s'agissait bien de bactéries. La réaction de PCR a été effectuée dans un volume de 25 µL contenant 5 ng d'ADN, 1X de tampon MgCl₂ (EUROMEDEX), 0,2 mM de dNTP (EUROMEDEX), 1 U de taq polymérase (EUROMEDEX) et 4 µM de chaque amorce (341 F et 534 R).

La réaction de PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : un cycle de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 30 cycles composées de 3 étapes : une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes ainsi qu'une

étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. Une étape d'élongation finale a été programmée à 72°C pendant 5 min.

Après amplification par PCR, les échantillons ont été déposés sur gel d'Agarose (1,5 %). Après une migration d'une trentaine de minutes, le gel a été observé avec après exposition aux UV dans un système dédié (ChemiDoc XRS+, BIO RAD) en utilisant le logiciel ImageLab.

Une PCR a également été réalisée sur un échantillon d'ADN extrait du microorganisme en utilisant les amorces ciblant le gène PAH-RHD α , intervenant dans la dégradation des HAP afin de déterminer si le microorganisme possède ce gène. Pour cela, le même protocole que pour l'ADNr 16S a été utilisé en remplaçant le programme PCR par le suivant : un cycle de 5 minutes à 95°C, 40 cycles de 3 étapes comprenant une étape à 95°C pendant 30 secondes, une à 54°C pendant 30 secondes et une à 72°C pendant 1 min ; suivie d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Les échantillons d'ADN ont ensuite été envoyés à Genoscreen pour l'identification de l'espèce par séquençage. La première étape a consisté à amplifier une région de l'ADNr 16S contenant des régions variables spécifiques de genres ou d'espèces (régions V1- V2 – V3 – V4 – V5). A la suite de l'amplification, le séquençage des 2 brins d'ADN du produit obtenu a été réalisé. Les séquences ont ensuite été assemblées à l'aide d'un logiciel (Sequencher commercialisé par Gene Codes Corporation) et ont ensuite été comparées à différentes bases de données (NCBI et Nucleotide collection) afin de déterminer l'espèce bactérienne en fonction du pourcentage d'homologie trouvé.

3.4. Mise en place de l'expérimentation

3.4.1. Production de microorganismes

Avant de mettre en place l'expérimentation de phytoremédiation assistée par bioaugmentation, une production en masse de bactéries sélectionnées (cf. paragraphe 3.1) a été réalisée. Pour cela, les bactéries ont été mises en culture dans 7,7 L (répartis en 11 erlenmeyers de 1 L) d'un milieu liquide nutritif riche, le milieu Luria-Bertani (LB) (composé de 10 g.L⁻¹ de peptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levures et de 10 g.L⁻¹ de NaCl) agrémenté de 25 mg.L⁻¹ de benzo(a)pyrène afin de permettre une croissance rapide des bactéries tout en conservant une pression de sélection. Les erlenmeyers ont été incubés dans un incubateur à 30°C avec une agitation de 125 rpm pendant 7 jours.

A la fin de la culture, l'absorbance a été mesurée à 620 nm, après 10 secondes de sonication afin de dissocier les pelotes formées par les bactéries, dans le but d'estimer la concentration bactérienne grâce à une gamme étalon ($Abs(620\text{ nm})=f(UFC)$).

Les cultures ont été réparties dans des tubes à centrifuger de 50 mL et ont été centrifugées à 5 500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant contenant le milieu de culture a été éliminé et

le culot a été repris dans de l'eau physiologique. Trois autres rinçages à l'eau physiologique ont été effectués afin d'éliminer tout le milieu de culture ainsi que le BaP.

Toutes les solutions bactériennes ont ensuite été regroupées et diluées dans de l'eau physiologique pour atteindre un volume de 1100 mL permettant d'inoculer 100 mL de solution bactérienne par pot. Un millilitre de cette suspension a été utilisé pour mesurer l'absorbance à 620 nm ainsi que le comptage UFC afin d'estimer le nombre de bactéries inoculées par gramme de sol.

3.4.2. Lancement de l'expérimentation de phytoremédiation assistée par bioaugmentation

Dans cette expérimentation, tous les pots (14 cm de diamètre et 11 cm de haut) ont été remplis avec 1 kg de technosol préalablement récupéré sur site, séché sur paillasse et tamisé à 2 mm. Six modalités ont été testées pour déterminer si la phytoremédiation assistée par bioaugmentation pourrait améliorer la dissipation des HAP et la biomasse de MxG. Nous avons testé à la fois MxG pour la partie phytoremédiation et l'association MxG + trèfle. Les différentes modalités testées sont les suivantes : non planté, bioaugmentation, MxG, MxG + bioaugmentation, co-culture MxG-trèfle et co-culture + bioaugmentation (Figure 25). Trois réplicas ont été réalisés pour ces différentes modalités.

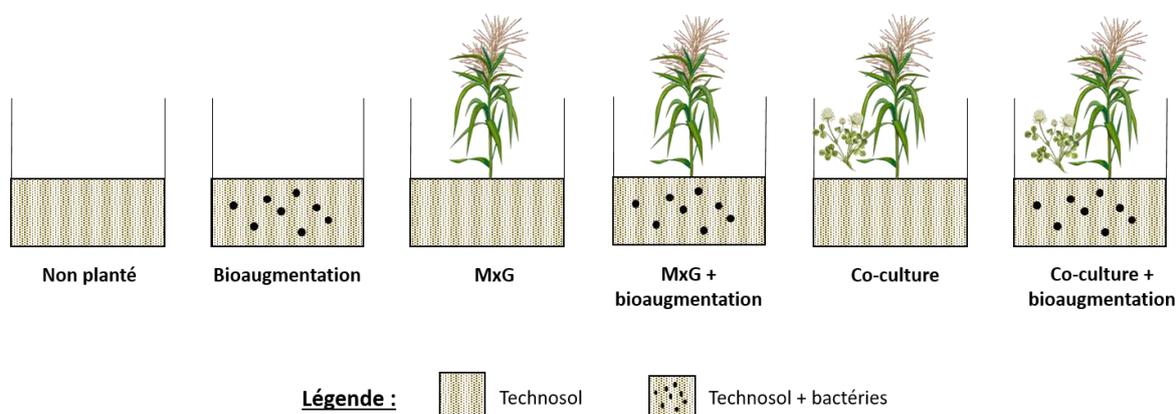


Figure 25 : Présentation des différentes modalités testées dans l'expérimentation « Phytoremédiation assistée par bioaugmentation »

Comme dans l'expérimentation précédente, un rhizome calibré de MxG par pot a été planté après s'être assuré de sa viabilité suite à l'émergence de sa tige dans du sable de quartz (cf. paragraphe 2.1.1) et/ ou 72 mg de graines de trèfle blanc, correspondant à une densité de 5 kg/ha.

Pour les conditions « bioaugmentation », 100 mL de solution bactérienne ont été inoculés, ce qui représente environ une densité de 2.10^7 bactéries par gramme de sol.

Le jour de plantation des végétaux et de l'ajout des bactéries est considéré comme le premier jour de l'expérimentation (T0). Les différents pots ont ensuite été placés dans la chambre phytotronique (Fitoclima 10000 EHFF, aralab) à 22°C, 70 % d'humidité et une photopériode jour/nuit de 16h/8h à 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant 148 jours.

Un arrosage automatique a été mis en place permettant une irrigation journalière des sols afin de maintenir leur capacité de rétention en eau à 60 % de leur capacité de rétention en eau maximale (Annexe 1 de la norme NF EN ISO 11268-1 (AFNOR, 2015b)).

3.5. Analyses

Plusieurs paramètres ont été analysés dans l'expérimentation « Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation » sur le technosol, les végétaux et les microorganismes du sol (bactéries et champignons) (Figure 26).

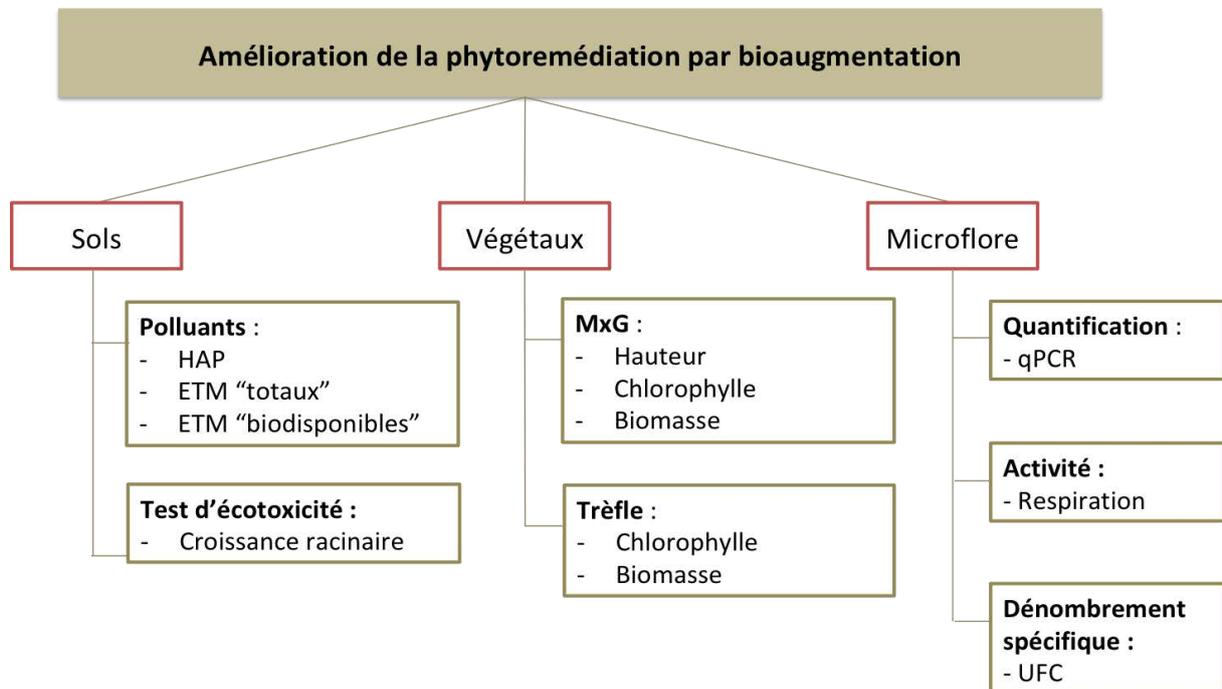


Figure 26 : Paramètres étudiés dans l'expérimentation "Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation"

Ces analyses ont été effectuées avant la plantation des végétaux et l'inoculation des bactéries (T0) et à la fin de l'expérimentation (TF), soit au bout de 148 jours (5 mois environ). En ce qui concerne le suivi des végétaux, les teneurs en chlorophylle dans les feuilles de MxG et de trèfle blanc ont été suivies tous les mois, ainsi que la hauteur de MxG. La biomasse respective des deux espèces végétales a été déterminée à TF.

Afin d'évaluer l'influence de la phytoremédiation, de la bioaugmentation ou de la combinaison de ces deux techniques, les teneurs en polluants dans le technosol ont été mesurées et le test d'écotoxicité « Inhibition de la croissance racinaire » a été réalisé, à T0 et à TF.

L'influence des végétaux et de l'ajout de bactéries dans le technosol a également été analysée par étude de la microflore (bactéries et champignons) en déterminant la quantité de gènes de bactéries, de champignons et de bactéries intervenant plus spécifiquement dans la dégradation des HAP. L'activité des microorganismes a été mesurée par la respiration du sol et le suivi de la population microbienne résistante voire ayant la capacité de dégrader le BaP a été réalisé en dénombrant le nombre de colonies pouvant se développer sur un milieu BH + BaP.

3.5.1. Analyses réalisées sur les sols

Comme dans l'expérimentation « Amélioration de la phytoremédiation par co-culture », les contaminants (HAP, ETM « totaux » et ETM « biodisponibles ») ont été dosés à T0 et à TF selon les mêmes modes opératoires (cf. paragraphes 2.2.5.3 et 2.2.5.2).

Le teste d'écotoxicité « Inhibition de la croissance racinaire » a été réalisé en suivant le même mode opératoire que pour la première expérimentation (cf. paragraphe 2.2.4.1). Ce test a été sélectionné car il s'est avéré être le mieux répondant lors de la première expérimentation.

3.5.2. Analyses réalisées sur les végétaux

Les mêmes paramètres ont été suivis chez les végétaux excepté les teneurs en ETM et HAP et les paramètres liés à la combustion puisque les plants de MxG ont été sacrifiés avant d'atteindre la sénescence (cf. paragraphes 2.2.5 et 2.2.6).

3.5.3. Analyses réalisées sur la microflore

Afin de suivre la densité des microorganismes du sol (bactéries, champignon et bactéries dégradantes), des qPCR ont été réalisées à T0 et à TF après extraction d'ADN (cf. paragraphes 2.2.7.1 et 2.2.7.3).

Deux nouveaux paramètres ont été étudiés afin de suivre les changements de la microflore engendrés par la présence de végétaux et/ou par l'ajout de bactéries sélectionnées. Il s'agit de la respiration microbienne du sol et le dénombrement d'unité formant colonies (UFC) résistantes voire dégradant le BaP.

3.5.3.1. Respiration microbienne du sol

La respiration microbienne du sol est le résultat de la minéralisation de substances organiques qui sont oxydées en dioxyde de carbone et eau. Elle est mesurée en quantifiant la production de CO₂ (ou la consommation d'O₂) qui est un indicateur de l'activité globale des microorganismes du sol et de la qualité d'un sol (Bispo et al., 2009) pouvant être utilisé pour quantifier les activités des communautés microbiennes du sol (Creamer et al., 2014). C'est également un indicateur clé pour mesurer les changements dans la qualité d'un sol (Creamer et al., 2014). La respiration microbienne des technosol a été mesurée à T0 et à TF afin de suivre l'évolution de la qualité du technosol en fonction des conditions (présence de végétaux, MxG et/ou trèfle blanc, et/ou l'ajout de bactéries sélectionnées) mais également pour suivre la survie des microorganismes inoculés puisque l'ajout de bactéries dans un sol peut conduire à une augmentation de la respiration comparée aux sols non inoculés (Pacwa-Płociniczak et al., 2019). La respiration microbienne peut également être utilisée comme indicateur de la dégradation des hydrocarbures puisqu'il a été montré une corrélation entre l'augmentation de l'activité du sol et la dissipation des hydrocarbures (Mancera-López et al., 2008).

La respiration microbienne du sol a été suivie à T0 et à TF pour chaque condition en utilisant une méthode modifiée du protocole « détermination de la production de CO₂ par titrage » de la norme NF EN ISO 16072 (AFNOR, 2011).

Pour ce faire, 20 g de sol ont été incubés dans un bocal fermé hermétiquement et le CO₂ produit a été absorbé dans 20 mL de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 0,05 mol.L⁻¹). Après incubation des bocaux à l'obscurité et à 22°C pour des durées variables allant de 24 h à 21 jours en fonction des temps identifiés dans la cinétique, le titrage de l'hydroxyde de sodium non consommé a été réalisé avec de l'acide chlorhydrique (HCl 0,1 mol.L⁻¹) afin de calculer la quantité de CO₂ produit. En effet, le CO₂ absorbé dans l'hydroxyde de sodium précipite sous forme de carbonate de baryum lors de l'ajout de 2 mL de chlorure de baryum (BaCl₂, 0,5 mol.L⁻¹) et la quantité de d'hydroxyde de sodium non consommée permet de déterminer le taux de production de CO₂ grâce à l'équation suivante :

$$R_{CO_2} = \frac{2,2 (V_b - V_p)}{m_{sm} \times w_{sd}}$$

- R_{CO_2} est le taux de production du CO₂ sur la base de la masse sèche de sol (mg de CO₂·g⁻¹·h⁻¹)
- V_b est le volume moyen de HCl consommé dans le contrôle, en millilitres
- V_p est le volume moyen de HCl consommé dans l'échantillon pour essai, en millilitres
- m_{sm} est la masse de l'échantillon de sol brut, en grammes
- 2,2 est un facteur (1 ml de HCl à 0,1 mol·l⁻¹ correspond à 2,2 mg de CO₂ par jour)
- w_{sd} est la fraction de masse sèche du sol brut.

Les différentes étapes de mesure de la respiration microbienne du sol sont schématisées dans la Figure 27.

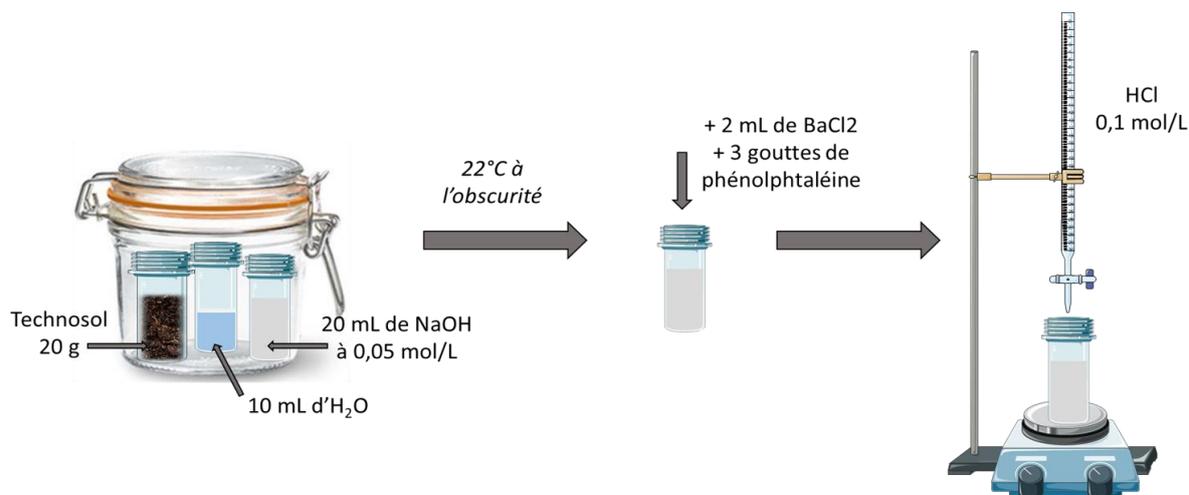


Figure 27 : Représentation schématique du protocole de mesure de la respiration microbienne du sol

Une fois le titrage réalisé, la soude est renouvelée et les bocaux sont de nouveaux incubés jusqu'à la prochaine mesure. Les différents points de prélèvements ont été choisis conformément à la norme AFNOR FD U44-163 : 1 jour, 3 jours, 7 jours, 14 jours, 21 jours, 28 jours, 49 jours et 70 jours.

3.5.3.2. Dénombrement des Unités Formants Colonies résistantes / capables de dégrader le BaP

Afin de suivre la population de microorganismes endémiques pouvant résister au BaP et potentiellement capables de le dégrader, comprenant les microorganismes ajoutés pour la bioaugmentation, des prélèvements de technosol de chaque pot ont été effectués tous les mois. Des dilutions en cascades de facteur 10 ont été réalisées et 100 µL des dilutions ont étéensemencées sur boîte de Pétri contenant du milieu BH (ne contenant pas de source de carbone) + 25 mg.L⁻¹ de BaP. Après une semaine d'incubation à 30°C, les colonies ont été dénombrées sur chacune des boîtes et le nombre d'unité formant colonies (UFC) par gramme de sol a été déterminé.

4. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (v 3.5.2) en choisissant un seuil de significativité de 0,05. Les résultats sont présentés en tant que moyenne de l'ensemble des répétitions (réplicas) \pm l'écart-type.

La comparaison de deux modalités entre elles a été déterminé par un test t pour échantillons indépendants alors que la comparaison entre 3 modalités ou plus ont été réalisés en utilisant un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey HSD, après vérification des conditions d'application. Lorsque les conditions d'application des tests paramétriques ne sont pas respectées, des tests non paramétriques sont utilisés (Kruskall-Wallis suivi d'un test de Nemenyi pour plus de deux groupes ; ou pour la comparaison de deux groupes : un test t de Welch si la normalité est respectée mais pas l'égalité des variances ou un test Wilcoxon si aucune des conditions n'est respectée).

Les différents paramètres suivis au cours du temps dans un même pot de sol (tel que les concentrations en HAP, la densité de gènes) sont catégorisés comme des échantillons appariés et leur évolution au cours du temps est analysés statistiquement par un test t pour échantillons appariés (paired t-test) après vérification des conditions d'application.

Enfin, pour comparer les moyennes observées à une moyenne théorique, le test de conformité de Student est utilisé. Ce test est utilisé pour comparer les concentrations en HAP des milieux de cultures en présence de bactéries par rapport au milieu de culture sans bactéries.

Résultats & Discussion

1. Amélioration de la phytoremédiation par co-culture

1.1. Caractérisation initiale des sols

1.1.1. Caractérisation physico-chimique des sols

La caractérisation physico-chimique du technosol et du sol standard a été réalisée à T0 (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractérisation physico-chimique initiale du technosol et du sol standard

	Sol Standard	Technosol
pH (H₂O)	5,92 ± 0,04	7,61 ± 0,01
pH (KCl)	5,52 ± 0,03	7,41 ± 0,01
Argiles (%)	19,9	33,7
Limons (%)	8,7	55
Sables (%)	71,4	11,3
CEC (cmol⁺.kg⁻¹)	8	19
Carbone organique (%)	4,11	2,85
Azote total (%)	0,08	0,26
C/N	51,4	11
Matière organique (%)	7,1	4,9
Potassium (g.kg⁻¹)	36,4 ± 0,7	776,2 ± 18,5
Phosphore (g.kg⁻¹)	10,6 ± 1,0	169,5 ± 3,3

Avec un pH de 5,92, le sol standard est un sol acide alors que le technosol est un sol basique avec un pH de 7,61. Les deux sols possèdent une acidité potentielle de réserve faible (écart de 0,4 entre pH H₂O et pH KCl) (Mathieu and Pieltain, 2003). Les pourcentages d'argiles, de limons et de sables dans les sols permettent de définir leur granulométrie en utilisant le triangle des textures de Jamagne modifié (Baize, 2018). Les résultats suggèrent que la texture du technosol est argile limoneuse alors que celle du sol standard est sable-argileux. Les deux diffèrent également par leur capacité d'échange cationique (CEC). Le sol standard a une CEC de 8 cmol⁺.kg⁻¹, qui est classée comme faible alors que le technosol a une forte CEC (19 cmol⁺.kg⁻¹). Les sols avec une CEC inférieure à 10 cmol⁺.kg⁻¹ comme c'est le cas pour le sol standard, sont généralement constitués d'une concentration importante en sable et possèdent une faible capacité de rétention en eau ainsi qu'une faible capacité de rétention des nutriments pour les végétaux, ces derniers étant perdus par lessivage. Au contraire, les sols avec une CEC comprise entre 11 et 50 cmol⁺.kg⁻¹ sont généralement constitués d'une forte teneur en argile et en matières organiques, possèdent une capacité élevée à retenir les

éléments nutritifs des végétaux ainsi qu'une forte capacité de rétention en eau du sol (Jones, 2012a).

Les teneurs en azote, phosphore et potassium du technosol sont nettement supérieures à celles du sol témoin, mettant en évidence que le technosol est plus riche en éléments nutritifs pour les végétaux que le sol standard. Un meilleur développement des végétaux peut donc être attendu dans le technosol en comparaison avec le sol standard. En revanche, le taux de matières organiques est supérieur dans le sol standard comparé au technosol.

1.1.2. Concentrations initiales en HAP dans les sols

Les concentrations en HAP ont été mesurées dans le sol témoin et dans le technosol à T0 (Tableau 11).

Tableau 11 : Concentrations initiales en HAP (mg.kg^{-1}) dans le sol standard et le technosol en comparaison avec les valeurs de référence du fond pédogéochimique naturel (FPGN) local (Darmendrail, 2000). Les valeurs en gras indiquent un dépassement de la valeur moyenne du FPGN local alors que les valeurs en gras et en rouge sont supérieures à la valeur maximale du FPGN local

Les 16 HAP prioritaires	Concentrations en HAP (mg/kg de sol sec)			
	Sol standard	Technosol	Fond pédogéochimique naturel Thionville- Custines	
			Moyenne	Maximum
Naphtalène	< LD	< LD	ND	ND
Acénaphthylène	< LD	< LD	ND	ND
Acénaphthène	< LD	< LD	ND	ND
Fluorène	< LD	< LD	ND	ND
Phénanthrène	< LD	0,09 ± 0,02	ND	ND
Anthracène	< LD	0,04 ± 0,01	ND	ND
Fluoranthène	< LD	0,58 ± 0,09	0,33	3
Pyrène	< LD	0,46 ± 0,03	ND	ND
Benzo(a)anthracène	< LD	0,14 ± 0,01	ND	ND
Chrysène	< LD	< LD	ND	ND
Benzo(b)fluoranthène	< LD	0,58 ± 0,04	0,17	1
Benzo(k)fluoranthène	< LD	< LD	0,1	0,6
Benzo(a)pyrène	< LD	0,28 ± 0,04	0,09	0,15
Dibenz(a,h)anthracène	< LD	< LD	ND	ND
Benzo(g,h,i)perylène	< LD	0,19 ± 0,02	0,18	0,6
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	< LD	0,28 ± 0,04	0,17	0,8
HAP totaux	< LD	2,65 ± 0,23	1,2	6,2

LD : Limite de détection ; ND : valeur non déterminée dans le fond pédogéochimique

Les résultats indiquent des concentrations en HAP inférieures à la limite de détection pour le sol standard, ce qui permet de confirmer l'absence de contamination de ce sol en ces éléments. En revanche, pour le technosol, 9 des 16 HAP prioritaires ont pu être quantifiés. Parmi eux, 4 HAP sont à des concentrations supérieures à la moyenne du fond pédogéochimique naturel local (valeurs en gras) : le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(g,h,i)perylène et l'indeno(1,2,3-cd)pyrène et 1 a une concentration supérieure à la valeur maximale du fond pédogéochimique naturel local (valeur en gras et en rouge), il s'agit du benzo(a)pyrène. De plus, la concentration en HAP totaux, correspondant à la somme des 16 HAP, est supérieure à la moyenne du FPGN local. Cependant, certaines teneurs en HAP ne sont pas déterminées dans le FPGN local (Tableau 11). Il est toutefois possible de trouver d'autres références dans la littérature.

Maliszewska-Kordybach (1996) a proposé des valeurs seuils pour classer les sols de Pologne utilisés en agriculture. Selon cet auteur, les sols possédant une concentration en HAP supérieure à $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$, soit 1 mg.kg^{-1} , peuvent être classés comme fortement contaminés. Avec une concentration initiale en HAP de $2,65 \pm 0,23 \text{ mg.kg}^{-1}$, le technosol serait alors classé comme fortement contaminé pour un usage agricole.

Le conseil canadien des ministres de l'environnement a développé des recommandations concernant la qualité des sols visant à protéger l'environnement et la santé humaine en calculant des indices à partir des concentrations en HAP cancérigènes (<http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/fr/224>).

- Le premier, l'équivalence de la toxicité totale relative au benzo(a)pyrène (ETT relative au BaP), permet de déterminer si les humains sont protégés contre un contact direct avec le sol.
- Le second, l'indice de risque cumulatif de cancer (IRCC) est calculé pour s'assurer que les ressources d'eau potables sont protégées (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2010).

Ces indices ont été calculés pour le technosol.

- L'ETT relative au BaP calculée est de 0,36. Elle est inférieure au niveau de risque acceptable souhaitée dont la valeur seuil est fixée à 0,6. Ce résultat suggère que le technosol présente un faible risque cancérigène par contact direct.
- L'IRCC calculée est égale à 4,84. Cette valeur est supérieure à la valeur seuil qui est fixée à 1. Ce résultat montre que le technosol peut générer un risque pour la qualité des eaux potables souterraines.

1.1.3. Concentrations en ETM dans les sols

Les ETM ont été dosés dans le sol standard et dans le technosol à T0 après extraction à l'eau régale afin d'estimer les concentrations « totales » et après extraction au DTPA afin d'estimer les concentrations en ETM biodisponibles dans les sols. Les résultats sont comparés au FPGN local afin de caractériser la contamination des matrices étudiées (Tableau 12).

Tableau 12 : Concentrations en ETM "totaux" et "biodisponibles" dans les sols à T0 en comparaison aux valeurs du fond pédogéochimique naturel local. Les valeurs en gras indiquent un dépassement de la moyenne du FPGN local.

	Concentrations en ETM (mg.kg ⁻¹ de sol sec)					
	Sol standard		Technosol		Fond pédogéochimique naturel local	
	"totaux"	DTPA	"totaux"	DTPA	Moyenne	Maximale
As	1,5 ± 0,2	ND	17,7 ± 0,4	ND	20	50
Cd	<LQ	<LQ	0,4 ± 0,0	<LQ	2	5
Cr	10,7 ± 4,1	<LQ	67,1 ± 3,1	<LQ	75	200
Cu	<LQ	0,1 ± 0,0	38,0 ± 0,8	5,3 ± 0,1	30	100
Ni	5,4 ± 0,6	0,1 ± 0,0	54,3 ± 0,9	1,7 ± 0,0	40	100
Pb	12,0 ± 1,8	0,7 ± 0,1	36,9 ± 0,8	4,8 ± 0,0	30	100
Zn	5,6 ± 1,3	0,8 ± 0,0	212,3 ± 2,8	15,2 ± 0,3	120	500

LQ : Limite de quantification ; ND : valeur non déterminée

Cinq des sept ETM étudiés ont pu être quantifiés dans le sol témoin. Il s'agit de l'arsenic, du chrome, du nickel, du plomb et du zinc avec des concentrations variant entre 1,5 mg.kg⁻¹ pour l'arsenic à 12,0 mg.kg⁻¹ pour le plomb. Toutes ces valeurs sont inférieures au FPGN local, ce qui permet de montrer l'absence de contamination du sol standard par les ETM. De plus, les concentrations en ETM biodisponibles (estimées après extraction au DTPA) sont très faibles dans ce sol standard. Elles sont comprises entre 0,1 mg.kg⁻¹ pour le cuivre et le nickel et 0,8 mg.kg⁻¹ pour le zinc, ce qui représente environ 2 % de nickel biodisponible, 6 % de plomb et 14 % de zinc.

En revanche, les sept ETM étudiés ont pu être quantifiés dans le technosol. Ce dernier présente des concentrations plus importantes en ETM, variant entre 0,4 mg.kg⁻¹ pour le cadmium et 212,3 mg.kg⁻¹ pour le zinc. Parmi elles, 4 sont supérieures à la valeur moyenne du FPGN local, il s'agit du cuivre, du nickel, du plomb et du zinc, montrant ainsi une contamination du technosol en ces 4 ETM. Les concentrations en ETM biodisponibles varient entre 1,7 mg.kg⁻¹ pour le nickel et 15,2 mg.kg⁻¹ pour le zinc. D'après ces concentrations, environ 3 % du nickel contenu dans le technosol est biodisponible, contre 7 % de zinc, 13 % de plomb et 14 % de cuivre. Ces résultats suggèrent que la majorité des ETM présents dans le technosol ne sont pas biodisponibles.

La caractérisation initiale des sols a permis de montrer les différences entre les propriétés physico-chimiques du sol standard et du technosol (pH, granulométrie, teneur en matières organiques, en éléments nutritifs, etc.). Les éléments nutritifs (N, P, K) présents à des concentrations supérieures dans le technosol pourraient permettre un meilleur développement des végétaux dans le technosol en comparaison avec le sol témoin.

Le sol standard n'est pollué ni en HAP ni en ETM. Ce sol peut donc bien être utilisé comme sol témoin non contaminé.

Quant au technosol, les résultats montrent une contamination par des HAP (HAP totaux) et particulièrement par le benzo(a)pyrène, le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(g,h,i)perylène et l'indeno(1,2,3-cd)pyrène). Le technosol est aussi contaminé par des ETM (cuivre, nickel, plomb et zinc). Enfin, si le calcul de l'ETT suggère que le technosol présente un risque cancérigène par contact faible, l'IRCC indique qu'il présente un risque avéré pour la qualité des eaux potables souterraines.

1.2. Suivi des teneurs en polluants dans les sols

1.2.1. Concentrations HAP

Les concentrations en HAP dans les sols ont été mesurées à T0 et à TF afin de déterminer la modalité testée la plus efficace en termes de dissipation des HAP et vérifier l'hypothèse émise, à savoir la possibilité d'amélioration de la dissipation des HAP par co-culture entre MxG et le trèfle blanc par rapport à une monoculture de MxG.

Que ce soit à T0 ou à TF, aucun des 16 HAP étudiés n'a été détecté dans le sol standard, c'est pourquoi seuls les résultats du technosol sont présentés et plus particulièrement les HAP pour lesquels des dissipations significatives ont été observées (Figure 28). A partir des concentrations mesurées, le taux de dissipation entre T0 et TF a pu être calculé pour chaque HAP et chaque condition (Wechtler et al., 2020)(Annexe A).

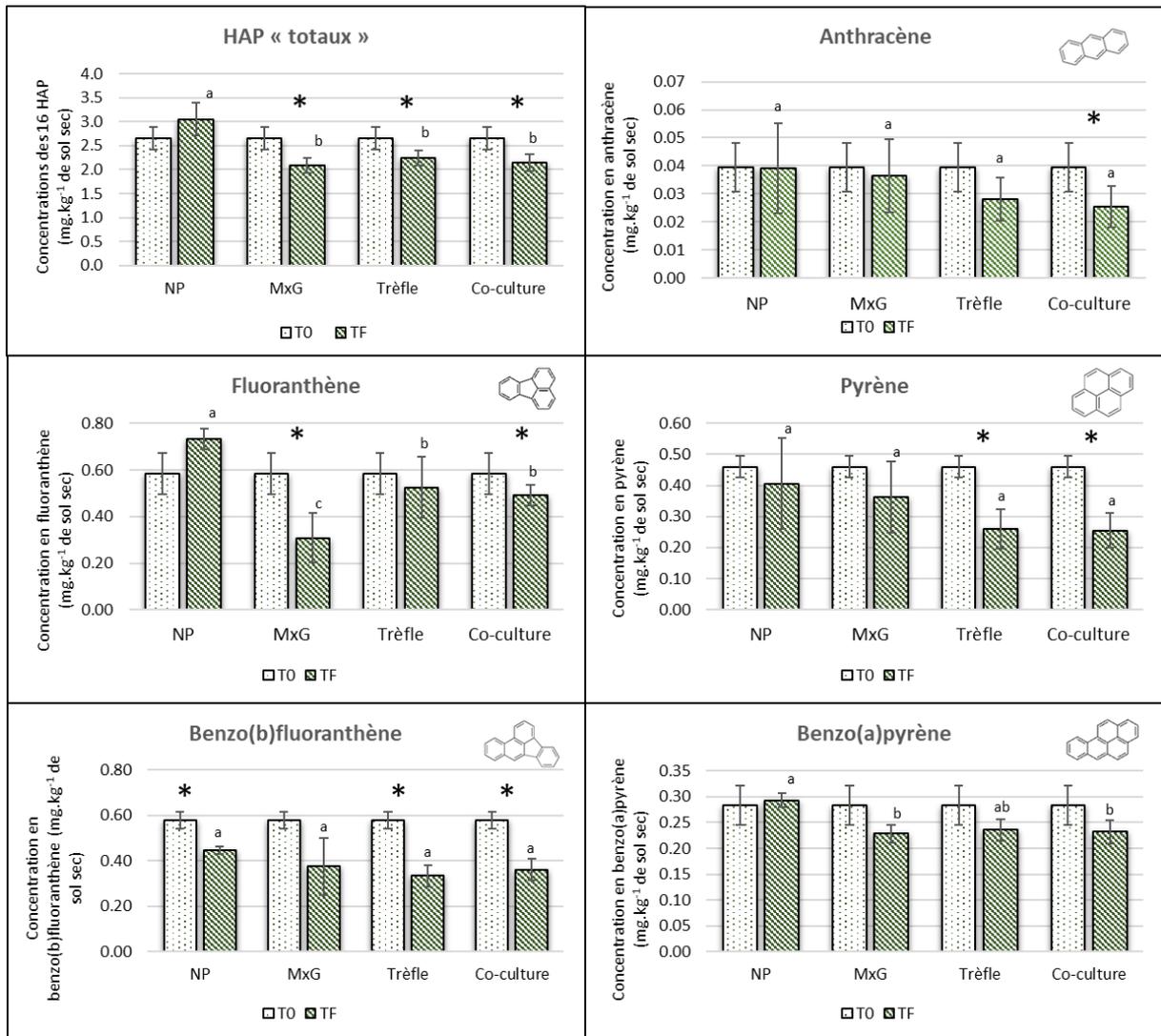


Figure 28 : Concentrations en HAP (mg.kg⁻¹ de sol sec) dans le technosol à T0 et à TF (après 263 jours) en fonction des différentes conditions testées : non planté (NP), en présence de *Miscanthus x giganteus* (MxG), de trèfle blanc et de la co-culture. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions à TF pour un HAP considéré (ANOVA suivi d'un test de Tukey HSD, $p < 0,05$, $n=6$). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives pour les concentrations d'un HAP considéré entre T0 et TF pour chaque condition (test t pour échantillons appariés, $p < 0,05$, $n=6$).

Pour les HAP totaux (somme des concentrations des 16 HAP), il n'y a pas de différence pour la condition non plantée entre T0 et TF. Une diminution significative de la concentration en HAP totaux est, en revanche, observée entre T0 et TF pour toutes les conditions plantées : MxG (31,7 %), trèfle blanc (26,2 %) et co-culture (29,3 %). La dissipation est similaire entre ces trois modalités. De plus, la concentration en HAP totaux est significativement inférieure pour toutes les conditions plantées par rapport à la condition non plantée à TF. Les résultats mettent donc en évidence que, quelle que soit l'espèce végétale utilisée, en monoculture ou en co-culture, toutes ont permis d'induire une diminution significative des concentrations totales en HAP montrant leur efficacité en phytoremédiation.

Ces résultats permettent également de montrer l'efficacité de MxG pour la dissipation des HAP dans un technosol puisque jusqu'à présent seules des dissipations dans des sols artificiellement contaminés avaient été montrées pour cette espèce végétale (Mazziotti, 2017; Techer et al., 2012b). La seule étude réalisée sur un technosol n'avait duré que 17 semaines et n'avait pas permis de montrer de dissipation significative (Techer et al., 2012c). Or, les polluants présents dans les sols contaminés artificiellement sont plus biodisponibles et donc plus facilement biodégradables que ceux contenus dans les sols avec une pollution ancienne. En effet, avec le temps, la biodisponibilité des HAP diminue et les molécules sont moins accessibles pour la biodégradation : ce processus est appelé « vieillissement » (Hatzinger and Alexander, 1995; Semple et al., 2003).

En regardant les 16 HAP étudiés en détail, cinq des neuf HAP détectés dans le technosol présentent une diminution significative de concentration pour au moins une modalité de plantation. Il s'agit de l'anthracène, du fluoranthène, du pyrène, du benzo(b)fluoranthène et du benzo(a)pyrène. Contrairement à nos résultats, d'autres études ont montré une diminution de la concentration de phénanthrène dans un sol planté avec du trèfle blanc (Wei and Pan, 2010; Xu et al., 2006) et dans un sol planté avec MxG (Techer et al., 2012b). De plus, Mazziotti (2017) a montré une dissipation du benzo(a)anthracène dans un sol planté avec MxG. Ces différences peuvent s'expliquer par les propriétés physico-chimiques des sols étudiés telles que les teneurs en matières organiques, les concentrations en HAP et leur biodisponibilité. En effet, dans les études citées, les sols ont été artificiellement contaminés avec des HAP : nous pouvons donc supposer que les contaminants y ont une meilleure biodisponibilité et sont plus facilement dégradés (Hatzinger and Alexander, 1995; Semple et al., 2003).

Pour l'anthracène, aucune différence significative n'est observée entre T0 et TF pour la condition non plantée, MxG et le trèfle blanc. Bien que, la co-culture ait permis d'induire une dissipation significative de l'anthracène de 35,6 %, il n'y a pas de différence significative entre les différentes conditions à TF même si les concentrations en anthracène pour le trèfle blanc et la co-culture semblent inférieures aux deux autres conditions. Il serait nécessaire de suivre la dissipation de l'anthracène sur plusieurs saisons de culture afin de vérifier la confirmation ou infirmation de cette tendance.

Concernant le fluoranthène, une dissipation significative a été montrée entre T0 et TF pour les conditions MxG et co-culture contrairement aux conditions « non planté » et « trèfle blanc ». A TF, des concentrations en fluoranthène significativement plus faibles sont observées pour les conditions plantées (MxG, trèfle et co-culture) par rapport au technosol non planté. Cette dissipation est nettement plus importante pour le technosol planté avec MxG comparé aux autres modalités de plantation. Un taux de dissipation moyen de 47,2 % a été calculé pour la condition MxG contre 15,7 % pour la co-culture et 10,1 % pour le trèfle blanc. De plus, à la fin de l'expérimentation, la concentration moyenne en fluoranthène dans

les pots contenant MxG a été mesurée à $0,31 \text{ mg.kg}^{-1}$ de sol sec, permettant ainsi de passer sous le seuil du fond pédogéochimique naturel local (à $0,33 \text{ mg.kg}^{-1}$). Selon ces résultats, MxG semble donc être l'espèce végétale la plus efficace pour la dissipation du fluoranthène, d'autant plus lorsqu'elle est en monoculture.

Une diminution significative des concentrations en pyrène est observée entre T0 et TF pour le trèfle blanc et la co-culture contrairement à la condition non plantée et MxG. La présence de trèfle blanc en monoculture a entraîné une diminution de 43,3 % de la concentration en pyrène alors qu'un taux de dissipation de 44,7 % a été calculé pour la co-culture. Le taux de dissipation moyen de pyrène pour MxG est de 21,0 %. Il n'y a cependant pas de différence significative entre les différentes modalités à TF. D'après ces résultats, le trèfle blanc semble plus efficace pour la dissipation du pyrène que MxG, montrant l'intérêt de la réalisation d'une co-culture entre MxG et le trèfle blanc pour la phytoremédiation de ce HAP. En effet, d'autres études ont montré la capacité du trèfle blanc à diminuer les concentrations en pyrène dans les sols. Xu et ses collaborateurs (2006) ont observé une dissipation de 62,3 à 88,1 % de pyrène après 60 jours de culture dans un sol contaminé artificiellement avec des concentrations en pyrène variant entre 4,32 et $365,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ alors que Wei and Pan (2010) ont montré que 54,4 % du pyrène a été dissipé en présence de trèfle blanc dans un sol artificiellement contaminé avec 80 mg.kg^{-1} de ce HAP. Des résultats similaires ont été rapportés par Xu et ses collaborateurs (2009) avec un taux de dissipation moyen de 77 %. Cependant les sols de ces études étaient artificiellement contaminés avec du pyrène, le rendant probablement plus biodisponible que dans le technosol (Hatzinger and Alexander, 1995; Semple et al., 2003), ce qui peut expliquer les taux de dissipation plus importants que pour notre expérimentation.

Pour le benzo(b)fluoranthène, une diminution significative a été obtenue pour le trèfle blanc, la co-culture et la condition « non planté ». Seule la condition avec MxG n'a pas montré de différence significative entre T0 et TF. Il n'y a cependant pas de différence entre les différentes conditions à TF. Les taux moyens de dissipation du benzo(b)fluoranthène sont de 23,1 % pour le technosol non planté, 35,3 % pour MxG, 37,7 % pour la co-culture et 42,2 % pour le trèfle blanc. La dissipation de 23,1 % dans le technosol non planté suggère que ce ne sont pas les végétaux qui sont responsables de la dissipation de ce HAP. L'hypothèse de microorganismes actifs indépendant de toute association végétale dans la biodégradation de ce HAP pourrait expliquer cette dissipation (Meng et al., 2011).

Enfin, concernant le benzo(a)pyrène, les concentrations à TF sont significativement plus faibles pour MxG et la co-culture par rapport à la condition non plantée et trèfle blanc. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre T0 et TF pour chacune des modalités plantées et non plantée. Un taux de dissipation de 19,6 % a été calculé pour MxG, 16,8 % pour le trèfle et 18,2 % pour la co-culture.

A la fin de l'expérimentation, l'Indice de Risque Cumulatif de Cancer (IRCC) et l'équivalence de la toxicité totale relative au benzo(a)pyrène (l'ETT) ont de nouveau été calculés afin de suivre leur évolution en fonction des différentes modalités testées (Figure 29).

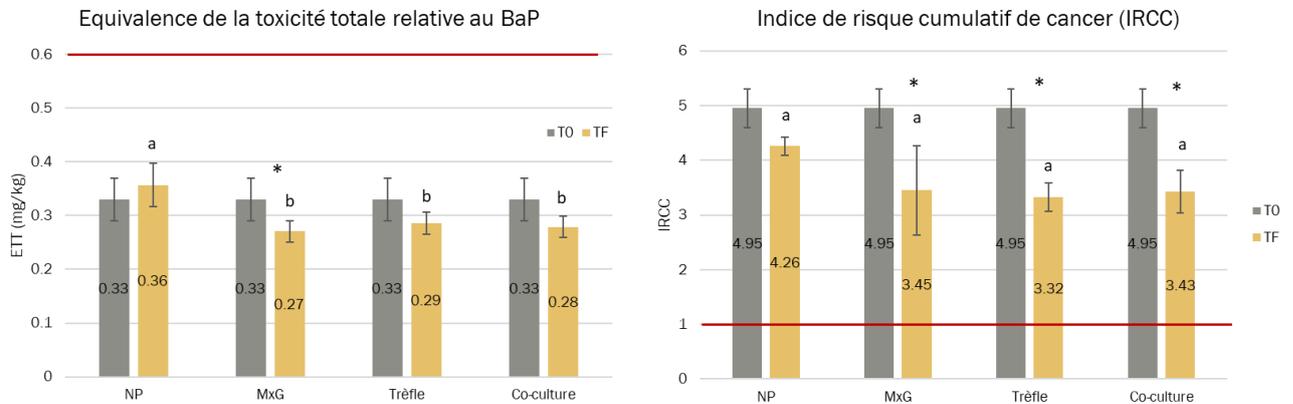


Figure 29 : Résultats de l'équivalence de la toxicité totale relative au benzo(a)pyrène (ETT) (graphique de gauche) et de l'indice de risque cumulatif de cancer (IRCC) (graphique de droite) calculés à T0 (gris) et à TF (jaune) pour les différentes conditions testées. Les barres de couleur rouge sur les graphiques indiquent la valeur seuil de chaque indice (0,6 mg/kg pour l'ETT et 1 pour l'IRCC). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions à TF (ANOVA suivi d'un test de Tukey HSD, $p < 0,05$, $n=6$). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives pour l'indice calculé entre T0 et TF, pour une condition considérée (test t pour échantillons appariés, $p < 0,05$, $n=6$).

Quelle que soit la modalité à T0 et à TF, l'ETT est inférieur à la valeur de risque acceptable de 0,6 fixée par les recommandations canadiennes (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2010), indiquant un faible risque cancérigène par contact direct avec le technosol. A la fin de l'expérimentation, des ETT significativement plus faibles sont obtenus pour les conditions plantées comparé à la condition non plantée. En revanche, seule une diminution significative de l'indice a été montrée entre T0 et TF pour la condition MxG. Ces résultats mettent donc en évidence un faible risque cancérigène pour les humains en contact direct avec le technosol et également une diminution de l'indice de risque après l'expérimentation de phytoremédiation.

Concernant l'IRCC, les valeurs calculées à T0 et à TF, toutes conditions confondues, sont supérieures à la valeur seuil de 1, indiquant que le technosol peut encore générer un risque pour la qualité des eaux potables souterraines même après la période de phytoremédiation expérimentale de 263 jours. Cependant, une diminution significative de l'indice est observée pour toutes les conditions plantées entre T0 et TF. Les valeurs obtenues étant inférieures à la fin de l'expérimentation de phytoremédiation en présence de végétaux, quelle que soit la modalité plantée, permet de montrer un impact positif des espèces végétales sur la dissipation des HAP. Ces résultats sont de plus en accord avec la diminution significative des HAP totaux pour les conditions plantées par rapport à la condition non plantée.

La présence de végétation, que ce soit MxG ou le trèfle blanc en monoculture ou en co-culture a permis d'améliorer la dissipation des HAP totaux comparée à la condition technosol non planté. De plus, la présence de végétaux a également permis de diminuer significativement l'IRCC contrairement à la condition non plantée, permettant de conclure sur l'efficacité de ces végétaux pour la phytoremédiation. Cependant, cet indice reste supérieur à la valeur seuil recommandée, suggérant que le technosol peut toujours générer un risque pour la qualité des eaux potables souterraines après 263 jours de culture. C'est pourquoi cette expérimentation de phytoremédiation devra être réalisée sur plusieurs cycles végétaux.

Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence que la monoculture de MxG est plus intéressante pour la dissipation du fluoranthène comparée à la co-culture. En revanche, une amélioration de la dissipation de l'anthracène et du pyrène après co-culture a été montrée en comparaison avec la monoculture de MxG, montrant ainsi l'intérêt d'associer MxG et le trèfle blanc pour la phytoremédiation des HAP.

1.2.2. Concentrations en ETM

1.2.2.1. ETM biodisponibles

Les concentrations en ETM extraits au DTPA ont été mesurées à TF afin d'estimer leur biodisponibilité et de déterminer l'influence des végétaux sur ce paramètre (Tableau 13). En effet, la présence d'un couvert végétal modifie les paramètres physico-chimiques des sols et détermine la spéciation des ETM dans les sols contaminés. Les végétaux peuvent donc influencer la biodisponibilité des ETM en modifiant leur répartition entre des fractions labiles et moins labiles (Nsanganwimana et al., 2014).

Tableau 13 : Concentrations en ETM extraits au DTPA (mg.kg^{-1} de sol sec) dans le sol témoin après 263 jours de plantation de MxG ainsi que dans les différentes modalités du technosol (non planté, MxG, trèfle blanc et co-culture entre MxG et trèfle blanc) ($n=3$). « <LQ » signifie inférieur à la limite de quantification

	Concentrations des ETM extraits au DTPA (mg.kg^{-1} de sol sec)					
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Témoin MxG	<LQ	<LQ	<LQ	$0,11 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,38$
NP	$0,11 \pm 0,00$	<LQ	$6,35 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,00$	$4,38 \pm 0,01$	$16,36 \pm 0,07$
MxG	$0,10 \pm 0,00$	<LQ	$6,14 \pm 0,14$	$1,12 \pm 0,01$	$4,54 \pm 0,12$	$15,35 \pm 0,80$
Trèfle	$0,10 \pm 0,01$	<LQ	$6,07 \pm 0,58$	$1,14 \pm 0,06$	$4,31 \pm 0,53$	$14,82 \pm 1,55$
Co-culture	$0,11 \pm 0,01$	<LQ	$6,01 \pm 0,20$	$1,15 \pm 0,03$	$4,40 \pm 0,07$	$15,15 \pm 0,85$

Les concentrations estimées en ETM biodisponibles ont été comparées entre les différentes conditions pour chaque ETM. Seules des différences significatives sont observées entre le sol témoin et toutes les conditions du technosol (ANOVA, $p < 0,05$). En revanche aucune différence n'est observée entre les différentes conditions du technosol (non planté, MxG, trèfle ou la co-culture). Ces résultats suggèrent une absence d'influence des végétaux sur la biodisponibilité des ETM dans le technosol.

Des études ont pourtant déjà montré une réduction de la biodisponibilité de certains ETM dans des cultures de MxG. C'est le cas notamment dans l'étude de Al Souki et ses collaborateurs (2017), qui a montré une inhibition des concentrations en Cd et en Pb extraits au CaCl_2 dans 5 sols différents avec des variations significatives entre les différents sols. De même, Ollivier et ses collaborateurs (2012) ont montré une réduction de 52 % de Pb et de 19 % d'As tous deux extraits au CaCl_2 (0,01 M) dans un technosol acide contaminé avec ces deux éléments après 3 mois de plantation de MxG. En revanche, dans cette même étude, le deuxième sol étudié ne présentait pas de réduction des concentrations en As et Pb biodisponibles après culture de MxG (Ollivier et al., 2012). La réduction de la biodisponibilité des ETM en présence de végétaux est spécifique à un ETM considéré mais également aux interactions entre les ETM et les propriétés physico-chimiques du sol, notamment le pH (Nsanganwimana et al., 2014), ce qui peut expliquer les différences de résultats entre les différentes études. De plus, deux méthodes différentes d'extraction ont été utilisées, le pouvoir d'extraction varie entre ces deux méthodes mais est également dépendant des paramètres physico-chimiques du sol étudié. En effet, l'extraction au DTPA est préférentiellement utilisé pour des sols possédant un pH supérieur à 6 (AFNOR, 2002) ou encore pour des sols calcaires (Aydinalp and Katkat, 2004).

1.2.2.2. ETM totaux

Les concentrations « totales » des 7 ETM étudiés ont été mesurées à TF dans le technosol en fonction des différentes conditions testées (Figure 30).

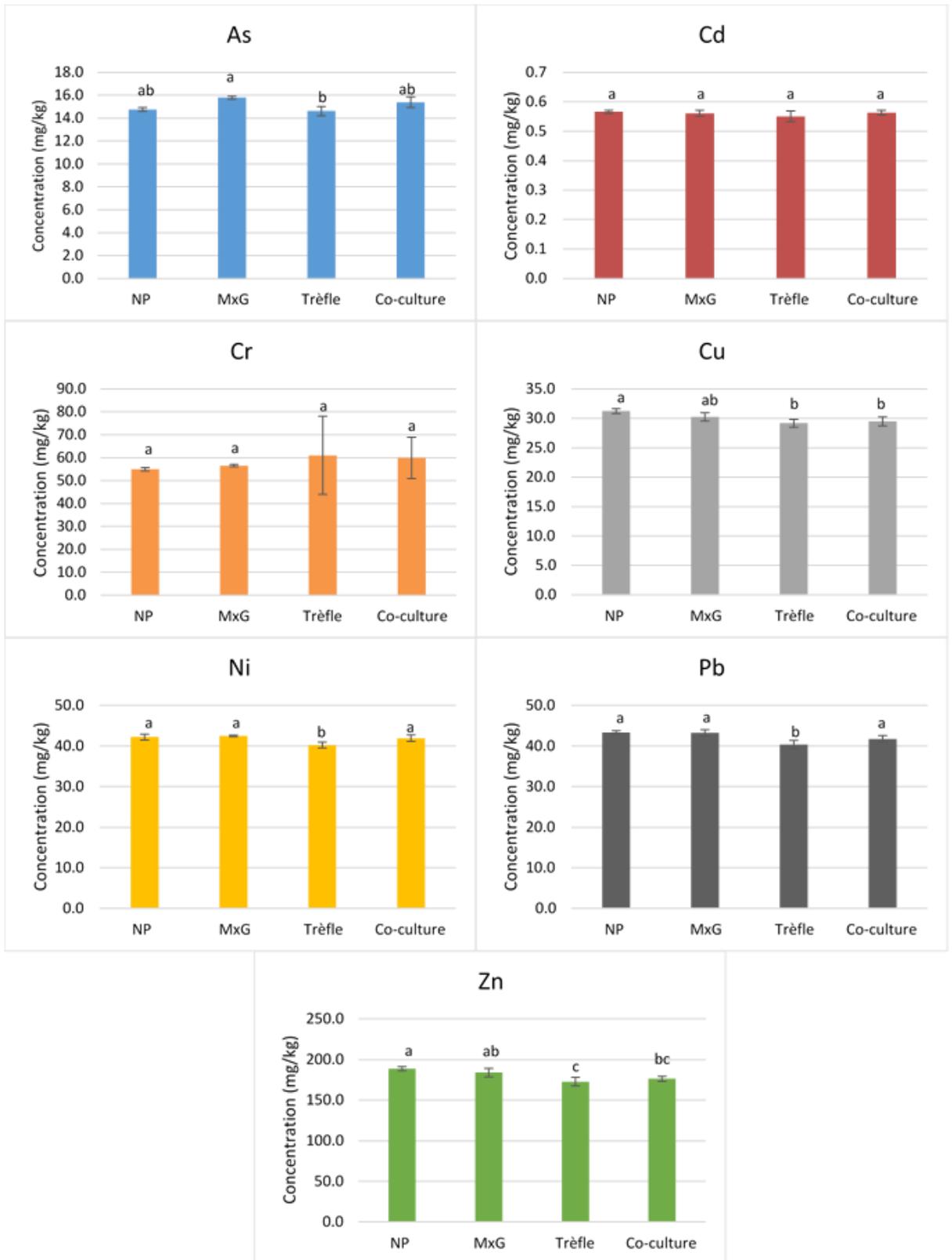


Figure 30 : Concentrations des 7 ETM étudiés (mg.kg^{-1} de sol sec) mesurées dans le technosol après 263 jours d'expérimentation en fonction des différentes conditions testées (non planté, MxG, trèfle blanc et co-culture). Des lettres différentes entre les conditions indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$; $n=3$).

A la fin de l'expérimentation, des différences significatives concernant les concentrations en ETM ont pu être mises en évidence en fonction des différentes modalités excepté pour le cadmium et le chrome, pour lesquels aucune différence n'est observée entre les différentes conditions. Pour ces deux ETM ainsi que pour l'arsenic, les concentrations présentent dans le technosol que ce soit à T0 (cf. paragraphe 1.1.3) ou à TF sont inférieures au FPGN local, indiquant une absence de contamination du technosol par ces éléments. En revanche, les concentrations en nickel, cuivre, plomb et zinc dépassent les concentrations du FPGN local, légèrement pour le nickel, le cuivre et le plomb avec des valeurs du FPGN de 40, 30 et 30 mg.kg^{-1} respectivement et avec un dépassement plus important pour le zinc (valeur du FPGN : 120 mg.kg^{-1}).

Concernant le cuivre, des concentrations significativement plus faibles en cet ETM sont observées après plantation du trèfle blanc ou de la co-culture à TF comparé à la condition non plantée. Ce résultat suggère un impact du trèfle blanc sur le cuivre avec une possible transfert de cet ETM vers la plante. Cette hypothèse pourra être vérifiée par la détermination des concentrations en cuivre dans les différentes parties du trèfle (cf. paragraphe 1.4.3.2). Les concentrations dans le technosol à TF pour les conditions trèfle et co-culture sont passées en dessous du seuil de 30 mg.kg^{-1} (FPGN) avec des concentrations respectives de $29,16 \pm 0,66$ et $29,47 \pm 0,74$ mg.kg^{-1} alors que les concentrations pour les conditions non plantées et MxG restent au-dessus du seuil avec des concentrations respectivement de $31,23 \pm 0,40$ et $30,25 \pm 0,72$ mg.kg^{-1} .

Pour le nickel et le plomb, des concentrations significativement plus faibles comparées aux autres modalités sont observées dans le technosol pour la condition trèfle blanc. Pour le zinc, les concentrations après culture du trèfle et de la co-culture sont significativement inférieures à celle du technosol non planté alors que seule la concentration pour la condition trèfle blanc est inférieure à la concentration pour la condition MxG.

Ces résultats mettent en évidence qu'après un cycle de culture de MxG, aucune différence statistiquement significative n'est observée entre cette condition et le technosol non planté, et ce, pour aucun des 7 ETM étudiés suggérant une absence d'accumulation d'ETM. Au contraire, le trèfle blanc entraîne une diminution des concentrations en ETM après 263 jours de culture et notamment en cuivre, nickel, plomb et zinc comparé au technosol non planté. Cette diminution des concentrations en ETM peut se traduire par un transfert du technosol vers la plante. En effet, Bidar et ses collaborateurs (2007) ont déjà montré une accumulation de Cd et de Zn dans les parties racinaires de trèfle blanc avec des concentrations en ETM largement plus importante que dans notre technosol, $25,86 \pm 0,97$ mg.kg^{-1} de Cd et $1301 \pm 54,5$ mg.kg^{-1} de Zn. Leur étude a conclu à une accumulation préférentielle des ETM dans les parties racinaires de trèfle et aucune accumulation dans les parties aériennes n'a été montrée. Cette hypothèse pourra être vérifiée après dosage des ETM dans le trèfle blanc.

La culture de trèfle blanc et de MxG en monoculture et en co-culture n'influence pas la biodisponibilité des ETM dans le technosol.

En revanche, la présence de trèfle blanc entraîne une diminution des concentrations en ETM « totaux », et plus particulièrement en cuivre, nickel, plomb et zinc comparé aux concentrations du technosol non planté.

Au contraire, la culture de MxG n'entraîne pas de diminution des concentrations en ETM dans le technosol.

Nous pouvons donc supposer une absence de transfert des ETM du technosol vers MxG et une accumulation possible en Cu, Ni, Pb et Zn dans le trèfle blanc.

1.3. Suivi de l'écotoxicité et de la génotoxicité du technosol

Afin de caractériser l'écotoxicité et la génotoxicité du technosol avant la mise en place de l'expérimentation « associations végétales » (à T₀) et à la fin de cette expérimentation (T_F) des tests d'écotoxicité et de génotoxicité ont été réalisés.

1.3.1. Test « Inhibition de la croissance racinaire » NF ISO 11269-1

Pour le premier test, « inhibition de la croissance racinaire », les longueurs des racines d'avoine les plus longues après 4 jours d'exposition dans les différents sols ont été mesurées (Figure 31).

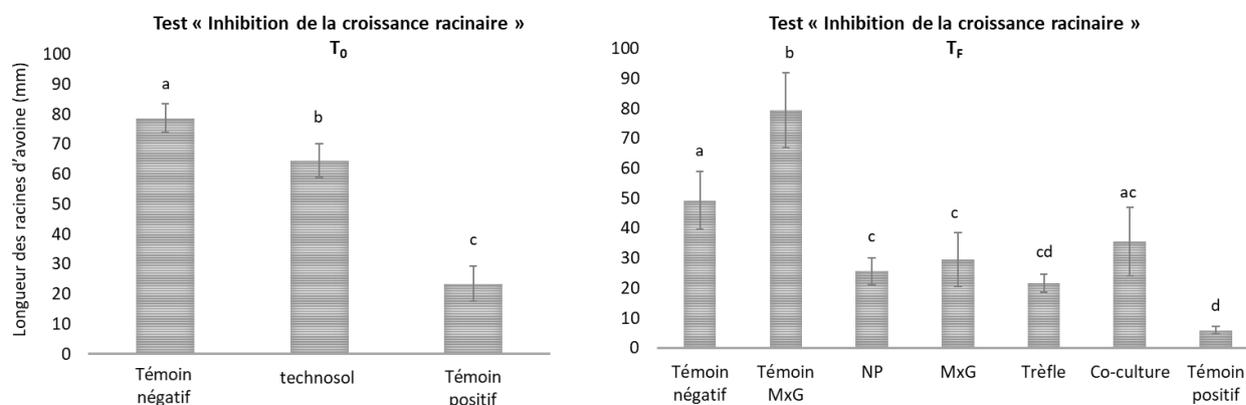


Figure 31 : Longueurs des racines d'avoine (mm) mesurées lors du test d'écotoxicité "Inhibition de la croissance racinaire" à T₀ (graphique de gauche) et à la fin de l'expérimentation (graphique de droite) en fonction des différentes modalités testées. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions ($p < 0,05$, $n = 3$)

A T0, les longueurs racinaires d'avoine sont comparées entre 3 conditions : le témoin négatif constitué d'un sol standard non contaminé, le technosol et le témoin positif (contrôle de validité de l'essai) correspondant à un sol standard contaminé artificiellement à l'acide borique. Le témoin positif présente une inhibition significative des longueurs des racines d'avoine comparées au témoin négatif et au technosol, montrant la validité de ce témoin et donc de l'essai.

Les résultats montrent que les longueurs des racines d'avoine dans le technosol sont significativement plus courtes que les longueurs des racines d'avoine dans le sol standard (témoin négatif). Ce test met donc en évidence un effet écotoxique du technosol sur l'avoine.

Le même test a été réalisé à TF afin de comparer l'évolution de l'écotoxicité du technosol en fonction des différentes modalités de phytoremédiation. Comme à T0, le témoin positif présente une inhibition significative des longueurs des racines d'avoine comparées au témoin négatif, montrant la validité de ce témoin et donc de l'essai.

Pour le sol standard, les résultats montrent une augmentation significative de la longueur racinaire de l'avoine après culture de MxG par rapport au témoin négatif et à toutes les autres conditions. Ces résultats suggèrent donc que la culture de MxG sur le sol standard a permis d'améliorer la qualité du sol.

En comparant les modalités technosol avec le témoin négatif, la longueur racinaire est significativement plus faible dans le technosol qu'il soit non planté ou en monoculture de MxG ou en monoculture de trèfle blanc comparé au témoin négatif. Ces résultats mettent en évidence une écotoxicité du technosol semblable à ceux obtenus pour le test à T0, suggérant qu'il n'y a pas eu d'amélioration de la qualité du technosol même après culture de MxG ou du trèfle blanc seuls.

En revanche, il n'y a pas de différence entre la condition co-culture et le témoin négatif. La co-culture entre MxG et le trèfle a donc permis de diminuer l'écotoxicité du technosol. La co-culture entre MxG et le trèfle blanc semble être la technique de phytoremédiation la plus prometteuse parmi les différentes modalités testées au regard de l'amélioration de l'écotoxicité du sol.

1.3.2. Test « Émergence et croissance des végétaux supérieurs » NF ISO 11269-2

Un second test d'écotoxicité est effectué sur une plus longue période que le test « Inhibition de la croissance racinaire » : 22 jours pour le test réalisé sur la navette et 21 jours pour l'avoine. Au terme de l'exposition, les masses sèches des parties aériennes des végétaux sont mesurées.

Les résultats obtenus que ce soit à T₀ ou à T_F ne montrent aucune diminution significative de la masse sèche des plantules entre les deux sols et le témoin négatif, quelle que soit la modalité testée. Ces résultats permettent de conclure que la contamination du technosol ne semble pas impacter le développement des parties aériennes des plantules d'avoine et de navette, montrant une absence de l'écotoxicité du technosol pour ce test.

Cette observation peut s'expliquer par de faibles concentrations en ETM et HAP dans le technosol ou également par la faible biodisponibilité des contaminants montrée dans la partie 1.1.3. Ces résultats concordent avec ceux de Maliszewska-Kordybach and Smreczak (2000), qui ont testés des concentrations en HAP variant de 1 à 100 mg.kg⁻¹ (somme de fluorène, anthracène, pyrène et chrysène) et n'ont observé aucune inhibition de la biomasse sèche de l'avoine même à la plus forte concentration testée comparé au témoin non contaminé.

1.3.3. Test « *Vicia faba* micronoyaux » NF ISO 29200

Le test de génotoxicité « *Vicia faba* micronoyaux » a également été réalisé à T₀ et à T_F soit directement en phase solide, en plantant les graines de fève dans les sols, soit en phase liquide en mettant en contact les racines de fèves avec les lixiviats de sol. Le nombre de micronoyaux dans 1000 cellules racinaires de fève a été compté dans six racines par pot (3 pots par condition) (Figure 32).

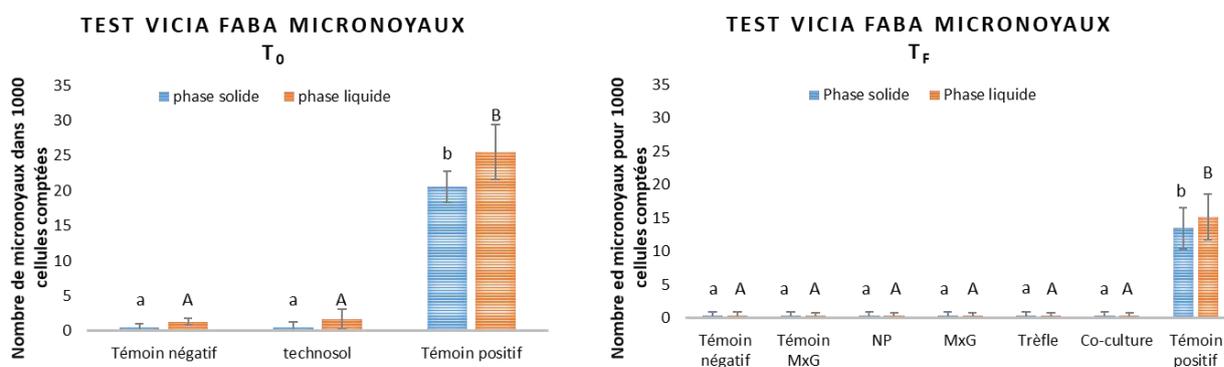


Figure 32 : Nombre de micronoyaux comptés dans les cellules racinaires de *Vicia faba* pour le test de génotoxicité à T₀ (graphique de gauche) et à T_F (graphique de droite). Les lettres minuscules sont utilisées pour montrer les différences entre les conditions pour la phase solide (en bleu, contact direct avec le sol) alors que les lettres majuscules sont utilisées pour la phase liquide (en orange, exposition des racines aux lixiviats de sol). Les lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions ($p < 0,05$, $n=3$).

Que ce soit à T₀ ou à T_F, un nombre de micronoyaux significativement plus élevé a été observé uniquement dans les témoins positifs que ce soit en phase liquide ou en phase solide. Le technosol n'induit pas d'augmentation du nombre de micronoyaux comparé au témoin négatif (ni à T₀ ni à T_F quel que soient les modalités). Les résultats mettent donc en évidence une absence de génotoxicité du technosol. Ces résultats peuvent être expliqués par les faibles

concentrations en substances cancérigènes ou à leur faible biodisponibilité. De plus, l'absence d'effet génotoxique à TF, que ce soit en phase liquide ou en phase solide permet de supposer que les végétaux n'ont pas induit d'augmentation de la biodisponibilité des polluants.

En effet, si un effet génotoxique a été montré grâce à ce test dans l'étude de Marcato-Romain et al., (2009), le sol étudié contenait des concentrations en polluants supérieures à celles du technosol que cela soit pour les concentrations en ETM ou en HAP. Ainsi, pour les ETM, le Cr, classé comme cancérigène certain par le CIRC (groupe 1) a été mesuré à 6 mg.kg^{-1} dans l'étude de Marcato-Romain et al., (2009) contre $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le technosol (T0). Il en est de même pour le Pb (cancérigène possible par le CIRC, groupe 2B) avec 1933 mg.kg^{-1} pour l'étude de Marcato-Romain et al., (2009) contre $36,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le technosol. Un effet génotoxique lié à la présence de HAP a aussi été mis en évidence grâce à ce même test mais ce sol contenait des teneurs en HAP élevées : environ 610 mg.kg^{-1} pour l'étude de Marcato-Romain et al., (2009) contre $2,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour notre technosol.

Les résultats du test « *Vicia faba* micronoyaux » en phase solide sont en accord avec l'ETT relative au BaP calculée précédemment pour caractériser les risques cancérigènes par contact direct avec le technosol. En effet, les résultats calculés, toutes modalités confondues, sont inférieurs au niveau de risque acceptable de $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ et le test de génotoxicité met en évidence une absence d'effet génotoxique. En revanche, l'IRCC calculé quelles que soit les modalités permet de supposer à un risque potentiel pour les ressources en eau souterraines potables alors que le test *Vicia faba* réalisé sur les lixiviats de sol n'a pas montré d'effet génotoxique.

Sur les trois tests réalisés à T0 et à TF seul le test « Inhibition de la croissance racinaire » permet de montrer un potentiel écotoxique du sol à T0. Cette écotoxicité est à nouveau observée à TF excepté après la co-culture de MxG et de trèfle blanc où la longueur des racines d'avoine n'est plus statistiquement différente du témoin négatif permettant de conclure sur l'effet positif de la co-culture sur la qualité du technosol.

En revanche, la contamination du technosol n'induit pas d'effet génotoxique (Test *Vicia faba* micronoyaux) et n'entraîne pas non plus d'inhibition de la biomasse sèche de l'avoine et la navette. Ces résultats peuvent être expliqués par des contaminants présents en trop faible quantité ou à leur faible biodisponibilité.

1.4. Suivi des végétaux

Afin de suivre le développement des deux espèces végétales étudiées en monoculture et en co-culture, plusieurs paramètres ont été suivis au cours du temps : hauteur, teneur en chlorophylle, nombre de rejets supplémentaires, taux de floraison et biomasse aérienne (feuilles, tiges et fleurs) et racinaire pour MxG et teneur en chlorophylle et biomasse aérienne et racinaire pour le trèfle blanc.

1.4.1. Suivi du développement de MxG

- **Hauteur**

Chaque mois la hauteur des plants de MxG a été mesurée ainsi que les teneurs en chlorophylle dans ses feuilles. A la fin de l'expérimentation, après 263 jours de culture, le nombre de rejets a été comptabilisé ainsi que le taux de floraison des tiges. Enfin la biomasse aérienne sèche des parties aériennes de MxG a été déterminée et comparée entre les différentes modalités testées.

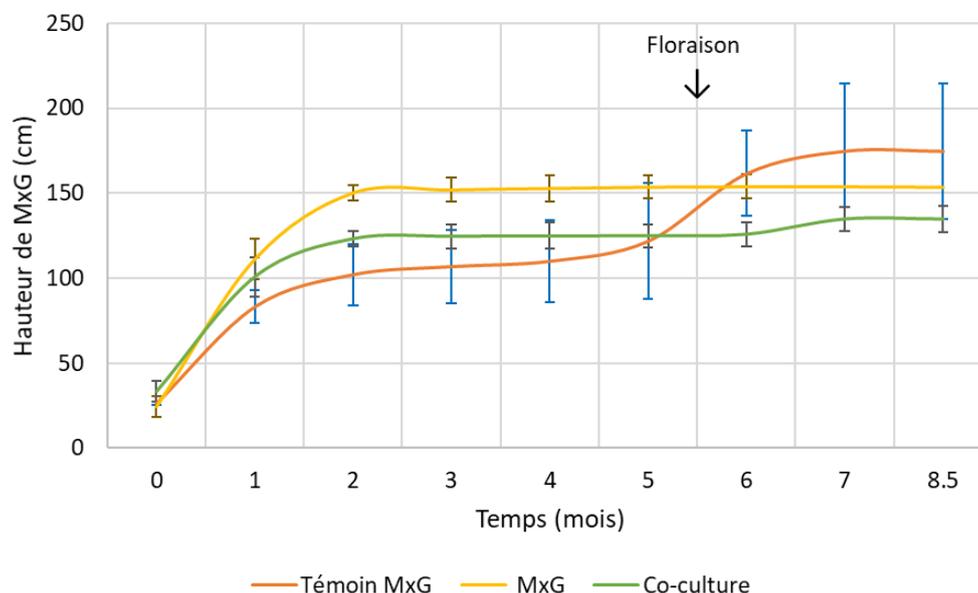


Figure 33 : Évolution de la croissance du rejet principal de MxG (cm) au cours du temps pour chacune des modalités. La période du début de floraison des MxG est indiquée sur le graphique. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes modalités pour un même temps donné ($p > 0,05$)

La hauteur du rejet principal de MxG a été mesurée chaque mois (Figure 33). Les résultats montrent une augmentation rapide de la hauteur de MxG les deux premiers mois de

culture suivie d'une stabilisation de leur taille jusqu'à la fin de l'expérimentation, excepté pour la condition MxG dans le sol standard où la croissance a recommencé à partir du cinquième mois, date à partir de laquelle la floraison de certains plants a eu lieu.

Même s'il semblerait que les plants de MxG dans le technosol soient plus grands que les deux autres conditions jusqu'au cinquième mois de culture, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été montrée, quel que soit la date de mesure considérée. Ces résultats indiquent donc que la croissance de MxG ne semble être ni impactée par la présence de polluants dans le technosol, ni par la présence de trèfle dans la condition co-culture.

• Taux de chlorophylle

Le deuxième paramètre suivi au cours du temps est la teneur en chlorophylle contenue dans les feuilles de MxG. Il s'agit d'un indicateur de l'état physiologique de la plante puisqu'il peut indiquer une carence en éléments nutritifs tels que l'azote, le magnésium, le zinc ou le fer mais également une toxicité induite par la présence de polluants (Jones, 2012a).

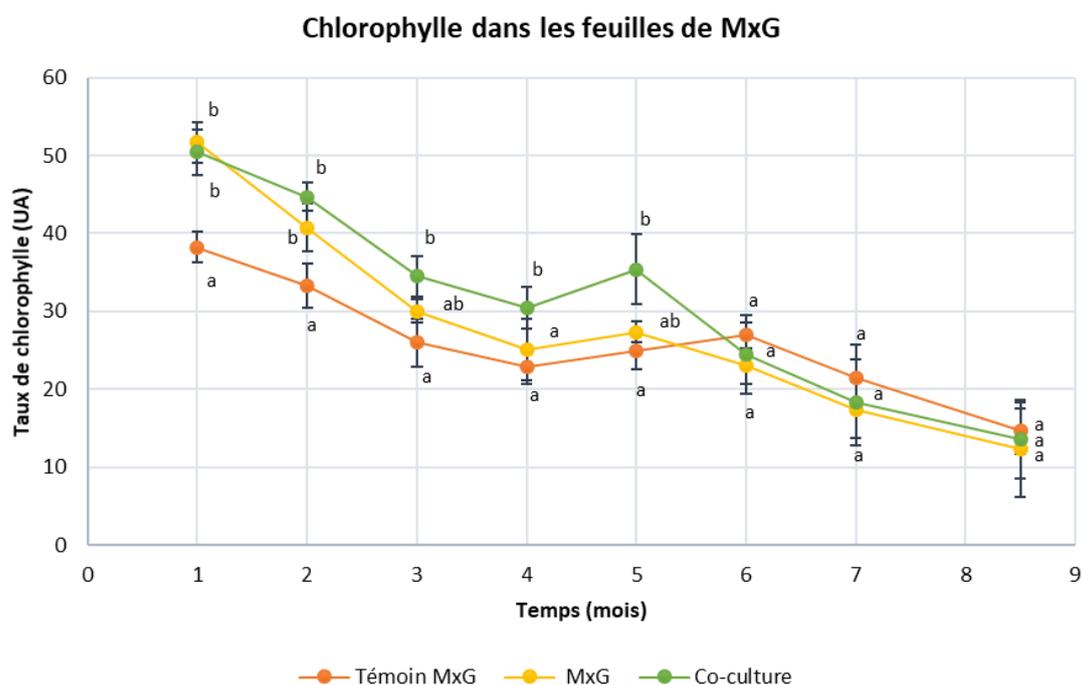


Figure 34 : Teneur en chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de MxG au cours du temps (n=9). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités pour un même temps ($p < 0,05$).

De manière générale, les teneurs en chlorophylle dans les feuilles de MxG décroissent au cours du temps quelle que soit la modalité (MxG dans le sol standard, MxG dans le technosol et MxG en présence de trèfle dans le technosol) (Figure 34).

Les teneurs en chlorophylle ont été comparées entre chaque modalité pour chaque temps. Des différences significatives sont observées pour les cinq premiers mois de culture. En effet, durant les 2 premiers mois, les teneurs en chlorophylle dans les feuilles de MxG se développant dans le technosol que ce soit en monoculture ou en co-culture, sont significativement plus élevées que celles du sol standard. Pour le 3^{ème} et le 5^{ème} mois, seule une différence significative est observée entre MxG dans le sol standard et MxG en co-culture dans le technosol, avec toujours une teneur en chlorophylle plus élevée dans le technosol.

En revanche, à partir du 6^{ème} mois de culture, aucune différence significative n'est observée entre les 3 modalités, les concentrations en chlorophylle décroissent de manière homogène.

Les teneurs en chlorophylle plus faibles dans les feuilles de MxG dans le sol témoin durant les premiers mois de culture pourraient s'expliquer par une carence en nutriments. En effet, de faibles concentrations en azote et en zinc peuvent être liées à une diminution du taux de chlorophylle (Jones, 2012a). Ces éléments sont présents à des concentrations plus faibles dans le sol témoin comparé au technosol (cf. paragraphe 2.2.1). En revanche, la présence de polluants dans le technosol et la présence de trèfle n'ont pas d'impact négatif sur la teneur en chlorophylle dans les feuilles de MxG. A partir du 6^{ème} mois de culture, l'absence de différence significative entre les différentes modalités pourrait s'expliquer par l'entrée en sénescence des végétaux.

- **Nombre de rejets**

Pour chaque condition, le nombre de rejets de MxG supplémentaires, c'est-à-dire les rejets qui se sont développés en plus du rejet « principal » présent à T0, ont été comptés dans chaque pot (Tableau 14).

Tableau 14: Nombre rejets supplémentaires de MxG (moyenne + écart type, n=3) pour chaque condition. Des lettres différentes montrent des résultats significativement différents ($p < 0,05$).

	Nombre de rejets supplémentaires	Statistiques
Témoin MxG	1,7 ± 1,3	a
MxG	7,3 ± 2,0	b
Co-culture	3,7 ± 0,5	ab

Le nombre de rejet de MxG supplémentaire moyen varie entre 1,7 pour la condition témoin à 7,3 pour la condition monoculture sur le technosol. Pour cette dernière modalité, le nombre de rejets supplémentaires qui se sont développés est significativement plus élevé que dans les pots témoins. En revanche, il n'y a pas de différence significative pour le nombre de rejets supplémentaires entre la co-culture et les monocultures (dans le technosol et le sol

standard). Les éléments nutritifs tels que l'azote, le phosphore et le potassium sont à des concentrations plus élevées dans le technosol que dans le sol standard (cf. paragraphe 2.2.1). En effet, la concentration initiale en azote dans le technosol est 3 fois plus importante que dans le sol standard, celle de phosphore 16 fois plus et celle de potassium 21 fois plus élevée. Ces différences entre les concentrations en éléments nutritifs des deux sols pourraient expliquer le fait que MxG se soit mieux développé dans le technosol en monoculture et ainsi que le nombre de rejets soit plus important pour cette condition.

- **Taux de floraison**

Le taux de floraison de MxG a été calculé pour chaque condition en divisant le nombre de fleurs par le nombre de tiges totales de MxG pour dans chaque pot ($\times 100$). Les résultats sont présentés dans la Figure 35.

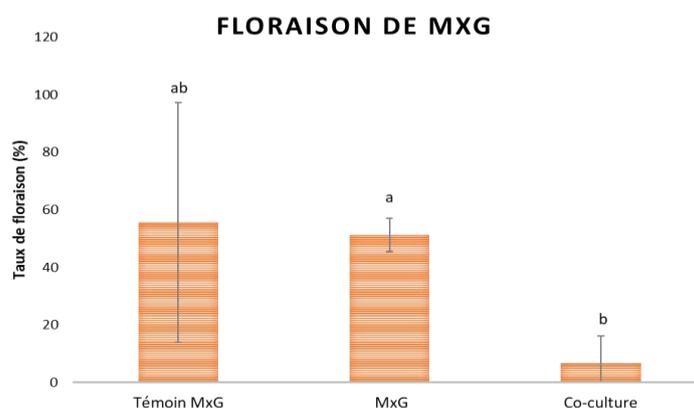


Figure 35 : Taux de floraison moyen de MxG (%) dans le sol standard, le technosol et dans le technosol en présence de trèfle blanc. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les modalités ($p < 0,05$).

En monoculture, il n'y a pas de différence significative entre le taux de floraison de MxG dans le sol standard et dans le technosol. Cependant, le taux de floraison est significativement plus faible en co-culture par rapport à la monoculture de MxG dans le technosol mettant en évidence un impact négatif de la présence de trèfle sur le taux de floraison de MxG. Ceci n'a cependant pas d'incidence sur la reproduction de MxG, ce dernier étant un hybride stérile.

- **Biomasse**

A la fin de l'expérimentation de phytoremédiation, les végétaux ont été sacrifiés afin de mesurer la biomasse des feuilles, des tiges et des fleurs de MxG pour chaque condition (Figure 36).

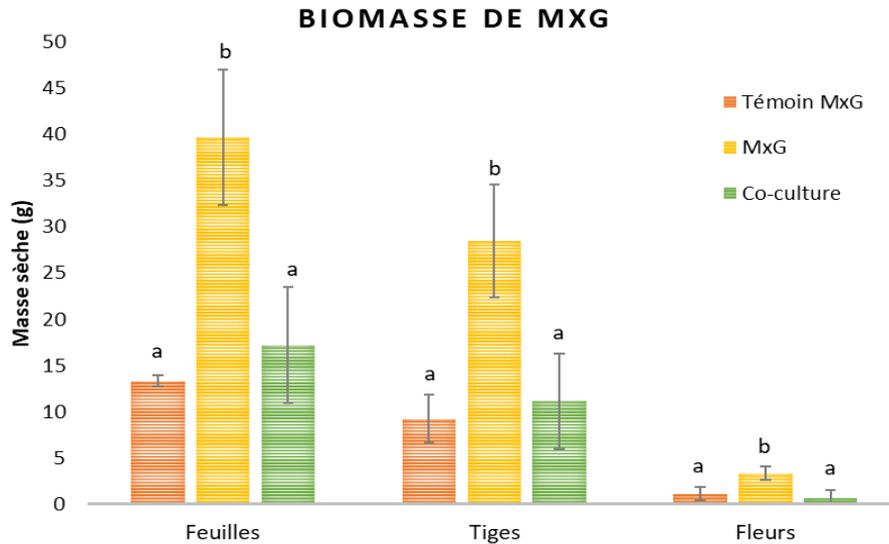


Figure 36 : Masses sèches des feuilles, tiges et fleurs de MxG dans les différentes conditions. Des lettres différentes pour une même partie indiquent des différences significatives entre les modalités ($p < 0,05$).

Les résultats obtenus montrent que, que ce soit pour les feuilles, les tiges ou les fleurs, les biomasses sont significativement plus élevées pour la condition MxG seul dans le technosol comparées à celles de MxG seul dans le sol standard ou MxG en co-culture dans le technosol.

La différence de biomasse entre les deux monocultures (sol standard et technosol) peut s'expliquer par des teneurs en éléments nutritifs (N, P, K) plus élevées dans le technosol que dans le sol témoin (cf. paragraphe 1.1.1). Ces résultats sont, de plus, en accord avec le nombre de rejets supplémentaires significativement plus élevés obtenus en monoculture sur le technosol comparé au sol standard (cf. Tableau 14).

En revanche, la biomasse plus faible de MxG en co-culture comparée à la monoculture dans le même technosol pourrait s'expliquer par une compétition pour les ressources. En effet, cette expérimentation étant réalisée dans un volume de sol contraint, il peut y avoir une compétition entre MxG et le trèfle blanc pour les mêmes éléments nutritifs. A noter tout de même que la biomasse de MxG en co-culture n'est pas différente de celle de MxG dans le sol standard.

D'un point de vue valorisation de la biomasse de MxG, la condition MxG seul dans le technosol semble donc être celle à privilégier si une valorisation est envisagée puisque c'est pour cette condition que la productivité est la plus importante. Il faut tout de même rappeler que cette expérimentation a duré pendant un seul cycle végétal, or la valorisation des tiges de MxG par combustion par exemple, est généralement réalisée qu'à partir de la 2^{ème} année (Gauthier and Somer, 2013). Ces résultats sont à confirmer avec une plantation sur site où la compétition pour les ressources pourrait être plus faible, le volume de sol étant moins contraint.

Les résultats obtenus permettent premièrement de conclure sur la capacité de MxG à se développer sur le technosol, constitué de 2/3 de sédiments excavés de ruisseaux et d'1/3 de sol, ouvrant ainsi une nouvelle voie de valorisation pour les sédiments excavés.

Le technosol, avec ses teneurs élevées en éléments nutritifs, a eu un effet positif sur le développement de MxG. La biomasse de MxG et le nombre de rejets sont ainsi significativement plus importants que dans le sol standard.

La biomasse de MxG, qui est un élément essentiel à considérer pour associer remédiation et valorisation de la biomasse, s'est révélée être significativement plus faible lorsque MxG était en co-culture avec du trèfle blanc comparé à une monoculture dans le technosol ce qui peut être expliqué par un volume de sol restreint puisque l'expérimentation s'est déroulée en mésocosme. En revanche, la biomasse en co-culture n'étant pas significativement différente de celle du sol standard, nous pouvons conclure à une faible concurrence des deux espèces végétales pour les nutriments.

Les résultats obtenus que ce soit en termes de biomasse et de remédiation des HAP en co-culture restent tout de même encourageants et montrent l'intérêt de transposer l'expérimentation *in situ* sur plusieurs années afin de s'affranchir du faible volume de sol.

1.4.2. Suivi du développement du trèfle blanc

- **Taux de chlorophylle**

L'état physiologique du trèfle blanc a également été suivi tout au long de l'expérimentation par des mesures en chlorophylle dans ses feuilles.

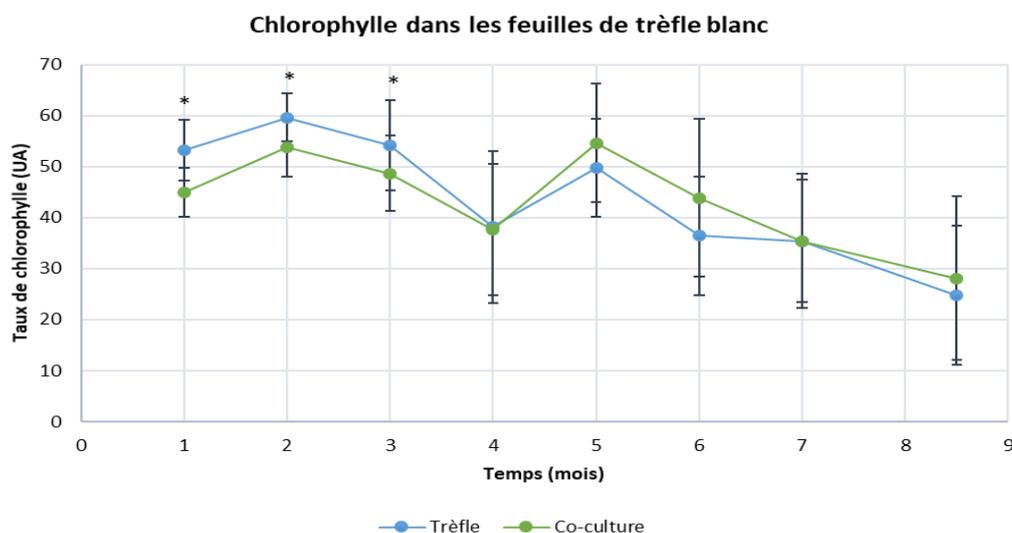


Figure 37 : Taux de chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de trèfle au cours du temps (n= 27). Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre les deux modalités : trèfle seul (en bleu) et trèfle en co-culture avec MxG (en vert) pour un même temps ($p < 0,05$).

De manière générale, les teneurs en chlorophylle dans les feuilles de trèfle blanc décroissent au cours du temps que ce soit pour la condition trèfle en monoculture ou trèfle en co-culture (Figure 37).

Les comparaisons entre ces deux conditions pour un même temps montrent une teneur en chlorophylle significativement plus importante dans les feuilles de trèfle en monoculture comparée à la co-culture pour les trois premiers mois de culture. A partir du quatrième mois, il n'y a plus de différence significative pour les taux de chlorophylle entre les deux conditions. Ces résultats suggèrent un impact négatif de la présence de MxG sur la teneur en chlorophylle du trèfle blanc seulement pour les 3 premiers mois de culture.

- **Biomasse aérienne**

A la fin de l'expérimentation, la biomasse aérienne du trèfle blanc ainsi que la biomasse racinaire totale des deux espèces végétales ont été mesurées.

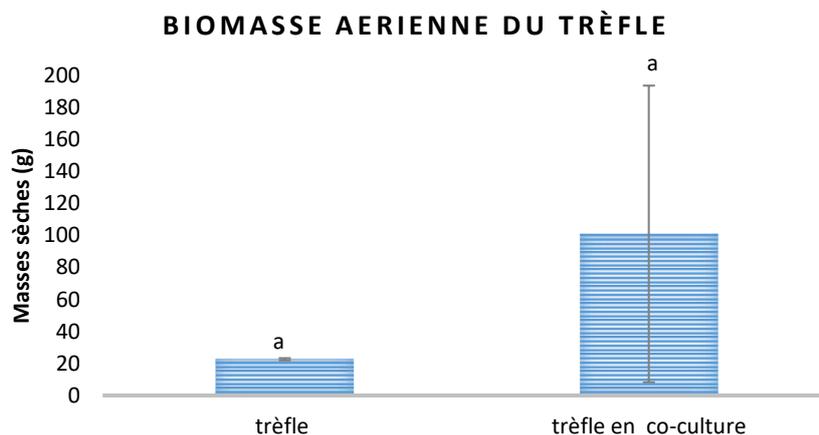


Figure 38 : Masse sèche (g) des parties aériennes du trèfle blanc en monoculture et en co-culture avec MxG. Deux lettres identiques indiquent l'absence de différence significative ($p > 0,05$).

La biomasse sèche des parties aériennes de trèfle blanc a été mesurée à TF pour la condition trèfle seul et trèfle en monoculture (Figure 38). Les résultats obtenus ne mettent en évidence aucune différence statistique entre la biomasse de trèfle lorsqu'il est en monoculture et sa biomasse lorsqu'il est en co-culture avec MxG. Ces résultats suggèrent donc que la présence de MxG n'a pas d'impact négatif sur le développement du trèfle blanc.

- **Biomasse racinaire**

La biomasse racinaire totale a également été mesurée à la fin de l'expérimentation. Quelle que soit la modalité : MxG dans le sol standard, MxG dans le technosol, trèfle blanc dans le technosol et biomasse totale de la co-culture, aucune différence statistique n'a été

montrée ($p > 0,05$). Ces résultats peuvent laisser supposer que la croissance des racines a été limitée par le volume de sol contraint dans les pots. Pour toutes les modalités, les racines se sont développées jusqu'au fond des pots. Ces résultats suggèrent tout de même que le technosol ou la co-culture n'affecte pas le développement racinaire des végétaux.

1.4.3. Teneurs en ETM et en HAP dans les végétaux

A la fin de l'expérimentation, les teneurs en ETM et en HAP ont été mesurées dans les différentes parties de MxG à savoir, les racines, les rhizomes, les feuilles et les tiges pour chaque modalité et dans les parties aériennes et racinaires du trèfle blanc en monoculture et en co-culture afin d'identifier les transferts entre les contaminants du technosol et les végétaux.

1.4.3.1. Teneurs en HAP dans les végétaux

Les concentrations en HAP dans les végétaux ont été mesurées afin de s'assurer qu'il s'agissait bien de biodégradation de ces polluants et non d'accumulation par les végétaux lorsque des dissipations ont été observées dans le technosol.

Aucun HAP n'a pu être détecté dans les différentes parties des plants de MxG et de trèfle blanc en monoculture ou en co-culture. L'absence d'absorption de ces composés dans les végétaux suggère que la principale voie de dissipation des HAP observée dans le technosol est la rhizodégradation tandis que l'absorption est négligeable. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gao and Zhu (2004) et de Meng et ses collaborateurs (2011) qui ont montré respectivement que plus de 99 % ou plus de 99,7 % de la dissipation des HAP dans les sols est causée par la biodégradation favorisée par les végétaux.

1.4.3.2. Teneurs en ETM dans les végétaux

Comme les HAP, les ETM ont également été dosés dans les différentes parties de MxG (Tableau 15) et du trèfle blanc (Tableau 16) afin de déterminer la stratégie d'absorption des ETM adoptée par les deux espèces végétales vis-à-vis du technosol.

- ***Miscanthus x giganteus***

Tableau 15 : Concentrations en ETM (mg.kg^{-1} de matière sèche) mesurée dans les différentes parties de MxG en fonction des modalités testées. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les 3 conditions pour un ETM donné et une partie du végétal considérée ($p < 0,05$, $n=3$).

	Modalité	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Tiges	MxG Témoin	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	29.2 ± 10.7 a
	MxG seul	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	37.3 ± 9.4 a
	MxG co-culture	<LQ	0.3 ± 0.1	<LQ	3.6 ± 2.4	<LQ	<LQ	68.5 ± 39.2 a
Feuilles	MxG Témoin	<LQ	<LQ	2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.3 a	<LQ	<LQ	16.7 ± 1.8 a
	MxG seul	<LQ	<LQ	<LQ	2.52 ± 0.6 a	<LQ	<LQ	20.9 ± 3.07 a
	MxG co-culture	<LQ	0.3 ± 0.1	<LQ	3.6 ± 2.4 a	<LQ	<LQ	68.5 ± 39.2 a
Racines	MxG Témoin	<LQ	<LQ	<LQ	4.5 ± 1.5 a	<LQ	2.9 ± 1.3a	24.8 ± 14.3 a
	MxG seul	<LQ	0.3 ± 0.03a	5.1 ± 0.7a	7.5 ± 0.3 ab	3.3 ± 0.3 a	1.6 ± 0.1a	22.55 ± 1.9 a
	MxG co-culture	<LQ	0.4 ± 0.1a	5.9 ± 1.1a	11.2 ± 2.1 b	4.6 ± 1.8 a	2.5 ± 1.1a	48.7 ± 12.6 a
Rhizome	MxG Témoin	<LQ	0.3 ± 0.1	3.3 ± 0.5	4.5 ± 0.7a	4.2 ± 0.7a	3.5 ± 0.7a	12.3 ± 1.7 a
	MxG seul	<LQ	<LQ	<LQ	4.6 ± 0.2a	3.5 ± 0.6a	1.0 ± 0.2a	14.7 ± 0.4 a
	MxG co-culture	<LQ	<LQ	<LQ	6.2 ± 2.2a	<LQ	2.6 ± 2.7a	21.6 ± 11.7 a

Pour les tiges de MxG, seul le zinc a pu être quantifié dans les 3 modalités. Les résultats indiquent une absence de différence significative entre les concentrations en zinc dans les tiges s'étant développées dans le sol standard non contaminé comparé à celles des tiges du technosol (en mono ou en co-culture). Le technosol contaminé en zinc n'induit donc pas de transfert en cet élément dans les tiges de MxG qu'il soit en monoculture ou en co-culture, hormis pour les besoins physiologiques de la plante, permettant ainsi la valorisation des tiges sans risque de contamination de la biomasse par des ETM.

Concernant les feuilles, seul le cuivre et le zinc ont pu être quantifiés dans les 3 modalités, les 5 autres ETM se trouvant en dessous de la limite de quantification. Que ce soit pour le cuivre ou le zinc, aucune différence significative n'est montrée entre les 3 modalités suggérant ainsi l'absence d'accumulation des ETM dans les feuilles de MxG lorsqu'il se développe sur le technosol, en monoculture ou en co-culture.

Pour les racines, il n'était pas possible de séparer celles de MxG de celles du trèfle blanc dans la condition co-culture, les racines des deux espèces ont donc été analysées ensemble. Pour cette partie, une concentration plus élevée en cuivre est retrouvée pour la condition co-culture comparé au sol standard, alors qu'aucune différence n'est constatée entre la

concentration en cuivre dans les racines de MxG ayant été cultivées dans le sol standard comparé au technosol, en monoculture. La concentration en cuivre plus élevée en co-culture suggère une absorption de cuivre dans les racines de trèfle blanc.

Dans les rhizomes, du cuivre, du nickel, du plomb et du zinc ont pu être dosés dans toutes les modalités excepté MxG en co-culture pour le Ni. Pour ces ETM, aucune différence statistique n'est observée entre les modalités, suggérant une absence de transfert des ETM du technosol dans les rhizomes de MxG que ce soit en monoculture ou en co-culture.

Les résultats obtenus dans cette étude ne montrent pas de transfert d'ETM du technosol vers les différentes parties de MxG permettant de conclure quant à la non-contamination de la biomasse végétale. MxG peut donc être caractérisé comme une plante « exclusive » pour les ETM l'absence de contamination de sa biomasse aérienne et notamment des tiges permettra d'envisager leur valorisation, après vérification de ces paramètres lorsque la plantation et la culture sur site aura lieu.

- **Trèfle blanc**

Le Tableau 16 présente les concentrations en ETM mesurées dans les parties aériennes et les racines du trèfle blanc s'étant développé dans le technosol que ce soit en monoculture ou en co-culture.

Tableau 16 : Concentrations en ETM (mg.kg⁻¹ de matière sèche) mesurée dans les parties aériennes et les racines du trèfle blanc en monoculture ou en co-culture dans le technosol. Des lettres identiques indiquent l'absence de différences statistiquement significatives entre les 2 conditions pour un ETM donné et une partie du végétal considérée (p < 0,05, n=3).

		As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Parties aériennes	Trèfle seul	<LQ	<LQ	<LQ	8.7 ± 0.5 a	<LQ	<LQ	44.2 ± 4.8 a
	Trèfle co-culture	<LQ	<LQ	<LQ	10.1 ± 0.6 a	<LQ	2.1 ± 1.8	37.1 ± 3.3 a
Racines	Trèfle seul	<LQ	<LQ	3.4 ± 1.2 a	11.8 ± 0.9 a	3.7 ± 1.0 a	1.4 ± 0.4 a	58.0 ± 3.1 a
	Trèfle + MxG	<LQ	0.4 ± 0.1	5.9 ± 1.1 a	11.2 ± 2.1 a	4.6 ± 1.8 a	2.5 ± 1.1 a	48.7 ± 12.6 a

Pour les parties aériennes, seules les concentrations en cuivre et en zinc ont pu être quantifiées dans les deux modalités. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les concentrations en ces deux ETM que ce soit en monoculture ou en co-culture. Un

plus grand nombre d'ETM a en revanche pu être quantifié dans les racines du trèfle blanc, il s'agit du chrome, du cuivre, du nickel, du plomb et du zinc. Comme pour les parties aériennes, aucune différence statistique n'est montrée entre les concentrations en ces ETM entre la monoculture et la co-culture. Ces résultats permettent donc de conclure que la présence de MxG n'a pas eu d'influence sur la teneur en ETM mesurées dans les parties aériennes et les racines du trèfle blanc. Puisque le trèfle blanc n'a pas été cultivé sur un sol standard contaminé, il n'est pas possible de conclure sur la présence ou l'absence de transfert d'ETM du technosol vers le trèfle à partir de nos résultats. Cependant les concentrations peuvent être comparées avec celles de la littérature. Bidar et ses collaborateurs (2007) ont dosés le plomb, le cadmium et le zinc dans les parties aériennes et dans les racines du trèfle blanc dans un sol non contaminé (contenant $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Cd, $34,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Pb et $61,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Zn) et dans un sol contaminé avec $25,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Cd, 1222 mg.kg^{-1} de Pb et 1301 mg.kg^{-1} de Zn. Seul le zinc a pu être quantifié parmi ces 3 ETM dans les parties aériennes du trèfle blanc dans le sol non contaminé avec une concentration mesurée de $27,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ alors que $96,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Zn a été mesuré pour le sol contaminé ainsi que des concentrations en Cd de 9 mg.kg^{-1} et des concentrations en Pb de $35,8 \text{ mg.kg}^{-1}$. Nos valeurs pour les parties aériennes de trèfle (44.2 ± 4.8 et $37.1 \pm 3.3 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le zinc en monoculture et en co-culture) se rapprochent donc plus de celles obtenus par Bidar et ses collaborateurs pour leur sol non contaminé même si elles sont plus élevées.

1.4.3.3. Transfert d'ETM vers les végétaux

Afin de déterminer s'il y a transfert et accumulation d'ETM dans les végétaux, des facteurs de bioconcentrations (BCF) sont calculés en faisant le rapport entre la concentration en un ETM considéré dans la plante (tiges, feuilles, racines ou rhizomes) et la concentration en ce même ETM dans le sol. Ainsi, si un ratio est supérieur à 1, il y a accumulation de l'ETM dans la plante. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17 pour MxG et dans le Tableau 18 pour le trèfle blanc.

RÉSULTATS & DISCUSSION

Tableau 17 : Facteurs de bioconcentration (BCF) calculés pour chacun des ETM étudiés dans les tiges, les feuilles, les racines et les rhizomes de MxG pour chaque modalité (dans le sol standard, en monoculture dans le technosol ou en co-culture dans le technosol). Les valeurs en rouge indiquent des ratios supérieurs à 1 alors que « ND : Non Déterminé » est utilisé pour indiquer que le BCF n'a pas pu être calculé en raison d'une concentration en ETM inférieure à une limite de quantification.

		BCF ([plante] / [sol])						
		As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Tiges	MxG Témoin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,5 ± 0,6
	MxG seul	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2 ± 0,05
	MxG co-culture	ND	0,6 ± 0,2	ND	0,12 ± 0,08	ND	ND	0,39 ± 0,22
Feuilles	MxG Témoin	ND	ND	0,3 ± 0,03	ND	ND	ND	2,9 ± 0,3
	MxG seul	ND	0,7 ± 0,1	ND	0,08 ± 0,02	ND	ND	0,11 ± 0,02
	MxG co-culture	ND	ND	ND	0,1 ± 0,05	ND	ND	0,12 ± 0,05
Racines	MxG Témoin	ND	ND	ND	ND	ND	0,2 ± 0,1	4,4 ± 2,5
	MxG seul	ND	0,5 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,01
	MxG co-culture	ND	0,7 ± 0,2	0,1 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,28 ± 0,07
Rhizome	MxG Témoin	ND	ND	0,4 ± 0,06	ND	ND	0,3 ± 0,05	2,2 ± 0,3
	MxG seul	ND	ND	ND	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00
	MxG co-culture	ND	0,26 ± 0,03	ND	0,17 ± 0,02	ND	0,08 ± 0,09	0,08 ± 0,01

Les résultats montrent que seuls des ratios supérieurs à 1 ont été obtenus pour le zinc dans chacune des parties de MxG. Cependant, dans ce cas il ne s'agit pas d'accumulation puisque le sol standard est un sol non contaminé, ces valeurs montrent que les concentrations présentes dans la plante sont naturellement supérieures à celles présentes dans le sol standard qui présente une faible concentration en zinc (5,7 mg.kg⁻¹). L'absorption correspond donc dans ce cas aux besoins physiologiques de la plante.

Par ailleurs, tous les BCF calculés dans le technosol, quel que soit l'ETM ou la partie de la plante considérée sont inférieurs à 1, montrant une absence d'accumulation des ETM dans MxG. Ces résultats sont en accord avec l'absence de transfert d'ETM montré par la comparaison de ces contaminants contenus dans la plante s'étant développée dans le technosol et dans le sol standard.

Tableau 18 : Facteurs de bioconcentration (BCF) calculés pour chacun des 7 ETM étudiés dans parties aériennes et les racines de trèfle blanc en monoculture ou en co-culture dans le technosol. La mention « ND » est utilisée pour indiquer que le BCF n'a pas pu être calculé en raison d'une concentration en ETM inférieure à une limite de quantification.

		BCF ([plante] / [sol])						
		As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Parties aériennes	Trèfle seul	ND	ND	ND	0.30 ± 0.02	ND	ND	0.26 ± 0.03
	Trèfle co-culture	ND	ND	ND	0.34 ± 0.02	ND	0.05 ± 0.04	0.21 ± 0.02
Racines	Trèfle seul	ND	ND	0.06 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.34 ± 0.02
	Trèfle co-culture	ND	0.66 ± 0.2	0.10 ± 0.02	0.38 ± 0.07	0.11 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.28 ± 0.07

Les résultats des BCF calculés pour le trèfle blanc n'indiquent aucune valeur supérieure à 1, quel que soit l'ETM considéré ou la condition (monoculture ou co-culture) montrant donc une absence d'accumulation des ETM dans les parties aériennes et dans les racines du trèfle blanc. Les résultats concordent avec ceux de Bidar et ses collaborateurs (2007), qui ont en effet, également montré une absence d'accumulation des ETM et notamment du Cd, du Pb et du Zn dans les parties aériennes du trèfle blanc alors que le sol de l'étude était contaminé avec des concentrations en ETM nettement plus importantes que celles du technosol (25,9 mg.kg⁻¹ de Cd, 1222 mg.kg⁻¹ de Pb et 1301 mg.kg⁻¹ de Zn). L'absence d'accumulation d'ETM par le trèfle blanc avait été pris en considération lors de la sélection de l'espèce végétale à utiliser en co-culture avec MxG. En effet, le choix s'est porté sur une espèce qui d'un point de vue phytoremédiation avait déjà montré une dissipation des HAP mais une absence d'accumulation des ETM, qui dans le cas contraire aurait nécessité une gestion particulière et adaptée de la biomasse végétale contaminée.

Les résultats obtenus permettent donc de conclure quant à l'absence de transfert et d'accumulation d'ETM provenant du technosol par MxG et le trèfle blanc, permettant de classer ces deux espèces végétales comme des « exclusives » (Baker, 1981) et confirmant les études précédentes menées sur le trèfle blanc . La valorisation de la biomasse de MxG est facilitée tout en permettant, dans le cadre d'une co-culture, de ne pas avoir à se préoccuper de la biomasse de trèfle blanc qui aurait risqué de remobiliser les ETM si une accumulation de ces contaminants avait été montrée.

1.4.4. Analyse de la combustion de MxG

Des analyses de combustion ont été réalisées sur les tiges de MxG afin de calculer deux indices : le pourcentage de dioxyde de silicium (SiO₂) ainsi que le ratio B/A, qui sont utilisés comme indicateur de scories et d'encrassement des chaudières, problème inhérent à la combustion de biomasse (Tableau 19). En effet, l'encrassement de la chaudière, qu'elle soit causée par la fusion des cendres ou le dépôt excessif de cendres, oblige à des opérations de maintenance plus fréquentes nécessitant des arrêts de production et diminuant par là même la rentabilité de la production énergétique à partir de la biomasse.

Tableau 19 : Indices de combustion calculés à partir des analyses réalisées sur les tiges de MxG pour deux répliques des 3 conditions. La couleur verte indique une tendance naturelle à l'encrassement faible, modérée en orange et élevée en rouge.

	SiO ₂ (%)	B/A
Témoin MxG 1	13.49	0.57
Témoin MxG 2	15.39	0.61
MxG 1	10.40	0.94
MxG 2	10.34	0.69
Co-culture 1	8.07	0.85
Co-culture 2	9.71	1.08

Le premier indicateur calculé est le pourcentage en dioxyde de silicium. La teneur en silice dans les cendres est en effet corrélée à la fraction de cendres qui forme des scories dans les brûleurs. Les pourcentages de SiO_2 calculés varient entre 8,07 % pour le premier réplica en co-culture à 15,39 % pour le deuxième réplica dans le sol standard. Toutes ces valeurs sont inférieures à 20 %, indiquant une tendance à l'encrassement faible (Garcia-Maraver et al., 2017). Ce résultat montre que quelle que soit la modalité, pour le sol standard ou le technosol, l'indice calculé est favorable à l'utilisation des tiges de MxG en combustion d'après les teneurs en silice.

Des pourcentages similaires ont été retrouvés dans d'autres types de biomasse telles que dans l'écorce de hêtre avec un indice de 12,4 %, dans l'écorce d'eucalyptus (10,0 %), dans le bois d'olivier (10,2 %) et dans la sciure de pin (9,7 %) (Garcia-Maraver et al., 2017). Selon ces mêmes auteurs, un pourcentage plus élevé en SiO_2 a été reporté pour *Miscanthus*, sans précision de l'espèce, avec un indice de 56,42 % et un autre de 64,31 % permettant donc de catégoriser cette biomasse avec une tendance naturelle à l'encrassement « élevée ».

Le deuxième indice calculé est le ratio B/A. Il s'agit du rapport des composés basiques aux composés acides, il est calculé pour prédire le dépôt des cendres. Ce ratio est compris entre 0,57 pour le témoin et 1,08 pour la co-culture. Selon Garcia-Maraver et ses collaborateurs (2017), la tendance à la scorification et à l'encrassement est catégorisée comme moyenne pour un ratio B/A compris entre 0,5 et 1 alors qu'elle est catégorisée comme élevée pour un ratio compris entre 1 et 1,75. Excepté pour le deuxième échantillon de la co-culture catégorisé comme élevé, la tendance à l'encrassement pour les échantillons de tiges de MxG peut être considéré comme modérée. Les données rapportées par Garcia-Maraver et ses collaborateurs montrent un rapport B/A de 0,71 et de 0,40 pour *Miscanthus* positionnant cette biomasse comme une tendance à l'encrassement faible ou modérée.

Pour l'écorce de hêtre, l'écorce d'eucalyptus, le bois d'olivier et la sciure de pin, des ratio B/A supérieurs à 6 ont été reportés, classant ainsi ces biomasses comme à tendance à l'encrassement extrêmement élevée (Garcia-Maraver et al., 2017).

Ces résultats préliminaires sont intéressants et les analyses de combustion devront être reconduites sur site quand les végétaux auront atteint leur optimum de croissance puisque c'est généralement qu'à partir de la troisième année de culture que la biomasse de MxG est valorisée. Par ailleurs, ces résultats ne montrent pas de contre-indication à une valorisation par combustion. De plus, une co-combustion peut être réalisée avec du bois afin de corriger ces tendances (Nsanganwimana et al., 2014). A noter également que l'absence de contamination de la biomasse de MxG se développant sur le technosol en monoculture ou en co-culture facilite la valorisation de la biomasse. De plus, d'autres voies de valorisation peuvent également être envisagées telles l'utilisation des tiges en méthanisation, pour du paillage horticole, de la litière pour animaux, pour la réalisation de biomatériaux, etc.

1.5. Suivi de la microflore des sols

Afin de déterminer l'influence des espèces végétales en monoculture et en co-culture sur la microflore du sol et également de comparer les deux sols étudiés, des analyses de la densité et de la diversité microbienne ont été réalisées au début (T0) et à la fin de l'expérimentation (TF).

1.5.1. Analyse de la densité microbienne par qPCR

1.5.1.1. Analyse de la densité bactérienne

Le nombre de gène de l'ADNr 16S permettant d'estimer la densité des bactéries dans un sol a été quantifié par qPCR à T0 et TF pour chaque modalité.

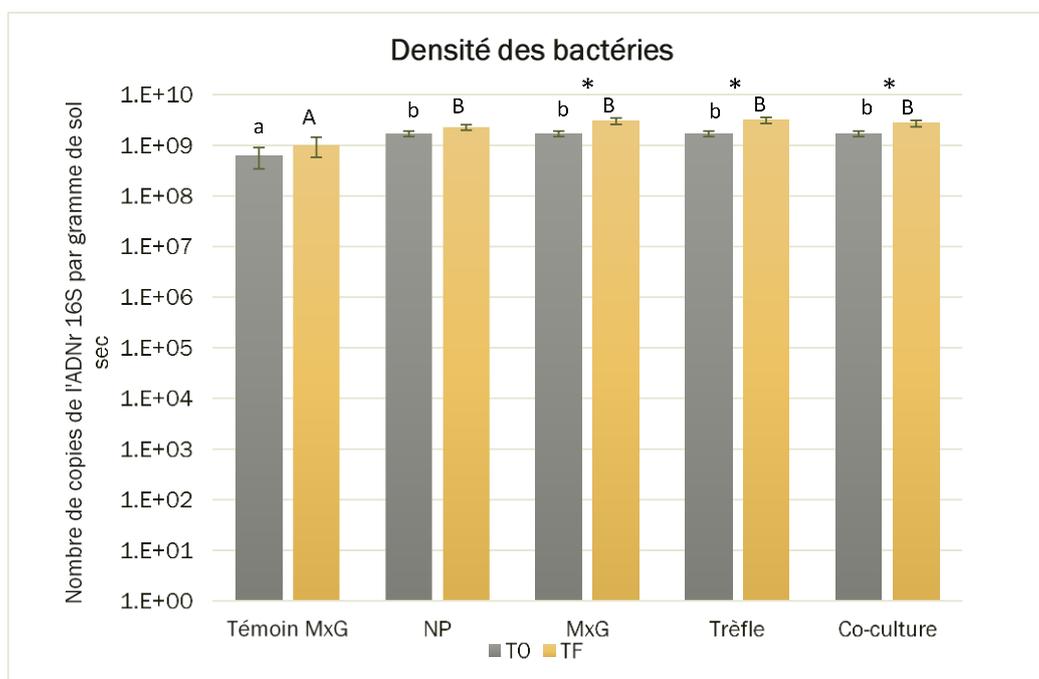


Figure 39 : Nombre de copies de l'ADNr 16S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en gris) et à TF (en jaune). Des lettres minuscules différentes permettent de montrer les différences entre les modalités à T0 alors que les majuscules permettent de montrer les différences entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$, $n=6$).

Les résultats montrent, premièrement, un nombre moyen de copies de gènes à T0 allant de $6,2 \cdot 10^8$ pour le sol standard à $1,7 \cdot 10^9$ pour le technosol ainsi qu'une variation à TF entre $1,0 \cdot 10^9$ pour le sol standard planté avec MxG et $3,1 \cdot 10^9$ pour le technosol planté avec le trèfle blanc. Les analyses statistiques ont permis de montrer que le nombre de copies du gène 16S est significativement plus élevé dans le technosol que dans le sol standard que ce soit à T0 ou à TF, traduisant une densité de bactéries plus élevée dans le technosol. Ces résultats

peuvent s'expliquer par le fait que le sol standard soit un sol artificiel ayant été constitué juste avant le début de l'expérimentation alors que le technosol est composé de sédiments et de sol « anciens » possédant déjà leur pool de microorganismes.

Lorsque l'on compare le nombre de copies d'ADNr 16S, entre les différentes conditions à T0 et à TF, une augmentation significative est observée pour toutes les conditions plantées sur le technosol contrairement à la condition non plantée et au sol standard planté avec MxG. La présence de trèfle blanc ou de MxG en monoculture et en co-culture a donc permis d'augmenter significativement la densité de bactéries dans le technosol comparée au début de l'expérimentation. Cette observation peut s'expliquer par la présence d'exsudations racinaires par les végétaux comme la quercétine et la rutine identifiées chez MxG par Técher et ses collaborateurs (2011). Ces molécules, entre autres, représentent une source importante de carbone et d'énergie qui va pouvoir être assimilée par les microorganismes rhizosphériques conduisant à une stimulation de leur croissance et de leur activité (Baudoin et al., 2003; Técher et al., 2011). En effet, un gramme de sol rhizosphérique contiendrait 10 à 100 fois plus de microorganismes qu'un gramme de sol non végétalisé (Gerhardt et al., 2009). Même si aucune différence significative n'a été observée pour la condition MxG sur le sol standard, le nombre moyen de copies de l'ADNr 16S par gramme de sol augmente de $6,2 \cdot 10^8$ à T0 à $1,7 \cdot 10^9$ à TF, cette augmentation n'est cependant pas suffisante pour être significative.

1.5.1.2. Analyse de la densité fongique

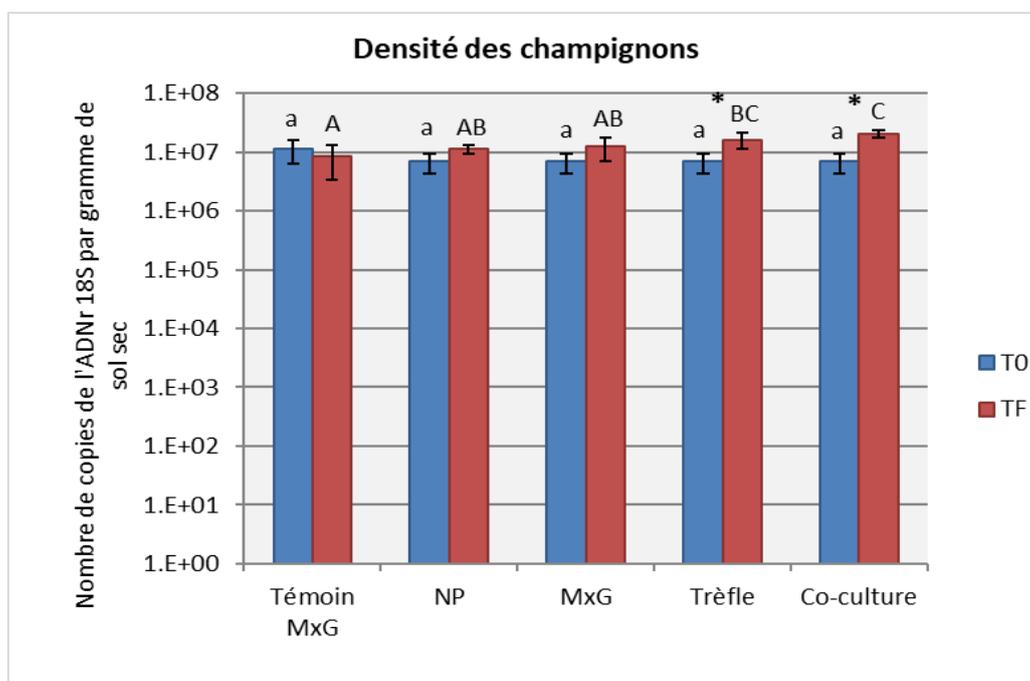


Figure 40 : Nombre de copies de l'ADNr 18S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en bleu) et à TF (en rouge). Des lettres minuscules différentes permettent de montrer les différences entre les modalités à T0 alors que les majuscules permettent de montrer les différences entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$, $n=6$).

A T0, le nombre de copies de l'ADNr 18S ne diffère pas significativement entre le technosol et le sol standard, impliquant une densité de champignons équivalente entre les deux sols étudiés.

A TF, le nombre de copies de gènes ne diffère pas entre le sol standard planté avec MxG, le technosol non planté et le technosol planté avec MxG. Ces résultats mettent donc en évidence que la culture MxG ne permet pas d'augmenter significativement la densité de champignons dans le sol standard ou le technosol dans ces conditions.

Pour la condition trèfle seul, le nombre de copies de l'ADNr 18S à TF est significativement plus élevé que pour la condition MxG dans le sol standard mais n'est pas différent de la condition technosol non planté ou technosol + MxG ou de la co-culture. Toutefois, une augmentation significative du nombre de copies de gènes fongiques est observée pour le trèfle entre T0 et TF, mettant en évidence la capacité du trèfle à augmenter la densité de champignons dans le sol même si cette augmentation n'est pas assez importante pour être différente du technosol non planté et du technosol après plantation de MxG.

Concernant la condition co-culture, une augmentation significative du nombre de copies d'ADNr 18S est observé entre T0 et TF. De plus, le nombre de gènes pour la condition co-culture à TF est supérieur à toutes les autres conditions exceptées pour le trèfle seul. Il semblerait donc que le trèfle blanc soit capable d'augmenter la densité de champignons dans le technosol et que cette augmentation est d'autant plus importante que lorsqu'il est en association avec MxG.

Les légumineuses comme le trèfle blanc induisent une augmentation de la biodiversité et de l'activité des microorganismes en raison principalement des spécificités de leur environnement racinaire comportant des exsudats riches en azote, du phosphore mobilisé (Schneider, 2015). De plus, le fait que la co-culture entraîne une augmentation de la densité fongique d'autant plus importante que le trèfle seul peut s'expliquer par un impact positif de la diversité végétale. Des études ont déjà montré que la diversité des espèces végétales cultivées permettaient de contribuer à une augmentation de la diversité des microorganismes du sol (Gao et al., 2012) et à une augmentation de l'activité microbienne des sols (Lange et al., 2015) comparée à des monocultures.

1.5.1.3. Analyse de la densité des bactéries dégradantes

Le dernier gène étudié est un gène spécifique permettant de cibler des bactéries Gram positif intervenant dans la première étape de dégradation des HAP (Cébron et al., 2008). L'évolution du nombre de copies de ce gène dans les sols a été suivi au cours du temps (Figure 41).

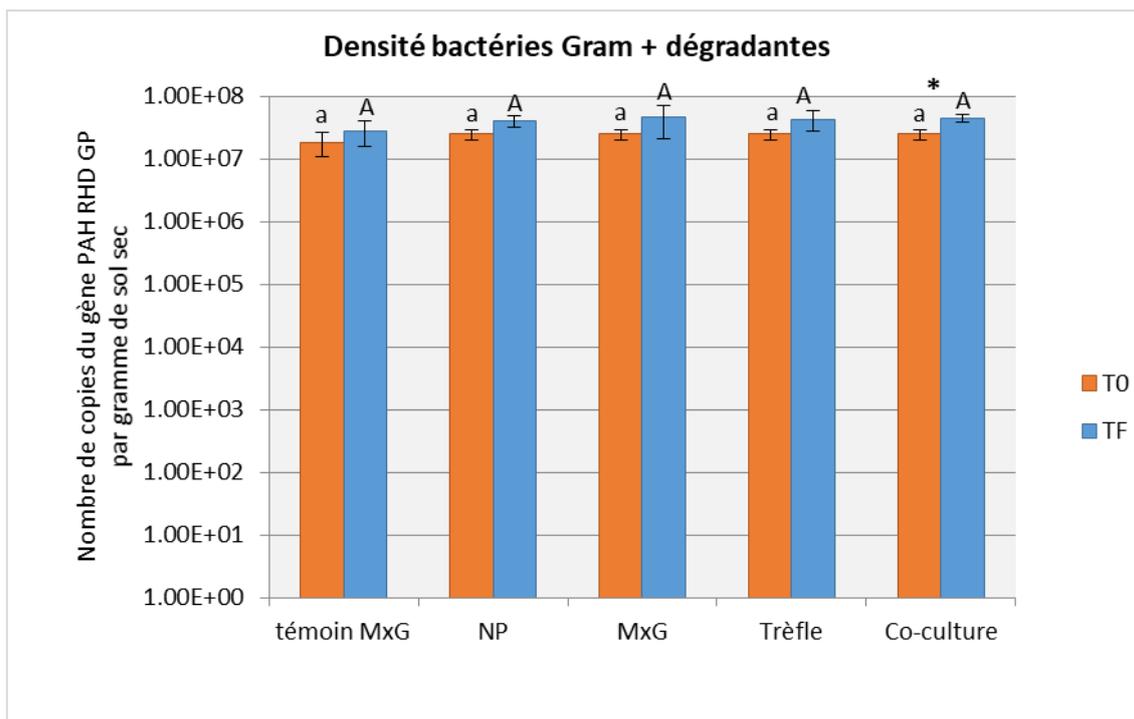


Figure 41 : Nombre de copies du gène PAH-RHD α GP par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en orange) et à TF (en bleu). Des lettres minuscules différentes permettent de montrer les différences entre les modalités à T0 alors que les majuscules permettent de montrer les différences entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$, $n=6$).

Les résultats obtenus montrent un nombre de copies du gène PAH-RHD α GP statistiquement équivalent entre le sol standard et le technosol à T0 et entre ces deux sols, quelle que soit la modalité à TF. Ces résultats montrent, premièrement, qu'il existe des bactéries potentiellement capables de dégrader les HAP dans le sol standard et le technosol, à une densité équivalente. La présence de ces bactéries dégradantes initialement présentes dans le technosol peut être expliquée par la présence de HAP mais également parce que les molécules composant la matière organique possèdent des similarités structurales avec les HAP, ce qui pourrait également expliquer la présence de ces bactéries dans le sol standard non contaminé qui proviendraient certainement de la tourbe utilisée pour constituer le sol standard. Des résultats similaires ont été observés par Mazziotti (2017) dans un sol standard non contaminé même si le nombre de gènes détectés était de l'ordre de 1.10^6 copies par gramme de sol sec contre $1,8.10^7$ pour notre étude. Cette différence peut être expliquée par le pourcentage de tourbe différent apporté au sol standard : 10 % pour Mazziotti (2017) contre 15 % dans cette étude.

Le fait qu'une densité de bactéries dégradante similaire soit trouvée dans le technosol et le sol standard à T0 peut venir du fait de la faible contamination du technosol par des HAP ou d'une faible biodisponibilité, ce qui serait en accord avec les résultats obtenus pour les tests de génotoxicité et d'écotoxicité (« émergence et croissance de végétaux supérieurs ») (cf.

paragraphe 1.3) puisqu'il a été montré que le facteur principal dans la stimulation des microorganismes dégradant est la présence de polluants (Muratova et al., 2009).

En comparant les résultats obtenus à TF, aucune différence statistique n'est observée quelle que soit la condition, traduisant une densité de bactéries dégradantes équivalente dans le sol standard après plantation de MxG ou dans toutes les conditions plantées ou non plantées du technosol. Toutefois, une augmentation significative du nombre de copies de ce gène est observée entre T0 et TF pour la condition co-culture uniquement. Ce résultat met en évidence une stimulation significative de la population de bactéries dégradantes après la culture simultanée de MxG et de trèfle blanc sur une période de 263 jours. De plus, ce résultat pourrait permettre d'expliquer la dissipation plus efficace de certains HAP comme le pyrène et l'anthracène en co-culture par rapport à la monoculture de MxG et également la diminution de l'écotoxicité du technosol observé à l'aide du test « inhibition de la croissance racinaire ».

Cette stimulation de bactéries dégradantes après la co-culture est donc encourageante et devrait être étudiée sur du plus long terme.

L'analyse de la densité des microorganismes montre que la culture des végétaux dans le technosol, que ce soit en monoculture ou en co-culture, a permis d'augmenter significativement la densité de bactéries. En revanche, seul le trèfle blanc, en monoculture ou en co-culture, a permis d'augmenter la densité des champignons dans le technosol, de façon d'autant plus importante pour la condition co-culture, montrant ainsi l'impact positif de l'association entre MxG et le trèfle blanc sur la densité des champignons du sol. Enfin, une densité de bactéries dégradantes similaire a été observée dans le sol standard et le technosol mais la co-culture a permis d'augmenter significativement le nombre de copies de gènes de dégradation étudié, mettant en évidence un effet positif et encourageant de la co-culture pour l'amélioration de la phytoremédiation des HAP.

1.5.2. Analyse de la diversité microbienne par métagénomique

Les communautés bactériennes et fongiques des sols ont été analysées par métagénomique avant (T0) et après la culture d'espèces végétales (TF) afin de déterminer leur composition et de déterminer l'influence des espèces végétales en monoculture et en co-culture sur la diversité microbienne des sols.

Le séquençage simultané des échantillons d'ADN génomique extraits à partir des différents sols (sol standard et technosol) en fonction des différentes modalités a permis d'obtenir 51 909 séquences d'ADNr 16S pleine longueur assemblées à 97 % d'identité nucléique et 58 836 séquences 18S pleine longueur assemblées également à 97 % d'identité. L'affiliation

taxonomique a pu être réalisée au niveau du Phylum et du Genre et l'indice de Shannon a été calculé.

1.5.2.1. Analyse de la diversité bactérienne

La proportion des différents phylums bactériens sont représentés dans la Figure 42 pour le sol standard (à T0 et à TF) et dans la Figure 43 pour les différentes modalités du technosol afin de mieux comparer les conditions d'un même sol. Les abondances relatives de chaque phylum sont présentées dans le Tableau 20, pour toutes les modalités confondues des deux sols afin de pouvoir toutes les comparer entre elles.

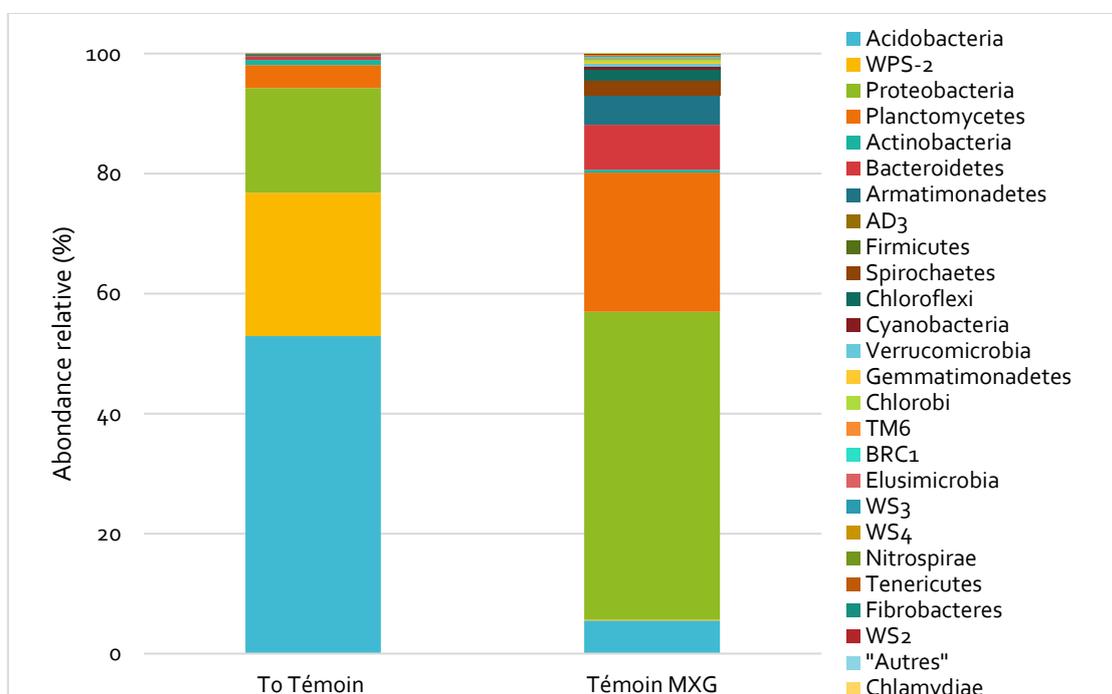


Figure 42 : Variations dans l'abondance relative (%) des phylums bactériens dans le sol standard à T0 (T0 témoin) et après culture de MxG (TF : Témoin MxG).

En comparant les différents phylums bactériens présents dans le sol standard à T0 et après culture de MxG, une forte variation d'abondance est constatée. En effet, les phylums bactériens majoritaires trouvés à T0 sont Acidobacteria (52,89 %), WPS-2 (23,93 %) et Proteobacteria (17,42 %). Ces 3 phylums couvrent 94,24 % de la diversité de la communauté bactérienne à T0. En revanche, après un cycle de culture de MxG, les phylums principalement trouvés sont Proteobacteria (51,30 %), Planctomycetes (23,17 %) et Bacteroidetes (7,51 %). Ces 3 phylums couvrent 81,98 % de la diversité de la communauté bactérienne. De plus une variation importante en nombre de phylum différents est observée. A T0, 9 phylums différents ont été observés alors que 26 phylums différents ont été observés à TF après culture de MxG.

Le développement de MxG semble donc avoir considérablement changé la structure de la communauté bactérienne du sol standard et également avoir augmenté la diversité bactérienne du sol.

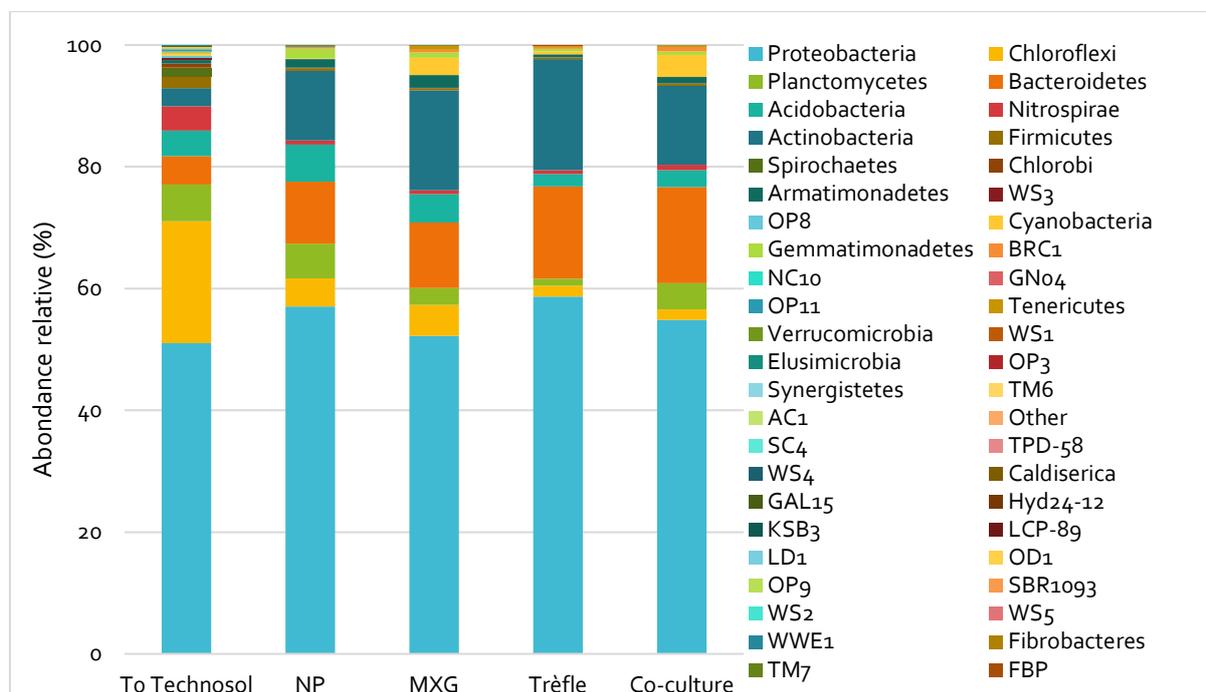


Figure 43 : Variations de la proportion relative des phylums bactériens dans le technosol à T0 et à la fin des 263 jours d'expérimentation : dans le technosol non planté, après culture de MxG, de trèfle blanc et de la co-culture.

Concernant le technosol, des variations dans les communautés bactériennes sont également observées en fonction du temps et des différentes conditions de plantation. La plus grande variation semble être observée entre T0 et TF toutes conditions confondues. En effet, à T0, 43 phylums différents sont observés dans le technosol alors qu'à TF le nombre de phylum varie entre 17 et 20. Cette première observation pourrait s'expliquer par une stabilisation du technosol au cours du temps. En effet, à T0, le technosol venait d'être constitué par mélange de sédiments et de sol. L'expérimentation de phytoremédiation ayant duré 263 jours, a pu laisser le temps au technosol et aux communautés bactériennes de se stabiliser.

Contrairement à ce qui a été observé dans le sol standard, le phylum majoritaire est identique pour toutes les conditions dans le technosol (à T0 et TF), il s'agit des Proteobacteria. L'abondance relative de ce phylum dans les communautés bactériennes varie entre 51,04 % à T0 et 58,66 % après culture de trèfle blanc. Ce sont dans les phylums Chloroflexi, Bacteroidetes et Actinobacteria que les variations entre T0 et TF sont les plus importantes.

En comparant à TF, le technosol non planté et après culture de MxG, une diminution de la proportion de Proteobacteria et de Planctomycetes est observée contre une augmentation d'Actinobacteria. Entre le technosol non planté et le trèfle blanc, une diminution de Chloroflexi, de Planctomycetes et d'Acidobacteria est remarquée contre une augmentation

de Bacteroidetes et d'Actinobacteria. Entre la condition non plantée et la co-culture, une diminution de la proportion de Chloroflexi et d'Acidobacteria est observée contre une augmentation de la proportion de Bacteroidetes. Enfin, en comparant la condition MxG et la co-culture, une diminution de la proportion de Chloroflexi et d'Acidobacteria est constatée contre une augmentation de la proportion de Planctomycetes, de Bacteroidetes et d'Actinobacteria.

Tableau 20 : Abondance relative des différents phylums bactériens retrouvés à plus de 0,1 % dans le sol standard et le technosol à T0 et à TF en fonction des différentes conditions de plantation

Phylum	T0 Témoïn	Témoïn MXG	T0 Technosol	NP	MXG	Trèfle	Co- culture
Proteobacteria	17,42	51,30	51,04	57,07	52,24	58,66	54,84
Chloroflexi	0,00	1,90	20,02	4,59	5,07	1,82	1,75
Planctomycetes	3,86	23,17	6,01	5,71	2,79	1,13	4,28
Bacteroidetes	0,56	7,51	4,69	10,19	10,73	15,18	15,79
Acidobacteria	52,89	5,53	4,20	6,08	4,67	2,03	2,81
Nitrospirae	0,00	0,06	3,98	0,68	0,66	0,62	0,88
Actinobacteria	0,85	0,50	2,95	11,45	16,38	18,28	12,96
Firmicutes	0,04	0,04	1,92	0,39	0,33	0,28	0,32
Spirochaetes	0,00	2,36	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00
Chlorobi	0,00	0,31	0,68	0,09	0,09	0,02	0,10
Armatimonadetes	0,34	4,86	0,56	1,45	2,11	0,48	1,04
WS3	0,00	0,12	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
OP8	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
Cyanobacteria	0,00	0,58	0,29	0,11	2,84	0,47	3,60
Gemmatimonadetes	0,00	0,35	0,27	1,62	0,88	0,46	0,63
BRC1	0,00	0,17	0,15	0,25	0,41	0,31	0,69
NC10	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
GN04	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Tenericutes	0,00	0,05	0,09	0,00	0,67	0,23	0,24
Verrucomicrobia	0,00	0,40	0,06	0,05	0,03	0,03	0,06
Elusimicrobia	0,00	0,17	0,05	0,20	0,03	0,00	0,00
TM6	0,00	0,26	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
WPS-2	23,93	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AD3	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nombre de phylum	9	26	43	19	20	18	17

La diversité des communautés bactériennes peut être comparée entre les différentes conditions en utilisant l'indice de Shannon (Tableau 21).

Tableau 21 : Indices de Shannon permettant de comparer la diversité bactérienne des sols en fonction des différentes conditions testées

	T0 Témoïn	Témoïn MxG	T0 Technosol	NP	MxG	Trèfle	Co- culture
Indice de Shannon	5,30	8,01	8,54	6,90	7,12	6,04	6,71

Les résultats indiquent une variation de cet indice entre 5,30 pour le sol témoin à T0 et 8,54 pour le technosol à T0. Cet indice suggère donc que le sol possédant la plus faible diversité bactérienne à T0 est le sol standard, ce qui n'est pas surprenant puisque c'est un sol constitué artificiellement.

En comparant les indices de Shannon calculés entre le sol standard à T0 et ce même sol après la culture de MxG, les résultats mettent en évidence une augmentation de cet indice passant de 5,30 à T0 à 8,01 après culture de MxG. Cette observation signifie que la culture de MxG a eu un impact positif sur la diversité bactérienne du sol et a permis par ailleurs d'améliorer la qualité du sol. En effet, la diversité microbienne est utilisée comme un facteur pour estimer la qualité biologique des sols puisqu'elle est impérative pour maintenir la biodiversité végétale, la qualité et la productivité des sols (Li and Wu, 2018; van der Heijden et al., 1998).

Concernant le technosol, l'indice de Shannon le plus élevé est observé à T0. Cet indice diminue de 8,54 à T0 jusqu'à 6,90 à TF pour la condition non plantée. Ce résultat concorde avec le nombre de phylum qui a diminué entre T0 et TF. Les indices de diversité sont ensuite de 6,04 après culture de trèfle, 6,71 après la co-culture et 7,12 après culture de MxG. La culture de MxG semble donc avoir permis d'augmenter la diversité bactérienne dans le technosol comparé à la condition non plantée alors que la culture de trèfle et la co-culture semblent au contraire engendrer une diminution de la diversité bactérienne du technosol.

Les résultats divergent dans la littérature. Chen et ses collaborateurs (Chen et al., 2020) ont montré une diminution de la diversité bactérienne dans des sols plantés avec différentes espèces de *Miscanthus* : *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus* et *Miscanthus floridulus* après 5 ans de culture. Au contraire, une autre étude a montré que deux ans de culture de *Miscanthus x giganteus* sur des sols agricoles pollués par des irrigations d'eaux usées stimulait la diversité bactérienne d'environ 20 % (Bourgeois et al., 2015).

Ces variations et divergences en termes de diversité et de structure des communautés bactériennes peuvent s'expliquer par différents facteurs. En effet, ces changements sont liés à l'espèce végétale cultivée et ses exsudats racinaires mais également aux caractéristiques physico-chimiques des sols et leur type d'utilisation (Lauber et al., 2008; Li and Wu, 2018; Mitchell et al., 2010).

Les résultats mettent en évidence une variation en termes de diversité et des structures des communautés bactériennes des sols en fonction du type de sol (sol standard ou technosol), de l'espèce végétale cultivée et également en fonction du temps. La culture de MxG semble augmenter la diversité bactérienne du sol, que ce soit dans le sol standard ou le technosol, permettant ainsi d'améliorer leur qualité. En revanche, la culture de trèfle blanc semble diminuer la diversité bactérienne du technosol rendant également la co-culture moins intéressante que la monoculture en termes de diversité bactérienne.

1.5.2.2. Analyse de la diversité fongique

L'abondance relative des différents phylums fongiques sont représentés dans la Figure 44 et dans le Tableau 22.

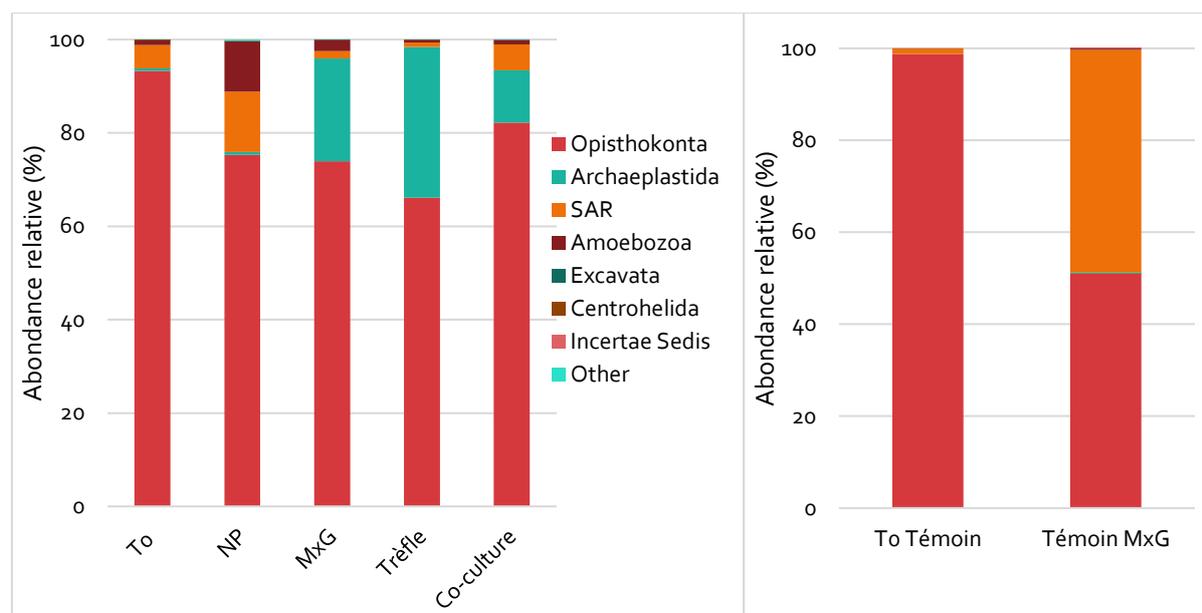


Figure 44 : Proportion (%) des différents phylum fongiques pour le technosol (à T0 et aux différentes conditions à TF : non planté, après culture de MxG, de trèfle blanc ou de la co-culture) (graphique de gauche) et pour le sol standard à T0 et à TF après culture de MxG (graphique de droite).

Tableau 22 : Abondance relative des différents phylum fongiques dans le sol standard et le technosol à T0 et à TF en fonction des différentes conditions de plantation

Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU)	Abondance relative (%)						
	T0 Témoin	Témoin MxG	T0 Technosol	NP	MxG	Trèfle	Co- culture
Opisthokonta	98,77	51,04	93,30	75,32	73,91	66,14	82,21
Archaeplastida	0,00	0,14	0,55	0,56	22,07	32,29	11,23
SAR	1,18	48,51	5,00	12,98	1,57	0,95	5,55
Amoebozoa	0,06	0,28	1,10	10,85	2,41	0,61	0,95
Excavata	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,06
Centrohélida	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Incertae Sedis	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Autres	0,00	0,00	0,03	0,28	0,04	0,01	0,01

Les résultats indiquent que 7 phylum ont été identifiés en ciblant le gène de l'ADNr 18S. Parmi eux, un phylum majoritaire est identifié que ce soit dans le technosol ou le sol standard, à T0 ou à TF, il s'agit de l'Opisthokonta. Son abondance varie entre 51,04 % dans le sol standard après culture de MxG et 98,77 % pour le sol standard à T0. Les trois phylum : Archaeplastida, SAR et Amoebozoa sont également présents en proportions majoritaires mais variables entre les différents sols et conditions de plantation alors que les phylum Excavata, Centrohélida et Incertae Sedis sont représentés de façon nettement minoritaire.

En comparant le sol standard, à T0 et après culture de MxG, on remarque une diminution de la proportion relative du phylum Opisthokonta de 99,77 % à T0 à 51,04 % à TF, en contrepartie, le phylum SAR passe de 1,2 % d'abondance relative à T0 à 48,5 % à TF, Archaeplastida de 0 à 0,14 % et Amoebozoa de 0,06 à 0,28 %. Ces résultats montrent donc l'influence de la culture de MxG sur les communautés fongiques du sol standard.

Dans le technosol, en comparant la condition non plantée à T0 et à TF, une diminution de la proportion Opisthokonta contre une augmentation de la proportion de SAR et d'Amoebozoa est observée. Ce changement dans la microflore peut être dû à la stabilisation du technosol qui venait juste d'être constitué lors du prélèvement à T0.

En comparant, à TF, la condition non plantée avec les conditions plantées dans le technosol, une augmentation importante de la proportion d'Archaeplastida est observée de 0,56 % dans le technosol non planté à 11,23 % pour la co-culture, 22,07 % pour MxG et 32,29 % pour le trèfle blanc. En contrepartie, la proportion de SAR et d'Amoebozoa est diminué dans les conditions plantées par rapport à la condition non plantée.

Afin d'estimer l'influence des végétaux sur la diversité des communautés fongiques dans les sols, l'indice de diversité de Shannon a été calculé (Tableau 23).

Tableau 23 : Indices de Shannon permettant de comparer la diversité fongique des sols en fonction des différentes conditions testées à T0 et à TF

	T0 Témoin	Témoin MxG	T0 Technosol	NP	MxG	Trèfle	Co- culture
Indice de Shannon	2,00	4,46	4,08	4,58	4,14	2,88	3,28

Les résultats montrent des indices de diversité variant de 2,00 à T0 pour le sol standard (témoin) jusqu'à 4,58 pour le technosol non planté à TF.

L'indice de Shannon calculé pour le sol standard à T0 est de 2,00 alors qu'il est de 4,46 à TF, toujours dans le sol standard mais après culture de MxG. Ces résultats montrent, premièrement, que le sol standard possède une faible diversité fongique à T0, puisqu'il possède l'indice de diversité le plus faible des différentes modalités comparées. Cette faible diversité est probablement due au fait que c'est un sol constitué artificiellement. En revanche après 263 jours de culture de MxG, l'indice de Shannon a fortement augmenté, signifiant que la culture de MxG a eu un impact positif sur la diversité de la communauté fongique du sol standard.

Concernant le technosol, l'indice de Shannon calculé à T0 est de 4,08. A TF, cet indice est de 4,58 pour la condition non plantée. Après 263 jours d'expérimentation sans végétaux, la diversité fongique semble donc légèrement augmentée. En revanche, pour les conditions plantées, l'indice de diversité est de 4,14 après culture de MxG, 2,88 après culture de trèfle blanc et 3,28 après la co-culture. La présence des végétaux semble donc faire diminuer la diversité des champignons du technosol de manière plus importante pour le trèfle, suivi de la co-culture et de MxG. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus dans le sol standard puisqu'une augmentation de la diversité fongique est constatée pour le sol standard après culture de MxG alors que la diversité semble diminuer après culture de cette même espèce dans le technosol. Ces différences observées peuvent être expliquées par le fait que les deux sols ont des propriétés physico-chimiques différentes. En effet, plusieurs études ont montré que des changements dans la diversité et la structure des communautés bactériennes ou fongiques sont liés à l'espèce végétale mais également aux caractéristiques physico-chimiques du sol et son utilisation (Lauber et al., 2008; Li and Wu, 2018; Mitchell et al., 2010). De plus, selon Lauber et ses collaborateurs, le facteur prédominant sur la composition des communautés bactériennes et fongiques des sols serait les propriétés physico-chimiques des sols (Lauber et al., 2008).

De plus, Chen et ses collaborateurs ont également montré une diminution de la diversité fongique après 5 ans de culture de différentes espèces de *Miscanthus* : *Miscanthus sinensis*,

Miscanthus sacchariflorus et *Miscanthus floridulus* (Chen et al., 2020). Au contraire, Bourgeois et ses collaborateurs (Bourgeois et al., 2015) ont montré une stimulation d'environ 10 % de la diversité fongique après deux ans de culture de MxG sur des sols agricoles pollués par des irrigations d'eaux usées.

Tout comme les changements dans les communautés bactériennes du sol, les changements de structure et de diversité des communautés fongiques du sol sont liés à l'espèce végétale cultivée mais également aux propriétés physico-chimiques des sols et leur type d'utilisation (Lauber et al., 2008; Li and Wu, 2018; Mitchell et al., 2010). Ces facteurs peuvent expliquer les divergences retrouvées dans la littérature.

Ces résultats montrent une influence du type de sol, des végétaux et du temps sur la structure (proportion des phylums) et sur la diversité fongique. La culture de MxG dans le sol standard semble permettre d'augmenter la diversité fongique. Au contraire, la présence de végétaux dans le technosol semble impacter négativement la diversité fongique. Cette inhibition semble plus importante après culture du trèfle suivi de la co-culture et de la culture de MxG rendant la co-culture moins intéressante que la monoculture de MxG en termes de diversité fongique.

1.6. Conclusion pour la partie « Amélioration de la phytoremédiation par co-culture »

Cette première expérimentation visant à étudier les possibilités d'amélioration de la phytoremédiation par co-culture « MxG – trèfle blanc » montre le développement de MxG et du trèfle blanc sur le technosol composé de sédiments excavés et de sol, ouvrant ainsi une nouvelle voie de valorisation pour les sédiments excavés. Le technosol a eu un effet positif sur le développement de MxG grâce à ses teneurs élevées en éléments nutritifs, la biomasse de MxG y étant significativement plus importante que dans le sol standard non contaminé. La présence de polluants ne semble donc pas impacter négativement le développement des végétaux en raison de leur faible biodisponibilité ou de leur faible concentration.

Par ailleurs, l'absence de transfert des contaminants vers les végétaux permet de faciliter la valorisation de la biomasse de MxG et ne pas avoir à gérer spécifiquement celle du trèfle blanc lors des récoltes. Concernant MxG, plusieurs voies de valorisation peuvent être envisagées lorsqu'il sera en culture sur site, et notamment la combustion de ses tiges puisque leur analyse n'a pas montré de contre-indication à cela.

Du point de vue de la phytoremédiation, la présence de végétation, que ce soit MxG ou le trèfle blanc en monoculture ou en co-culture a permis d'induire une dissipation des HAP totaux et également une diminution de l'IRCC comparé à la condition non plantée. Cette étude

montre donc l'efficacité des deux espèces végétales étudiées pour la rhizodégradation des HAP. Concernant les ETM, MxG n'a pas entraîné de variations dans les concentrations en ces éléments comparé au technosol non planté et les deux espèces végétales n'ont pas entraîné de modifications dans la biodisponibilité des ETM. Ceux-ci sont donc stabilisés dans la matrice. La culture de végétaux a également influencé la microflore des sols en augmentant notamment la densité de bactéries présentes, toutes modalités plantées confondues. En revanche, seul le trèfle blanc en monoculture ou en co-culture a permis d'augmenter la densité des champignons dans le technosol. Les végétaux ont également influencé la structure et la diversité des communautés microbiennes. La culture de MxG a augmenté la diversité bactérienne des sols, permettant ainsi d'améliorer leur qualité. Au contraire, la présence de trèfle blanc en co-culture semble induire la diminution de la diversité bactérienne du technosol. L'impact des végétaux sur la diversité fongique semble être dépendante du type de sol. En effet, la culture de MxG dans le sol standard semble permettre d'augmenter la diversité fongique alors qu'au contraire, la présence de végétaux dans le technosol semble avoir un impact négatif sur ce paramètre.

En comparant la condition MxG en monoculture et MxG en association avec du trèfle blanc, les résultats obtenus permettent de conclure que la co-culture améliore la dissipation de deux HAP : le pyrène et l'anthracène et améliore également la qualité du technosol par une diminution de son écotoxicité et une augmentation de la densité fongique, en comparaison avec la monoculture de MxG. La co-culture est, de plus, la seule modalité pour laquelle une augmentation de la densité de bactéries Gram + possédant le gène de dégradation étudié a été montrée, mettant en évidence un effet positif et encourageant de l'association végétale pour l'amélioration de la phytoremédiation des HAP.

En revanche, la présence de trèfle blanc dans la co-culture semble diminuer la diversité bactérienne du technosol rendant également la co-culture moins intéressante que la monoculture en termes de diversité bactérienne. De plus, l'inconvénient principal de la co-culture est la mise en évidence d'une faible concurrence des deux espèces végétales pour les ressources, qui peut s'expliquer par un volume de sol restreint.

Les résultats obtenus que ce soit en termes de biomasse et de remédiation des HAP en co-culture restent tout de même encourageants et montrent l'intérêt de transposer l'expérimentation *in situ* sur plusieurs années afin de s'affranchir du faible volume de sol et de mieux comprendre le « comportement » entre les deux espèces végétales.

2. Partie Amélioration de la phytoremédiation par bioaugmentation

2.1. Sélection et identification du microorganisme

2.1.1. Sélection du microorganisme

Au total 12 colonies différentes ont été isolées du technosol sur boîtes de Pétri contenant du milieu BH et 50 mg.L⁻¹ de BaP. Chacune d'elle a été repiquée jusqu'à l'obtention de colonies identiques sur la même boîte de Pétri. Elles ont ensuite été mises en culture dans un milieu BH liquide contenant la même concentration en BaP. Au bout de 8 semaines de culture à 30°C, seul un microorganisme a induit un brunissement du milieu de culture, ce qui est caractéristique de l'apparition de métabolites de dégradation des HAP (Amellal et al., 2001; Joner et al., 2002). Ce microorganisme sera donc utilisé en bioaugmentation pour vérifier si l'addition d'un microorganisme adapté dès le début du processus de phytoremédiation pouvait faciliter la dégradation des HAP présents.

2.1.2. Identification du microorganisme sélectionné

Afin d'identifier le microorganisme sélectionné, une observation macroscopique des colonies a été réalisée (Figure 45) ainsi qu'une observation microscopique après coloration de Gram (Figure 46).



Figure 45 : Photographies d'une colonie formée par le microorganisme sélectionné pour la bioaugmentation après 7 jours, 11 jours et 14 jours de culture sur un milieu BH + 25 mg.L⁻¹ de BaP incubé à 30°C. Le trait noir représente une échelle de 1 cm.

L'observation macroscopique des colonies a permis de les décrire comme des colonies rondes, avec un pourtour crénelé, rugueuses et opaques, de couleur blanchâtre et plutôt gris au centre avec présence d'un halo de dégradation autour des colonies.

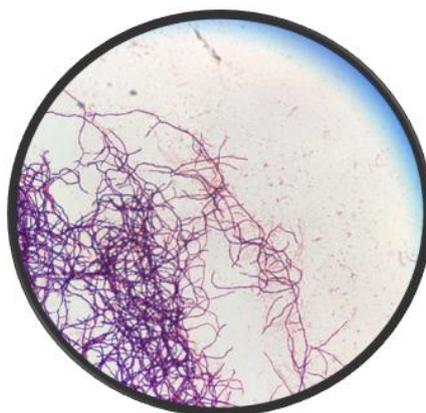


Figure 46 : Observation microscopique (grossissement x 1000) du microorganisme sélectionné pour la bioaugmentation après coloration de Gram.

L'observation microscopique du microorganisme a permis de conclure qu'il s'agissait certainement d'une bactérie filamenteuse Gram positif (Figure 46).

L'extraction d'ADN du microorganisme a été réalisée afin de l'identifier par séquençage. Une PCR a tout d'abord été réalisée sur l'ADN extrait et a permis de confirmer qu'il s'agissait bien d'une bactérie puisqu'une amplification de l'ADNr 16S a été observée. L'extrait d'ADN a ensuite été envoyé en séquençage. Les résultats ont montré qu'une espèce bactérienne a bien été isolée et qu'il s'agit de ***Streptomyces globisporus***. Une homologie de 100 % a été trouvée avec la base de données NCBI.

Une PCR a également été réalisée en ciblant le gène de dégradation étudié (PAH-RHD α GP). Cependant aucune amplification n'a été observée. La bactérie isolée *Streptomyces globisporus* ne possède donc pas ce gène. Il existe cependant d'autres gènes intervenant dans la dégradation des HAP qui ne sont pas ciblés par les amorces utilisées tels que : narB, narAb, nahAd, nahC, etc. (Kimura et al., 2006; Lu et al., 2011; Miyazawa et al., 2019). Des analyses supplémentaires pourront être réalisées afin d'identifier le ou les gènes de dégradation qu'elle possède.

2.1.3. Vérification de la capacité de *Streptomyces globisporus* à dégrader le benzo(a)pyrène

La bactérie sélectionnée, *Streptomyces globisporus*, a induit un brunissement du milieu de culture, traduisant sa capacité à dégrader le BaP. Afin de quantifier cette aptitude, la dégradation du benzo(a)pyrène a été suivie au cours du temps par spectrophotométrie (Figure 48) et par dosage en HPLC (Figure 50), tout en suivant la croissance des bactéries (Figure 47).

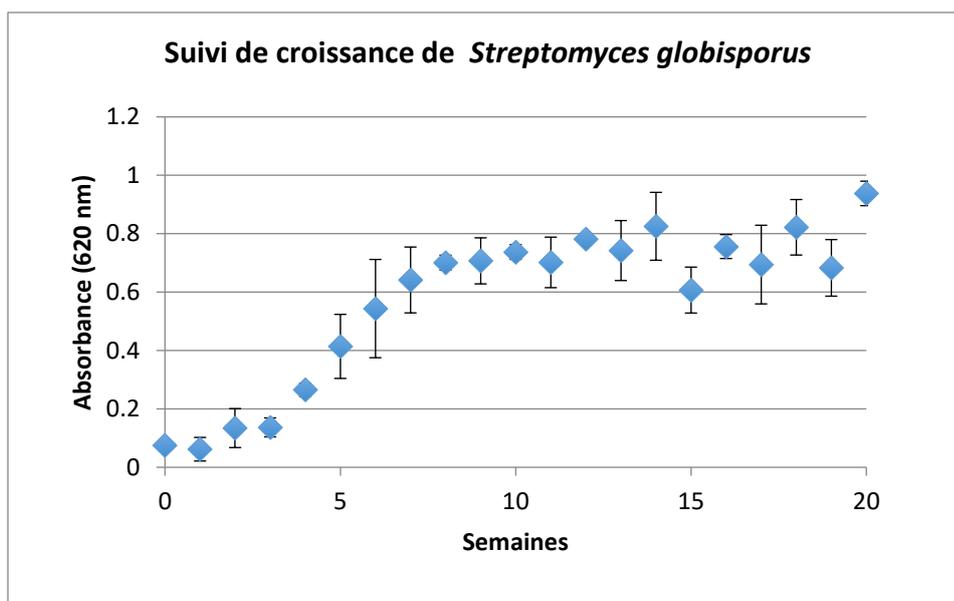


Figure 47 : Cinétique de croissance de *Streptomyces globisporus* par mesure d'absorbance à 620 nm dans un milieu de culture BH contenant 25 mg.L⁻¹ de benzo(a)pyrène (n=3)

Chaque semaine, un prélèvement de milieu de culture a été effectué pour réaliser les mesures spectrophotométriques permettant de déterminer la courbe de croissance de *Streptomyces globisporus* ainsi que sa courbe de suivi de dégradation du benzo(a)pyrène.

La courbe obtenue pour la cinétique de croissance (Figure 47) peut se décomposer en 3 phases distinctes : la phase de latence pour les 3 premières semaines de culture, la phase de croissance exponentielle qui commence à la troisième semaine et se termine à la huitième semaine et la phase stationnaire qui commence la huitième semaine et dure jusqu'à la fin de la cinétique, c'est-à-dire 20 semaines. La cinétique de croissance de la bactérie a été réalisée en même temps que les mesures de dissipation du BaP afin de s'assurer que les bactéries sont toujours en croissance. Cette condition est donc validée pour toute la durée de la cinétique puisqu'aucune phase de déclin de la population bactérienne n'est observée.

Le développement des bactéries dans ce milieu de culture signifie qu'elles sont résistantes au benzo(a)pyrène, mais également qu'elles sont capables de l'utiliser comme source de carbone puisqu'il s'agit de la seule source de carbone dans le milieu de culture.

Bien que plusieurs études expliquent la biodégradation de HAP à haut poids moléculaires comme le benzo(a)pyrène par co-métabolisme (Juhász and Naidu, 2000; Rentz et al., 2008), d'autres ont montré la capacité de certains microorganismes à utiliser le benzo(a)pyrène comme seule source de carbone (Kotoky and Pandey, 2020). Ce serait donc aussi le cas de *Streptomyces globisporus* bien qu'aucune étude n'ait encore été reportée sur cette espèce bactérienne dans la littérature.

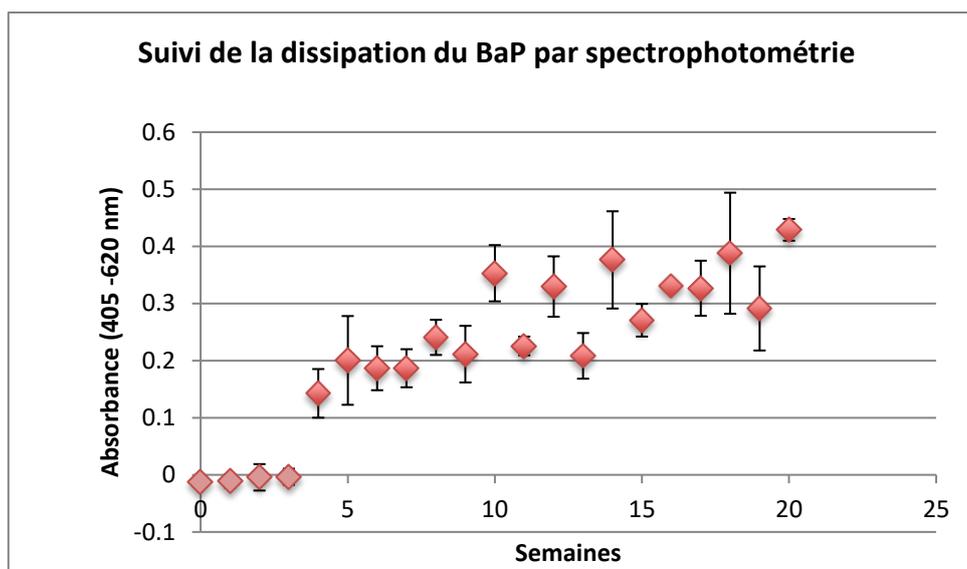


Figure 48 : Suivi de la dissipation du benzo(a)pyrène au cours du temps par spectrophotométrie (différence des valeurs d'absorbance obtenues à 405 et à 620 nm) dans les milieux de culture BH + BaP contenant *Streptomyces globisporus* (n=3)

La dissipation du benzo(a)pyrène est mesurée par spectrophotométrie en calculant la différence de la valeur d'absorbance obtenue à 405 nm avec celle obtenue à 620 nm. Sur les trois premières semaines de culture, une différence d'absorbance nulle est observée. A partir de la 4^{ème} semaine, la différence d'absorbance devient supérieure à 0 et augmente de façon linéaire tout au long du suivi. La 4^{ème} semaine correspond au début de la phase exponentielle de croissance des bactéries et coïncide également avec l'observation du brunissement des milieux de cultures ensemencés avec *Streptomyces globisporus* (Figure 49). Ce changement de couleur est causé par une accumulation de produits d'oxydation partielle de substances aromatiques suggérant la présence d'un métabolite de dégradation (Binet et al., 2000).

Les résultats obtenus suggèrent donc une dissipation du BaP par les bactéries *Streptomyces globisporus* à partir de la 4^{ème} semaine et ce, de façon linéaire tout au long du suivi.

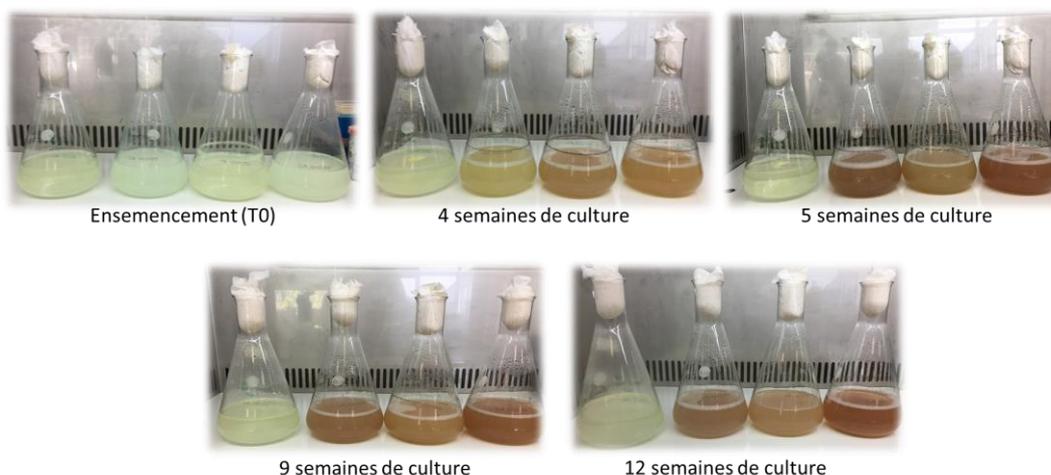


Figure 49 : Évolution de la coloration des milieux de culture au cours du temps. Les erlenmeyers photographiés de gauche à droite représentent : le témoin sans bactéries et les 3 suivants : 3 milieux ensemencés avec *Streptomyces globisporus*

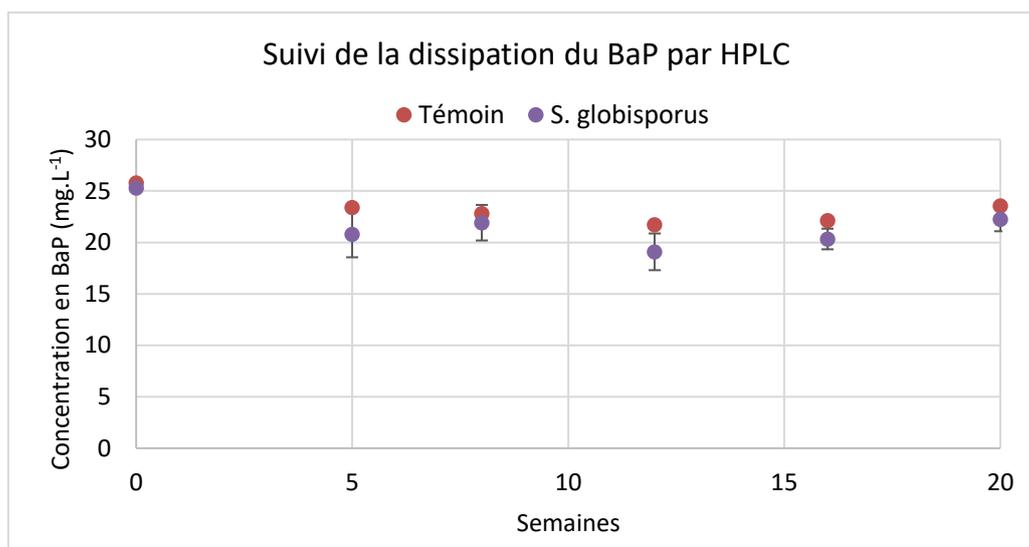


Figure 50 : Suivi de la dissipation du benzo(a)pyrène au cours du temps après extraction et dosage en HPLC dans les milieux de culture BH contenant 25 mg.L⁻¹ de BaP avec bactéries : *Streptomyces globisporus* (n=3) et sans bactéries (Témoin) (n=1). Les concentrations en benzo(a)pyrène dans les milieux en présence de bactéries sont comparées avec le milieu témoin sans bactéries (test de conformité de Student), l'absence d'astérisque montre une absence de différence significative entre les conditions ($p > 0,05$).

Les concentrations en benzo(a)pyrène ont été mesurées dans les milieux de culture en présence et en absence de bactéries afin de quantifier la dégradation du polluant.

Les résultats obtenus à T0 indiquent, premièrement, une concentration en BaP conforme à celle qui a été ajoutée dans les milieux de culture et également une absence de différence significative entre le milieu sans bactéries (témoin) et les milieux ensemencés avec des bactéries. Les concentrations en BaP ont ensuite été mesurées dans les milieux de culture après 5, 8, 12, 16 et 20 semaines. Les concentrations diminuent faiblement au cours du temps, mais aucune différence significative n'est observée entre les cultures bactériennes et le témoin sans bactéries, quel que soit le temps. Cette mesure ne permet donc pas de conclure sur la biodégradation du BaP, ce qui peut s'expliquer par une différence de concentration trop faible entre le témoin et les cultures bactériennes aux vues des incertitudes de mesure. L'utilisation d'une UHPLC (chromatographique à ultra haute performance) pourrait peut-être permettre de réduire ces incertitudes et fournir des résultats plus probants.

En revanche, lors du passage des échantillons extraits à partir des cultures bactériennes à l'HPLC, un deuxième pic est présent (temps de rétention : 25,1 min), en plus de celui du benzo(a)pyrène, dans tous les erlenmeyers contenant des bactéries (Figure 51). Ce pic n'est en revanche pas observé dans le témoin sans bactéries ce qui est un autre indicateur de la capacité de dégradation des bactéries pour le BaP puisqu'il pourrait s'agir d'un métabolite de dégradation à ce jour encore non identifié.

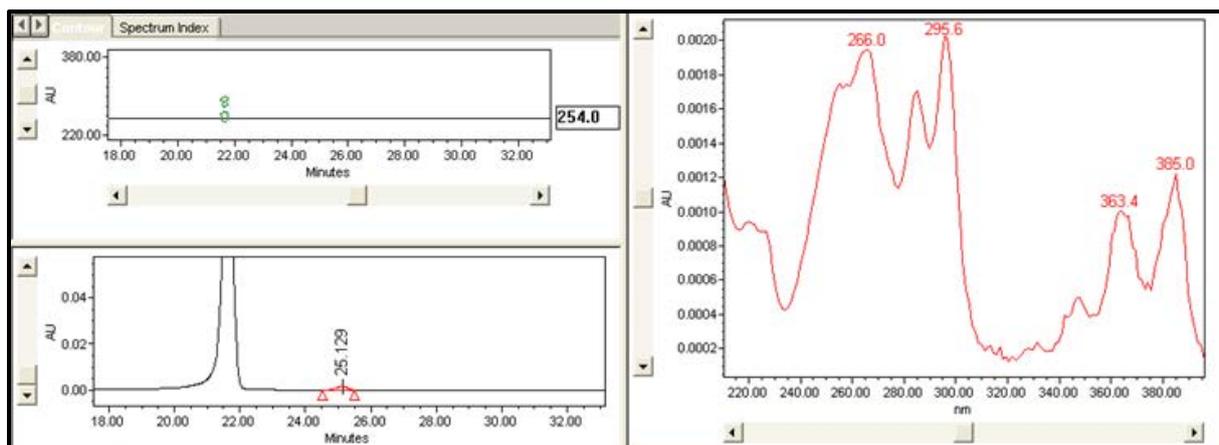


Figure 51 : Pic détecté en HPLC après celui du benzo(a)pyrène avec son spectre d'absorption dans les milieux de culture BH+BaPensemencés avec les bactéries *Streptomyces globisporus*

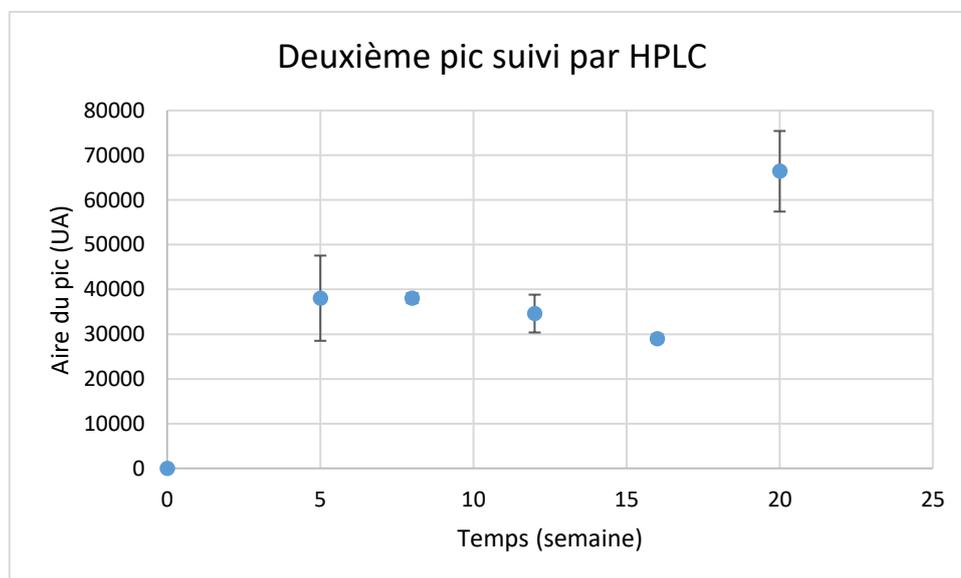


Figure 52 : Suivi de l'évolution de l'aire du deuxième pic détecté en HPLC au cours du temps dans les milieux de culture BH + BaPensemencés avec *Streptomyces globisporus*

L'aire du pic de ce métabolite a été suivi au cours du temps (Figure 52). La concentration du composé, détecté à compter de la 5^{ème} semaine de culture, tend à croître au cours du temps et ce, jusqu'à la fin du suivi.

Il serait nécessaire d'identifier la molécule détectée en UHPLC-MS (UHPLC couplée à la spectrométrie de masse) ou en GC-MS (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) afin de confirmer qu'il s'agit bien d'un métabolite formé par la dégradation du BaP par *Streptomyces globisporus*, et éventuellement, de proposer la voie de dégradation correspondante.

Les bactéries *Streptomyces globisporus* isolées à partir du technosol sont capables de croître dans un milieu contenant du benzo(a)pyrène comme seule source de carbone : elle est donc capable de dégrader le BaP. Ceci est confirmé par un brunissement du milieu de culture à partir de la 4^{ème} semaine de culture, ce qui est caractéristique de la dégradation des HAP et de la formation de métabolites secondaires dans le milieu. Par ailleurs, une analyse par HPLC montre un autre pic que celui du benzo(a)pyrène, et ce, uniquement en présence de bactéries, suggérant qu'il s'agit d'un métabolite de dégradation du BaP, qu'il serait nécessaire d'identifier. De plus, la concentration de ce composé dans le milieu de culture augmente au cours du temps, parallèlement à la croissance bactérienne et au brunissement du milieu. Tous ces indicateurs tendent donc à montrer que *Streptomyces globisporus* est capable de dégrader le benzo(a)pyrène.

2.2. Suivi des teneurs en polluants dans le technosol

Après avoir isolé une bactérie endémique capable de dégrader le BaP, un essai de bioaugmentation a été réalisé en mésocosme en ajoutant environ $2 \cdot 10^7$ bactéries/g de technosol. Les concentrations en ETM et en HAP ont été suivies dans le technosol.

2.2.1. Concentrations en HAP

Les concentrations en HAP ont été mesurées à T0 et à TF, après 148 jours d'expérimentation afin de suivre leur évolution et de déterminer la technique de bioremédiation la plus intéressante en termes de dissipation des HAP (Figure 53).

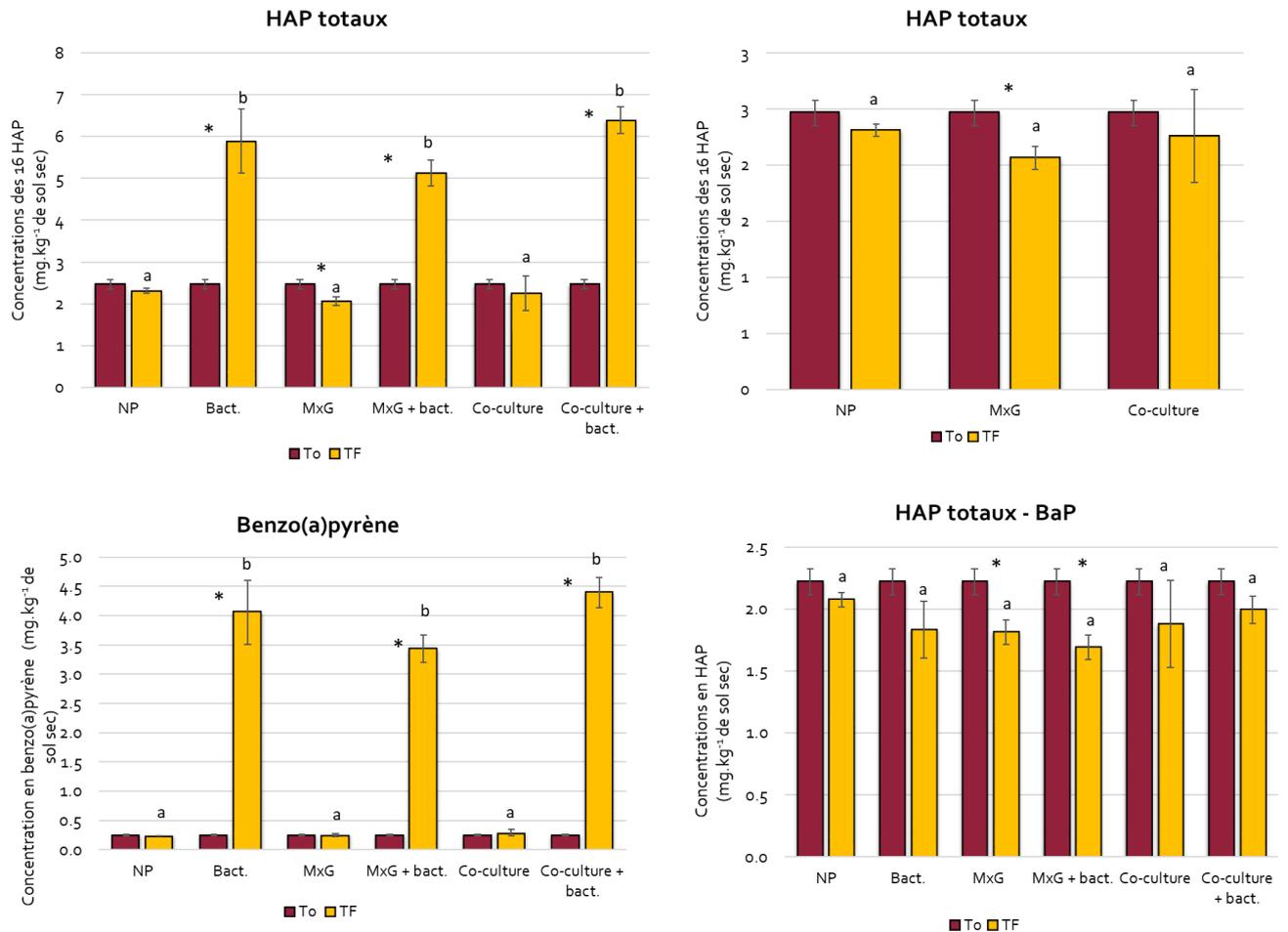


Figure 53 : Concentrations en HAP totaux (somme des 16 HAP), en benzo(a)pyrène et en HAP totaux excepté le benzo(a)pyrène dans le technosol (mg.kg⁻¹ de sol.sec) à T0 (rouge) et TF (jaune) de l'expérimentation "phytoremédiation assistée par bioaugmentation" en fonction des différentes conditions : non planté, bactéries (bioaugmentation), MxG, MxG + bactéries, co-culture et co-culture + bactéries. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives pour une modalité entre T0 et TF (test t pour échantillons appariés) alors que des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités à TF ($p < 0,05$, $n=3$).

Si l'on compare les concentrations en HAP totaux pour les conditions sans bioaugmentation, une dissipation significative est montrée après culture de MxG uniquement. La co-culture n'a, en revanche, pas permis d'induire une dissipation des HAP totaux, contrairement aux résultats obtenus dans l'expérimentation précédente (cf. Figure 28). Les différences entre les deux expérimentations peuvent être expliquées par la durée, celle-ci n'a été que de 148 jours pour l'expérimentation « phytoremédiation assistée par bioaugmentation » contre 263 jours pour l'expérimentation « Amélioration de la phytoremédiation par co-culture ».

Les résultats mettent aussi en évidence, une augmentation significative de la concentration en HAP totaux (somme des 16 HAP prioritaires) pour les conditions « bactéries », « MxG + bactéries » et « co-culture + bactéries », c'est-à-dire pour toutes les conditions pour lesquelles les bactéries *Streptomyces globisporus* ont été inoculées dans le technosol. Les concentrations

en HAP totaux dans le technosol sont de $2,47 \pm 0,11 \text{ mg.kg}^{-1}$ de sol sec à T0 et de $5,89 \pm 0,76 \text{ mg.kg}^{-1}$, $5,13 \pm 0,31 \text{ mg.kg}^{-1}$ et $6,39 \pm 0,32 \text{ mg.kg}^{-1}$ à TF pour les conditions « bactéries », « MxG + bactéries » et « co-culture + bactéries » respectivement.

En mesurant les concentrations de benzo(a)pyrène, une augmentation significative des teneurs est montrée pour les conditions pour lesquelles les bactéries ont été ajoutées. Ces résultats indiquent donc un apport de benzo(a)pyrène lors de l'inoculation dans le technosol, expliquant ainsi l'augmentation de la somme des concentrations en HAP à TF pour toutes les conditions avec bioaugmentation. En effet, les bactéries ont été mises en culture dans un milieu contenant du BaP pour maintenir une pression de sélection afin qu'elles conservent leur gène de résistance et/ou de dégradation. Cependant, les étapes de centrifugation utilisées pour concentrer l'inoculum n'ont pas permis d'éliminer le BaP, contaminant ainsi le technosol lors de l'inoculation microbienne.

Le protocole utilisé pour cette expérimentation, pourtant extrait de la littérature (Silva et al., 2009), n'est donc pas adapté dans notre cas. Il pourrait en revanche être utilisé pour des sols très contaminés en HAP et plus particulièrement en BaP : la concentration de polluant liée à l'inoculum serait alors négligeable au regard des concentrations déjà présentes, ce qui n'est pas le cas du technosol utilisé dans cette étude. La technique développée par (Jacques et al., 2008) pourrait être plus adaptée. Les auteurs ont mis en culture des microorganismes dans des boîtes de Pétri en présence d'anthracène et ont récupéré les colonies après ajout d'eau distillée stérile sur la gélose, en gardant l'étape de centrifugation pour concentrer les cellules dans le culot. Cette technique pourrait cependant être peu adaptée à une production en masse de microorganismes pour la bioaugmentation, particulièrement si l'objectif est de transposer l'expérimentation *in situ*.

Les concentrations des HAP totaux sans prendre en compte le BaP ont été calculées puisque les résultats des HAP totaux sont masqués par la présence excessive de ce HAP. Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution significative des concentrations après culture de MxG et de MxG + bactéries uniquement.

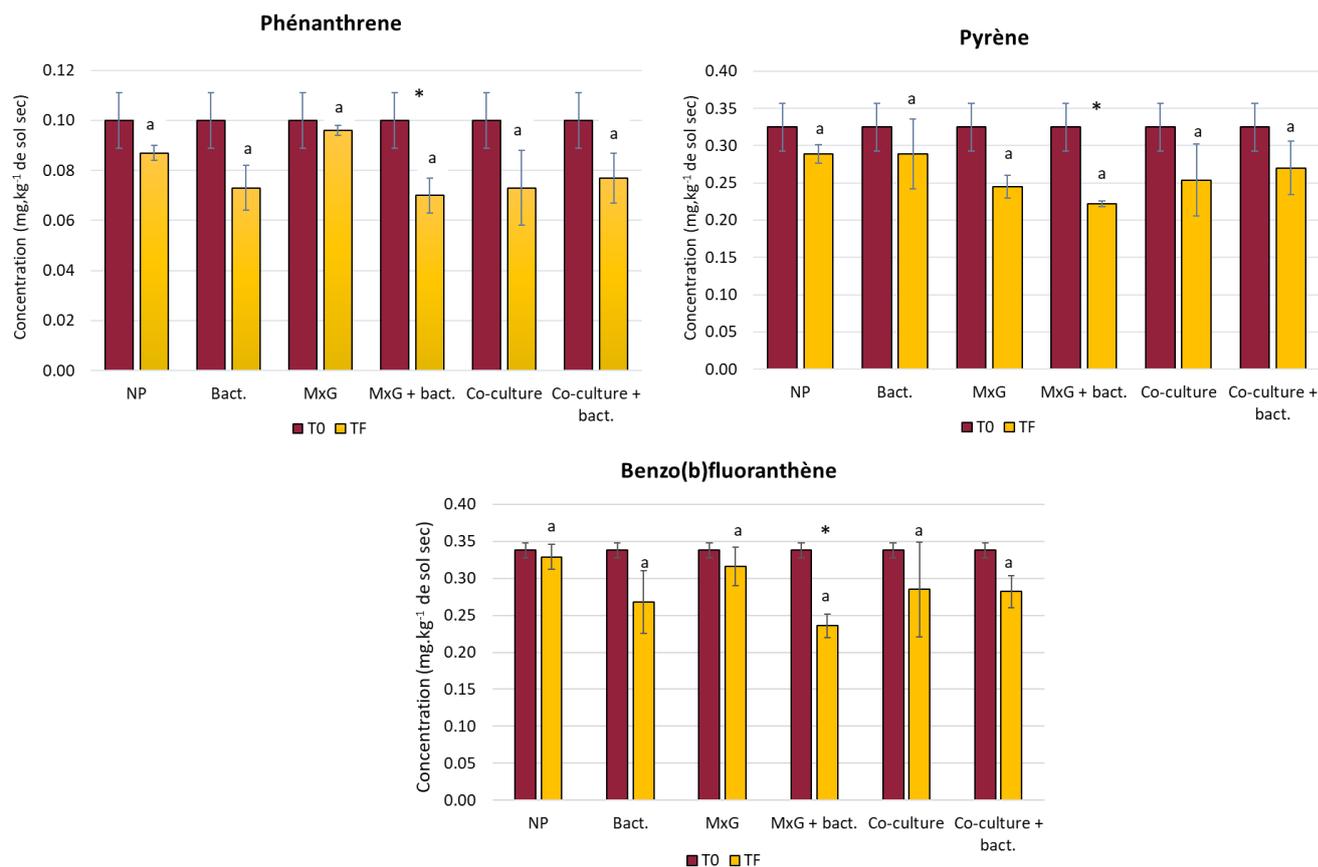


Figure 54 : Concentrations des HAP (mg.kg⁻¹ de sol sec) pour lesquels une dissipation significative après au moins une technique de bioremédiation a été montrée. Concentrations en phénanthrène, pyrène et benzo(b)fluoranthène à TO (rouge) et TF (jaune) en fonction des différentes conditions : non planté, bactéries (bioaugmentation), MxG, MxG + bactéries, co-culture et co-culture + bactéries. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives pour une modalité entre TO et TF alors que des lettres identiques indiquent une absence de différence significative entre les modalités à TF ($p > 0,05$; $n=3$).

En regardant les HAP individuellement, seuls 3 présentent des différences significatives entre les conditions de culture : le phénanthrène, le pyrène et le benzo(b)fluoranthène (Figure 54). Pour ces 3 HAP, seule une inhibition significative de leur concentration est montrée entre TO et TF pour la condition « MxG+ bactéries ».

Les HAP présentant des dissipations significatives après phytoremédiation assistée par bioaugmentation (MxG + bactéries) sont différents des HAP qui présentaient des dissipations significatives après co-culture de MxG et de trèfle blanc (première expérimentation), l'association de la co-culture et de la bioaugmentation pourrait donc agir de manière complémentaire sur la dissipation des HAP, ce qui pourrait être mis en évidence par un temps d'expérimentation plus long.

D'après ces résultats, la modalité la plus intéressante serait l'association entre MxG et la bioaugmentation, qui a permis une dissipation significative des HAP totaux (hors benzo(a)pyrène apporté via l'inoculation des bactéries), ainsi que la dissipation du phénanthrène, du pyrène et du benzo(b)fluoranthène.

L'association de la co-culture et de la bioaugmentation n'a permis de montrer aucune dissipation significative de HAP. Cette condition n'est donc pas à privilégier pour améliorer la phytoremédiation des HAP dans le technosol.

La culture de MxG en monoculture est la seule modalité qui a permis d'obtenir une dissipation des HAP totaux : cette condition est donc à privilégier, tant qu'une technique permettant de produire des microorganismes en quantité suffisante sans contaminer le technosol et tout en conservant une pression de sélection n'a pas été trouvée.

Les valeurs d'ETT (Équivalence de la toxicité totale) relative au benzo(a)pyrène et d'IRCC (Indice de Risque Cumulatif de Cancer) sont calculées à T0 et à TF pour évaluer la qualité des sols conformément aux réglementations du conseil canadien des ministres de l'environnement (<http://cegg-rcqe.ccme.ca/download/fr/224>).

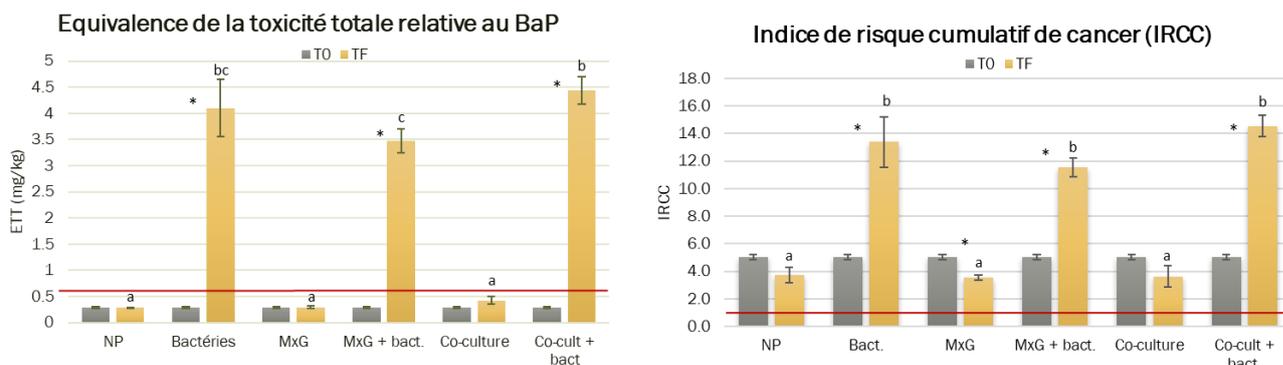


Figure 55 : Valeurs de l'équivalence de la toxicité totale relative au benzo(a)pyrène (ETT) (graphique de gauche) et de l'indice de risque cumulatif de cancer (IRCC) (graphique de droite) calculées à T0 (gris) et à TF (jaune) pour les différentes modalités testées. Les barres de couleur rouge sur les graphiques indiquent la valeur seuil acceptable de chaque indice (0,6 mg/kg pour l'ETT et 1 pour l'IRCC). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions à TF ($p < 0,05$, $n=3$). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives pour l'indice calculé entre T0 et TF pour une condition considérée (test t pour échantillons appariés, $p < 0,05$, $n=3$).

L'ETT relative au BaP calculée à T0 est de $0,29 \text{ mg.kg}^{-1}$. Elle est inférieure au niveau de risque acceptable souhaitée dont la valeur seuil est fixée à $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$. Ce résultat suggère donc que le technosol présente un faible risque cancérigène par contact direct.

A TF, les valeurs d'ETT varient entre $0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le technosol non planté jusqu'à $4,44 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour la condition « co-culture + bactéries ». Pour toutes les conditions avec bioaugmentation, une augmentation significative de la valeur d'ETT est observée c'est-à-dire pour les conditions « bactéries », « MxG + bactéries » et « co-culture + bactéries », ce qui est causé par l'apport de benzo(a)pyrène dans le technosol. Pour ces modalités, les valeurs d'ETT sont significativement supérieures à toutes les autres conditions sans bioaugmentation et

dépassent également la valeur seuil de $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$. Ce résultat suggère que le technosol présente un risque cancérigène par contact direct.

Pour toutes les conditions sans bioaugmentation, les ETT restent en-dessous de la valeur seuil, indiquant un faible risque cancérigène du technosol en cas de contact direct. Aucune différence statistique n'est montrée entre ces conditions ni entre T0 et TF, suggérant que ni la présence de MxG ni celle de la co-culture a permis de diminuer cette valeur dans le cadre de cette expérimentation. En revanche, la première expérimentation avait permis de montrer une diminution significative de la valeur d'ETT après culture de MxG, ceci pouvant être expliqué par un temps de culture plus long.

Concernant l'IRCC, les valeurs calculées à T0 et à TF, toutes modalités confondues, sont supérieures à la valeur seuil de 1, indiquant que le technosol peut générer un risque pour la qualité des eaux potables souterraines même après la période de bioremédiation expérimentale. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la première expérimentation qui avait montré un résultat similaire pour un temps expérimental plus long.

L'IRCC calculé à T0 est de 5,03 et varie, à TF, entre 3,53 après culture de MxG, jusqu'à 14,54 pour la condition « co-culture + bactéries ». Tout comme l'ETT, les conditions en présence de bioaugmentation ont significativement augmenté les valeurs de l'IRCC, en raison de l'apport du BaP. En comparant, les conditions sans bioaugmentation, seule la culture de MxG a permis de diminuer significativement la valeur de l'IRCC entre T0 et TF même si cette valeur n'est pas significativement différente des autres conditions. Cette valeur reste cependant supérieure à la valeur seuil. Ce résultat permet tout de même de montrer un impact positif de la culture de MxG sur la qualité du technosol et la dissipation des HAP. Ces résultats sont de plus, en accord avec la diminution significative de la concentration en HAP totaux qui est montré uniquement pour cette condition.

La méthode de production de bactéries et d'inoculation du technosol utilisée a entraîné une contamination importante du technosol en benzo(a)pyrène pour toutes les conditions avec bioaugmentation, augmentant de façon significative les valeurs d'ETT et d'IRCC, suggérant un risque cancérigène du technosol en cas de contact direct ainsi qu'un risque pour la qualité des eaux potables souterraines. Cette méthode n'est donc pas adaptée pour la phytoremédiation.

Seule la monoculture de MxG a permis de diminuer la concentration en HAP totaux entre le début et la fin des 148 jours de culture, confirmant ainsi l'efficacité de cette espèce végétale pour la rhizodégradation des HAP. De plus, c'est la seule condition qui a permis de diminuer significativement l'IRCC entre le début et la fin de l'expérimentation, même si celui-ci reste supérieur à la valeur seuil. La monoculture de MxG est donc, d'après les résultats de cette

expérimentation, la technique de bioremédiation à privilégier vis-à-vis de la dissipation des HAP.

La co-culture n'induit pas de dissipation des HAP dans le technosol, contrairement à la première expérimentation. L'hypothèse pouvant être émise pour expliquer cette différence est un temps d'expérimentation trop court.

Si l'on met de côté la contamination du technosol par le benzo(a)pyrène pour les modalités avec bioaugmentation, l'association entre MxG et les bactéries *Streptomyces globisporus* serait la plus efficace puisqu'elle a permis une dissipation significative des HAP totaux en retirant le benzo(a)pyrène, ainsi que la dissipation du phénanthrène, du pyrène et du benzo(b)fluoranthène. Les résultats obtenus montrent donc l'avantage de coupler la phytoremédiation par MxG et la bioaugmentation avec *Streptomyces globisporus* par rapport à la phytoremédiation seule, mais uniquement si la technique utilisée pour la production et l'inoculation des bactéries dans le technosol n'entraîne pas de contamination de ce dernier.

2.2.2. Concentrations en ETM

L'influence des végétaux et / ou des bactéries (bioaugmentation) sur les ETM a été déterminée en mesurant les concentrations en ETM (Tableau 24) et en ETM extraits au DTPA à la fin de l'expérimentation de bioremédiation (Tableau 25).

Tableau 24 : Concentrations en ETM (mg.kg^{-1} de sol sec) à TF dans les différentes modalités du technosol : non planté, bioaugmentation (bact.), MxG ; MxG + bioaugmentation, co-culture et co-culture + bioaugmentation. Des lettres identiques indiquent aucune différence significative entre les conditions pour un ETM considéré ($p > 0,05$; $n=3$).

	Concentrations (mg.kg^{-1} de sol sec)						
	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
NP	15.9 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	57.3 ± 2.4 ^a	24.7 ± 0.1 ^a	38.4 ± 0.1 ^a	46.6 ± 0.9 ^a	146.6 ± 1.0 ^a
Bact.	16.4 ± 0.8 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	55.5 ± 1.2 ^a	24.0 ± 0.6 ^a	38.8 ± 0.2 ^a	45.7 ± 1.0 ^a	147.9 ± 2.5 ^a
MxG	15.1 ± 0.6 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	57.1 ± 4.0 ^a	22.8 ± 0.7 ^a	37.6 ± 1.3 ^a	42.3 ± 0.9 ^a	140.9 ± 4.4 ^a
MxG + Bact.	17.2 ± 3.8 ^a	0.8 ± 0.2 ^a	62.0 ± 14.2 ^a	24.6 ± 4.7 ^a	41.4 ± 8.7 ^a	46.9 ± 9.8 ^a	153.4 ± 32.0 ^a
Co-culture	14.8 ± 2.7 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	55.8 ± 10.4 ^a	21.9 ± 4.2 ^a	37.2 ± 7.2 ^a	41.5 ± 7.9 ^a	137.7 ± 26.3 ^a
Co-cult. + bact.	15.9 ± 1.3 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	55.9 ± 8.6 ^a	23.3 ± 0.8 ^a	36.8 ± 0.7 ^a	44.2 ± 1.6 ^a	144.9 ± 8.7 ^a

Les concentrations en ETM mesurées dans le technosol, quelles que soient les conditions à TF, montrent premièrement une contamination en plomb et en zinc puisque les concentrations mesurées dans le technosol sont supérieures à celles du FPGN local (30 mg.kg^{-1} pour le Pb et 120 mg.kg^{-1} pour le Zn). Ensuite, les analyses statistiques permettent de conclure qu'aucune différence n'est constatée entre les différentes modalités à TF, quel que

soit l'ETM considéré suggérant une absence d'effet des végétaux et des bactéries sur les teneurs en ETM dans le technosol.

Les ETM extraits au DTPA ont également été mesurés à la fin de l'expérimentation de bioremédiation afin d'estimer les concentrations biodisponibles et de déterminer l'influence des végétaux et/ou bactéries inoculées sur celles-ci (Tableau 25).

Tableau 25 : Concentrations en ETM extraits au DTPA (mg.kg^{-1} de sol sec) à TF dans les différentes modalités du technosol : non planté, bioaugmentation (bact.), MxG ; MxG + bioaugmentation, co-culture et co-culture + bioaugmentation. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions pour un ETM considéré ($p < 0,05$; $n=3$).

	Concentrations (mg.kg^{-1} de sol sec)				
	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
NP	0.12 ± 0.0 a	4.7 ± 0.1 a	1.0 ± 0.0 a	3.9 ± 0.1 a	12.5 ± 0.1 a
Bact.	0.11 ± 0.0 a	5.6 ± 0.8 a	1.1 ± 0.1 a	4.1 ± 0.1 a	11.9 ± 0.5 abc
MxG	0.10 ± 0.0 a	4.9 ± 0.1 a	1.0 ± 0.0 a	3.9 ± 0.0 a	12.3 ± 0.2 ab
MxG + bact.	0.11 ± 0.0 a	5.2 ± 0.4 a	1.1 ± 0.1 a	4.2 ± 0.3 a	12.7 ± 0.2 a
Co-cult.	0.10 ± 0.0 a	4.9 ± 0.1 a	1.0 ± 0.0 a	3.9 ± 0.1 a	11.0 ± 0.6 bc
Co-cult. + bact.	0.11 ± 0.0 a	5.4 ± 0.1 a	1.0 ± 0.0 a	4.0 ± 0.1 a	10.6 ± 0.5 c

Les concentrations estimées en ETM biodisponibles sont comparées entre les différentes conditions pour chaque ETM. Seules des différences significatives sont observées pour le zinc. En effet, la co-culture et la co-culture couplée à la bioaugmentation ont permis de diminuer significativement les concentrations en zinc biodisponibles par rapport au technosol non planté. Ces résultats montrent l'intérêt de la co-culture en présence ou non de bactéries inoculées pour la phytostabilisation du zinc dans un sol contaminé.

Ces résultats diffèrent, cependant, de la première expérimentation, pour laquelle la co-culture n'a pas significativement modifié la biodisponibilité du zinc. Ces différences peuvent s'expliquer par un échantillon de technosol différent, prélevé à une date ultérieure laissant une possible évolution du technosol par maturation mais également par une durée expérimentale plus courte ainsi qu'une quantité de sol plus faible.

Les analyses des ETM dans le technosol ont permis de déterminer que ni les bactéries ni les végétaux ne modifient les concentrations en ETM « totaux » dans le technosol.

Concernant les ETM extraits au DTPA, seules les modalités « co-culture » et « co-culture + bioaugmentation » diminuent significativement les concentrations en zinc, montrant une réduction de la biodisponibilité du zinc pour ces deux modalités. Cette observation montre l'intérêt de la co-culture en présence ou absence de bactéries sur la phytostabilisation du zinc.

2.3. Suivi de l'écotoxicité du technosol

Le test d'écotoxicité « inhibition de la croissance racinaire » a été réalisé à T0 et à TF (après 148 jours d'expérimentation) afin de suivre l'écotoxicité du technosol en fonction des modalités étudiées (figure 56).

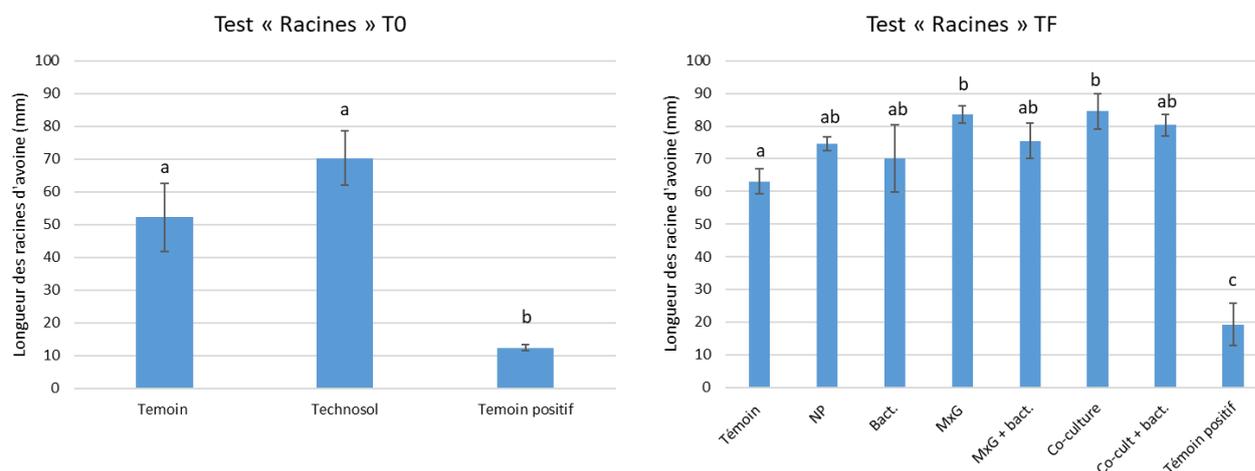


Figure 56 : Longueur des racines d'avoine (mm) mesurées au début de l'expérimentation "Phytoremédiation assistée par bioaugmentation" à T0 (graphique de gauche) et à TF (graphique de droite) en fonction des différentes modalités testées. Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions ($p < 0,05$, $n=3$).

Que ce soit à T0 ou à TF, la longueur des racines d'avoine du témoin positif sont significativement plus faibles que pour le témoin négatif, permettant de valider le test.

A T0, la longueur des racines d'avoine dans le technosol n'est pas différente du témoin, indiquant une absence d'écotoxicité du technosol. Ce résultat est différent de l'expérimentation précédente « Amélioration de la phytoremédiation par co-culture », où une écotoxicité du technosol avait été montrée à T0 pour ce même test. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité du technosol mais également par la date ultérieure du prélèvement de sol pour cette deuxième expérimentation. En effet, ce prélèvement a été réalisé un an plus tard que celui de la première expérimentation, laissant au technosol un peu de temps de maturation et de vieillissement alors que pour la première expérimentation, le technosol venait d'être constitué. De plus, au moment de ce deuxième prélèvement, des espèces adventices s'étaient développées de façon importante sur le site, formant une couverture végétalisée, ce qui a pu permettre d'améliorer la qualité du technosol par atténuation naturelle.

A TF, aucune différence statistique entre les longueurs racinaires du témoin et celles des modalités suivantes : non planté, bactéries, MxG + bactéries et co-culture + bactéries n'est observée, concordant avec les résultats du test réalisé à T0. En revanche, des longueurs

racinaires significativement plus longues ont été obtenues pour les conditions MxG et co-culture, montrant une amélioration de la qualité du technosol après culture de MxG en monoculture ou en co-culture avec le trèfle blanc.

Le test d'écotoxicité « Inhibition de la croissance racinaire » effectué à T0 et à TF de l'expérimentation « phytoremédiation assistée par phytoremédiation » ne révèle aucune écotoxicité du technosol. En revanche, une amélioration de la qualité du technosol est constatée après culture de MxG en monoculture et en co-culture avec le trèfle blanc.

2.4. Suivi des végétaux

2.4.1. Suivi du développement de MxG

Afin de suivre le développement de MxG en présence des bactéries *Streptomyces globisporus* et/ ou de trèfle blanc, la hauteur (Figure 57) et la teneur en chlorophylle (Figure 58) dans ses feuilles ont été mesurées chaque mois alors que la biomasse de ses feuilles et tiges a été mesurée à la fin de l'expérimentation (Figure 59).

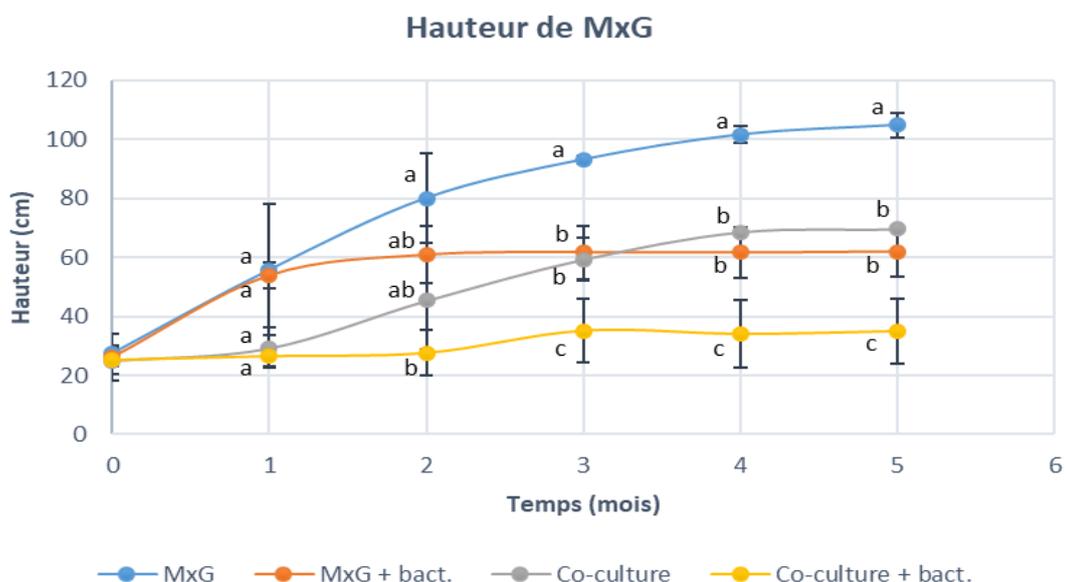


Figure 57 : Évolution de la hauteur du rejet principal de MxG (cm) au cours du temps pour chacune des modalités. Les lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les modalités pour un même temps ($p < 0,05$; $n=3$)

A T0 et après le 1^{er} mois de culture, aucune différence de hauteur n'est observée entre les différentes conditions. Au 2^{ème} mois de culture, la hauteur de MxG « seul » est significativement plus élevée que la hauteur de MxG en présence de trèfle et de bactéries, mais pas des deux autres conditions.

En revanche, pour les 3 derniers mois de culture, la hauteur de MxG « seul » est significativement plus élevée comparée à toutes les autres conditions, montrant ainsi un meilleur développement de la plante en monoculture. Ce résultat est en accord avec l'expérimentation précédente « Amélioration de la phytoremédiation par co-culture ». Par ailleurs, la hauteur de MxG est équivalente lorsque la plante est en présence de bactéries ou de trèfle blanc, suggérant une compétition pour les ressources, d'autant plus que la quantité de sol utilisée pour cette expérimentation est d'1 kg ou alors d'un effet négatif du benzo(a)pyrène apporté lors de l'inoculation des bactéries.

Enfin, la hauteur de MxG en présence de trèfle blanc et de bactéries est significativement plus faible comparé à toutes les autres conditions, montrant un impact négatif de l'association de la co-culture et de la bioaugmentation sur le développement de MxG. Ce résultat peut être expliqué par une compétition pour les ressources plus importante lors de l'ajout de trèfle et de bactéries mais également en raison de l'ajout de benzo(a)pyrène. D'après ces résultats, coupler la bioaugmentation avec la co-culture aurait le plus fort impact négatif sur le développement de MxG.

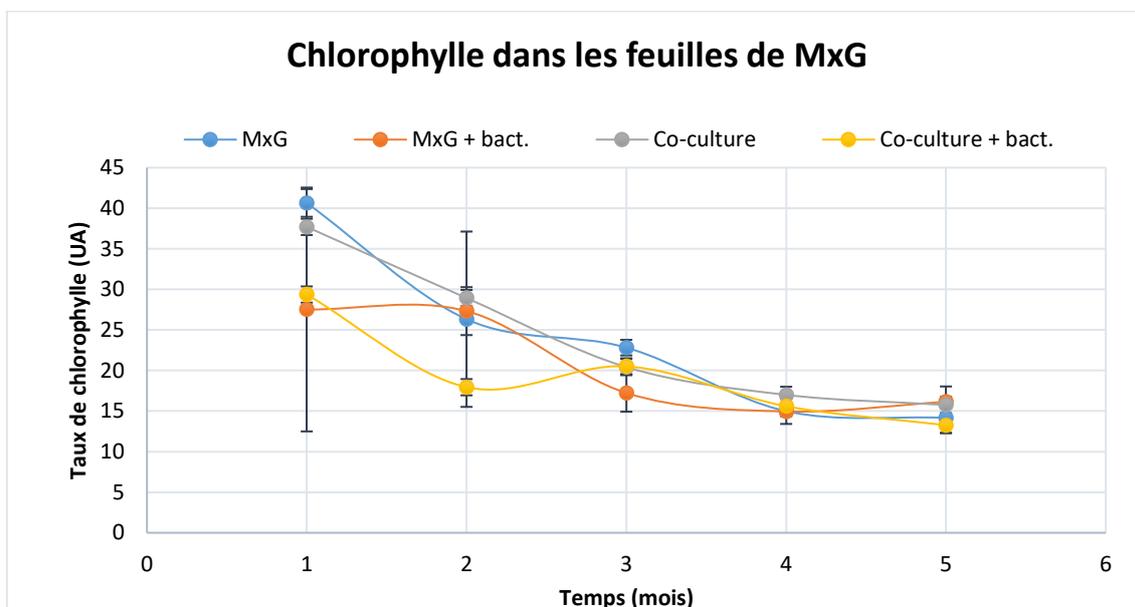


Figure 58 : Évolution de la teneur en chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de MxG au cours du temps pour chacune des modalités. Pour chaque temps, aucune différence du temps de chlorophylle n'est observée entre les différentes conditions ($p > 0,05$; $n=6$).

La teneur en chlorophylle dans les feuilles de MxG a été mesurée chaque mois tout au long de l'expérimentation (Figure 58). Les résultats montrent une diminution de la teneur en chlorophylle au cours du temps. Pour chaque temps, les teneurs sont comparées entre les différentes conditions. Aucune différence significative n'est montrée entre les conditions, quel que soit le temps. La présence de bactéries et donc de benzo(a)pyrène et/ ou de trèfle blanc n'impacte donc pas la teneur en chlorophylle dans les feuilles de MxG.

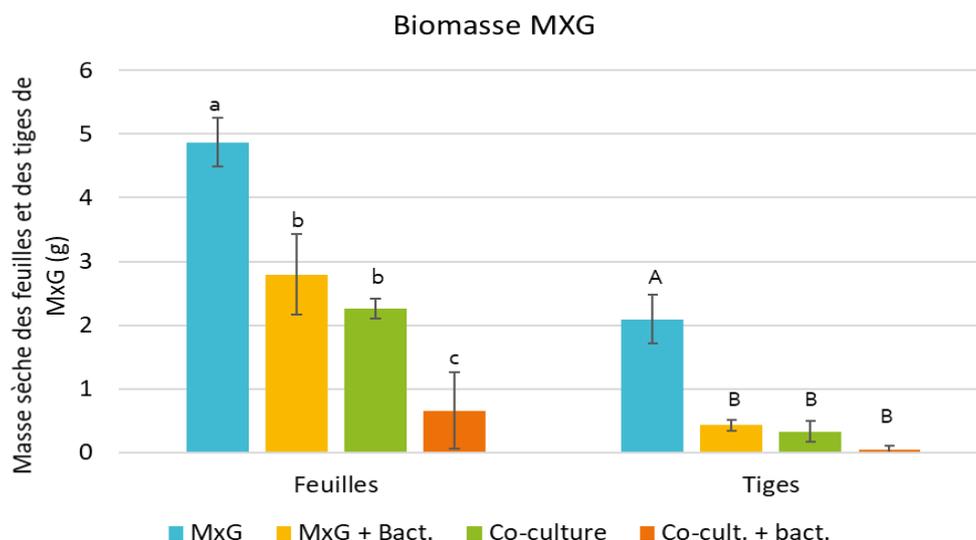


Figure 59 : Masses sèches des feuilles et tiges de MxG pour chacune des conditions. Des lettres minuscules différentes indiquent des différences significatives pour les biomasses de feuilles entre les conditions alors que les lettres majuscules montrent les différences significatives pour les biomasses des tiges entre les différentes conditions ($p < 0,05$; $n=3$).

Les résultats de biomasses obtenus montrent, que ce soit pour les tiges ou les feuilles, des biomasses significativement plus élevées lorsque MxG est « seul » comparé aux autres conditions : en présence de bactéries et/ou de trèfle blanc. Ces résultats sont en accord avec la hauteur des plants de MxG, qui confirme que MxG se développe mieux « seul ».

En comparant les autres conditions entre elles, la biomasse des feuilles est, ensuite, significativement plus importante pour les conditions « MxG + bactéries » et « co-culture » que pour la condition « co-culture + bactéries ». D'après ces résultats, coupler la co-culture et la bioaugmentation entraîne un effet négatif sur la biomasse des feuilles de MxG, ceci pouvant être dû à une compétition pour les ressources et en plus, à la contamination par le benzo(a)pyrène. Ces résultats sont en accord avec les mesures de hauteurs des plants de MxG.

Pour les tiges, les 3 conditions : « MxG + bactéries », « co-culture » et « co-culture + bactéries » présentent des biomasses significativement plus faibles que pour MxG « seul » mais ne sont pas différentes entre elles.

D'un point de vue valorisation de la biomasse, la condition MxG « seul » semble donc être celle à privilégier puisque c'est pour cette condition que la productivité est la plus importante. La présence de bactéries et/ou de trèfle blanc impacte négativement la production de biomasse, suggérant une compétition pour les ressources et/ou une inhibition de la production à cause de concentrations plus importantes en benzo(a)pyrène. Il faut tout de même rappeler que cette expérimentation n'a duré que 148 jours et sur une quantité de sol de seulement 1 kg. Ces résultats préliminaires sont à confirmer avec une plantation sur site où la compétition pour les ressources pourrait être plus faible, le volume de sol étant moins contraint.

2.4.2. Suivi du développement du trèfle blanc

Comme pour MxG, le taux de chlorophylle dans les feuilles de trèfle blanc a été mesurée chaque mois (Figure 60) et la biomasse des parties aériennes de trèfle a été déterminée à la fin de l'expérimentation (Figure 61) afin de déterminer l'influence de la bioaugmentation sur cette espèce végétale.

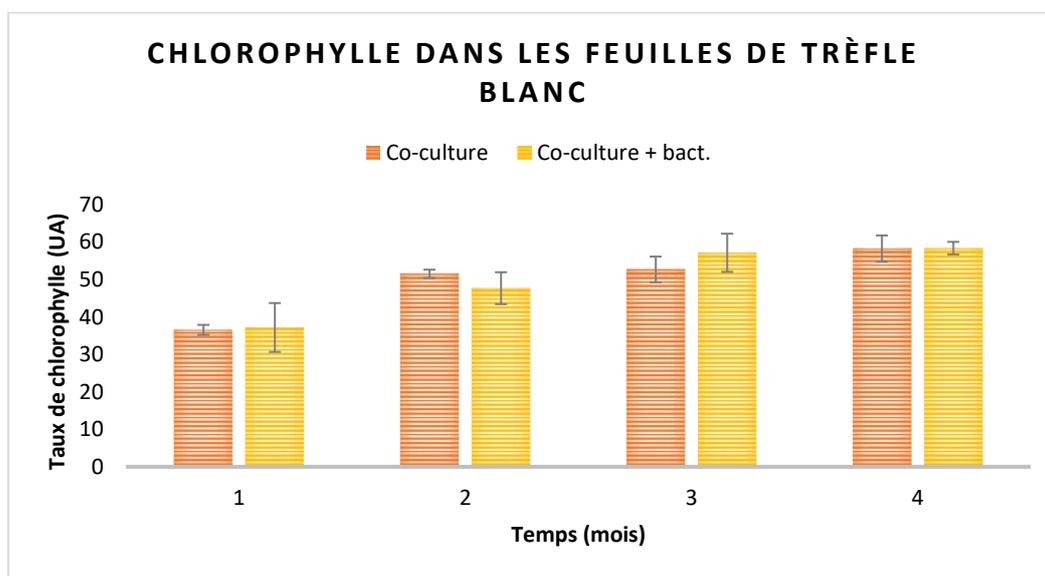


Figure 60 : Évolution de la teneur en chlorophylle (unité arbitraire) dans les feuilles de trèfle blanc au cours du temps en fonction des modalités "co-culture" et "co-culture + bactéries". Pour chaque temps, aucune différence n'est montrée entre les deux conditions ($p > 0,05$; $n = 9$).

Chaque mois, le taux de chlorophylle a été mesuré dans les feuilles de trèfle blanc pour la condition « co-culture » et la condition « co-culture + bactéries ». Aucune différence n'est observée entre les deux conditions, quel que soit le temps. Les résultats suggèrent que la présence de bactéries inoculées dans le technosol n'a pas d'impact sur le taux de chlorophylle

dans les feuilles de trèfle blanc, et par conséquent, que le benzo(a)pyrène apporté dans le technosol lors de l'inoculation des bactéries n'a pas d'impact sur la teneur en chlorophylle.

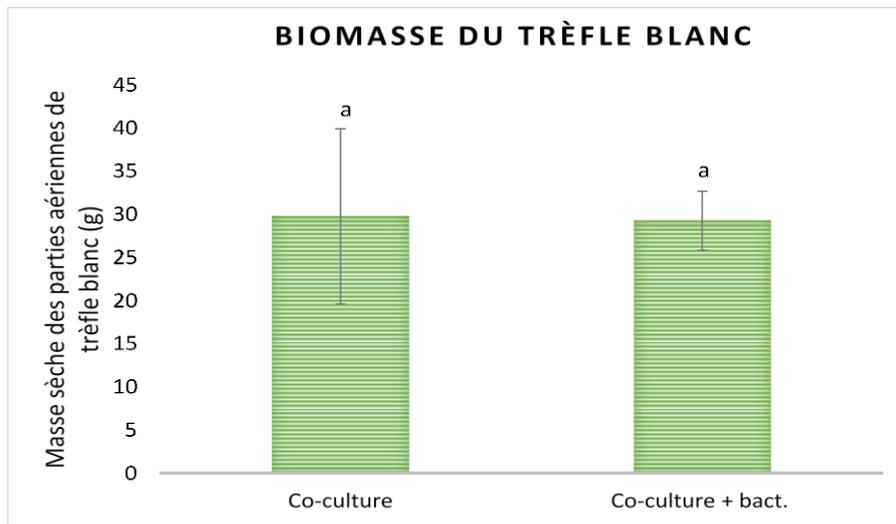


Figure 61 : Masse sèches des parties aériennes de trèfle blanc lorsqu'il se trouve en co-culture avec MxG ou alors en co-culture en présence de bioaugmentation. Les lettres identiques indiquent l'absence de différences significatives entre les conditions ($p > 0,05$; $n=3$).

Les résultats obtenus concernant les biomasses aériennes de trèfle blanc en co-culture en absence et en présence de bioaugmentation n'indiquent pas de différences entre elles. Les résultats suggèrent donc que la présence de bactéries et donc l'augmentation de la concentration en benzo(a)pyrène dans le technosol n'ont pas d'impact négatif sur la biomasse du trèfle blanc.

Concernant MxG, un meilleur développement et une meilleure productivité sont observés lorsqu'il est « seul ». La bioaugmentation ou la présence de trèfle blanc inhibe sa croissance et sa production de biomasse en mésocosme. De plus, l'association entre la co-culture et la bioaugmentation inhibe de façon encore plus importante sa croissance et sa production de biomasse foliaire. En revanche, la bioaugmentation et/ou la présence de trèfle blanc n'a pas d'effet sur les teneurs en chlorophylle dans les feuilles de MxG.

D'un point de vue valorisation de biomasse, la monoculture de MxG semble être la meilleure condition, sur du court terme et en mésocosme, puisque la bioaugmentation et présence de trèfle blanc entraîne une inhibition de la productivité de MxG. Des essais *in situ* devront être réalisés afin de s'affranchir du faible volume de sol.

Concernant le trèfle, la bioaugmentation et par conséquent l'apport de benzo(a)pyrène dans le technosol n'impacte ni la teneur en chlorophylle dans les feuilles de l'espèce végétale ni la biomasse aérienne produite.

2.5. Suivi de la microflore du technosol

2.5.1. Analyse de la densité microbienne par qPCR

2.5.1.1. Analyse de la densité bactérienne

Le nombre de copies d'ADNr 16S permettant d'estimer la densité des bactéries dans le technosol a été quantifié par qPCR à T0 et TF pour chaque modalité (Figure 62).

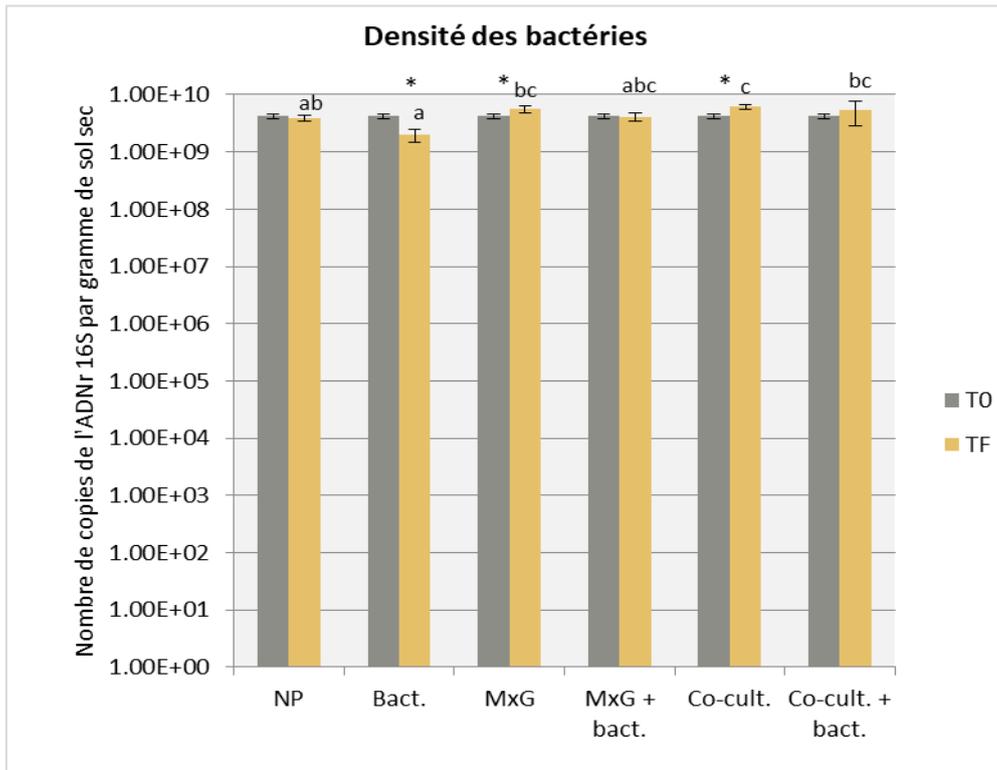


Figure 62 : Nombre de copies de l'ADNr 16S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en gris) et à TF (en jaune). Des lettres différentes montrent des différences statistiquement significatives à TF entre les différentes conditions. Les astérisques (*) montrent les différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$; $n=6$).

Les résultats montrent un nombre moyen de copies de gènes de $4,2 \cdot 10^9$ à T0 dans le technosol. A TF, le nombre moyen de copies de gènes varie de $2,0 \cdot 10^9$ pour la condition « bactéries » à $6,2 \cdot 10^9$ pour la condition « co-culture ». Les analyses statistiques montrent que le nombre de copies d'ADNr 16S est significativement plus élevé à TF après culture de MxG ainsi qu'après la co-culture comparé à T0. Ces résultats indiquent donc que la culture de MxG et la co-culture augmentent significativement la densité de bactéries dans le technosol comparée au début de l'expérimentation. Ces résultats confirment ceux obtenus pour la première expérimentation, où une augmentation significative du nombre de copies de gènes bactériens a également été montrée.

En revanche, une diminution significative du nombre de copies de gènes est observée pour la condition « bactéries » entre T0 (avant l'inoculation de bactéries) et TF. Ce résultat permet de constater que l'ajout de bactéries n'augmente pas le nombre de copies de gènes bactériens sur le « long terme » (148 jours), puisqu'au contraire, le nombre de copies d'ADNr 16S a diminué. Cette observation peut être expliquée par l'impact négatif de l'ajout de benzo(a)pyrène en même temps que l'inoculum sur les communautés bactériennes endémiques ou par une compétition entre les bactéries ajoutées et les bactéries autochtones.

En comparant les différentes conditions à TF, un nombre de gènes significativement plus élevé est observé pour la co-culture comparé à la condition « non planté », suggérant un impact positif de la co-culture sur la densité bactérienne du technosol.

2.5.1.2. Analyse de la densité fongique

Le nombre de copies d'ADNr 18S permettant d'estimer la densité des champignons dans le technosol a été quantifié par qPCR à T0 et TF pour chaque modalité (Figure 63).

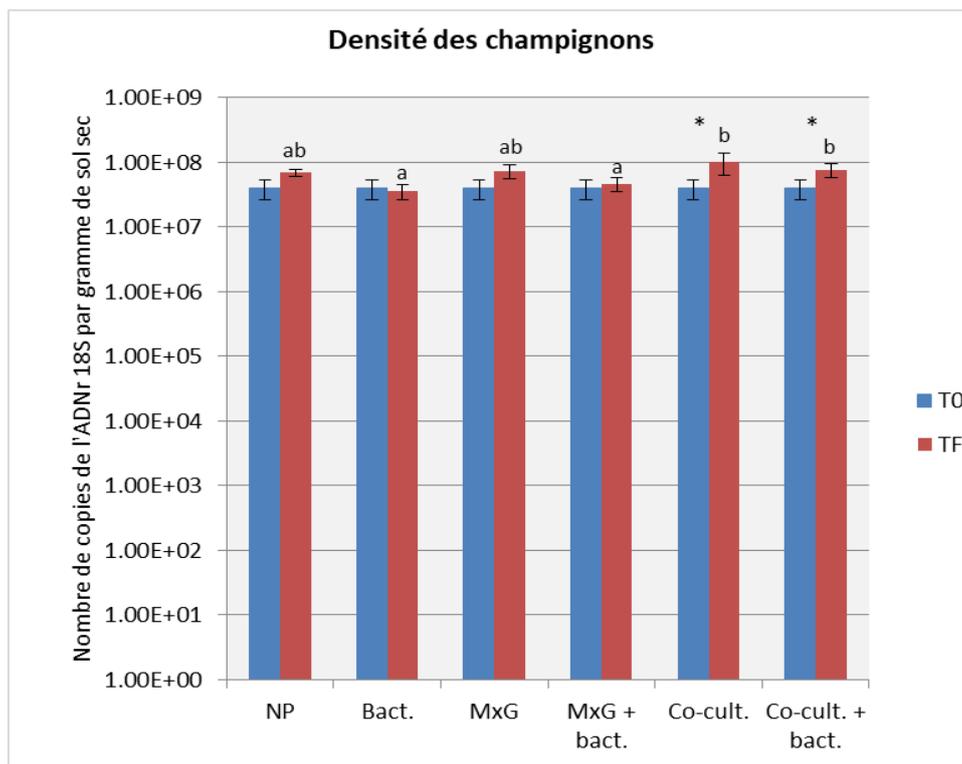


Figure 63 : Nombre de copies d'ADNr 18S par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en bleu) et à TF (en rouge). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$; $n=6$).

A T0, le nombre moyen de copies d'ADNr 18S est de $4,1 \cdot 10^7$. Il augmente significativement à TF uniquement après la co-culture et la co-culture + bactéries pour

atteindre $1,0 \cdot 10^8$ et $7,8 \cdot 10^7$ respectivement. Ces résultats concordent avec ceux de la première expérimentation, où la co-culture avait également permis une augmentation du nombre de gènes d'ADNr 18S.

Les autres modalités de bioremédiation testées ne permettent pas d'augmenter la densité d'ADNr 18S et les résultats permettent de montrer que l'ajout de bactéries en présence ou non de MxG n'impacte pas le nombre de gènes fongiques, montrant également que l'ajout de benzo(a)pyrène n'a pas d'effet négatif sur la densité de la population fongique.

La modalité la plus intéressante pour améliorer la qualité du technosol *via* l'augmentation de la densité bactérienne et fongique est donc la co-culture, en présence ou non de bioaugmentation.

2.5.1.3. Analyse de la densité bactérienne dégradante

Le dernier gène étudié est un gène spécifique permettant de cibler des bactéries Gram positif intervenant dans la première étape de dégradation des HAP. Le nombre de copies de ce gène est quantifié à T0 et TF pour chaque modalité.

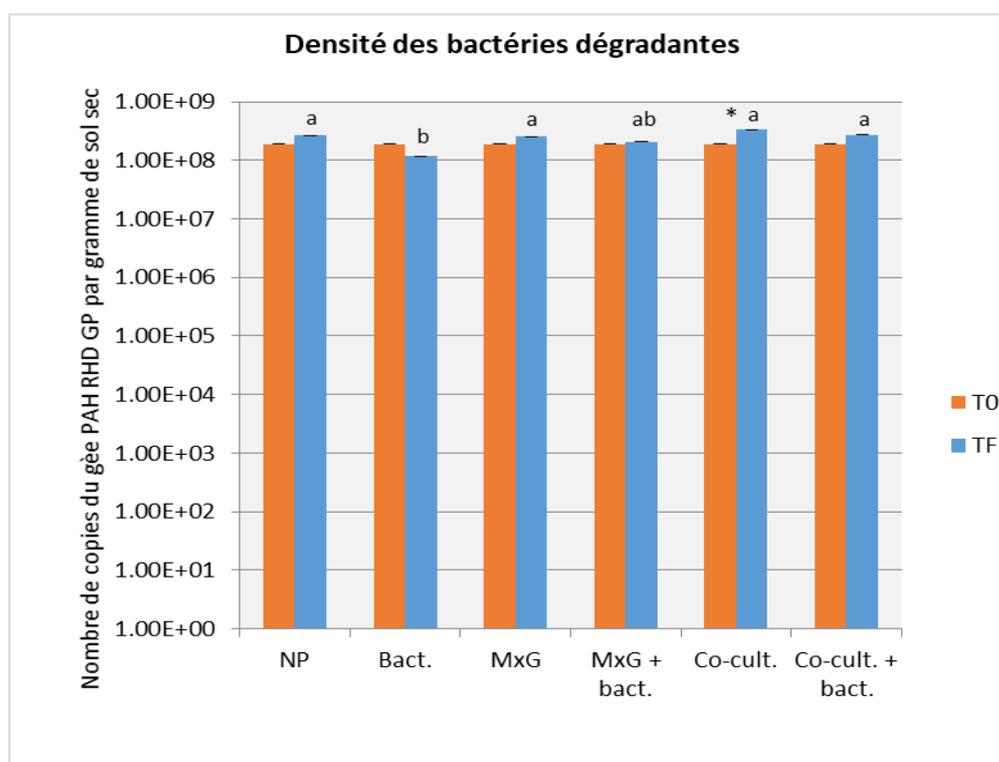


Figure 64 : Nombre de copies du gène PAH-RHD α GP par gramme de sol sec pour les différentes modalités à T0 (en orange) et à TF (en bleu). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les modalités à TF. Les astérisques (*) montrent des différences statistiquement significatives pour une même modalité entre T0 et TF ($p < 0,05$; $n=6$).

En comparant les résultats obtenus à TF concernant le nombre de copies du gène PAH-RHD α GP, un nombre de copies de ce gène de dégradation plus faible pour la condition « bactéries » est observé, comparé au technosol non planté. Cependant, aucune diminution significative n'est montrée entre T0 et TF.

Une augmentation significative du nombre de gènes entre T0 et TF est uniquement observée pour la condition co-culture. Puisque ce gène est utilisé comme un bio-indicateur de la densité de population bactérienne dégradant les HAP (Cébron et al., 2008), la co-culture semble donc être la modalité la plus intéressante pour la phytoremédiation de ces polluants organiques. A noter tout de même que les bactéries inoculées dans le technosol : *Streptomyces globisporus*, ne possèdent pas ce gène. D'autres gènes de dégradation devraient être testés pour approfondir ces résultats.

L'analyse de la densité des microorganismes dans le technosol montre que la culture de MxG « seul » permet d'augmenter le nombre d'ADNr 16S, même si cette augmentation n'est pas suffisante pour induire une différence significative avec la condition « non planté ». Cependant, la monoculture de MxG n'entraîne pas d'effet sur la densité de la population fongique et de la population de bactéries dégradantes.

La bioaugmentation seule induit une inhibition du nombre de gènes bactériens et n'a pas d'autres effets sur la densité des autres gènes testés, cette modalité est donc la moins intéressante en termes de densité bactérienne.

La co-culture est la seule modalité qui permet d'augmenter significativement le nombre de copies d'ADNr 16S, 18S et le nombre de copies de gènes ciblant les bactéries dégradantes. Cette modalité s'avère donc être la plus intéressante en termes de densité microbienne mais également pour promouvoir la densité de bactéries capables de dégrader les HAP, mettant en évidence un effet positif et encourageant de la co-culture pour l'amélioration de la phytoremédiation des HAP.

2.5.2. Respiration du technosol

La respiration du technosol, exprimée en mg de CO₂ produit par kg de sol sec, a été évaluée pour quantifier l'activité microbienne globale avant et à la fin de l'expérimentation de bioremédiation. Pour cela, une cinétique de respiration a été réalisée durant 70 jours à T0 pour le technosol non planté et juste après inoculation des bactéries *Streptomyces globisporus* (Figure 65) ainsi qu'à TF pour toutes les conditions étudiées (Figure 66).

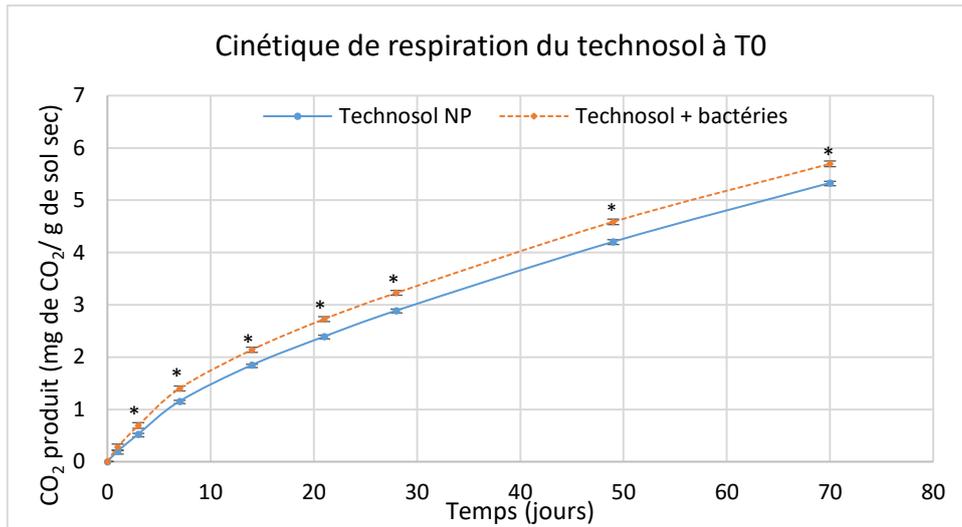


Figure 65 : Concentration de CO₂ produit par gramme de sol sec à T0 pour le technosol non planté (bleu) et pour le technosol bioaugmenté (orange). Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre les deux conditions pour un même temps ($p < 0,05$; $n = 3$).

Les résultats de respiration du technosol montrent une augmentation significative de la production de CO₂ en présence de bactéries inoculées comparée au technosol non planté pour chaque temps excepté après 24h d'incubation. La bioaugmentation permet donc d'augmenter la respiration du technosol et donc son activité microbienne.

Vu l'augmentation de la concentration en BaP qui a été apporté lors de l'inoculation des bactéries, il est également possible de conclure que la contamination du technosol n'impacte pas de manière négative l'activité des microorganismes du sol.

Cinétique de respiration du technosol à TF

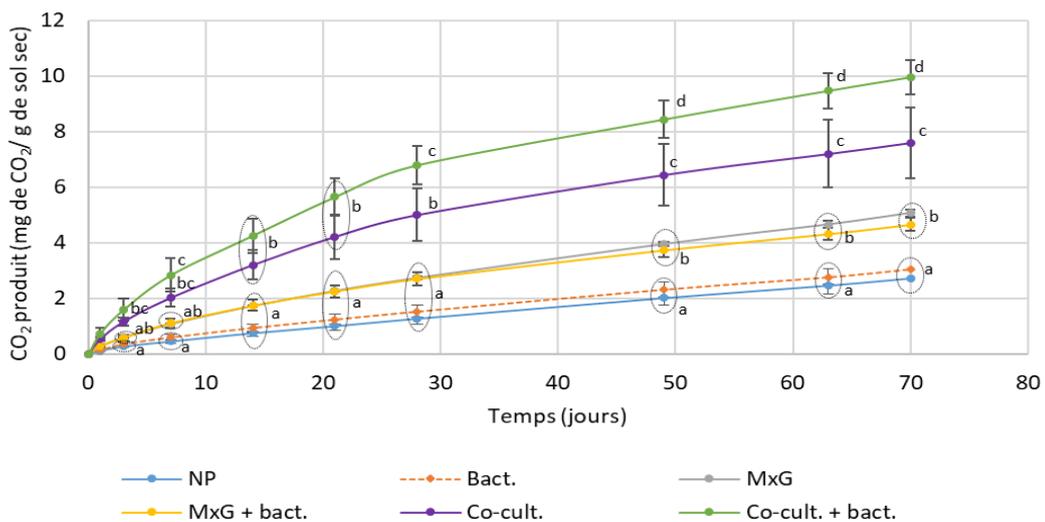


Figure 66 : Concentration de CO₂ produit par gramme de sol sec à TF pour les différentes modalités de bioremédiation sur le technosol. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions pour un même temps alors que les valeurs encrées ne présentent pas de différences significatives entre elles ($p < 0,05$; $n = 3$).

Cette même cinétique de respiration du technosol a été réalisée à TF, après les 148 jours d'expérimentation (Figure 66). Les résultats obtenus ne montrent aucune différence en termes de quantité de CO₂ produit entre les conditions « non planté » et « bactéries », quel que soit le temps de la cinétique. Ce résultat diffère de la cinétique réalisée à T0 et suggère que l'inoculation de bactéries endémiques du technosol a un effet positif sur l'activité microbienne sur du court terme uniquement.

La culture de MxG a, en revanche, permis d'augmenter l'activité microbienne globale du sol en comparaison avec la condition « non planté » (et technosol + bactéries) puisqu'une augmentation de la production de CO₂ est mesurée à partir du 49^{ème} jour, et ce jusqu'à la fin de la cinétique. Al Souki et ses collaborateurs ont également montré une croissance de la respiration du sol dans les sols plantés avec cette espèce végétale (Al Souki et al., 2017). Cependant, l'ajout de bactéries en plus de MxG ne permet pas d'induire de différence significative par rapport à MxG seul, indiquant comme précédemment l'absence d'impact de l'ajout des bactéries sur l'activité du technosol.

A partir de 14 jours de cinétique, la quantité de CO₂ produit est significativement plus importante après la culture simultanée de MxG et du trèfle comparé aux conditions : non planté, bactéries, MxG et MxG + bactéries. La co-culture permet donc d'augmenter significativement la respiration du sol et donc l'activité microbienne globale comparé aux modalités citées.

Enfin, la condition pour laquelle la production de CO₂ est significativement plus élevée par rapport à toutes les autres modalités est la co-culture + bactéries. Contrairement au technosol sans végétaux ou en monoculture de MxG, l'ajout de bactéries dans la co-culture a permis d'augmenter significativement la respiration microbienne et donc l'activité microbienne comparée à la co-culture sans bioaugmentation.

Si la respiration du sol est utilisée pour suivre la survie des bactéries inoculées, puisque l'ajout de bactéries dans un sol peut conduire à une augmentation de la respiration microbienne comparée aux sols non inoculés (Pacwa-Płociniczak et al., 2019), les résultats obtenus suggèrent que les bactéries inoculées auraient survécu seulement dans la condition co-culture. Bien que la survie des microorganismes inoculés ne soit pas suivie spécifiquement, le dénombrement des UFC au cours du temps permettra de conclure sur le nombre de microorganismes résistants et potentiellement capables de dégrader le BaP.

A la fin de la cinétique de respiration, le CO₂ produit permet de classer les différentes modalités dans l'ordre croissant de l'activité microbienne du technosol : non planté ; bioaugmentation < MxG ; MxG + bioaugmentation < co-culture < co-culture + bioaugmentation. D'après ces résultats, la condition qui semble être la plus intéressante en termes de qualité du technosol est l'association de la co-culture et de la bioaugmentation.

De plus, la respiration microbienne peut être utilisée comme un indicateur de la dégradation des HAP puisqu'il a été montré une corrélation entre l'augmentation de l'activité du sol et la

dissipation des hydrocarbures (Mancera-López et al., 2008). Cependant ces résultats ne semblent pas corrélés avec ceux obtenus lors de la mesure de dissipation des HAP. En effet, seule la culture de MxG induit une dissipation mesurable des HAP totaux pour cette expérimentation qui a duré 148 jours ; et seules les conditions MxG et MxG + bactéries induisent la dissipation mesurable des HAP totaux si on excepte les concentrations en benzo(a)pyrène. La co-culture et la co-culture couplée à la bioaugmentation n'ont pas permis d'induire de dissipation des HAP mesurable dans cette expérimentation alors que la respiration est la plus importante pour ces conditions. Un suivi de dégradation des HAP plus précise, par marquage des carbones par exemple, pourrait établir un lien entre l'augmentation de la respiration et l'utilisation du carbone par le métabolisme microbien.

Une augmentation de la respiration microbienne et ainsi de l'activité microbienne dans le technosol est observée à T0 juste après l'inoculation des bactéries sélectionnées. En revanche, à la fin des 148 jours d'expérimentation de bioremédiation, la présence de bactéries inoculées ne permet plus d'induire une augmentation de la respiration du technosol, pouvant suggérer une survie des microorganismes inoculés, et par conséquent de la bioremédiation, uniquement sur le court terme excepté pour la condition co-culture + bioaugmentation. En effet, la bioaugmentation couplée à la co-culture permet d'obtenir une respiration et donc une activité microbienne significativement plus élevée que toutes les autres modalités.

Les mesures de respiration mettent également en évidence la capacité de MxG à augmenter l'activité microbienne du technosol et ainsi sa qualité comparée à la condition non plantée. De plus, la co-culture entraîne une augmentation de l'activité microbienne en comparaison avec la monoculture de MxG, montrant l'intérêt d'associer les deux espèces végétales pour améliorer la qualité du technosol.

2.5.3. Dénombrement des UFC résistantes / capables de dégrader le BaP

Chaque mois, des prélèvements de technosol ont été réalisés pour dénombrer les colonies se développant sur un milieu BH + BaP après ensemencement, afin de déterminer l'influence des différentes modalités de bioremédiation sur un nombre estimé de bactéries viables pouvant résister voire dégrader le benzo(a)pyrène (Figure 67).

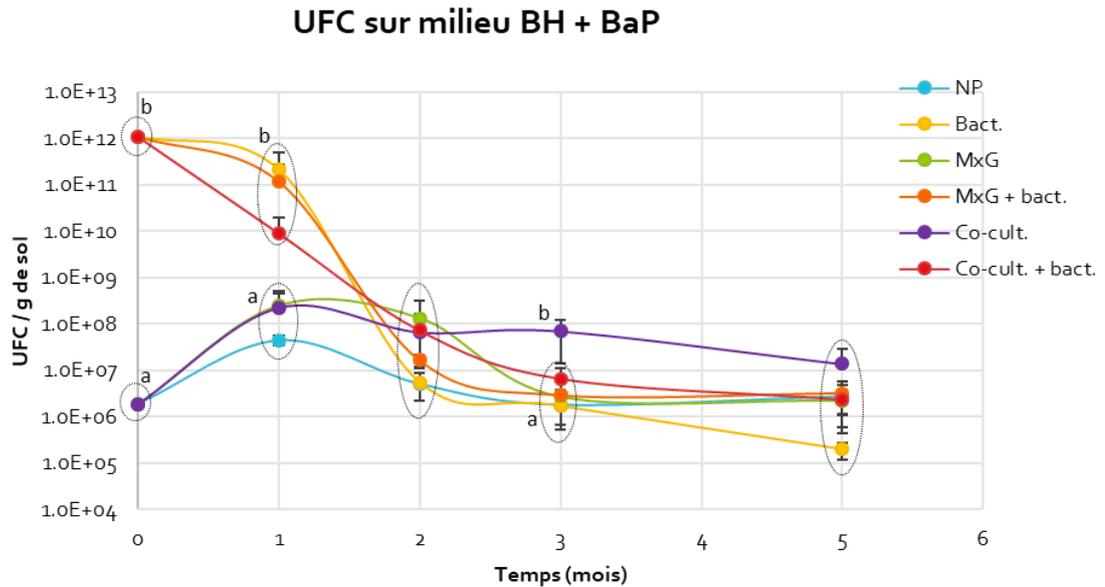


Figure 67 : Nombre d'UFC par gramme de sol déterminé sur un milieu BH + BaP tous les mois pour chacune des conditions de bioremédiation. Les lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les modalités pour un même temps alors qu'aucune différence n'est montrée entre les points encerclés pour un même temps ($p < 0,05$; $n=9$).

A T0, $1,08 \cdot 10^{12}$ UFC par gramme de sol ont été dénombrées pour le technosol dans lequel les bactéries *Streptomyces globisporus* ont été inoculées alors que $1,88 \cdot 10^6$ UFC/g de sol ont été comptées pour le technosol sans bioaugmentation. Ce résultat montre que la bioaugmentation a bien permis d'augmenter de façon considérable le nombre de microorganismes capables de résister et/ou dégrader le BaP en comparaison avec le technosol sans bioaugmentation.

Après un mois, une différence significative est toujours observée pour toutes les conditions avec bioaugmentation « bactéries », « MxG + bactéries » et « co-culture + bactéries » comparé aux conditions sans bioaugmentation : « non planté », « MxG » et « co-culture ». En revanche, pour tous les temps suivants, plus aucune différence d'UFC n'est observée entre les conditions avec bioaugmentation comparées aux conditions sans bioaugmentation. Le nombre de colonies se développant sur les milieux de cultures est semblable entre toutes les conditions, excepté à 3 mois où le nombre d'UFC dans le technosol avec co-culture est significativement plus élevé que toutes les autres conditions, ce résultat n'est cependant pas répété à TF.

Les résultats obtenus indiquent donc une augmentation de la population microbienne résistante, voir dégradante, au BaP pendant les deux premiers mois d'expérimentation pour les conditions avec bioaugmentation, montrant un effet positif de l'inoculation de bactéries endémiques sur la population bactérienne dégradante. En revanche, à partir du 3^{ème} mois d'expérimentation, plus aucune différence n'est observée entre les conditions avec et sans bioaugmentation, suggérant que les bactéries inoculées ne survivent dans le technosol que

durant les 2 premiers mois d'expérimentation. Ces résultats mettent en évidence un effet de la bioaugmentation à court terme uniquement, même en utilisant des bactéries endémiques au technosol. Afin d'améliorer la dissipation des HAP, il serait donc nécessaire d'apporter régulièrement les bactéries dans le technosol. Par exemple, Agnello et ses collaborateurs inoculent tous les 15 jours des microorganismes non endémiques dans leur sol lors de leur expérimentation (Agnello et al., 2016).

Le comptage des UFC sur un milieu BH + BaP met en évidence une augmentation de la population microbienne résistante voir dégradant le BaP pendant les deux premiers mois d'expérimentation uniquement. Après cette période, la bioaugmentation ne se montre plus efficace. Afin d'améliorer la dissipation des HAP, il serait donc nécessaire d'apporter les bactéries sélectionnées plus fréquemment dans le technosol, tout en modifiant la technique d'inoculation.

2.6. Conclusion pour la partie phytoremédiation couplée à la bioaugmentation

Pour cette deuxième expérimentation, l'objectif visait à déterminer si une amélioration de la phytoremédiation par MxG en monoculture ou en co-culture avec le trèfle blanc pouvait être observée en présence de bioaugmentation. Une bactérie, *Streptomyces globisporus*, endémique du technosol a été sélectionnée pour son potentiel de biodégradation du benzo(a)pyrène.

L'inoculation des bactéries dans le technosol a entraîné une contamination de ce dernier en benzo(a)pyrène, augmentant de façon significative les valeurs d'ETT et d'IRCC, montrant un risque cancérigène du technosol en cas de contact direct et ainsi qu'un risque pour la qualité des eaux potables souterraines mais ne permettant pas de mettre en évidence un effet écotoxique du technosol par le test « Inhibition de la croissance racinaire ». La méthode d'inoculation utilisée n'est donc pas adaptée.

La bioaugmentation a tout de même permis d'augmenter la population microbienne résistante voire dégradant le BaP pendant les deux premiers mois d'expérimentation, montrant une efficacité de cette méthode sur du court terme et la nécessité d'inoculer des bactéries plus fréquemment pour améliorer l'efficacité de la technique. L'inoculation de bactéries a également permis d'augmenter la respiration microbienne du technosol à T0 comparée à la condition non plantée et donc l'activité microbienne globale du technosol. En revanche, à la fin des 148 jours d'expérimentation, la présence de bactéries inoculées ne permet plus d'induire une augmentation de la respiration du technosol, pouvant appuyer l'hypothèse d'une survie des microorganismes sur du court terme, excepté pour la condition

co-culture + bioaugmentation qui présente l'activité microbienne la plus élevée de toutes les modalités confondues.

Concernant la phytoremédiation, seule la monoculture de MxG a permis de diminuer la concentration en HAP totaux entre le début et la fin des 148 jours de culture, confirmant ainsi l'efficacité de cette espèce végétale pour la rhizodégradation des HAP. De plus, c'est la seule condition qui a permis de diminuer significativement l'IRCC entre le début et la fin de l'expérimentation.

L'association entre la phytoremédiation par MxG et la bioaugmentation par *Streptomyces globisporus* permet de diminuer de façon significative les concentrations en phénanthrène, en pyrène et en benzo(b)fluoranthène ainsi que la somme des HAP en excluant le BaP. Cette modalité s'avère donc être la plus efficace pour la dissipation des HAP mais n'est à privilégier seulement si la bioaugmentation peut se faire sans contamination supplémentaire du technosol par le HAP utilisé pour maintenir la pression de sélection au cours de la culture bactérienne.

Concernant les ETM, ni les végétaux ni les bactéries ne modifient les concentrations totales dans le technosol. Les modalités « co-culture » et « co-culture + bioaugmentation » permettent de diminuer significativement les concentrations en zinc extraites au DTPA, et donc biodisponibles, montrant l'intérêt de la co-culture en présence ou absence de bactéries sur la phytostabilisation du zinc.

Du point de vue de la valorisation de la biomasse de MxG, un meilleur développement de la plante et une meilleure productivité sont observés lorsque MxG est cultivé « seul ». La bioaugmentation ou la présence de trèfle blanc inhibe sa croissance et sa production de biomasse en mésocosme. De plus, l'association entre la co-culture et la bioaugmentation inhibe de façon encore plus importante sa croissance et sa production de biomasse foliaire. La monoculture de MxG semble être la condition à privilégier en vue d'une valorisation de la biomasse. Il serait tout de même intéressant de déterminer si la bioaugmentation entraîne une inhibition de la biomasse de MxG en raison de la contamination en benzo(a)pyrène ou si'il s'agit d'un phénomène de compétition accentué par le volume restreint de sol lors des expérimentations en mésocosme.

Du point de vue de l'amélioration de la qualité du technosol, la culture de MxG en monoculture ou en co-culture a permis d'augmenter significativement la longueur racinaire de l'avoine, suggérant une amélioration de la qualité du technosol pour ces conditions.

L'analyse de la microflore a permis de montrer que la culture de MxG « seul » permet d'augmenter la densité bactérienne après 148 jours mais n'a pas eu d'impact sur la densité de la population fongique ni sur la densité de la population de bactéries dégradantes.

La co-culture étant la seule modalité permettant d'augmenter la densité bactérienne, fongique et la densité des bactéries dégradantes, elle s'avère être la plus intéressante en

termes de qualité du technosol mais aussi la plus encourageante vis-à-vis de l'amélioration de la dissipation des HAP.

MxG a permis d'augmenter l'activité microbienne globale du technosol, la co-culture également mais de façon encore plus importante, montrant l'intérêt de la co-culture pour l'amélioration de l'activité microbienne du sol. La bioaugmentation couplée à la co-culture permet d'obtenir une activité microbienne significativement plus élevée que toutes les autres modalités, mais ne permet en revanche aucune dissipation des HAP et inhibe la croissance et la biomasse de MxG, ce n'est donc pas la modalité à privilégier afin d'améliorer la phytoremédiation des HAP.

La modalité qui semble la plus intéressante selon les résultats obtenus après 148 jours de culture en mésocosme, est la monoculture de MxG puisque c'est pour cette condition uniquement qu'une dissipation des HAP totaux est observée avec également une diminution de l'IRCC. C'est également pour cette condition que la biomasse récoltée est la plus élevée, critère important si une valorisation de la biomasse est envisagée. De plus, la culture de MxG permet d'améliorer la qualité du technosol en augmentant l'activité microbienne globale du technosol et la densité bactérienne.

La co-culture entraîne une inhibition de la croissance et de la biomasse de MxG et n'a montré aucune dissipation des HAP dans cette expérimentation. Néanmoins elle permet d'augmenter la densité bactérienne, fongique ainsi que la densité des bactéries dégradantes et permet également d'augmenter l'activité microbienne du sol. De plus, cette modalité permet de diminuer la biodisponibilité du zinc, ce qui est intéressant pour de la phytostabilisation. Cette association végétale reste donc intéressante même si elle requiert un temps d'expérimentation plus long pour montrer des résultats en termes de dissipation des HAP (première expérimentation).

La phytoremédiation par MxG couplée à la bioaugmentation pourrait être intéressante uniquement si une technique est trouvée pour inoculer les bactéries endémiques sans contaminer le technosol puisque c'est pour cette technique que le plus grand nombre d'HAP a été dissipé (HAP totaux en excluant le BaP ; benzo(b)fluoranthène, pyrène et phénanthrène). En revanche, pour cette condition, l'activité microbienne du sol n'est pas augmentée par rapport à une monoculture de MxG, elle ne permet pas non plus d'augmenter la densité microbienne du technosol et entraîne une diminution de la biomasse de MxG par rapport à une monoculture.

Cette condition mérite d'être réétudiée après s'être assuré que l'inoculation des bactéries n'apporte pas de BaP dans le technosol et une inoculation plus fréquente (tous les deux mois par exemple) pourrait être réalisée.

3. Comparaison des deux méthodes utilisées : la co-culture et la bioaugmentation pour améliorer la phytoremédiation par MxG

Bien que les deux expérimentations ne se soient pas exactement déroulées dans les mêmes conditions puisque la quantité de sol utilisée était différente (9 kg pour la co-culture contre 1 kg pour la phytoremédiation assistée par bioaugmentation) ainsi que la durée d'expérimentation (263 jours pour la première expérimentation contre 148 pour la seconde), les deux techniques étudiées sont comparées afin de déterminer celle qui semble la plus intéressante et la plus adaptée à l'objectif de recherche.

Premièrement, la co-culture entre MxG et le trèfle blanc présente des avantages pour son utilisation en phytoremédiation des technosols contaminés. Elle a montré son efficacité en rhizodégradation puisqu'elle permet d'entraîner, après 263 jours de culture, une dissipation significative des HAP totaux ainsi qu'une diminution de l'IRCC, comme MxG en monoculture. Comparée à la monoculture, la co-culture améliore la dissipation de certains HAP tels que le pyrène et l'antracène. De plus, elle permet d'améliorer la qualité du technosol en diminuant son écotoxicité, contrairement à la monoculture de MxG.

Comme la monoculture de MxG, la co-culture augmente la densité des bactéries du technosol mais en plus, c'est la seule condition pour laquelle une augmentation significative de la densité des champignons du technosol et de la densité des bactéries Gram + dégradantes est montrée. Enfin, la deuxième expérimentation permet de montrer une augmentation de l'activité microbienne globale du technosol de manière plus importante que la monoculture de MxG et également une diminution de la biodisponibilité du zinc dans le technosol (2^{ème} expérimentation uniquement), contrairement à la monoculture, présentant donc un avantage pour la phytostabilisation du zinc dans le technosol.

L'inconvénient principal de la co-culture entre MxG et le trèfle blanc comparée à une monoculture de MxG est la mise en évidence d'une compétition pour les ressources entre les deux espèces végétales en mésocosme, conduisant à une diminution de la biomasse de MxG. Cependant cette biomasse en co-culture sur le technosol ne diffère pas de la biomasse de MxG en monoculture dans le sol témoin qui possède une quantité d'éléments nutritifs plus faible que le technosol. Deux autres inconvénients de la co-culture comparé à la monoculture sont, de plus, mis en évidence. Il s'agit premièrement d'une dissipation du fluoranthène plus importante en monoculture qu'en co-culture. En plus, la présence de trèfle blanc dans la co-culture semble induire une diminution la diversité bactérienne du technosol. Il serait nécessaire d'étudier les bénéfices / inconvénients de la co-culture sur site où le volume de sol serait moins contraint.

La phytoremédiation par MxG couplée à la bioaugmentation par *Streptomyces globisporus* présente aussi des avantages et des inconvénients par rapport à la monoculture de MxG.

Premièrement, l'inconvénient majeur de la bioaugmentation est la contamination du technosol par le BaP. Une autre technique de récupération des bactéries en excluant le polluant doit donc être mise au point afin de ne pas écarter la bioaugmentation lors de prochaines recherches.

La bioaugmentation a, de plus, montré son efficacité sur du court terme en augmentant la population microbienne dégradante sur les deux premiers mois uniquement, mettant en évidence la nécessité de renouveler l'inoculation des bactéries plusieurs fois, même lorsqu'il s'agit de bactéries endémiques du technosol. De plus, la bioaugmentation ne permet ni d'augmenter la densité microbienne ni l'activité microbienne du technosol contrairement à la monoculture de MxG à la fin des 148 jours d'expérimentation. Enfin, la présence de bioaugmentation entraîne une diminution de la croissance et de la biomasse de MxG comparé à la monoculture de MxG.

Le principal avantage de la phytoremédiation assistée par bioaugmentation est le nombre plus important de HAP dissipés comparé à la monoculture de MxG (phénanthrène, benzo(b)fluoranthène, pyrène et la somme des HAP en excluant le BaP). Il conviendrait donc de réitérer les expérimentations en bioaugmentation en employant une autre technique d'inoculation ce qui semble être le premier verrou relatif à cette méthode.

Enfin, la dernière méthode testée pour améliorer la phytoremédiation du technosol par MxG est l'association de la co-culture avec la bioaugmentation. Comme pour la phytoremédiation par MxG assistée par bioaugmentation, le principal inconvénient de cette technique est la contamination du technosol par du BaP. De plus, co-culture couplée à la bioaugmentation ne permet pas d'induire une dissipation des HAP ni d'augmenter la densité des bactéries dans le technosol contrairement à la monoculture de MxG. De plus, c'est pour cette condition que la croissance de MxG et sa biomasse foliaire est impactée de manière la plus importante par rapport à toutes les autres conditions.

Le principal avantage de la co-culture couplée à la bioaugmentation est l'augmentation de l'activité microbienne du sol, de façon plus importante que toutes les autres conditions. De plus, comme la co-culture et contrairement à la monoculture de MxG, la co-culture couplée à la bioaugmentation permet d'augmenter la densité des champignons dans le sol et entraîne une diminution de la biodisponibilité du zinc et donc une amélioration de la phytostabilisation de cet ETM dans le technosol.

D'après les résultats obtenus concernant la dissipation des HAP, la phytostabilisation des ETM et l'amélioration de la qualité du technosol, la co-culture apparaît, dans nos conditions expérimentales, comme la technique la plus intéressante pour améliorer la phytoremédiation des HAP et des ETM et améliorer la qualité du technosol par rapport à la phytoremédiation assistée par bioaugmentation.

De plus, lorsque l'on compare la mise en place des deux méthodes, la plantation de trèfle blanc est plus économique, plus rapide et plus simple à mettre en œuvre puisqu'il suffit de semer les graines de trèfle une seule fois, le trèfle étant une espèce vivace.

En revanche, la bioaugmentation nécessite de produire des bactéries en masse, tout en gardant une pression de sélection, de centrifuger les milieux de cultures pour ne récupérer que les bactéries sans le polluant, qui de plus ne s'est pas montré efficace et a provoqué une contamination plus importante du technosol. Cette production est donc plus onéreuse et plus fastidieuse à mettre en œuvre surtout que les résultats ont montré la nécessité de renouveler l'opération d'inoculation. De plus, transposer la bioaugmentation sur site nécessite une production de bactéries encore plus importante. Par ailleurs, des études ont montré que même si la bioaugmentation s'avère efficace au laboratoire, une biodégradation réussie sur le terrain est souvent plus difficile à réaliser (Glick, 2010), montrant encore une autre difficulté de la phytoremédiation assistée par bioaugmentation

Conclusion & perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a consisté à étudier des voies d'amélioration de la phytoremédiation par MxG. Pour cela, les capacités de remédiation (dissipation des HAP, stabilisation des ETM, amélioration de la qualité du technosol, augmentation de la biomasse valorisable, etc.) de MxG en co-culture avec du trèfle blanc ou de MxG en bioaugmentation avec des microorganismes endémiques présentant un potentiel de dégradation des HAP ont été comparées à l'évolution naturelle du technosol et à sa phytoremédiation par MxG seul.

Les résultats obtenus ont montré une croissance des deux espèces végétales : MxG et le trèfle blanc sur le technosol. De plus, grâce aux teneurs élevées en éléments nutritifs dans le technosol, ce dernier a eu un effet positif sur le développement de MxG, sa biomasse y étant significativement plus importante que dans le sol standard non contaminé. Par ailleurs, l'absence de transfert des contaminants vers les deux espèces végétales permettra de faciliter la valorisation de la biomasse de MxG et ne pas avoir à gérer spécifiquement celle du trèfle blanc. Concernant MxG, plusieurs voies de valorisation pourront être envisagées lorsqu'il sera en culture sur site, et notamment la combustion de ses tiges puisque leur analyse n'a pas montré de contre-indication à cela.

Du point de vue de la phytoremédiation, MxG en monoculture ou en co-culture avec le trèfle blanc et même le trèfle blanc « seul » ont montré leur efficacité en rhizodégradation puisqu'une dissipation significative des teneurs en HAP totaux a été montrée en présence des végétaux après 263 jours de culture. De plus, la présence des végétaux a entraîné une diminution significative de l'indice de risque cumulatif de cancer (IRCC) comparé à la condition « non planté ».

Le bon développement des végétaux et la rhizodégradation des HAP sur le technosol montrent la possibilité de remédier des sédiments excavés par phytoremédiation après les avoir mélangé à du sol, ouvrant ainsi une nouvelle voie de valorisation des sédiments excavés.

Les résultats obtenus avec la co-culture ont également permis de mettre en évidence des avantages de cette condition par rapport à la monoculture de MxG. En effet, après la culture simultanée des deux espèces végétales, une meilleure dissipation de deux HAP : le pyrène et l'anthracène a été montrée, ainsi qu'une amélioration de la qualité du technosol *via* une diminution de son écotoxicité, une augmentation de la densité de bactéries Gram positif dégradants les HAP et une augmentation de l'activité microbienne globale du technosol (2^{ème} expérimentation) en comparaison avec une monoculture de MxG. De plus, la co-culture a permis de diminuer la biodisponibilité du zinc dans le technosol (2^{ème} expérimentation uniquement), contrairement à la monoculture, présentant donc un avantage pour la phytostabilisation du zinc dans le technosol.

Cependant, la co-culture présente également des inconvénients par rapport à la monoculture. Le principal est la mise en évidence d'une compétition pour les ressources entre les deux espèces végétales en mésocosme, conduisant à une diminution de la biomasse de MxG.

Toutefois, cette biomasse en co-culture dans le technosol ne diffère pas de la biomasse de MxG en monoculture dans le sol témoin qui possède une quantité d'éléments nutritifs plus faible que le technosol. Cette compétition pourrait peut-être être résolue en plantant les deux espèces sur site où le volume de sol serait moins contraint. Deux autres inconvénients de la co-culture comparé à la monoculture ont, de plus, été mis en évidence. Il s'agit premièrement d'une dissipation du fluoranthène plus importante en monoculture qu'en co-culture et deuxièmement, la présence de trèfle blanc dans la co-culture semble induire une diminution la diversité bactérienne du technosol.

La phytoremédiation par MxG couplée à la bioaugmentation par *Streptomyces globisporus* présente aussi des avantages et des inconvénients par rapport à la monoculture de MxG.

Premièrement, l'inconvénient majeur de la bioaugmentation est la contamination du technosol par le BaP. Une autre technique de récupération des bactéries en excluant le polluant doit donc être mise au point afin de ne pas écarter la bioaugmentation lors de prochaines recherches. La bioaugmentation a, de plus, montré son efficacité sur du court terme en augmentant la population microbienne dégradante sur les deux premiers mois uniquement, mettant en évidence la nécessité de renouveler l'inoculation des bactéries plusieurs fois, même lorsqu'il s'agit de bactéries endémiques du technosol. De plus, la bioaugmentation ne permet ni d'augmenter la densité microbienne ni l'activité microbienne du technosol contrairement à la monoculture de MxG à la fin des 148 jours d'expérimentation. Enfin, la présence de bioaugmentation entraîne une diminution de la croissance et de la biomasse de MxG comparé à la monoculture de MxG.

Le principal avantage de la phytoremédiation assistée par bioaugmentation est le nombre plus important de HAP dissipés comparé à la monoculture de MxG (phénanthrène, benzo(b)fluoranthène, pyrène et la somme des HAP en excluant le BaP).

La co-culture couplée à la bioaugmentation n'a pas permis d'induire une dissipation des HAP ni d'augmenter la densité des bactéries dans le technosol contrairement à la monoculture de MxG. De plus, c'était pour cette condition que la croissance de MxG et sa biomasse foliaire est impactée de manière la plus importante par rapport à toutes les autres conditions.

Le principal avantage de la co-culture couplée à la bioaugmentation est l'augmentation de l'activité microbienne du sol, de façon plus importante que toutes les autres conditions. De plus, comme la co-culture et contrairement à la monoculture de MxG, la co-culture couplée à la bioaugmentation permet d'augmenter la densité des champignons dans le sol et entraîne une diminution de la biodisponibilité du zinc et donc une amélioration de la phytostabilisation de cet ETM dans le technosol.

D'après les résultats obtenus concernant la dissipation des HAP, la phytostabilisation des ETM et l'amélioration de la qualité du technosol, la co-culture apparaît comme la technique la plus intéressante par rapport à la phytoremédiation assistée par bioaugmentation. De plus, la plantation de trèfle blanc en co-culture est plus économique, plus rapide et plus simple à mettre en œuvre que la bioaugmentation.

Les résultats suggèrent donc que les associations végétales sont une voie à développer pour améliorer la phytoremédiation et la qualité des sols contaminés.

La co-culture entre MxG et le trèfle blanc serait intéressante à tester sur site et sur plusieurs cycles végétaux afin d'étudier les interactions entre les deux espèces végétales et les contaminants des sols. D'autres associations pourraient être testées avec MxG, et notamment associer une espèce accumulatrice dans le but de traiter à la fois les HAP par rhizodégradation avec MxG mais également d'extraire les ETM par phytoextraction avec une espèce accumulatrice connue et/ou endémique du technosol, comme par exemple *Tussilago farfara* pour le zinc (Wechtler et al 2019) (Annexe B).

Les politiques publiques pourraient trouver dans la phytoremédiation des sols contaminés grâce à MxG en co-culture avec le trèfle blanc un outil de gestion des friches dont elles ont hérité. L'utilisation de ces techniques peu coûteuses amorcerait ainsi la dépollution des sols en attendant leur requalification.

Annexes

Annexe A : Article publié dans le journal "Journal of Soils and Sediments" en mai 2020.

<https://doi.org/10.1007/s11368-020-02648-6>

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation from a contaminated technosol composed of dredged sediments with *Miscanthus x giganteus* and *Trifolium repens* L. in mono- and co-culture

Laura Wechtler ⁽¹⁾, Sonia Henry ⁽¹⁾, Jairo Falla ⁽¹⁾, Louise Walderdorff ⁽¹⁾, Antoine Bonnefoy ⁽²⁾, Philippe Laval-Gilly ⁽¹⁾

(1) Université de Lorraine, INRA, LSE, F-54000 Nancy, France

(2) Université de Lorraine, IUT de Thionville-Yutz, F-57970 Yutz, France

Abstract

Purpose Dredged sediments from waterways are often contaminated due to human activities. We tested an original remediation method consisting of mixing dredged contaminated sediments with contaminated soil to create a technosol and establish a phytoremediation technique. The objective was to determine if the *Miscanthus x giganteus* (MxG) and white clover co-culture could improve the PAH dissipation compared to monoculture.

Materials and methods MxG and white clover were tested in mono and co-culture on a technosol composed of sediments and soil in mesocosm during 263 days (a life cycle of MxG until its senescence). PAHs measurements and ecotoxicity and genotoxicity tests were performed at the beginning (T0) and the end (TF) of the phytoremediation experiment.

Results and discussion PAH removal varied according to the planting patterns and the PAHs involved, but overall, the presence of vegetation significantly induced dissipation of total PAHs in the technosol. After 263 days of culture, 26.24% of the total 16 priority PAHs were removed with white clover monoculture, 29.27% with co-culture, and 31.65% with MxG monoculture. Moreover, after 263 days of culture, the Index of Additive Cancer Risk (IACR) values were 4.26 for the non-planted technosol, 3.43 for MxG monoculture, 3.31 for white clover monoculture, and 3.43 for co-culture. The different planting patterns improved the decrease of the IACR values in the technosol compared to the non-planted technosol, even if it remained above the reference value. Furthermore, co-culture significantly enhanced the dissipation of pyrene and anthracene and decreased the technosol ecotoxicity in contrary to MxG monoculture.

Conclusion The present study showed the possibility to remediate dredged sediments after mixing them with soil, thus opening a new way to clean up contaminated excavated sediments. The presence of vegetation significantly promoted the dissipation of the total 16 priority PAHs and improved the decrease of the IACR values. Co-culture was more efficient for the dissipation of specific PAH, such as pyrene and anthracene, compared to MxG monoculture. Moreover, the co-culture improved the decrease of the technosol ecotoxicity contrarily to other planting patterns.

Keywords: *Miscanthus x giganteus*, *Trifolium repens* L., phytoremediation, PAHs, co-culture, sediments

1. Introduction

Sediment excavation is often necessary to improve watercourse flow conditions, prevent flooding, and restore waterways. However, dredged sediments can be contaminated with various organic contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and inorganic contaminants such as trace metals due to human activities. Remediation with conventional physicochemical techniques is effective but often not economically feasible, therefore, sediments are disposed of in confined landfills (Touzé 2013). However, this management mode is not sustainable. New solutions are needed. To improve the value of contaminated sediments, we mixed them with contaminated soil to create a technosol and to establish a phytoremediation technique. The goal is to remediate both sediments and soil of the host site. Furthermore, the addition of soil in dredged sediments will improve its structure and its agronomic quality for better plant development. Phytoremediation uses plants and their associated microorganisms to remove, stabilize, or degrade pollutants from soil, sediment, water, and air (Khan 2005; Ma et al. 2016). Unlike classic physicochemical remediation techniques, phytoremediation is an environmental-friendly technique since it improves the soil's structure and fertility. It is also cost-effective and well accepted by the public (Ali et al. 2013; Oyuela et al. 2017). PAHs phytoremediation involves organic pollutants biodegradation in plant rhizosphere - the soil directly influenced by plant roots. Rhizodegradation may involve the activities of both the plant and its rhizospheric microorganisms (Olson et al. 2008). Plant promoted biodegradation is considered as the major pathway for phytoremediation of PAH-contaminated soils (99% according to Meng et al. (2011); >99.7% according to Gao and Zhu (2004) while plant uptake was a minor contribution for PAH removal (Gao and Zhu 2004; Meng et al. 2011).

The plant used in this study is *Miscanthus x giganteus* (MxG). This plant is a sterile rhizomatous perennial grass, which can grow on a large variety of soils, including soils contaminated by trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). MxG does not require any addition of fertilizers (Lewandowski and Heinz 2003; Nsanganwimana et al. 2014). Used in phytoremediation, MxG can promote bacteria capable of degrading PAHs (phyto/rhizodegradation) (Técher et al., 2012). It can accumulate trace metals in its roots without transferring it to its shoots (phytostabilization) (Laval-Gilly et al. 2017). Moreover, an advantage of the use of this plant is its high biomass production, which can be used for combustion, as biofuel, bedding for animals, etc (Nsanganwimana et al. 2014)

In order to improve the PAHs dissipation in the technosol, a co-culture was tested between MxG and *Trifolium repens* L. (white clover). Indeed, many studies showed a dissipation of PAHs such as pyrene, phenanthrene, and the 16 US EPA PAHs in soils planted with white clover (Xu et al. 2006, 2009; Meng et al. 2011). Moreover, certain co-cultures facilitate the phytoremediation of PAH-contaminated soils over monocultures (Xu et al. 2006; Wei and Pan 2010; Meng et al. 2011). Studies showed an increase of PAHs dissipation when white clover was in mixture with other plants species such as maize (*Zea mays*) (Xu et al. 2006) or celery (*Apium graveolens*) or ryegrass (*Lolium perenne*) or white clover in mixture with ryegrass and celery (Meng et al. 2011). Furthermore, white clover does not accumulate trace metals in its shoots (Bidar et al. 2007) and can form a vegetal cover on trace element contaminated soils (Bidar et al. 2007). Moreover, its small size should not interfere with the MxG harvest and neither enter in competition for light.

The objective of this study is to determine if the co-culture between MxG and white clover can increase PAHs dissipation compared to monocultures. To check this hypothesis, this experiment was realized in mesocosm before implementing it *in situ*.

2. Materials and methods

2.1. Sediments and soil of the host site

In order to improve the flow of two streams located in the Northeast France, their sediments had to be dredged. Before excavation, physicochemical analyses were realized by an engineering office (ASPECT Service Environnement SARL). Results showed a contamination of sediments by PAHs such as benzo[a]pyrene ($0.44 \pm 0.33 \text{ mg.kg}^{-1}$), benzo[b]fluoranthene ($0.46 \pm 0.32 \text{ mg.kg}^{-1}$) and fluoranthene ($0.70 \pm 0.52 \text{ mg.kg}^{-1}$) ($n=5$) and trace metals such as Zn ($320.0 \pm 146.3 \text{ mg.kg}^{-1}$), Cu ($46.3 \pm 31.5 \text{ mg.kg}^{-1}$), Pb ($42.6 \pm 14.0 \text{ mg.kg}^{-1}$) and Ni ($44,8 \pm 6,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) ($n=5$). These concentrations were higher than

local pedo-geochemical background concentrations (Thionville – Custines) which are 0.09 mg.kg⁻¹ of benzo[a]pyrene, 0.17 mg.kg⁻¹ of benzo[b]fluoranthene, 0.33 mg.kg⁻¹ of fluoranthene, 30 mg.kg⁻¹ of Cu, 40 mg.kg⁻¹ of Ni, 30 mg.kg⁻¹ of Pb and 120 mg.kg⁻¹ of Zn (Darmendrail 2000).

Contaminated sediments have been transported to an external brownfield formerly used as an auto repair shop. Physicochemical analyses of the soil were realized by the engineering office mentioned beforehand and showed a contamination of PAHs (benzo[a]pyrene: 0.26 ± 0.13 mg.kg⁻¹, benzo[b]fluoranthene: 0.38 ± 0.25 mg.kg⁻¹ and fluoranthene 0.32 ± 0.20 mg.kg⁻¹ (n=13) and trace elements (Zn: 217.9 ± 238.7 mg.kg⁻¹, Cu: 33.8 ± 24.8 mg.kg⁻¹ and Pb 66.1 ± 74.8 mg.kg⁻¹ (n=13)).

The soil was removed to mix it with the sediments to create a technosol that could be treated by phytoremediation. Wet dredged sediments were mixed with soil in proportions of approximately 2/3 of sediments and 1/3 of soil. The site has been reworked to isolate the mixture of soil and sediments by using a geomembrane and a recovery basin for leachate and percolation water to limit pollutant transfer.

2.2. Experimental design

For this study, the experiment was realized in mesocosm. The technosol was sampled in June 2018. The technosol samples were air-dried at room temperature and sieved to 2 mm for analyses and the phytoremediation experiment. Samples were stored at -20°C until PAH analyses at T0. Plastic pots were filled with 9 kg of technosol. Four modalities were tested: non-planted; MxG; White clover; MxG + White clover (Table 1).

Three replicates were prepared for each modality except for the non-planted technosol where only one replicate was realized. In each pot, one rhizome of MxG was planted and/ or 144 mg of white clover seeds (approximately 200 seeds), corresponding to a density of 5 kg/ha according to recommendations of the “Lycée agricole de Courcelles-Chaussy” and other references in the literature (Lowther 1975; Newbould and Rangeley 1984). Prior to experiments, rhizomes of MxG were collected from the “Lycée agricole de Courcelles-Chaussy.”

First, the rhizomes were washed with running tap water to remove any soil particles adhering to the rhizomes and rinsed with deionized water. Then, for 3 weeks, they were placed in wet quartz sand for shoot emergence in a greenhouse (ARALAB, Fitoclima 10000 EHHF) maintained at 22°C, 70% humidity and 16h/8h photoperiod (16h/8h at 350 μmol.m⁻².s⁻¹). The sand was regularly irrigated during this period. This step was realized to ensure the viability of the rhizomes before planting. The planting date was considered as day 0 (T0). MxG rhizomes and white clover seeds were planted at the same time. Pots containing planted and non-planted technosol were transferred to the greenhouse at the conditions described for rhizome shoot emergence. Pots were kept in these conditions for 263 days (time corresponding to a vegetal cycle of MxG until its senescence). The technosol was watered automatically every day to maintain the soil humidity at 60% of its water holding capacity (Annexe 1 of the French standardized method NF EN ISO 11268-1 (AFNOR 2015)).

2.3. Technosol analyses

The physicochemical properties of the technosol were determined at T0. The soil texture was analyzed with NF X 31-107 (AFNOR 2003, pp. 31–107) and the technosol's pH was determined in soil-KCl and soil-water mix with a ratio of 1:5 in using the NF ISO 10390 (AFNOR 2005). Cation Exchange Capacity (CEC) was determined by the Metson method (NF X 31-130) (AFNOR 1999). Total nitrogen and organic carbon were respectively determined by NF ISO 11261 (AFNOR 1995) and NF ISO 14235 (AFNOR 1998).

Measurements, except for pH determination, were performed by the “Laboratoire Agronomique de Normandie” (LANO, France) which is COFRAC accredited for these analyses. The soil sample moisture's percentage was measured at 105°C with a moisture analyzer (HC 103, Metler Toledo) to express results in mg.kg⁻¹ dry matter (DM).

2.4. PAH quantification

The PAH extractions from the technosol and the plant material were performed using a microwave (MarsXpress, CEM) according to the US EPA Method 3546 (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3546.pdf>). Approximately 10 g of

technosol sieved to 2 mm or 5 g of plant material were mixed with 12.5 mL of acetone and 12.5 mL of n-heptane in extraction vessels. According to the manufacturer's recommendations, the temperature of the mixture was brought to 110°C in 20 minutes and maintained at 110°C for 15 minutes. After cooling at room temperature, the samples were filtered, and the solvents were evaporated to concentrate the samples in a volume of 2 mL. Samples were stored at 4°C until HPLC assays.

The PAH extracts were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a system (Waters™ 626 Pump) equipped with a photodiode array detector (Waters 996) and a STABILITY®HAP-5µ column (250 mm, 4.0 mm, 5 µm). The mobile phase used was Acetonitrile/Water with the following gradient: 0-5 min: 50% acetonitrile; 5-15 min: 50% to 85% acetonitrile and 15-20 min: 85% to 100% acetonitrile; with a flow rate of 1.5 mL/min. PAHs were detected at the wavelength of 254 nm and their concentrations were determined using a standard range. A certified reference material containing the 16 US EPA PAHs in acetonitrile: methanol (9:1) was used (SIGMA-ALDRICH, EPA TCL PAH Mix). The limits of detection of the 16 PAHs in HPLC were calculated using to the standard range and are presented in Table 2. The Relative Standard Deviation (RSD) of the standard range of the reference material did not exceed 4.1%, suggesting a good repeatability of the analysis. The rightness of the results was verified using a standard reference sample for each analysis.

2.5. PAH dissipation

For each treatment, the average dissipation rate (R) of PAHs after 263 days plantation of crops was calculated as follows:

$$R = (C_{T0} - C_{TF}) \times 100 / C_{T0}$$

where C_{T0} was the initial PAH concentration in the technosol and C_{TF} the concentration at the end of the experiment.

2.6. Ecotoxicity and genotoxicity tests

In order to evaluate the ecotoxic and the genotoxic potential of the soil, standardized assays were performed. The ecotoxic assay entitled "NF EN ISO 11269-1: Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: method for the measurement of inhibition of root growth" (AFNOR 2013a) was performed. The short-term test lasts 4 days. It compares the lengths of oat roots (*Avena sativa* L.) which were grown in the technosol with those that were grown in the control soils (non-polluted standard soil and standard soil polluted with 500 mg.kg⁻¹ boric acid). Six seeds were planted per pot, 4 pots were used for each treatment (n=4).

A genotoxicity test was realized, the *Vicia faba* micronucleus test (NF ISO 29200. Soil quality — Assessment of genotoxic effects on higher plants — *Vicia faba* micronucleus test) (AFNOR 2013b). Its principle consists in the evaluation in vivo of the rate of micronuclei in *Vicia faba* root cells after 5 days of exposure by direct contact with soils or by putting the roots in leaching soils. Micronuclei rates were then compared between the different treatments: the technosol, the non-polluted standard soil (control), and the standard soil polluted with 1.12 mg.L⁻¹ of maleic hydrazide (positive control). For this, the micronuclei were counted in 1000 cells per root and 6 roots per treatment.

2.7. Statistical analyses

Analyses were carried out using R studio (v 3.5.2.) statistical software. For all tests, a probability level of 0.05 was considered statistically significant. The differences between PAHs concentrations of the different treatments at TF were determined by ANOVA followed by TukeyHSD post hoc tests, while the differences between PAHs concentrations at T0 and TF for each condition were determined by a paired samples t test after checking the application conditions. For ecotoxicity and genotoxicity tests, results were compared by using an ANOVA followed by TukeyHSD post hoc tests after checking for parametric conditions.

Results were expressed as means of all replicates ± SD (Standard Deviation).

3. Results and discussion

3.1. Technosol characteristics

In order to characterize the technosol, a mixture of soil and sediments, several physicochemical parameters were measured. The technosol was basic with a pH (H₂O) value of 7.61 (Baize 2018) and a pH (KCl) value of 7.41. The measurement of the pH (KCl) determines the soil's potential acidity. The difference between the pH (H₂O) and the pH (KCl) indicated the soil sample had a low reserve acidity (Mathieu and Pieltain 2003). The soil was composed of 33.7% of clay, 55% of silt, and 11.3% of sand. Its texture was identified as Silty Clay Loam (NRCS Soils 2019). The technosol was rich in organic matter (4.91 %) (Jones, 2012). Its organic carbon (2.85%) and its total nitrogen (0.26%) were used to calculate the C/N ratio, which was 10.96. Since this value is lower than 12, the mineralization does not encounter any difficulty (Baize 2018). Its Cation Exchange Capacity (CEC) was 19 cmol+.kg⁻¹. Soils with a CEC greater than 11 generally have high clay and organic matter contents, high water capacity and are highly capable of holding plant nutrient elements (Jones 2012).

3.2. PAH quantification in the technosol

PAH extractions and quantifications were performed on the technosol at T0 to determine the PAH concentrations before the establishment of the phytoremediation techniques. Results were presented in table 3 and were compared to the pedo-geochemical background of Thionville-Custines (Darmendrail 2000).

Among the 16 priority PAHs, 7 had concentrations below the Limit of Detection (LD): naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, chrysene, benzo[k]fluoranthene and dibenz[a,h]anthracene. The other 9 could be quantified. The values of the limit of detection were presented in Table 2. Our results showed that 4 PAHs and the sum of the 16 PAHs had concentrations higher than the local pedo-geochemical background. It was the case for fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, and indeno[1.2.3-cd]pyrene. According to the pedo-geochemical background of Thionville-Custines (Darmendrail 2000) the technosol was contaminated by these PAHs. However, certain PAH concentrations of the local pedo-geochemical background were Not Determined (ND), as shown in table 3. Other references to PAH levels can be found in the literature. Maliszewska-Kordybach (1996) proposed reference values to classify soils in Poland in terms of their agricultural uses and the protection of the environment. According to this author, soils with a PAH concentration higher than 1000 µg.kg⁻¹ are classified as heavily contaminated. As the initial concentration (at T0) of the total 16 PAHs in the technosol was 2.65 ± 0.23 mg.kg⁻¹ DM, it can be classified as heavily contaminated.

Canadian council of ministers of the environment has developed soil quality guidelines for the protection of environmental and human health (Canadian Council of Ministers of the Environment 2010) suggesting to calculate the Benzo[a]pyrene Total Potency Equivalents (B[a]P TPE) to ensure human protection from direct contact with contaminated soil. Canadian council of ministers of the environment also suggests calculating the Index of Additive Cancer Risk (IACR) to ensure that potable water resources are protected. We performed these calculations for our PAH concentrations at T0. The B[a]P TPE obtained was 0.39 mg.kg⁻¹. This value is lower than the desired level of acceptable risk, which is 0.6, suggesting that the technosol presented a low risk of carcinogenic effects by direct contact. According to the document of the Canadian council of ministers of the environment, the IACR must be less than 1, since the result of the IACR for our soil was 4.94, our technosol can generate a potential risk for potable groundwater quality.

These two calculations are used for the protection of human health from PAHs only carcinogenic effects. The non-carcinogenic effects of PAHs were not assessed in this guideline. Ecotoxicity and genotoxicity tests were performed to characterize the carcinogenic and the non-carcinogenic effects of PAHs on plants.

The PAHs were measured at TF in the shoots and roots of MxG and white clover as well as in the rhizomes of MxG. The all PAHs were lower than the limit of detection (Table 2) for each sample. There are, therefore, few PAH transfers from the technosol to the plants. These results are in agreement with the study of Fismes et al. (2002). In their study, low PAH concentrations (approximately 0.2 mg.kg⁻¹ of the all 16 PAHs) were found in potato and lettuce which grown in a soil contaminated with 4 mg.kg⁻¹ of

total PAHs. On the other hand, PAH concentrations in plants tended to increase with PAH concentrations in soil (Fismes et al. 2002; Gao and Zhu 2004; Parrish et al. 2006). The PAH uptake by plants varies depending of the plant species, the PAH concentrations in soils and their bioavailability, as well as the organic matter content of the soil (Simonich and Hites 1995; Parrish et al. 2006).

3.3. PAH dissipation in the technosol

After 263 days of the experiment, PAH concentrations were measured for each planting patterns. Results showing significant PAH dissipations are displayed in figure 1, average dissipation rates in table 4. PAHs dissipations between T0 and TF were observed for the sum of the 16 PAHs (total PAHs), as well as for anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene. No dissipation was shown for phenanthrene, benzo[a]anthracene, benzo[g,h,i]perylene and indeno[1.2.3-cd]pyrene whatever the plants.

However, contrary to our results, other studies showed a significant decrease of phenanthrene concentration in soil planted with white clover (Xu et al. 2006; Wei and Pan 2010) and in soil planted with MxG (Técher et al. 2012). Mazziotti (2017) showed a significant decrease in benzo[a]anthracene concentrations in soil planted by MxG. These differences can be explained by the soil physicochemical properties such as the organic matter quantity, PAHs concentrations, and their bioavailability. Indeed, in these previous studies, soils were artificially contaminated with PAHs, thus we can suppose that contaminants are more bioavailable and easier to biodegrade. With time, PAHs bioavailability decreases and PAHs are less available for biodegradation; this process is called “ageing” (Hatzinger and Alexander 1995; Semple et al. 2003).

For the total PAHs (the sum of the 16 priority PAHs), there was no significant difference for the non-planted control between T0 and TF. A significant decrease in the total PAHs concentrations was observed between T0 and TF in pots planted with MxG, white clover, and the co-culture (MIX). The decrease was similar amongst the planting patterns. So, whatever the plant species, in monoculture or in co-culture, they all induced a significant decrease in total PAH concentrations at the end of the phytoremediation experiment. On average, the total PAHs dissipation in the technosol was 31.7% for MxG, 26.2% for white clover, and 29.3% for the co-culture (MIX).

For anthracene, there was no significant difference between T0 and TF for the non-planted control, MxG, and White clover. There was only a significant difference between T0 and TF in the presence of both plant species (MIX). An average dissipation rate of 35.6% was calculated. However, there was no significant difference in anthracene concentrations between the different treatments at TF even if anthracene concentrations for white clover and MxG seemed lower than the two other conditions.

For fluoranthene, there was no significant difference between T0 and TF for the non-planted control and the pots planted with white clover. A significant decrease was shown only for MxG and the co-culture (MIX) between T0 and TF. When we compared the fluoranthene concentrations at TF between the different conditions, we observed a lower concentration in the planted technosol compared to the non-planted. Moreover, this dissipation is significantly more important for the technosol planted with MxG. Average dissipation rates of 47.2%, 10.1%, and 15.7% were respectively calculated for MxG, white clover, and co-culture (MIX). According to these results, the fluoranthene dissipation was more efficient with MxG alone. Moreover, the fluoranthene concentration after the experiment of phytoremediation by MxG was $0.31 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DM}$. This concentration was below the limit of the pedogeo-chemical background of Thionville-Custines (0.33 mg.kg^{-1}).

A significant decrease of pyrene concentrations was observed between T0 and TF for white clover and MIX. There were no significant differences between the beginning and the end of the experiment for the non-planted technosol and for technosol planted with MxG. The presence of white clover in monoculture resulted in a decrease of 43.3% of pyrene concentration. White clover and MxG (MIX) induced a decrease of 44.7%. The average pyrene's dissipation rate for MxG was 21.04%. There are, however, no significant differences between the different planting patterns at TF.

According to these results, white clover seems more efficient for pyrene dissipation than MxG, making a co-culture of the two an interesting model for this PAH removal. Other studies showed the ability of white clover to decrease pyrene concentrations in soils. Indeed, Xu et al. (2006) showed a dissipation of 62.33 to 88.12% after 60 days in an artificially contaminated soil with pyrene concentrations that vary

between 4.32 and 365.38 mg.kg⁻¹. Wei and Pan (2010) showed that 54.36% of pyrene was removed with white clover in single cropping in a soil artificially contaminated with initial pyrene concentration of 80 mg.kg⁻¹. Similar results have been reported by Xu et al. (2009) with an average removal ratio of pyrene in soil with white clover for 77%. However, the soils of these studies were artificially contaminated. Therefore, we can suppose that PAHs were more bioavailable than in an aged PAH-contaminated technosol.

For benzo[b]fluoranthene, a significant decrease was obtained for white clover and MIX but not for MxG alone. However, there was no statistically significant difference between all treatments at TF. The average benzo[b]fluoranthene dissipation rates were 23.1% for non-planted technosol, 35.3% for MxG, 42.2% for white clover, and 37.7% for the MIX. The observation that 23.1% benzo[b]fluoranthene was dissipated in the control treatment suggests the presence of active microorganisms in the technosol (Meng et al. 2011). PAH volatilization might be another contribution to this loss but benzo[b]fluoranthene is a five ring-PAH and has low volatility.

No significant difference was observed for benzo[a]pyrene concentrations between T0 and TF for the non-planted technosol and the other planting patterns. However, benzo[a]pyrene concentrations in the technosol at TF were significantly lower for the treatments with MxG and co-culture (MIX). A dissipation rate of 19.6%, 16.8%, and 18.2% was calculated for MxG, white clover, and MIX, respectively.

At the end of the experimentation, the Index of Additive Cancer Risk (IACR) was calculated for each modality. The results of the IACR were 4.26 for the non-planted technosol, 3.43 for MxG, 3.31 for white clover, and 3.43 for co-culture. The values obtained were lower in the presence of plants than in the non-planted technosol. These results showed the positive impact of plant species on the PAH dissipation. IACR values were similar for the three-planted conditions. They ranged from 3.31 for white clover to 3.43 for MxG and co-culture. These results were in agreement with the total PAH concentrations at TF. However, all IACR values were higher than the reference value (1), which means that risk persists on the potability of the groundwater despite phytoremediation.

In summary, the presence of vegetation, whatever the planting pattern, significantly enhanced the dissipation of the total PAHs in the tested technosol and decreased the IACR values. For certain PAHs, such as anthracene and pyrene, the co-culture of the two plants significantly improved the removal of these organic compounds compared to MxG alone. However, for fluoranthene, an enhanced dissipation was observed for MxG alone compared to the co-culture.

The absence of accumulation of these compounds in the two plants suggested that the major pathway for PAH dissipation was the rhizodegradation, while PAH uptake by plants accounted for a negligible portion of technosol PAH removal. These results were in agreement with the studies of Gao and Zhu (2004) and Meng et al. (2011) which showed that more than 99% or more than 99.7% of PAH removal in contaminated soil is caused by the plant promoted biodegradation.

3.4. Ecotoxicity and genotoxicity tests

Ecotoxicity and genotoxicity tests were performed to evaluate the toxicity potential of this technosol before the beginning of the experiment (T0) and after 263 days of the experiment (TF). Results for the “inhibition of root growth” test are presented in figure 2. There was a significant difference at T0 and TF between the length of oat roots grown in the positive control and the one grown in the control soil. The test can thus be considered valid.

At T0, the lengths of oat roots were significantly lower in the technosol than in the control soil. Hence, the technosol had induced inhibition of oat root growth. This test highlighted the ecotoxicity of the technosol.

The same test was performed at the end of the 263 days of phytoremediation experiments. Results showed a significant difference between the control soil and the non-planted technosol as well as between the control and MxG, white clover monocultures. The oat roots inhibition was significant at the end of the phytoremediation experiment after MxG and white clover cropping compared to the control. However, there was no statistically significant difference for the root length between the control soil

and the technosol planted with MIX (MxG + white clover). The presence of both plants in co-culture during 263 days had reduced the ecotoxicity of the technosol.

The genotoxicity test “*Vicia faba* micronucleus” was realized at T0 and TF by exposing the seeds directly to the technosol (direct contact) and by exposing the roots to technosol aqueous extracts (after leaching). Results are presented in Figure 2. Significant higher micronuclei rates were found for the positive control compared to the negative control, whatever the exposure condition. The test can thus be considered valid. Results showed no significant differences for the micronuclei rates between the control and the technosol whatever the exposure condition. At T0, the technosol did not induce genotoxicity, which can be explained by less bioavailable PAHs or low PAHs concentrations. Indeed, because of their high hydrophobicity, PAHs tend to be adsorbed on the soil organic matter (Bertrand 2012), thereby they show a low bioavailability for soil organisms. The absence of genotoxicity at TF suggested that the plants did not increase the bioavailability of contaminants.

The results of the *Vicia faba* micronucleus test by direct contact were in agreement with the B[a]P TPE previously calculated to characterize technosol risks of carcinogenic effect by direct contact. Indeed, the calculation result was lower than the level of acceptable risk, and the genotoxicity test did not show genotoxic effects. However, in contrary to the IARC that suggested a potential risk for the potable groundwater quality, the *Vicia faba* micronucleus test performed in technosol aqueous extracts did not show genotoxic effects.

4. Conclusion

The present study showed the possibility to remediate dredged sediments after mixing them with soil, thus opening a new way of valorizing contaminated excavated sediments. The presence of vegetation, whatever the planting pattern (*Miscanthus x giganteus*, white clover, or co-culture), significantly induced a dissipation of the sum of the 16 priority PAHs in the technosol. After 263 days of culture, corresponding to one life cycle of MxG, 26.24% of the total PAHs were removed with white clover, 29.27% with both species, and 31.65% with MxG. The major pathway of PAH dissipation was the rhizodegradation, while the plant uptake was negligible since no PAH was found in plant tissues. Moreover, the different plant species decreased the Index of Additive Cancer Risk (IACR) values in the technosol compared to the non-planted technosol, even if it remained above the reference value.

Our results suggested that the MxG and white clover co-culture is more efficient for certain PAHs dissipation (anthracene and pyrene) than the MxG monoculture. Moreover, the co-culture decreased the technosol ecotoxicity contrarily to other planting patterns.

These first results are encouraging since this study was performed during only one plant life cycle, while phytoremediation is a long remediation process. This study should therefore be conducted in the long term and directly in situ. It would be interesting to compare the MxG biomass in co-culture against its biomass in monoculture in situ to make sure that white clover does not enter in competition with MxG, which could lead to a decrease in the economic value of its biomass.

Acknowledgements

The authors would like to thank “Portes de France-Thionville” and “Communauté de Communes Cattenom et Environs” for their financial supports. We would like to thank Sarah Berns and Hindi Boolell for their assistance in carrying out the ecotoxicity and genotoxicity tests at the end of the experiment. We gratefully thank Marine and Pascale Sauton (San Jose, California) for their English revision.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

This research did not involve any human participants and/ or animals.

References:

- AFNOR (2015) NF EN ISO 11268-1. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms- Part 1 : Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (2003) NF X31-107. Soil quality - Particle size determination by sedimentation - Pipette method. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (2005) NF ISO 10390. Soil quality - Détermination of pH. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (1999) NF X31-130. Soil quality - Chemical methods - Determination of cationic exchange capacity (CEC) and extractible cations. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (1995) NF ISO 11261. Soil quality. Determination of total. Modified kjeldahl method. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (1998) NF ISO 14235. Soil quality. Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (2013a) NF EN ISO 11269-1. Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1 : method for the measurement of inhibition of root growth. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- AFNOR (2013b) NF ISO 29200. Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test. AFNOR, Saint-Denis La Plaine
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Baize D (2018) Guide des analyses en pédologie, 3ème édition revue et argumentée. Quae, Paris
- Bertrand J-C (2012) Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés. Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, Pau
- Bidar G, Garçon G, Pruvot C, et al (2007) Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environ Pollut* 147:546–553. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.013>
- Darmendrail D (2000) Fonds géochimique naturel—État des connaissances à l'échelle nationale. INRA/BRGM. BRGM/RP-50158-FR, juin 2000. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 99-F-269
- Fismes J, Perrin-Ganier C, Empereur-Bissonnet P, Morel JL (2002) Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *J Environ Qual* 31:1649–1656. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1649>
- Gao Y, Zhu L (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55:1169–1178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.01.037>
- Hatzinger PB, Alexander Martin (1995) Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. *Environ Sci Technol* 29:537–545. <https://doi.org/10.1021/es00002a033>
- Jones JB (2012) Plant nutrition and soil fertility manual, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton
- Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 18:355–364
- Laval-Gilly P, Henry S, Mazziotti M, et al (2017) *Miscanthus x Giganteus* Composition in Metals and Potassium After Culture on Polluted Soil and Its Use as Biofuel. *Bioenergy Res* 10:846–852. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9846-3>
- Lewandowski I, Heinz A (2003) Delayed harvest of *miscanthus*—influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy* 19:45–63. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00018-7)
- Lowther WL (1975) Pelleting materials for oversown clover. *New Zeal J Exp Agr* 3:121–125. <https://doi.org/10.1080/03015521.1975.10425787>
- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J Env Manage* 174:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Maliszewska-Kordybach B (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in Poland: preliminary proposals for criteria to evaluate the level of soil contamination. *Appl Geochem* 11:121–127. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0883-2927(95)00076-3)
- Mathieu C, Pieltain F (2003) Analyse chimique des sols: méthodes choisies. Éd. Tec & doc, Paris
- Mazziotti M (2017) Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo(a)anthracène. Université de Lorraine
- Meng L, Qiao M, Arp HPH (2011) Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *J Soils Sediments* 11:482–490. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0319-y>
- Newbould P, Rangeley A (1984) Effect of lime, phosphorus and mycorrhizal fungi on growth, nodulation and nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) grown in UK hill soils. *Plant Soil* 76:105–114. <https://doi.org/10.1007/BF02205571>
- NRCS Soils (2019) Soil Texture Calculator | NRCS Soils. https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/?cid=nrcs142p2_054167. Accessed 21 Sep 2018
- Nsanganwimana F, Pourrut B, Mench M, Douay F (2014) Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *J Env Manage* 143:123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.027>
- Olson PE, Castro A, Joern M, et al (2008) Effects of Agronomic Practices on Phytoremediation of an Aged PAH-Contaminated Soil. *J Environ Qual* 37:1439. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0202>
- Oyuela M, Fernández W, Sarmiento M (2017) Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands — A review. *Chemosphere* 168:1230–1247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.075>
- Parrish ZD, White JC, Isleyen M, et al (2006) Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere* 64:609–618. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.003>
- Semple KT, Morriss AWJ, Paton GI (2003) Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur J Soil Science* 54:809–818. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0564.x>
- Simonich SL, Hites RA (1995) Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environ Sci Technol* 29:2905–2914. <https://doi.org/10.1021/es00012a004>
- Técher D, Laval-Gilly P, Henry S, et al (2012) Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: A microcosm study. *Industrial Crops and Products* 36:276–281. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.030>
- Touzé S (2013) Procédé innovant de traitement de la fraction fine de sédiments pollués. Techniques de l'ingénieur Innovations en énergie et environnement base documentaire : TIB503DUO.:

Wei S, Pan S (2010) Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *J Soils Sediments* 10:886–894. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0216-4>

Xu S-Y, Chen Y-X, Lin K-F, et al (2009) Removal of Pyrene from Contaminated Soils by White Clover. *Pedosphere* 19:265–272. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(09\)60117-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60117-X)

Xu SY, Chen YX, Wu WX, et al (2006) Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Sci Total Environ* 363:206–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.05.030>

Table 26: Different planting patterns tested during this study

Treatment	Letter Symbol	Composition
Non-planted	NP	Non-planted technosol
Monoculture	MxG	Technosol + <i>Miscanthus x giganteus</i>
	White clover	Technosol + White clover
Co-culture	MIX	Technosol + <i>Miscanthus x giganteus</i> + White clover

Table 27: Values (in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of the detection limit for the 16 US EPA priority PAHs of the HPLC

16 US EPA priority PAHs	Limit of detection in HPLC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Naphtalene	0.366
Acenaphtylene	0.360
Acenaphtene	0.917
Fluorene	0.094
Phenanthrene	0.024
Anthracene	0.012
Fluoranthene	0.039
Pyrene	0.065
Benzo(a)anthracene	0.035
Chrysene	0.033
Benzo(b)fluoranthene	0.016
Benzo(k)fluoranthene	0.017
Benzo(a)pyrene	0.033
Dibenz(a,h)anthracene	0.132
Benzo(g,h,i)perylene	0.056
Indeno(1.2.3-cd)pyrene	0.030

Table 3: PAHs concentrations (mg.kg^{-1}) in the technosol at T_0 (mean values \pm standard deviation, $n=6$) and concentrations of the local pedo-geochemical background (Thionville – Custines). Numbers in bold indicate values higher than the local pedo-geochemical background.

16 US EPA priority PAHs	PAHs concentrations (mg.kg^{-1} DM)	
	Technosol at T_0	Local pedo-geochemical background
Naphtalene	<LD	ND
Acenaphtylene	<LD	ND
Acenaphtene	<LD	ND
Fluorene	<LD	ND
Phenanthrene	0.09 ± 0.02	ND
Anthracene	0.04 ± 0.01	ND
Fluoranthene	0.58 ± 0.09	0.33
Pyrene	0.46 ± 0.03	ND
Benzo[a]anthracene	0.14 ± 0.01	ND
Chrysene	<LD	ND
Benzo[b]fluoranthene	0.58 ± 0.04	0.17
Benzo[k]fluoranthene	<LD	0.1
Benzo[a]pyrene	0.28 ± 0.04	0.09
Dibenz[a.h]anthracene	<LD	ND
Benzo[g.h.i]perylene	0.19 ± 0.02	0.18
Indeno[1.2.3-cd]pyrene	0.28 ± 0.04	0.17
Total 16 PAHs	2.65 ± 0.23	1.2

ND: Not determined; LD: Limit of Detection

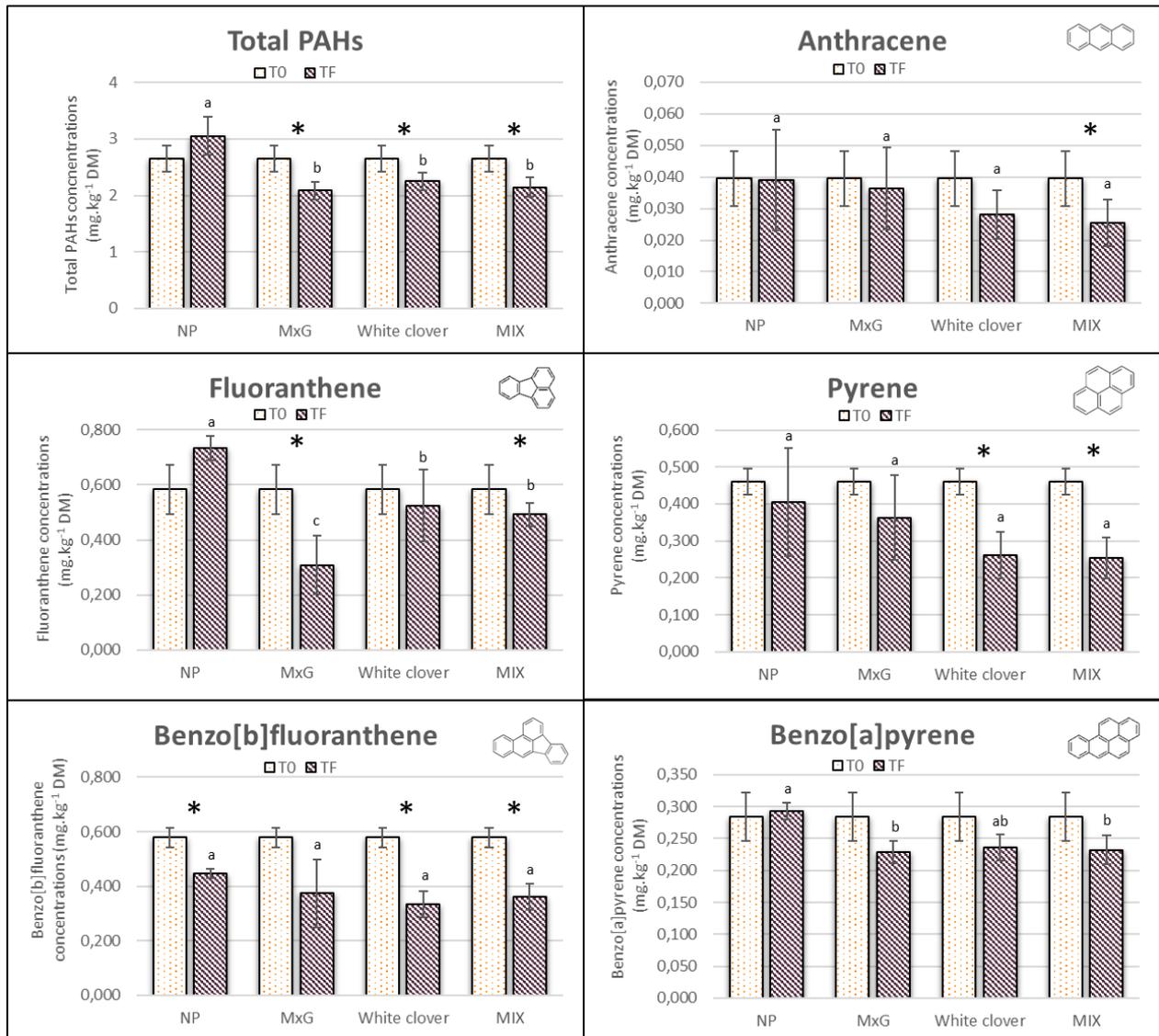


Figure 1: PAHs concentrations (mg.kg⁻¹ dry matter) in technosol at T₀ and T_F (after 263 days of phytoremediation) using different plant species: *Miscanthus x giganteus* (MxG), white clover, co-culture between MxG and white clover (MIX) and without plants (NP: Non-planted). Different letters indicate statistically significant differences between PAH concentrations of the different planting conditions at T_F (ANOVA followed by Tukey HSD, $p < 0.05$, $n = 6$). Asterisks (*) indicate statistically significant differences between PAH concentrations at T₀ and T_F for each condition (Paired Samples *t* test, $p < 0.05$, $n = 6$).

Table 4: Average dissipation rates of PAHs at the end of the experiment under the different treatments (mean values \pm SD, n=6).

16 US EPA priority PAHs	NP	MxG	White Clover	MIX
Total PAHs	//	31.7 \pm 5.0	26.2 \pm 5.1	29.3 \pm 5.7
Naphtalene	//	//	//	//
Acenaphtylene	//	//	//	//
Acenaphtene	//	//	//	//
Fluorene	//	//	//	//
Phenanthrene	//	13.2 \pm 19.9	7.7 \pm 13.9	//
Anthracene	1.2 \pm 40.3	8.6 \pm 31.9	28.7 \pm 19.1	35.6 \pm 18.9
Fluoranthene	//	47.2 \pm 18.7	10.1 \pm 22.3	15.7 \pm 7.4
Pyrene	11.8 \pm 31.3	21.0 \pm 25.1	43.3 \pm 13.7	44.7 \pm 12.1
Benzo(a)anthracene	//	21.2 \pm 19.1	2.9 \pm 11.7	8.4 \pm 20.4
Chrysene	//	//	//	//
Benzo(b)fluoranthene	23.1 \pm 2.9	35.3 \pm 21.6	42.2 \pm 8.21	37.7 \pm 8.2
Benzo(k)fluoranthene	//	//	//	//
Benzo(a)pyrene	//	19.6 \pm 5.7	16.8 \pm 7.4	18.2 \pm 8.0
Dibenz(a,h)anthracene	//	//	//	//
Benzo(g,h,i)perylene	//	//	//	//
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	//	//	//	//

The absence of dissipation is represented by “//”.

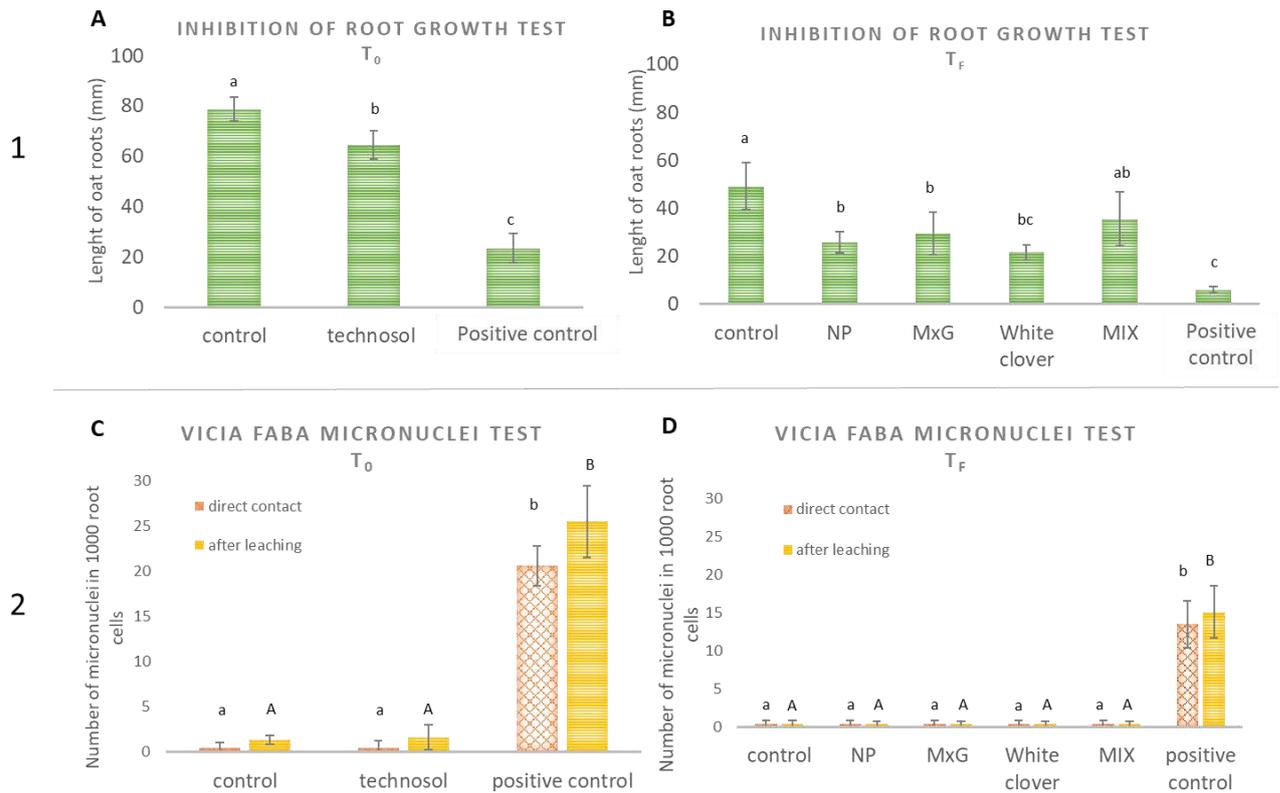


Figure 2: 1: Lengths of oat roots (mm) under the different modalities before the experiment (A) and at the end of the experiment (B). Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA followed by Tukey HSD, $p < 0.05$, $n = 4$). The control soil was an artificial non-polluted soil and the positive control was an artificial soil contaminated with boric acid.

2: Number of micronuclei in roots cells of *Vicia faba* after direct contact or after soil leaching under the different modalities before the experiment (C) and at the end of the experiment (D). Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA followed by Tukey HSD, $p < 0.05$, $n = 6$). The control soil was an artificial non-polluted soil and the positive control was an artificial soil contaminated with maleic hydrazide.

Annexe B : Article publié dans le journal "Environmental Science and Pollution Research" en octobre 2019.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06892-3>

Trace metal uptake by native plants growing on a brownfield in France: Zinc accumulation by *Tussilago farfara* L.

Laura Wechtler ⁽¹⁾, Philippe Laval-Gilly ⁽¹⁾, Olivier Bianconi ⁽²⁾, Louise Walderdorff ⁽¹⁾, Antoine Bonnefoy ⁽³⁾, Jaïro Falla-Angel ⁽¹⁾, Sonia Henry ⁽¹⁾

(3) Université de Lorraine, INRA, LSE, F-54000 Nancy, France

(4) Communauté d'Agglomération du Val de Fensch, F-57700 Hayange, France

(5) Université de Lorraine, IUT de Thionville-Yutz, F-57970 Yutz, France

Abstract

Several human activities such as mining, smelting or transportations lead to trace metal pollution in soil. The presence of these pollutants can represent environmental and organism health risks. Phytoextraction can be used to remediate trace metal contaminated soils. It uses the plants ability to remove trace metals from soil and to accumulate them in their shoots, which can then be harvested. We studied the spontaneous vegetation growing on a brownfield located in France. The use of native plants is interesting since spontaneous vegetation is already well adapted to the site's environmental conditions leading to a better survival and growth than non-native plants.

Ten native plant species were sampled and the Cr, Cu, Cd, Ni, Pb and Zn concentrations present in their shoots were measured. In order to determine the plant's capacity to extract trace metals from the soil the bioconcentration factor (BCF) was calculated for each plant and trace metal. Plants with a BCF greater than 1 are able to accumulate trace metals in their shoots and could be a good candidate to be used in phytoextraction.

Results underscored one new accumulator plant for Zn: *Tussilago farfara* L. with a BCF value of 3.069. No hyperaccumulator was found among the other sampled plants. Our preliminary study showed that *T. farfara* is able to accumulate zinc in its shoots. Moreover, this native plant is a pioneer species able to quickly colonize various habitats by vegetative. That is why *T. farfara* could be interesting for zinc phytoextraction and could be worth further studies.

Keywords: Plant accumulation, Trace metals, Brownfields, Phytoextraction, Native plants, *Tussilago farfara* L.

Acknowledgments

The authors would like to thank "Communauté d'Agglomérations du Val de Fensch", "Portes de France-Thionville", "Ville de Thionville", "Syndicat intercommunal de Curage de Cattenom et environs" and "Communauté de Communes Cattenom et Environs" for their financial supports. We gratefully thank Marine and Pascale Sauton, and Seanna Campista (San Jose, California) for their English revision. We would like to thank Romain Goudon for performing ICP analyzes.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Introduction

Trace metals are naturally present at certain concentrations in soils without any human influence, depending on parental materials, called the local natural pedo-geochemical background (Baize and Sterckeman 2001; Baize et al. 2010). However, many anthropogenic activities such as mining, coal burning, smelting, industrial discharge, agricultural fertilizers, and transportations have contributed to increase metal concentrations beyond the natural threshold (Khan 2005; Nagajyoti et al. 2010; Ali et al. 2013). Furthermore, these pollutants have the capacity to accumulate in plants, animals and human tissues. This represents environmental and human health risks since trace metal can enter into the food chain (Khan 2005; Hashim et al. 2011; Islam et al. 2015; Saha et al. 2016). Food consumption is the main pathway to human exposure to trace metals (Saha et al. 2016).

Furthermore metal contaminated soils generally cover large areas which are unsuitable for housing constructions, agricultural or other human uses (Khan 2005). This is generally the case for brownfields, which are present in old industrial regions, especially in the Northeast of France. For these reasons, polluted soils remediation is necessary. Phytoremediation uses plants and their associated microorganisms to remove, stabilize or degrade pollutants from the soil, sediment, water and air (Khan 2005; Ma et al. 2016). Unlike classic chemical-physical soils remediation techniques, phytoremediation is an environmental-friendly technique since it does not destroy the structure and fertility of the soil. It is also cost-effective and well accepted by the public (Ali et al. 2013; Oyuela et al. 2017).

One of the strategies of phytoremediation, which can be used on metal-contaminated soils, is phytoextraction (Khan 2005; Nsanganwimana et al. 2014). This technique uses the plant's ability to remove trace metals from the soil and accumulate them into its leaves and stalks, which can then be harvested (Khan 2005; Nsanganwimana et al. 2014; Oyuela et al. 2017). Certain plants are able to accumulate very high concentrations of metals. An example of these plants are the so-called hyperaccumulators which can concentrate more than 100 mg.kg⁻¹ dry weight Cd, more than 1000 mg.kg⁻¹ dry weight Ni, Cu and Pb or more than 10 000 mg.kg⁻¹ dry weight Zn and Mn in their shoots when they grow on metal rich soils (Baker and Brooks 1989). More than 400 hyperaccumulator species have been reported in literature (McGrath and Zhao 2003). But, there's still a possibility to discover new hyperaccumulator species, thus it is interesting to keep searching for native plants growing on trace metal contaminated soils. This is why several studies have evaluated the potential of native plants under field conditions (Yoon et al. 2006; Robinson et al. 2008; Evangelou et al. 2012; Mahdavian et al. 2015; Grison et al. 2015; Boechat et al. 2016; Rocco et al. 2018). Moreover, there are many advantages to using native plants in phytoremediation since they are better adapted to the soil and climate conditions, leading to a better survival, growth and reproduction of native plants under environmental stress. Furthermore, native plants do not disturb the ecosystem (Yoon et al. 2006; Heckenroth et al. 2016; Aihemaiti et al. 2018).

The objective of this preliminary study is to identify native plant species growing on a metal contaminated brownfield in Northeast France, which can accumulate trace metals (Cd, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn) in their shoots. Once native metal accumulator plant species are identified, they could be tested in phytoextraction trials for potential remediation of trace metal contaminated soils, in subsequent studies. The plants of interest could then be cultivated alone or in combination with other well-known metal accumulators in order to clean up polluted sites with high efficiency, as spontaneous vegetation is already well adapted to the brownfield's environmental conditions. In this article we show that *Tussilago farfara* L. is capable of accumulating trace metals from the brownfield's soil in contrary to what was found for this plant in other studies.

Material and methods

Site description

The soil and plant samples used in this study were collected from a brownfield located in Moselle, Northeast of France (49° 20' 55.906" E 6° 2' 17.547"). Brownfields were defined as "sites that have been affected by the former uses of the site and surrounding land; are derelict and underused; may have real or perceived contamination problems; are mainly in developed urban areas; and require intervention to bring them back to beneficial use" (Oliver et al. 2005; Rizzo et al. 2015; Bartke et al. 2016).

The site was used for steel industry. Blast furnaces, a smelter and rolling mills were implanted on the site and exploited for 87 years. The site has been vacant since 1983. Past industrial and metallurgical activities have contributed to an increase in metal concentrations in the soil. The site under assessment can be considered as a brownfield according to the previous definition and its characteristics.

Since the factory demolition, spontaneous vegetation has been growing on the brownfield. The study was performed on a section of the brownfield.

Soil sampling and analysis

The soil was sampled on the site on October 2017 on four representative plots (n=4) of 150 m² each. For each plot, six soil samples were collected randomly from the top 20 cm of the soil and combined into one sample. The soil samples were air-dried at room temperature and then sieved through a 2 mm mesh for analysis.

Cation exchange capacity (CEC) was determined by the Metson method (NF X 31-130)(AFNOR 1999) and the soil texture was analyzed with the NF X 31-107 (AFNOR 2003). Total nitrogen, organic carbon and CaCO₃ was determined by the NF ISO 13878 (AFNOR 1998), NF ISO 10694 (AFNOR 1995a) and the NF ISO 10693 (AFNOR 2014) respectively. Soil pH was determined in soil-KCl and soil-water mix with a ratio of 1:5 in using the NF ISO 10390 (AFNOR 2005). Metal concentrations in the soils were measured by ICP-AES after being crushed and sieved through a 0.25 mm mesh and extracted with aqua regia (NF ISO 11466) (AFNOR 1995b).

Bioavailable trace metals concentrations in the soils were measured by ICP-OES (ThermoFisher, ICAP GUO 6000) after being extract in diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) according to the NF ISO 14870 (AFNOR 2002).

Measurements, except for pH determination and bioavailable trace metals, were performed by the Laboratoire d'Analyse des Sols (LAS), INRA, France, which is COFRAC accredited for these analyzes. The soil samples moisture percentage was measured at 105°C with a moisture analyzer (HC 103, Metler Toledo) in order to express results in mg.kg⁻¹ dry matter.

Plant sampling and analysis

Native plants covering the plots were collected in order to identify their capacity to accumulate trace metals in their shoots. The shoots of ten plant species (n=3), which were the most represented on the site, were sampled on the plots at the same time as the soil samples. Plant samples were washed with running tap water to remove any soil particles adhering to the plants and rinsed with deionized water. Then the plant samples were air-dried at room temperature, milled and sieved to 1 mm. Samples were stored at 4°C until analysis.

Approximately 0.5 g of the plant samples were digested in a mixture of 5 mL of HNO₃ (65%) and 3 mL of H₂O₂ (30%) using a microwave heating (MarsXpress, CEM). The temperature of the mix was brought to 170°C in 5 minutes and maintained at 170°C for 13 minutes. After cooling, the samples were filtered and diluted to 25 mL with deionized H₂O. The total metal concentrations were measured using an ICP-OES (ThermoFisher, ICAP GUO 6000). The repeatability of the results was verified using a standard reference plant sample ("LSE-EchCont-0020") (n=3) for each analysis.

The plant samples moisture percentage was measured at 105°C with a moisture analyzer (HC 103, Metler Toledo) in order to express results in mg.kg⁻¹ dry matter.

Metal accumulation in the plants

In order to determine the plant capacity to extract a metal from the soil, transport and accumulate it to its shoots, the bioconcentration factor (BCF) was calculated for each metal as follows:

$$\text{BCF} = (\text{metal concentration in plant shoot})/(\text{metal concentration in soil})$$

When a plant has a BCF greater than one, the metal concentrations in plant shoots are higher than metal concentrations in the soil. Therefore, the plant is able to accumulate trace metals in its shoots.

Results and discussion

Soil characteristics and metal concentrations

Table 1 shows the physico-chemical properties of the soil sampled on the brownfield. The soil was moderately calcareous (Baize 2000) and alkaline with a pH (H₂O) value of 8.35 and a pH (KCl) value of 7.58. The measurement of the pH (KCl) determines the soil's potential acidity. The difference between the pH (H₂O) and the pH (KCl) indicated the soil sample had an average reserve acidity (Mathieu and Pieltain 2003). Using clay, silt and sand percentages the soil texture was identified as Clay Loam (NRCS Soils 2019). The soil contained a low organic matter content (1.37 %) (Soltner 1996). Its C/N ratio was 11.58, this value is close to the value of 12 which indicates that the mineralization encounters difficulties. Its cation exchange capacity (CEC) was 11.88 cmol+.kg⁻¹. Soils with a CEC greater than 11 generally have high clay and organic matter contents, high water capacity and are highly capable of holding plant nutrient elements within the soil (Jones 2012).

Total trace metals such as Cd, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn were measured in the soil and are presented in Table 2. These trace metals are generally found in brownfield soils (Dazy et al. 2008; Techer et al. 2012). Total concentrations ranged from 0.52 mg.kg⁻¹ for Cd to 130.75 mg.kg⁻¹ for Zn. In the study area, Thionville - Custines, local pedo-geochemical background concentrations in trace metals are 2 mg.kg⁻¹ of Cd, 30 mg.kg⁻¹ of Cu, 75 mg.kg⁻¹ of Cr, 40 mg.kg⁻¹ of Ni, 30 mg.kg⁻¹ of Pb and 120 mg.kg⁻¹ of Zn (Darmendrail 2000). Therefore our results showed a higher concentration in Ni, Pb and Zn than the pedo-geochemical background. However, these metal concentrations were low compared to other brownfields also used by the steel industry. Some soils in the same region, of the Northeast of France can contain up to 679 mg.kg⁻¹ of Cr, 2350 mg.kg⁻¹ of Zn and 543 mg.kg⁻¹ of Pb (Dazy et al. 2008). Other soils in France are even more polluted. This is the case of a Northern France brownfield, which exploited a zinc and a lead smelter where the highest trace metal concentrations measured were 30.2 mg.kg⁻¹ of Cd, 3711 mg.kg⁻¹ of Pb and 6908 mg.kg⁻¹ of Zn (Douay et al. 2008).

DTPA extractable trace metals concentrations were measured in the soil and are presented in Table 2. The DTPA-extractable trace metals concentrations ranged from 0.07 mg.kg⁻¹ for Cd to 3.33 mg.kg⁻¹ for Pb. None of these concentrations were higher than the local pedo-geochemical background concentrations. The ratio between the DTPA-extractable and the total concentrations was higher for Cd (13.5 %) than for Pb (9.1 %), Cu (7.1 %), Zn (2 %) and Ni (0.4%). Results showed the percentages of bioavailable trace metals differed depending on the elements. Overall, there is a small proportion of bioavailable trace metals in the soil.

A genotoxicity test (Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test; NF ISO 29200) and an ecotoxicity test (effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants; NF EN ISO 11269-2) were used and no significant differences were observed between the soil in this study and the reference soil (data not shown). These results are in accordance with the low bioavailability of pollutants in the soil.

To resume, the soil was contaminated with Ni, Pb and Zn and contained a low proportion of bioavailable trace metals. Therefore, the soil in this study allows the establishment of a phytoremediation technique, such as the phytoextraction. Indeed, phytoremediation techniques are cost-effective and are used to remediate large areas of land contaminated with low to moderate levels of trace metals (Padmavathiamma and Li 2007).

Metal concentrations in the plants

For this study, ten of the brownfield native plant were sampled (Table 3) and identified by using two plant identification guides (Schauer and Caspari 2008; Muratet et al. 2017). Species names have been checked against the International Plant Names Index (www.ipni.org). Among these ten species, six different families were collected: Asteraceae, Euphorbiaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Poaceae and Apiaceae. Several of these native plants able to colonize brownfields were found in other metal contaminated soils. *Senecio vernalis* and *Daucus carota* L. were found in an industrial wasteland in the same region of France (Dazy et al. 2008, 2009). *T. farfara* grew spontaneously in a military shooting range in Switzerland (Evangelou et al. 2012).

This spontaneous vegetation is considered metal tolerant. One of the strategies of metal tolerant plants is to accumulate metals in above-ground biomass (Baker 1981). In order to determine if the sampled

plants have developed this strategy, metal concentrations in the shoots of these plants were measured. Results are presented in Table 4. Metal levels in the shoots differed, depending on the plant species and the metal. Only 2 plant species contained Ni concentrations, 6 plants Cd and Cr, and 7 plants Pb concentrations higher than the quantification limit. On the contrary, Cu and Zn have been detected in all ten species. The highest Cd and Ni concentrations were measured in *S. vernalis* shoots while *Erigeron sp* contained the highest Cu level and *T. farfara* the highest Cr, Pb and Zn concentrations. The main metal found in the above-ground biomass of the ten plants was Zn with concentrations ranging from 13.20 mg.kg⁻¹ to 401.25 mg.kg⁻¹. The highest concentration, all metals combined, was measured in the *T. farfara* leaves.

According to Baker's definition (Baker and Brooks 1989), none of these ten collected plants can be considered hyperaccumulators due to the low concentration levels measured in their shoots. However, this definition defines metal concentrations in the plants shoots when they grow on metal rich soil. However, even if the plants are not considered hyperaccumulators in our study due to the low level of soil pollution, they can still accumulate trace metals in their shoots.

Metal accumulation in the plants

Results are shown in Table 5. *S. vernalis* has the highest BCF for Cd and Ni with values of 1.308 and 0.069 respectively. The highest BCF for Cu is 0.940 and was measured for *Erigeron sp*. *T. farfara* has the highest BCF for Zn, Pb and Cr with values of 3.069, 0.050 and 0.066 respectively. Results show that two plant species have a BCF greater than one: *T. farfara* for Zn and *S. vernalis* for Cd. These plants were able to accumulate these elements and should potentially be used in phytoextraction in order to remediate polluted soils. Indeed, many authors have determined the efficiency of phytoextraction by using two criteria: the biomass production and the bioconcentration factor. The BCF is generally greater than 1 and sometimes it can reach 50 or 100 in the case of hyperaccumulators (McGrath and Zhao 2003; Cluis 2004).

Several studies have been carried out on the phytoextraction potential of *T. farfara* and *S. vernalis* as native plants growing on metal contaminated soils (Robinson et al. 2008; Dzierzanowski and Gawroński 2012; Evangelou et al. 2012). Contrary to our results, an accumulation of Pb has been reported in *T. farfara* (Robinson et al. 2008). A Pb concentration of 1580 mg.kg⁻¹ has been measured in the leaves of this plant when it grows on a contaminated soil with a Pb concentration of 132 000 mg.kg⁻¹ (Robinson et al. 2008). However, results reported by Evangelou et al. (2012) did not show a Pb accumulation in *T. farfara* when it grows on a soil polluted by 466 mg.kg⁻¹ of Pb (Evangelou et al. 2012). Results shown by Evangelou and our study, when compared with Robinson's results, suggest *T. farfara* is able to accumulate Pb only on soils with high levels of contamination, suggesting a passive lead absorption mechanism.

The results of Evangelou et al. (2012) did not show a Zn accumulation in *T. farfara* shoots, which is contrary to our results. Zn concentration in the plant leaves were approximately 75 mg.kg⁻¹ and Zn concentration in soil were 99.8 mg.kg⁻¹ (Evangelou et al. 2012). This represents a BCF value less than one.

The differences between these two studies and our results can be explained by many factors such as soil properties, concentration of trace metals in the soil, bioavailability and speciation (Wu et al. 2007; Ali et al. 2013; Aihemaiti et al. 2018). The two comparative soils had similarities: they were alkaline with a low organic matter content but they did not have the same texture and the same concentration in trace metals. The zinc concentration in our soil (129.50 mg.kg⁻¹) is higher than the concentration in the soil of Evangelou et al. (2012). According to Jung and Thornton (1996), the total metal concentration in the soil is positively correlated to the metal concentration in plants and it is the main factor for metal uptake in plants. Bioavailable Zn in the study of Evangelou et al. (2012) was measured after an extraction with EDTA and its concentration was 14.7 mg.kg⁻¹. This concentration is much higher than our DTPA extractable Zn (2.58 mg.kg⁻¹). However, we cannot compare the bioavailable Zn between the two studies since the extractants used are different.

Another reason which could explain the presence of Zn accumulation in the shoots of *T. farfara* in our study and not in the study of Evangelou et al. (2012) is the harvest time (harvest time was not specified in the study of Evangelou et al. (2012)). We sampled the native plants in October, just before the

senescence of the plants, therefore *T. farfara* could have accumulated Zn in its shoots during its entire life cycle.

T. farfara is native to Europe, western Asia and northwestern Africa (Innes and Robin 2011). It is a pioneer species able to grow in various habitats including brownfields, clayey slopes, agricultural fields, roadsides, gravelly riversides, industrial waste sites, forests and disturbed soils. It quickly colonizes sites by rapid vegetative multiplication (Pfeiffer et al. 2008; Stefanowicz et al. 2015). Its capacity to grow in a wide range of habitats and climates as well as its rapid colonization of environments are advantages for its use in phytoremediation.

The second plant species with a BCF greater than one is *S. vernalis* with a Cd concentration of 0.68 mg.kg⁻¹ measured in its leaves. However, Cd concentrations in our soil are low (0.52 mg.kg⁻¹), they are not higher than the pedo-geochemical background. This is why we cannot conclude if this plant is a good candidate for phytoextraction. It should be studied on a richer Cd soil to determine its metal tolerance and then measure the Cd concentration in its shoots.

Conclusion

This study was conducted to screen native plants growing on a trace metal contaminated brownfield in order to determine the native plant's potential for metal accumulation.

Our study showed that, before establishing a phytoremediation technique with known accumulators, it is useful to screen the native vegetation of a contaminated site. Indeed, new accumulators can be discovered in spontaneous vegetation, which is already adapted to the site's environmental conditions. Thus, native plants will have a better survival and growth than non-native plants and perhaps a better efficiency. According to our results, no plant could be classified as a hyperaccumulator because of the low levels of metal concentrations in our soil. However, results underscored one new accumulator plant for Zn: *Tussilago farfara* L.

Among the sampled plants, *T. farfara* is the most promising species to use for Zn phytoextraction on contaminated soils because of its capacity to accumulate three times more Zn in its leaves than the concentration present in the soil. Moreover, this plant species has many advantages such as rapid colonization by vegetative multiplication, capacity to grow in various habitats and its native presence on the tested brownfield.

This plant species does deserve further study in order to determine if it could be used in Zn phytoextraction to remediate trace metals in contaminated soils. For this, a crop management will need to be defined in order to determine the plant biomass and the phytoextraction feasibility. Moreover, it could be interesting to measure the Zn concentrations in the different parts of *T. farfara* shoots (leaves, stems and flowers) in order to know which part accumulates the most Zn and when.

References

- AFNOR (1999) NF X31-130. Soil quality - Chemical methods - Determination of cationic exchange capacity (CEC) and extractible cations
- AFNOR (2003) NF X31-107. Soil quality - Particle size determination by sedimentation - Pipette method
- AFNOR (1998) NF ISO 13878. Soil quality. Determination of total nitrogen content by dry combustion ("elemental analysis").
- AFNOR (1995a) NF ISO 10694. Soil quality. Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis).
- AFNOR (2014) NF EN ISO 10693. Soil quality - Determination of carbonate content - Volumetric method
- AFNOR (2005) NF ISO 10390. Soil quality - Détermination of pH
- AFNOR (1995b) NF ISO 11466. Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia.
- AFNOR (2002) NF ISO 14870. Soil quality - Extraction of trace elements by buffered DTPA solution
- Aihemaiti A, Jiang J, Li D, et al (2018) The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *J Environ Manage* 222:216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Baize D (2000) Guide des analyses en pédologie: choix, expression, présentation, interprétation, 2e éd. rev. et augm. Institut national de la recherche agronomique, Paris
- Baize D, Gilkes RJ, Prakongkep N (2010) Concentrations of trace elements in soils: the three keys. In: 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. pp 1–6
- Baize D, Sterckeman T (2001) Of the necessity of knowledge of the natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Sci Total Environ* 264:127–139
- Baker A, Brooks R (1989) Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126. *Bull Env Contam Toxicol* 64:489–496

- Baker AJM (1981) Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr* 3:643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Bartke S, Martinát S, Klusáček P, et al (2016) Targeted selection of brownfields from portfolios for sustainable regeneration: User experiences from five cases testing the Timbre Brownfield Prioritization Tool. *J Environ Manage* 184:94–107. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.037>
- Boechat CL, Pistóia VC, Gianelo C, Camargo FA de O (2016) Accumulation and translocation of heavy metal by spontaneous plants growing on multi-metal-contaminated site in the Southeast of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Environ Sci Pollut Res* 23:2371–2380. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5342-5>
- Cluis C (2004) Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination. *BioTeach J* 2:1–67
- Darmendrail D (2000) Fonds géochimique naturel—État des connaissances à l'échelle nationale. INRA/BRGM. BRGM/RP-50158-FR, juin 2000. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 99-F-269
- Dazy M, Béraud E, Cotelte S, et al (2009) Changes in plant communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* 77:376–383. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.021>
- Dazy M, Jung V, Férard J-F, Masfaraut J-F (2008) Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.014>
- Douay F, Pruvot C, Roussel H, et al (2008) Contamination of Urban Soils in an Area of Northern France Polluted by Dust Emissions of Two Smelters. *Water Air Soil Pollut* 188:247–260. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9541-7>
- Dzierżanowski K, Gawroński SW (2012) Heavy metal concentration in plants growing on the vicinity of railroad tracks: A pilot study. *Chall Mod Technol* 3:
- Evangelou MW, Hockmann K, Pokharel R, et al (2012) Accumulation of Sb, Pb, Cu, Zn and Cd by various plants species on two different relocated military shooting range soils. *J Environ Manage* 108:102–107
- Grisson CM, Mazel M, Sellini A, et al (2015) The leguminous species *Anthyllis vulneraria* as a Zn-hyperaccumulator and eco-Zn catalyst resources. *Environ Sci Pollut Res* 22:5667–5676. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3605-1>
- Hashim MA, Mukhopadhyay S, Sahu JN, Sengupta B (2011) Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *J Environ Manage* 92:2355–2388. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.009>
- Heckenroth A, Rabier J, Dutoit T, et al (2016) Selection of native plants with phytoremediation potential for highly contaminated Mediterranean soil restoration: Tools for a non-destructive and integrative approach. *J Environ Manage* 183:850–863. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.029>
- Innes, Robin J (2011) Tussilago farfara. In : Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. Available : <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/forb/tusfar/all.html>. Accessed 2 October 2019.
- Islam MdS, Ahmed MdK, Habibullah-Al-Mamun Md, Raknuzzaman M (2015) The concentration, source and potential human health risk of heavy metals in the commonly consumed foods in Bangladesh. *Ecotoxicol Environ Saf* 122:462–469. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.022>
- Jones JB (2012) Plant nutrition and soil fertility manual, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton
- Jung MC, Thornton I (1996) Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. *Appl Geochem* 11:53–59. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(95\)00075-5](https://doi.org/10.1016/0883-2927(95)00075-5)
- Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 18:355–364
- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J Environ Manage* 174:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Mahdavian K, Ghaderian SM, Torkzadeh-Mahani M (2015) Accumulation and phytoremediation of Pb, Zn, and Ag by plants growing on Koshk lead–zinc mining area, Iran. *J Soils Sediments* 17:1310–1320. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1260-x>
- Mathieu C, Pieltain F (2003) Analyse chimique des sols: méthodes choisies. Éd. Tec & doc, Paris
- McGrath SP, Zhao F-J (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* 14:277–282. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00060-0)
- Muratet A, Muratet M, Pellaton M (2017) Flore des friches urbaines du nord de la France et des régions voisines
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8:199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- NRCS Soils (2019) Soil Texture Calculator | NRCS Soils. https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/?cid=nrcs142p2_054167. Accessed 21 Sep 2018
- Nsanganwimana F, Pourrut B, Mench M, Douay F (2014) Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *J Environ Manage* 143:123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.027>
- Oliver L, Ferber U, Grimski D, et al (2005) The scale and nature of European brownfields. In: CABERNET 2005-International Conference on Managing Urban Land LQM Ltd, Nottingham, UK, Belfast, Northern Ireland, UK
- Oyuela M, Fernández W, Sarmiento M (2017) Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands — A review. *Chemosphere* 168:1230–1247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.075>
- Padmavathamma PK, Li LY (2007) Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut* 184:105–126. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
- Pfeiffer T, Günzel C, Frey W (2008) Clonal reproduction, vegetative multiplication and habitat colonisation in *Tussilago farfara* (Asteraceae): A combined morpho-ecological and molecular study. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 203:281–291. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2007.02.008>
- Rizzo E, Pesce M, Pizzol L, et al (2015) Brownfield regeneration in Europe: Identifying stakeholder perceptions, concerns, attitudes and information needs. *Land Use Policy* 48:437–453. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2015.06.012>
- Robinson BH, Bischofberger S, Stoll A, et al (2008) Plant uptake of trace elements on a Swiss military shooting range: Uptake pathways and land management implications. *Environ Pollut* 153:668–676. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.034>
- Rocco C, Agrelli D, Coppola I, et al (2018) Native plant colonization of brownfield soil and sludges: effects on substrate properties and pollutant mobility. *J Soils Sediments* 18:2282–2291. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1850-x>

- Saha N, Mollah MZI, Alam MF, Safiur Rahman M (2016) Seasonal investigation of heavy metals in marine fishes captured from the Bay of Bengal and the implications for human health risk assessment. *Food Control* 70:110–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.040>
- Schauer T, Caspari C (2008) *Guide Delachaux des plantes par la couleur: 1150 fleurs, graminées, arbres et arbustes*. Delachaux et Niestlé, Paris
- Soltner D (1996) *Les bases de la production végétale: le sol et son amélioration*
- Stefanowicz AM, Kapusta P, Błońska A, et al (2015) Effects of *Calamagrostis epigejos*, *Chamaenerion palustre* and *Tussilago farfara* on nutrient availability and microbial activity in the surface layer of spoil heaps after hard coal mining. *Ecol Eng* 83:328–337. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.034>
- Techer D, Martinez-Chois C, Laval-Gilly P, et al (2012) Assessment of *Miscanthus×giganteus* for rhizoremediation of long term PAH contaminated soils. *Appl Soil Ecol* 62:42–49. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.07.009>
- Wu QT, Wei ZB, Ouyang Y (2007) Phytoextraction of Metal-Contaminated Soil by *Sedum alfredii* H: Effects of Chelator and Co-planting. *Water Air Soil Pollut* 180:131–139. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9256-1>
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ* 368:456–464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>

Table 1: Physico-chemical properties of the brownfield soil (means values \pm standard deviation, n=4)

Soil parameters	Values
pH (H ₂ O)	8.35 \pm 0.02
pH (KCl)	7.58 \pm 0.04
OM (g.kg ⁻¹)	13.73 \pm 0.80
CaCO ₃ (g.kg ⁻¹)	68.75 \pm 22.16
CEC (cmol ⁺ .kg ⁻¹)	11.88 \pm 0.51
C/N	11.58 \pm 0.40
Clay (%)	30.02 \pm 2.06
Silt (%)	43.30 \pm 3.57
Sand (%)	26.68 \pm 3.17

Table 2: Total and DTPA-extractable trace metal concentrations in the soil (mean values \pm standard deviation, n=4) and concentrations of the local pedo-geochemical background (Thionville – Custines). Numbers in bold indicate values higher than the local pedo-geochemical background.

Trace metals	Trace metal concentrations (mg.kg ⁻¹)		
	Total	DTPA-extractable	Local pedo-geochemical background
Cd	0.52 \pm 0.26	0.07 \pm 0.00	2
Cu	22.15 \pm 1.00	1.57 \pm 0.03	30
Cr	56.83 \pm 1.23	< 0.0088	75
Ni	46.53 \pm 0.91	0.18 \pm 0.01	40
Pb	36.43 \pm 2.13	3.33 \pm 0.33	30
Zn	130.75 \pm 2.49	2.58 \pm 0.41	120

Table 3: Identification of the plant species sampled on the site

Species n°	Scientific name	Family
1	<i>Tussilago farfara L.</i>	<i>Asteraceae</i>
2	<i>Mercurialis annua L.</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
3	<i>Matricaria maritima L.</i>	<i>Asteraceae</i>
4	<i>Brassica napus L.</i>	<i>Brassicaceae</i>
5	<i>Euphorbia lathyris L.</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
6	<i>Medicago arborea L.</i>	<i>Fabaceae</i>
7	<i>Erigeron sp.</i>	<i>Asteraceae</i>
8	<i>Senecio vernalis</i>	<i>Asteraceae</i>
9	<i>Hordeum murinum L.</i>	<i>Poaceae</i>
10	<i>Daucus carota L.</i>	<i>Apiaceae</i>

Table 4: Metal concentrations (mg.kg⁻¹ dry matter) in the shoots of the sampled plants (n=3)

Scientific name	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<i>Tussilago farfara L.</i>	0.36 ± 0.15	3.73 ± 0.82	7.54 ± 0.80	2.28 ± 0.50	1.82 ± 0.14	401.25 ± 107.15
<i>Mercurialis annua L.</i>	0.49 ± 0.01	1.74 ± 0.01	4.91 ± 0.10	< 1.97	1.11 ± 0.05	43.79 ± 0.52
<i>Matricaria maritima L.</i>	< 0.15	< 1.50	5.87 ± 0.17	< 1.97	< 0.69	15.61 ± 0.01
<i>Brassica napus L.</i>	0.42 ± 0.01	< 1.50	4.67 ± 0.18	< 1.97	< 0.69	42.40 ± 0.90
<i>Euphorbia lathyris L.</i>	< 0.15	< 1.50	5.97 ± 0.12	< 1.97	0.81 ± 0.02	127.13 ± 2.94
<i>Medicago arborea L.</i>	< 0.15	< 1.50	5.20 ± 0.36	< 1.97	< 0.69	13.20 ± 0.42
<i>Erigeron sp.</i>	0.48 ± 0.02	2.25 ± 0.16	18.80 ± 0.48	< 1.97	1.04 ± 0.19	70.05 ± 2.45
<i>Senecio vernalis</i>	0.68 ± 0.04	3.58 ± 0.34	12.23 ± 0.81	3.23 ± 0.22	1.77 ± 0.20	45.62 ± 2.12
<i>Hordeum murinum L.</i>	< 0.15	2.80 ± 0.18	3.08 ± 0.19	< 1.97	1.33 ± 0.08	20.83 ± 0.31
<i>Daucus carota L.</i>	0.32 ± 0.03	2.10 ± 0.20	6.75 ± 0.33	< 1.97	1.66 ± 0.21	25.27 ± 1.66

Table 5: Bioconcentration factor of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in the selected plants. Numbers in bold indicate BCF values greater than one.

Scientific name	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<i>Tussilago farfara L.</i>	0.692	0.066	0.340	0.049	0.050	3.069
<i>Mercurialis annua L.</i>	0.942	0.031	0.221	ND	0.030	0.335
<i>Matricaria maritima L.</i>	ND	ND	0.265	ND	ND	0.119
<i>Brassica napus L.</i>	0.808	ND	0.211	ND	ND	0.324
<i>Euphorbia lathyris L.</i>	ND	ND	0.270	ND	0.022	0.972
<i>Medicago arborea L.</i>	ND	ND	0.235	ND	ND	0.101
<i>Erigeron sp.</i>	0.923	0.040	0.849	ND	0.029	0.536
<i>Senecio vernalis</i>	1.308	0.063	0.552	0.069	0.049	0.349
<i>Hordeum murinum L.</i>	ND	0.049	0.139	ND	0.037	0.159
<i>Daucus carota L.</i>	0.615	0.037	0.305	ND	0.046	0.193

BCF were not determined (ND) when metal concentrations in shoots were lower than the quantification limit

Références bibliographiques

- AFNOR, 2019. NF EN ISO 21268-1. Qualité du sol - Modes opératoire de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux analogues au sol.
- AFNOR, 2015a. ISO 11074. Qualité du sol. Vocabulaire.
- AFNOR, 2015b. NF EN ISO 11268-1. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms- Part 1 : Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*.
- AFNOR, 2014. NF EN ISO 10693. Soil quality - Determination of carbonate content - Volumetric method.
- AFNOR, 2013a. NF EN ISO 11269-1. Qualité du sol. Détermination des effets des polluants sur la flore du sol. Partie 1 : Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- AFNOR, 2013b. NF ISO 29200. Qualité du sol. Evaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs - Essai des micronoyaux sur *Vicia faba*.
- AFNOR, 2013c. NF EN ISO 11269-1. Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1 : method for the measurement of inhibition of root growth.
- AFNOR, 2013d. NF ISO 29200. Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test.
- AFNOR, 2012. NF ISO 12914. Qualité du sol - Extraction assistée par micro-ondes de la fraction soluble dans l'eau régale pour la détermination des éléments.
- AFNOR, 2011. NF EN ISO 16072. Qualité du sol- Méthodes de laboratoire pour la détermination de la respiration microbienne du sol.
- AFNOR, 2005. NF ISO 10390. Soil quality - Détermination of pH.
- AFNOR, 2003. NF X31-107. Soil quality - Particle size determination by sedimentation - Pipette method.
- AFNOR, 2002. NF ISO 14870. Soil quality - Extraction of trace elements by buffered DTPA solution.
- AFNOR, 1999. NF X31-130. Soil quality - Chemical methods - Determination of cationic exchange capacity (CEC) and extractible cations.
- AFNOR, 1998a. NF ISO 14235. Soil quality. Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation.
- AFNOR, 1998b. NF ISO 13878. Soil quality. Determination of total nitrogen content by dry combustion ("elemental analysis").
- AFNOR, 1995a. NF ISO 11261. Soil quality. Determination of total. Modified kjeldahl method.
- AFNOR, 1995b. NF ISO 10694. Soil quality. Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis).
- AFNOR, 1995c. NF ISO 11466. Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia.
- Agnello, A.C., Bagard, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G., Huguenot, D., 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of The Total Environment* 563–564, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>
- Ahangar, A.G., 2010. Sorption of PAHs in the soil environment with emphasis on the role of soil organic matter: A review. *World Applied Sciences Journal* 11, 759–765.

- AIDA, 2008. Circulaire du 04/07/08 relative à la procédure concernant la gestion des sédiments lors de travaux ou d'opérations impliquant des dragages ou curages maritimes et fluviaux | AIDA [WWW Document]. URL https://aida.ineris.fr/consultation_document/7177 (accessed 3.6.20).
- Aihemaiti, A., Jiang, J., Li, D., Liu, N., Yang, M., Meng, Y., Zou, Q., 2018. The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *Journal of Environmental Management* 222, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>
- AIR PARIF, 2013. Pollution atmosphérique au benzo(a)pyrène et autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
- Al Souki, K.S., Louvel, B., Douay, F., Pourrut, B., 2017. Assessment of *Miscanthus x giganteus* capacity to restore the functionality of metal-contaminated soils: Ex situ experiment. *Applied Soil Ecology* 115, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.002>
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Amellal, N., Portal, J.-M., Vogel, T., Berthelin, J., 2001. Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation* 12, 49–57. <https://doi.org/10.1023/A:1011909107858>
- Anderson, E., Arundale, R., Maughan, M., Oladeinde, A., Wycislo, A., Voigt, T., 2011. Growth and agronomy of *Miscanthus x giganteus* for biomass production. *Biofuels* 2, 71–87. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.80>
- Antoni, V., 2013. BASOL: un panorama des sites et sols pollués, ou potentiellement pollués, nécessitant une action des pouvoirs publics. *Études & documents-Commissariat Général au développement durable-Observations et statistiques* 97.
- Aydinalp, C., Katkat, A.V., 2004. The comparison of extraction methods for evaluating some heavy metals in polluted soils. *Plant Soil and Environment* 50, 212–217.
- Baize, D., 2018. Guide des analyses en pédologie, 3ème édition revue et argumentée. ed. Quae, Paris.
- Baize, D., 2007. Les Éléments Traces Métalliques (ETM) dans les SOLS. TOUT ce qu'il FAUT SAVOIR! Interface 1–28.
- Baize, D., 2000. Guide des analyses en pédologie: choix, expression, présentation, interprétation, 2e éd. rev. et augm. ed, Techniques et pratiques. Institut national de la recherche agronomique, Paris.
- Baize, D., Gilkes, R.J., Prakongkep, N., 2010. Concentrations of trace elements in soils: the three keys, in: 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. pp. 1–6.
- Baize, D., Sterckeman, T., 2001. Of the necessity of knowledge of the natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Science of the Total Environment* 264, 127–139.
- Baker, A., Brooks, R., 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 64, 489–496.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3, 643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>

- Baker, A.J.M., Brooks, R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1, 81–126.
- Bartke, S., Martinát, S., Klusáček, P., Pizzol, L., Alexandrescu, F., Frantál, B., Critto, A., Zabeo, A., 2016. Targeted selection of brownfields from portfolios for sustainable regeneration: User experiences from five cases testing the Timbre Brownfield Prioritization Tool. *Journal of Environmental Management* 184, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.037>
- BASOL, 2020. BASOL - Ministère de la Transition écologique et solidaire [WWW Document]. BASOL. URL <https://basol.developpement-durable.gouv.fr/accueil.php> (accessed 5.28.20).
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1183–1192. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2)
- Baxter, X.C., Darvell, L.I., Jones, J.M., Barraclough, T., Yates, N.E., Shield, I., 2014. Miscanthus combustion properties and variations with Miscanthus agronomy. *Fuel* 117, 851–869. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.003>
- Beale, C.V., Long, S.P., 1997. Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus x giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy* 12, 419–428.
- Beale, C.V., Long, S.P., 1995. Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? *Plant, Cell & Environment* 18, 641–650.
- Bert, V., Hadj-Sahraoui, A., Leyval, C., Fontaine, J., Ouvrard, S., 2012. Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués: état de l’art et guide de mise en oeuvre. EDP sciences.
- Bertrand, J.-C., 2012. *Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des Pays de l’Adour, Pau.
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., 2011. *Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des Pays de l’Adour, Pau.
- Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P., 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environ. Pollut.* 147, 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.013>
- Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2000. Dissipation of 3–6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 2011–2017. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00100-0)
- Bispo, A., Cluzeau, D., Creamer, R., Dombos, M., Graefe, U., Krogh, P.H., Sousa, J.P., Peres, G., Rutgers, M., Winding, A., 2009. Indicators for monitoring soil biodiversity. *Integrated environmental assessment and management* 5, 717–719.
- Boechat, C.L., Pistóia, V.C., Gianelo, C., Camargo, F.A. de O., 2016. Accumulation and translocation of heavy metal by spontaneous plants growing on multi-metal-contaminated site in the Southeast of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Environ Sci Pollut Res* 23, 2371–2380. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5342-5>
- Bourgeois, E., Dequiedt, S., Lelièvre, M., van Oort, F., Lamy, I., Maron, P.-A., Ranjard, L., 2015. Positive effect of the *Miscanthus* bioenergy crop on microbial diversity in wastewater-

- contaminated soil. *Environ Chem Lett* 13, 495–501. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0531-5>
- Bourrelier, P.-H., Pédro, G., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. Lavoisier Tec et Doc.
- Branchu, P., Damas, O., Douay, F., Grand, C., Marot, F., Schwartz, C., 2018. Présomption de pollution d'un sol: des clés pour comprendre et agir.
- BRGM, 2017. Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués.
- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques: Guide méthodologique. Rapport d'étude 28.
- Cadière, F., Masselot, G., 2012. Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitements des sols et eaux souterraines pollués en France. Synthèse des données 2010. ADEME, Angers.
- Calvet, R., 2013. Le sol, éditions France Agricole. ed, Agri production. Paris.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 2010. Canadian soil quality guidelines for the prospection of environmental and human health: Carcinogenic and other PAHs. Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.
- cancer-environnement, 2018. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et risque de cancer [WWW Document]. Cancer-environnement. URL <https://www.cancer-environnement.fr/235-Hydrocarbures-aromatiques-polycycliques-HAP.ce.aspx> (accessed 3.26.20).
- Carretier, J., Fervers, B., 2017. Volume 100C, Revue des cancérogènes pour l'Homme : métaux, arsenic, poussières et fibres | Cancer et environnement [WWW Document]. Cancer-environnement. URL <https://www.cancer-environnement.fr/242-Vol-100C-métaux,-arsenic,-poussieres-etfibres.ce.aspx> (accessed 5.28.20).
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 73, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- Chen, Y., Tian, W., Shao, Y., Li, Y.-J., Lin, L.-A., Zhang, Y.-J., Han, H., Chen, Z.-J., 2020. Miscanthus cultivation shapes rhizosphere microbial community structure and function as assessed by Illumina MiSeq sequencing combined with PICRUSt and FUNGUld analyses. *Arch Microbiol* 202, 1157–1171. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01830-1>
- Christian, D.G., Riche, A.B., Yates, N.E., 2008. Growth, yield and mineral content of *Miscanthus x giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial Crops and Products* 28, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.02.009>
- Chung, J.-H., Kim, D.-S., 2012. Miscanthus as a potential bioenergy crop in East Asia. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 15, 65–77. <https://doi.org/10.1007/s12892-012-0023-0>
- Cluis, C., 2004. Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination. *BioTeach Journal* 2, 1–67.
- Colombano, S., Saada, A., Guerin, V., Bataillard, P., Bellenfant, G., Beranger, S., Hube, D., Blanc, C., Zornig, C., Girardeau, I., 2010. Quelles techniques pour quels traitements—Analyse coûts-bénéfices. Rapport final BRGM-RP-58609-FR.
- Combe, M., 2017. Le miscanthus, pour du béton biosourcé. *Techniques de l'Ingénieur*. URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/actualite/articles/le-miscanthus-pour-du-beton-biosource-45263/> (accessed 4.23.20).

- Creamer, R.E., Schulte, R.P.O., Stone, D., Gal, A., Krogh, P.H., Lo Papa, G., Murray, P.J., Pérès, G., Foerster, B., Rutgers, M., Sousa, J.P., Winding, A., 2014. Measuring basal soil respiration across Europe: Do incubation temperature and incubation period matter? *Ecological Indicators* 36, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.08.015>
- Cristaldi, A., Conti, G.O., Jho, E.H., Zuccarello, P., Grasso, A., Copat, C., Ferrante, M., 2017. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environmental Technology & Innovation* 8, 309–326. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.08.002>
- Darmendrail, D., 2000. Fonds géochimique naturel–État des connaissances à l'échelle nationale. INRA/BRGM (No. BRGM/RP-50158-FR). BRGM/RP-50158-FR, juin 2000. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 99-F-269.
- Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Grévillet, F., Féraud, J.-F., Masfaraud, J.-F., 2009. Changes in plant communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* 77, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.021>
- Dazy, M., Jung, V., Féraud, J.-F., Masfaraud, J.-F., 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.014>
- Dohleman, F.G., Long, S.P., 2009. More Productive Than Maize in the Midwest: How Does Miscanthus Do It? *Plant Physiol.* 150, 2104–2115. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139162>
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of Urban Soils in an Area of Northern France Polluted by Dust Emissions of Two Smelters. *Water, Air, and Soil Pollution* 188, 247–260. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9541-7>
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., Clipson, N., 2008. Microbial PAH Degradation, in: *Advances in Applied Microbiology*. p. 305.
- Dzierżanowski, K., Gawroński, S.W., 2012. Heavy metal concentration in plants growing on the vicinity of railroad tracks: A pilot study. *Challenges of Modern Technology* 3.
- EFSA, 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. European Food Safety Authority.
- El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current opinion in microbiology* 8, 268–275.
- Evangelou, M.W., Hockmann, K., Pokharel, R., Jakob, A., Schulin, R., 2012. Accumulation of Sb, Pb, Cu, Zn and Cd by various plants species on two different relocated military shooting range soils. *Journal of environmental management* 108, 102–107.
- Figala, J., Vranová, V., Rejšek, K., Formánek, P., 2015. Giant miscanthus (*Miscanthus × Giganteus* Greef Et Deu.) – A Promising Plant for Soil Remediation: A Mini Review. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 63, 2241–2246. <https://doi.org/10.11118/actaun201563062241>
- Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P., Morel, J.L., 2002. Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *J. Environ. Qual.* 31, 1649–1656. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1649>
- Floraine, 2013. Atlas de la flore lorraine. Vent d'Est, Strasbourg.

- Frame, J., Newbould, P., 1986. Agronomy of White Clover, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 1–88. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60280-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60280-1)
- France-Miscanthus, 2020. France-Miscanthus, développement et promotion du miscanthus [WWW Document]. France Miscanthus. URL <https://www.france-miscanthus.org/> (accessed 4.23.20).
- Gao, Y., Miao, C., Xia, J., Mao, L., Wang, Y., Zhou, P., 2012. Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. *Front. Environ. Sci. Eng.* 6, 213–223. <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0345-z>
- Gao, Y., Zhu, L., 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55, 1169–1178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.01.037>
- Garcia-Maraver, A., Mata-Sanchez, J., Carpio, M., Perez-Jimenez, J.A., 2017. Critical review of predictive coefficients for biomass ash deposition tendency. *Journal of the Energy Institute* 90, 214–228. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2016.02.002>
- García-Sánchez, M., Košnář, Z., Mercl, F., Aranda, E., Tlustoš, P., 2018. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.012>
- Gauthier, G., Somer, L., 2013. Guide pratique de la culture de miscanthus.
- Gentry, T., Rensing, C., Pepper, I., 2004. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34, 447–494. <https://doi.org/10.1080/10643380490452362>
- Gerhardt, K.E., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant science* 176, 20–30.
- Girard, M.-C., 2011. Sols et environnement. Dunod, Paris.
- Girard, M.-C., 2005. SOLS et ENVIRONNEMENT, Dunod. ed. Paris.
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>
- Grisson, C.M., Mazel, M., Sellini, A., Escande, V., Biton, J., Grison, C., 2015. The leguminous species *Anthyllis vulneraria* as a Zn-hyperaccumulator and eco-Zn catalyst resources. *Environ Sci Pollut Res* 22, 5667–5676. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3605-1>
- Hardy, D., Assié, M., 2002. Historique National des opérations de curage et perspectives. Ministère de l'écologie et du développement durable, pp 17.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Hashim, M.A., Mukhopadhyay, S., Sahu, J.N., Sengupta, B., 2011. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of Environmental Management* 92, 2355–2388. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.009>
- Hatzinger, P.B., Alexander, Martin., 1995. Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537–545. <https://doi.org/10.1021/es00002a033>

- Heaton, E.A., Dohleman, F.G., Miguez, A.F., Juvik, J.A., Lozovaya, V., Widholm, J., Zabolina, O.A., Mclsaac, G.F., David, M.B., Voigt, T.B., 2010. Miscanthus: a promising biomass crop, in: *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp. 75–137.
- Heckenroth, A., Rabier, J., Dutoit, T., Torre, F., Prudent, P., Laffont-Schwob, I., 2016. Selection of native plants with phytoremediation potential for highly contaminated Mediterranean soil restoration: Tools for a non-destructive and integrative approach. *Journal of Environmental Management* 183, 850–863. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.029>
- Hedde, M., van Oort, F., Boudon, E., Abonnel, F., Lamy, I., 2013. Responses of soil macroinvertebrate communities to Miscanthus cropping in different trace metal contaminated soils. *biomass and bioenergy* 55, 122–129.
- Hodkinson, T.R., 2002. Characterization of a Genetic Resource Collection for Miscanthus (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany* 89, 627–636. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf091>
- INERIS, 2005. Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Guide méthodologique (Guide méthodologique No. 66244- DESP-R01). INERIS.
- Innes, Robin, J., 2011. Tussilago farfara. In : *Fire Effects Information System*, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. Available : <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/forb/tusfar/all.html>. Accessed 2 October 2019.
- Islam, Md.S., Ahmed, Md.K., Habibullah-Al-Mamun, Md., Raknuzzaman, M., 2015. The concentration, source and potential human health risk of heavy metals in the commonly consumed foods in Bangladesh. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.022>
- IUSS, W. group W. (Ed.), 2006. World reference base for soil resources, 2006, World soil resources reports. FAO, Rome.
- Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology* 99, 2637–2643. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.047>
- Janssen, J., Weyens, N., Croes, S., Beckers, B., Meiresonne, L., Peteghem, P.V., Carleer, R., Vangronsveld, J., 2015. Phytoremediation of Metal Contaminated Soil Using Willow: Exploiting Plant-Associated Bacteria to Improve Biomass Production and Metal Uptake. *International Journal of Phytoremediation* 17, 1123–1136. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1045129>
- Joner, E.J., Corgié, S.C., Amellal, N., Leyval, C., 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 859–864. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00018-4)
- Jones, J.B., 2012a. Plant nutrition and soil fertility manual, 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Jones, J.B., 2012b. Plant nutrition and soil fertility manual, 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Jørgensen, U., 1997. Genotypic variation in dry matter accumulation and content of N, K and Cl in Miscanthus in Denmark. *Biomass and Bioenergy* 12, 155–169. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00002-0)
- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International*

- Biodeterioration & Biodegradation 45, 57–88. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)
- Jung, M.C., Thornton, I., 1996. Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. *Applied Geochemistry* 11, 53–59. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(95\)00075-5](https://doi.org/10.1016/0883-2927(95)00075-5)
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364.
- Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of environmental management* 71, 95–122.
- Kimura, N., Kitagawa, W., Mori, T., Nakashima, N., Tamura, T., Kamagata, Y., 2006. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 474–484. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0481-8>
- Kotoky, R., Pandey, P., 2020. Rhizosphere assisted biodegradation of benzo(a)pyrene by cadmium resistant plant-probiotic *Serratia marcescens* S217, and its genomic traits. *Sci Rep* 10, 5279. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62285-4>
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C.A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R.I., Mellado-Vázquez, P.G., Malik, A.A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B.C., Trumbore, S.E., Gleixner, G., 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nat Commun* 6, 6707. <https://doi.org/10.1038/ncomms7707>
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2407–2415. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>
- Lauber, K., Wagner, G., Gfeller, E., Gygax, A., 2007. *Flora Helvetica flore illustrée de Suisse*. Belin, Paris.
- Laurent, C., Feidt, C., Laurent, F., France, Agence de l’environnement et de la maîtrise de l’énergie, 2005. Contamination des sols transferts des sols vers les animaux. EDP Sciences : ADEME Editions, Les Ulis; Angers.
- Laval-Gilly, P., Henry, S., Mazziotti, M., Bonnefoy, A., Comel, A., Falla, J., 2017. *Miscanthus x Giganteus* Composition in Metals and Potassium After Culture on Polluted Soil and Its Use as Biofuel. *Bioenergy Res.* 10, 846–852. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9846-3>
- Legifrance, 2016. Code de l’environnement - Article R541-8, Code de l’environnement.
- Legifrance, 2006. Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d’une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d’eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée à l’article R. 214-1 du code de l’environnement.
- Legifrance, 2002. Décret n°2002-540 du 18 avril 2002 relatif à la classification des déchets., 2002-540.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Scurlock, J.M.O., Huisman, W., 2000. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy* 19, 209–227. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00032-5)
- Lewandowski, I., Heinz, A., 2003. Delayed harvest of *miscanthus*—influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy* 19, 45–63. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00018-7)

- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., Christou, M., 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 25, 335–361. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00030-8)
- Li, S., Wu, F., 2018. Diversity and Co-occurrence Patterns of Soil Bacterial and Fungal Communities in Seven Intercropping Systems. *Front. Microbiol.* 9, 1521. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01521>
- Lin, X., Li, X., Li, P., Li, F., Zhang, L., Zhou, Q., 2008. Evaluation of Plant–Microorganism Synergy for the Remediation of Diesel Fuel Contaminated Soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 81, 19–24. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9438-1>
- Linde-Laursen, I.B., 1993. Cytogenetic analysis of *Miscanthus* ‘Giganteus’, an interspecific hybrid. *Hereditas* 119, 297–300.
- López-Gutiérrez, J.C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G., Philippot, L., 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 57, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.02.009>
- Lowther, W.L., 1975. Pelleting materials for oversown clover. *New Zeal J. Exp. Agr.* 3, 121–125. <https://doi.org/10.1080/03015521.1975.10425787>
- Lu, X.-Y., Zhang, T., Fang, H.H.-P., 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 1357–1371. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>
- Luo, L., Lin, S., Huang, H., Zhang, S., 2012. Relationships between aging of PAHs and soil properties. *Environmental Pollution* 170, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.003>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., Freitas, H., 2016a. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Env. Manage.* 174, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., Freitas, H., 2016b. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Env. Manage.* 174, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Mahdavian, K., Ghaderian, S.M., Torkzadeh-Mahani, M., 2015. Accumulation and phytoremediation of Pb, Zn, and Ag by plants growing on Koshk lead–zinc mining area, Iran. *Journal of Soils and Sediments* 17, 1310–1320. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1260-x>
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S., Valantin-Morison, M., 2009. Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 43–62. <https://doi.org/10.1051/agro:2007057>
- Maliszewska-Kordybach, B., 1999. Sources, concentrations, fate and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment. Part A: PAHs in air. *Polish journal of environmental studies* 8, 131–136.
- Maliszewska-Kordybach, B., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in Poland: preliminary proposals for criteria to evaluate the level of soil contamination. *Appl. Geochem.* 11, 121–127. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0883-2927(95)00076-3)
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., 2000. Ecotoxicological Activity of Soils Polluted with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) - Effect on Plants. *Environ. Technol.* 21, 1099–1110. <https://doi.org/10.1080/09593330.2000.9618996>

- Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G., Barrera-Cortés, J., 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.05.012>
- Marcato-Romain, C.-E., Guirese, M., Cecchi, M., Cotelle, S., Pinelli, E., 2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere* 77, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.016>
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and environmental microbiology* 67, 2354–2359.
- Mathieu, C., Pielain, F., 2003. *Analyse chimique des sols: méthodes choisies*. Éd. Tec & doc, Paris.
- Mazziotti, M., 2017. Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo(a)anthracène. Université de Lorraine.
- Mazziotti, M., Henry, S., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla, J., 2018. Comparison of two bacterial DNA extraction methods from non-polluted and polluted soils. *Folia Microbiologica* 63, 85–92. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0530-y>
- McGrath, S.P., Zhao, F.-J., 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 277–282. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00060-0)
- Meng, L., Qiao, M., Arp, H.P.H., 2011. Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *J Soils Sediments* 11, 482–490. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0319-y>
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental science & technology* 26, 1278–1284.
- Meyer, S., Reeb, C., Bosdeveix, R., 2008. *Botanique biologique et physiologie végétales*, 2e édition. ed. Maloine, Paris.
- Mitchell, R.J., Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., 2010. The ecological engineering impact of a single tree species on the soil microbial community: Tree impacts on the soil microbial community. *Journal of Ecology* 98, 50–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01601.x>
- Miyazawa, D., Thanh, L.T.H., Tani, A., Shintani, M., Loc, N.H., Hatta, T., Kimbara, K., 2019. Isolation and Characterization of Genes Responsible for Naphthalene Degradation from Thermophilic Naphthalene Degradator, *Geobacillus* sp. JF8. *Microorganisms* 8, 44. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010044>
- Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., Singh, R.B., Mishra, S., 2010. Effect of toxic metals on human health. *The Open Nutraceuticals Journal* 3.
- Muratet, A., Muratet, M., Pellaton, M., 2017. Flore des friches urbaines du nord de la France et des régions voisines.
- Muratova, A., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W., Turkovskaya, O., 2009. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany* 66, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.001>

- Muyzer, G., Waal, E.C. de, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8, 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Neukirchen, D., Himken, M., Lammel, J., Czipionka-Krause, U., Olf, H.-W., 1999. Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *European Journal of Agronomy* 11, 301–309.
- Newbould, P., Rangeley, A., 1984. Effect of lime, phosphorus and mycorrhizal fungi on growth, nodulation and nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) grown in UK hill soils. *Plant Soil* 76, 105–114. <https://doi.org/10.1007/BF02205571>
- NRCS Soils, 2019. Soil Texture Calculator | NRCS Soils [WWW Document]. URL https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/?cid=nracs142p2_054167 (accessed 9.21.18).
- Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., Douay, F., 2014. Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *J. Env. Manage.* 143, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.027>
- Okere, U.V., 2011. Biodegradation of PAHs in \blacklozenge Pristine \blacklozenge Soils from Different Climatic Regions. *J Bioremed Biodegrad s1*. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.S1-006>
- Oliver, L., Ferber, U., Grimski, D., Millar, K., Nathanail, P., 2005. The scale and nature of European brownfields, in: CABERNET 2005-International Conference on Managing Urban Land LQM Ltd, Nottingham, UK, Belfast, Northern Ireland, UK.
- Ollivier, J., Wanat, N., Austruy, A., Hitmi, A., Joussein, E., Welzl, G., Munch, J.C., Schloter, M., 2012. Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in the Root–Rhizosphere Complex of *Miscanthus x giganteus* Grown in Heavy Metal-Contaminated Soils. *Microb Ecol* 64, 1038–1046. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0078-y>
- Olson, P.E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N.M., Pilon-Smits, E., Reardon, K.F., 2008. Effects of Agronomic Practices on Phytoremediation of an Aged PAH-Contaminated Soil. *J. Environ. Qual.* 37, 1439. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0202>
- Oyuela, M., Fernández, W., Sarmiento, M., 2017. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands — A review. *Chemosphere* 168, 1230–1247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.075>
- Pacwa-Płociniczak, M., Czaplą, J., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., 2019. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.081>
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 184, 105–126. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
- Parrish, Z.D., White, J.C., Isleyen, M., Gent, M.P.N., Iannucci-Berger, W., Eitzer, B.D., Kelsey, J.W., Mattina, M.I., 2006. Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere* 64, 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.003>
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., Laval, K., Lebeau, T., Lemanceau, P., Leyval, C., Lindström, K., Pandard, P., Romero, E., Sarr, A., Schloter, M.,

- Simonet, P., Smalla, K., Wilke, B.-M., Martin-Laurent, F., 2011. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples.” *Journal of Microbiological Methods* 84, 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.016>
- Pfeiffer, T., Günzel, C., Frey, W., 2008. Clonal reproduction, vegetative multiplication and habitat colonisation in *Tussilago farfara* (Asteraceae): A combined morpho-ecological and molecular study. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 203, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2007.02.008>
- Pichard, A., 2005. Zinc et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS. Institut National de l’Environnement Industriel et des Risques. INERIS–DRC-01-25590-00DF259. doc. Version No 2, 69.
- Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Lewis, E.E., Erickson, L.E., Davis, L.C., 2014. *Miscanthus* as a Productive Biofuel Crop for Phytoremediation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33, 1–19. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.847616>
- Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Springer, Berlin; London.
- Ramade, F., 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l’eau: biogéochimie et écologie des eaux continentales et littorales. Édiscience International, Paris.
- RECORD, Hayet, A., Dream, A., Bohain, D., 2017. Impacts écologiques de sédiments pollués extraits et déposés en milieux terrestres. Etat des connaissances et évaluation des risques pour les écosystèmes n°14-1023/1A, 136.
- Rentz, J.A., Alvarez, P.J., Schnoor, J.L., 2008. Benzo [a] pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental pollution* 151, 669–677.
- Rizzo, E., Pesce, M., Pizzol, L., Alexandrescu, F.M., Giubilato, E., Critto, A., Marcomini, A., Bartke, S., 2015. Brownfield regeneration in Europe: Identifying stakeholder perceptions, concerns, attitudes and information needs. *Land Use Policy* 48, 437–453. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2015.06.012>
- Robert, M., 1996. Le sol: interface dans l’environnement ; ressource pour le développement, Collection Sciences de l’environnement 3e cycle et recherche. Masson, Paris.
- Robinson, B.H., Bischofberger, S., Stoll, A., Schroer, D., Furrer, G., Roulier, S., Gruenwald, A., Attinger, W., Schulin, R., 2008. Plant uptake of trace elements on a Swiss military shooting range: Uptake pathways and land management implications. *Environmental Pollution* 153, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.034>
- Rocco, C., Agrelli, D., Coppola, I., González, I., Adamo, P., 2018. Native plant colonization of brownfield soil and sludges: effects on substrate properties and pollutant mobility. *Journal of Soils and Sediments* 18, 2282–2291. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1850-x>
- Rudolf, K., Cornelis, A.V.G., 2003. Uptake and Accumulation of PAHs by Terrestrial Invertebrates. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* 4, 173.
- Ruellan, A., 2010. Des sols et des hommes: Un lien menacé. IRD Éditions. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.8293>
- Saha, N., Mollah, M.Z.I., Alam, M.F., Safiur Rahman, M., 2016a. Seasonal investigation of heavy metals in marine fishes captured from the Bay of Bengal and the implications for human health risk assessment. *Food Control* 70, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.040>
- Saha, N., Mollah, M.Z.I., Alam, M.F., Safiur Rahman, M., 2016b. Seasonal investigation of heavy metals in marine fishes captured from the Bay of Bengal and the implications for

- human health risk assessment. *Food Control* 70, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.040>
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M.R., Ishaque, W., Kamran, M.A., Matloob, A., Rehim, A., Hussain, S., 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 171, 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>
- Schauer, T., Caspari, C., 2008. Guide Delachaux des plantes par la couleur: 1150 fleurs, graminées, arbres et arbustes. Delachaux et Niestlé, Paris.
- Schneider, A. (Ed.), 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Éditions Quae, Versailles.
- Seaward, M.R.D., Richardson, D.H.S., 1989. Atmospheric sources of metal pollution and effects on vegetation. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects 75–92.
- Seple, K.T., Morriss, A.W.J., Paton, G.I., 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur J Soil Science* 54, 809–818. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0564.x>
- Senesil, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N., Radina, B., 1999. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* 39, 343–377. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00115-0)
- Shneider, G., 2001. Le curage des sédiments des cours d'eau. Le courrier de l'environnement de l'INRA 43, 146–147.
- Silva, Í.S., Santos, E. da C. dos, Menezes, C.R. de, Faria, A.F. de, Franciscan, E., Grossman, M., Durrant, L.R., 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology* 100, 4669–4675. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.079>
- Simonich, S.L., Hites, R.A., 1995. Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2905–2914. <https://doi.org/10.1021/es00012a004>
- Simonnot, M.O., Laubie, B., Zhang, X., Houzelot, V., Ferrari, F., Rodrigues, J., Pons, M.N., Bani, A., Echevarria, G., Morel, J.L., 2016. AGROMINING: PRODUCING NI SALTS FROM THE BIOMASS OF HYPERACCUMULATOR PLANTS. Canadian Institute of Mining, Metallurgy and Petroleum.
- Singer, A.C., Crowley, D.E., Thompson, I.P., 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* 21, 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00041-0)
- Soltner, D., 1996. Les bases de la production végétale: le sol et son amélioration.
- Steckerman, T., Ouvrard, S., Leglize, P., 2011. Phytoremédiation des sols. *Revue technique de l'ingénieur*.
- Stefanowicz, A.M., Kapusta, P., Błońska, A., Kompała-Bąba, A., Woźniak, G., 2015. Effects of *Calamagrostis epigejos*, *Chamaenerion palustre* and *Tussilago farfara* on nutrient availability and microbial activity in the surface layer of spoil heaps after hard coal mining. *Ecological Engineering* 83, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.034>
- Sterckeman, T., Ouvrard, S., Leglize, P., 2011. Phytoremédiation des sols. Les techniques de l'ingénieur.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment, in: *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Springer, pp. 133–164.

- Técher, D., 2011. Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus*. Université Paul Verlaine-Metz.
- Techer, D., D’Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Martinez-Chois, C., Falla, J., 2012a. Assessment of *Miscanthus x giganteus* secondary root metabolites for the biostimulation of PAH-utilizing soil bacteria. *Applied Soil Ecology* 62, 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.06.009>
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., D’Innocenzo, M., Muanda, F., Dicko, A., Rejšek, K., Falla, J., 2011. Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of The Total Environment* 409, 4489–4495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.049>
- Techer, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Martinez-Chois, C., D’Innocenzo, M., Falla, J., 2012b. Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: A microcosm study. *Industrial Crops and Products* 36, 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.030>
- Techer, D., Martinez-Chois, C., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., D’Innocenzo, M., Falla, J., 2012c. Assessment of *Miscanthus x giganteus* for rhizoremediation of long term PAH contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 62, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.07.009>
- Thomé, O.W., 1885. *Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz*. Gera, Alemania 3.
- Tilman, D., Wedin, D., Knops, J., 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379, 718–720. <https://doi.org/10.1038/379718a0>
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., 2005. LES SUBSTANCES PRIORITAIRES DE LA DIRECTIVE CADRE SUR L’EAU (DCE).
- Touzé, S., 2013. Procédé innovant de traitement de la fraction fine de sédiments pollués. Techniques de l’ingénieur Innovations en énergie et environnement base documentaire : TIB503DUO.
- US EPA, 2007. Method 3546. Microwave extraction.
- US EPA, 1997. Remediation Case Studies : Bioremediation and Vitrification (No. EPA-542-R-97-008). Environmental Protection Agency.
- Vainio, E.J., Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological research* 104, 927–936.
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72. <https://doi.org/10.1038/23932>
- Vergara Cid, C., Pignata, M.L., Rodriguez, J.H., 2020. Effects of co-cropping on soybean growth and stress response in lead-polluted soils. *Chemosphere* 246, 125833. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125833>
- Volkering, F., 1996. Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Wanat, N., Austruy, A., Joussein, E., Soubrand, M., Hitmi, A., Gauthier-Moussard, C., Lenain, J.-F., Vernay, P., Munch, J.C., Pichon, M., 2013. Potentials of *Miscanthus x giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *Journal of Geochemical Exploration* 126–127, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.01.001>

- Watkins, J.W., Sorensen, D.L., Sims, R.C., 1994. Volatilization and Mineralization of Naphthalene in Soil—Grass Microcosms, in: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.), *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 123–131. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0563.ch011>
- Wechtler, L., Henry, S., Falla, J., Walderdorff, L., Bonnefoy, A., Laval-Gilly, P., 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation from a contaminated technosol composed of dredged sediments with *Miscanthus x giganteus* and *Trifolium repens* L. in mono- and co-culture. *J Soils Sediments*. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02648-6>
- Wei, S., Pan, S., 2010. Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *J Soils Sediments* 10, 886–894. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0216-4>
- Wenzel, W.W., 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321, 385–408. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9686-1>
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental pollution* 88, 91–108.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* 81, 229–249. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90206-4](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90206-4)
- Wu, Q.T., Wei, Z.B., Ouyang, Y., 2007. Phytoextraction of Metal-Contaminated Soil by *Sedum alfredii* H: Effects of Chelator and Co-planting. *Water, Air, and Soil Pollution* 180, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9256-1>
- Xu, S.-Y., Chen, Y.-X., Lin, K.-F., Chen, X.-C., Lin, Q., Li, F., Wang, Z.-W., 2009. Removal of Pyrene from Contaminated Soils by White Clover. *Pedosphere* 19, 265–272. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(09\)60117-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60117-X)
- Xu, S.Y., Chen, Y.X., Wu, W.X., Wang, K.X., Lin, Q., Liang, X.Q., 2006. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Sci Total Environ.* 363, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.05.030>
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment* 368, 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>
- Zhang, X.-X., Cheng, S.-P., Zhu, C.-J., Sun, S.-L., 2006. Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere* 16, 555–565. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60088-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60088-X)
- Zhu, J., Zhao, Z., Lu, Y., 2006. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. *Journal of Environmental Sciences* 18, 1210–1215. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(06\)60064-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(06)60064-8)

Résumé

Chaque année, 50 millions de mètres cubes de sédiments sont excavés en France. Parmi eux, certains sont contaminés et des solutions doivent être trouvées pour les valoriser. Dans cette étude, des sédiments excavés ont été mélangés avec le sol du site d'accueil, tous deux contaminés en ETM et HAP, afin de créer un technosol à traiter en phytoremédiation par *Miscanthus x giganteus* (MxG). L'objectif de ce travail consistait à améliorer la rhizodégradation des HAP et la phytostabilisation des ETM tout en augmentant la productivité de MxG en vue de la valorisation de sa biomasse. Pour cela, deux expérimentations ont été réalisées. La première associait MxG en co-culture avec le trèfle blanc et la seconde couplait MxG en monoculture et en co-culture avec la bioaugmentation par des microorganismes hydrocarbonoclastes endémiques du technosol. D'après les résultats obtenus, la co-culture apparaît comme la technique la plus intéressante pour améliorer la phytoremédiation des HAP et des ETM et pour améliorer la qualité du technosol comparé à la phytoremédiation assistée par bioaugmentation. De plus, la plantation de trèfle blanc pour réaliser la co-culture est plus économique, plus rapide et plus simple à mettre en œuvre que la bioaugmentation. Ces résultats devront être confirmés *in situ* et d'autres espèces végétales pourraient également être testées en association avec MxG afin de coupler la rhizodégradation des HAP avec la phytoextraction des ETM.

Mots clés : *Phytoremédiation, Sédiments, Miscanthus x giganteus, Co-culture, Trèfle blanc, Bioaugmentation*

Abstract

Every year, 50 million cubic meters of sediments are excavated in France. Among them, some are contaminated and solutions must be found to valorize them. In this study, excavated sediments were mixed with the host-site soil, both contaminated with trace metals and PAHs, in order to create a technosol, then treated by phytoremediation with *Miscanthus x giganteus* (MxG). The objective was to improve the rhizodégradation of PAHs and the phytostabilisation of trace metals as well as to improve the quality of the technosol to increase the productivity of MxG with the aim of valorizing its biomass. Thus, two experiments were carried out. The first associated MxG in co-culture with white clover, and the second combined phytoremediation with a mono- and a co-culture of MxG with bioaugmentation by the endemic hydrocarbonoclast microorganisms of the technosol. According to the results obtained, co-culturing of MxG and white clover appears to be the most note-worthy technique to improve the phytoremediation of PAHs and trace metals and the quality of the technosol compared to phytoremediation assisted by bioaugmentation. In addition, planting white clover for co-culturing is more cost-effective, faster and easier to implement than bioaugmentation. These results will have to be confirmed *in situ* and other plant species could also be tested in association with MxG in order to combine rhizodegradation with phytoextraction.

Keywords: *Phytoremediation, Sediments, Miscanthus x giganteus, Co-culture, White clover, Bioaugmentation*