



HAL
open science

Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution

Esteban Remon

► **To cite this version:**

Esteban Remon. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Biologie végétale. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2006. Français. NNT : . tel-00362527

HAL Id: tel-00362527

<https://theses.hal.science/tel-00362527>

Submitted on 5 Mar 2009

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.

UNIVERSITÉ JEAN MONNET

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THÈSE DE DOCTORAT

2006

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur des Universités en Biologie Végétale
Par

ESTEBAN REMON

*Tolérance et accumulation des métaux lourds par la
végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de
nouvelles méthodes de bio-dépollution*

Soutenue publiquement le 07 décembre 2006 devant la commission d'examen :

Pr. Jean-Claude LECLERC, Université de Saint-Etienne	Directeur
Pr. Gérard LEDOIGT, Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Pr. Jean-Paul SCHWITZGUEBEL, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne	Rapporteur
Pr. Philippe SONNET, Université Catholique de Louvain	Examineur
Dr. Bernard GUY, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne	Examineur
Dr. Michel MENCH, Université de Bordeaux	Examineur
Dr. Olivier FAURE, Université de Saint-Etienne	Examineur
Dr. Jean-Luc BOUCHARDON, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne	Examineur

REMERCIEMENTS

Mon travail de thèse a débuté en octobre 2002 suite à l'obtention d'une Allocation Doctorale de Recherche financée dans le cadre des programmes AVENIR de la région Rhône-Alpes. La thématique retenue concerne l'identification et la caractérisation de plantes résistantes aux métaux lourds dans le but de sélectionner de nouvelles variétés potentiellement efficaces dans des actions de phytoremédiation.

La plus grande partie de ce travail a été effectuée au Laboratoire d'Ecophysiologie Appliquée (LEPA) de la Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Etienne, en collaboration avec le laboratoire de Géochimie (GENERIC) de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

Je remercie donc tout particulièrement les membres de ces deux unités, en commençant par messieurs **Jean-Claude Leclerc et Bernard Guy**, qui m'ont permis d'effectuer ma thèse sous leur direction et pour la confiance qu'ils ont su m'accorder. Un grand merci également à **Olivier Faure**, pour sa présence au quotidien, sa participation aux expériences, nos fructueuses discussions et ses inestimables conseils de rédaction. Je tiens également à remercier chaleureusement **Jean-Luc Bouchardon** pour sa patience, son sens de la diplomatie et son aide précieuse dans le domaine de la géochimie des sols. J'exprime ici aussi toute ma gratitude à l'égard de **Jacques Moutte et Frédéric Gallice** pour leur précieuse contribution apportée lors du dosage des éléments métalliques par spectrométrie d'émission atomique. Merci également aux nombreux stagiaires de ces deux laboratoires, qui ont su contribuer avec brio aux expériences réalisées, tout en assurant une excellente ambiance de travail. Merci à **Landry, Mohammed, Belkacem, Natacha, Rodrigue, Alpha, Régis, Gabin, Dorothée, Céline, Diane, Julien L., Nadège, Julie, Landry, Marie-Anne, Stéphanie, Julien B., Philippe, Véronique, Christelle et Christian**.

J'adresse ici une pensée toute particulière aux membres de l'équipe EA 3296 et à son directeur, monsieur **Gérard Ledoigt**. Qu'ils soient remerciés pour leur généreuse collaboration.

C'est avec un grand plaisir que j'adresse toute ma gratitude à **Bruno Cornier**, qui a toujours su, avec gentillesse, m'apporter à travers son expérience, sa précieuse collaboration dans le domaine de la botanique de terrain, mais aussi pour son soutien moral et son infini sens de l'écoute.

Que serais-je devenu sans l'énorme participation, la bonne humeur, et la très grande sagesse de **Jacqueline Joly** et **Wanda Pazdzior**, mes deux amies et collaboratrices durant cette période ; qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus profonds sentiments.

Ma reconnaissance s'adresse également à ma famille et à mes proches amis qui ont du supporter mes écarts de rythme de vie et d'humeur et qui m'ont toujours soutenu et encouragé, même dans les périodes les plus difficiles.

Enfin, je remercie les membres de mon jury ainsi que les rapporteurs qui ont accepté de me faire partager leurs conseils et leur réflexion sur ce travail.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
SOMMAIRE	III
INTRODUCTION GENERALE	1
1. Les enjeux environnementaux	2
2. L'utilisation des plantes pour la réhabilitation des sols	4
3. Présentation de l'étude	6
4. Références	7
CHAPITRE I	8
MOBILITE DES POLLUANTS METALLIQUES DANS LES SOLS	8
I.1 Constituants des sols impliqués dans la mobilité des éléments métalliques	9
I.1.1 Les minéraux primaires	9
I.1.2 Les minéraux secondaires	10
I.1.2.1 Les argiles	10
I.1.2.2 Les oxydes et hydroxydes	11
I.1.2.3 Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures	11
I.1.3 La matière organique	12
I.2 Phénomène de sorption des éléments métalliques dans les sols	13
I.2.1 La physisorption : une adsorption non spécifique	13
I.2.2 La chimisorption : une adsorption spécifique	14
I.3 Facteurs modifiant la mobilité des éléments métalliques	14
I.3.1 Le pH	14
I.3.2 Le potentiel redox	15
I.3.3 L'activité biologique	15
I.3.4 La température	17
I.4 Estimation de la mobilité des polluants métalliques	17
I.5 Références	18
CHAPITRE II	22
LES FLORES METALLICOLES : DIVERSITE BOTANIQUE ET PHENOMENE D'ADAPTATION AUX METAUX LOURDS	22
II.1 Historique	23
II.2 Etude géobotanique des flores métallicoles : éléments de phytosociologie	23
II.2.1 Nomenclature	24
II.2.2 Les différentes approches phytosociologiques	25
II.3 Les associations caractéristiques des sites européens à hautes teneurs en métaux lourds	26
II.3.1 Les sites naturels	26
II.3.2 Les sites industriels	28
II.4 Adaptation aux métaux lourds	30
II.5 Références	32
CHAPITRE III	36
TOLERANCE AUX METAUX LOURDS CHEZ LES VEGETAUX	36
III.1 Les métaux lourds dans la plante	37
III.1.1 Absorption racinaire	38
III.1.2 Translocation	38
III.1.3 Accumulation	39
III.2 Toxicité et tolérance	39
III.2.1 La membrane plasmique	40
III.2.2 Système anti-oxydant	41
III.2.2.1 Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS	41
III.2.2.2 Le système anti-oxydant contrôle la production de ROS	42
III.2.3 La chélation et la compartimentation cellulaires	44
III.2.3.1 La chélation	44
III.2.3.2 La compartimentation	46
III.2.4 Autres systèmes de défense au stress métallique	47
III.3 Références	48

CHAPITRE IV.....	52
ETUDE PEDOLOGIQUE ET ENVIRONNEMENTALE D'UN CRASSIER METALLURGIQUE.....	52
IV.1 Abstract.....	53
IV.2 Introduction.....	53
IV.3 Material and method.....	55
IV.3.1 Site description.....	55
IV.3.2 Soil sampling and analysis.....	55
IV.3.3 Vegetation study and plant analysis.....	57
IV.4 Results.....	57
IV.4.1 Pedological characteristics and mineral composition of the soil.....	57
IV.4.2 Heavy metal content and availability.....	60
IV.4.3 Plant communities and heavy metal phytoaccumulation.....	62
IV.5 Discussion.....	64
IV.6 References.....	66
CHAPITRE V.....	70
LA VEGETATION DE TROIS CRASSIERS : APPROCHE PHYTOSOCIOLOGIQUE ET OUTIL DE DIAGNOSTIC.....	70
V.1 Abstract.....	71
V.2 Introduction.....	71
V.3 Material and method.....	74
V.3.1 Sites description.....	74
V.3.2 Soil analyses.....	74
V.3.3 Plant analyses.....	75
V.3.4 Phytosociological study.....	75
V.4 Results.....	76
V.4.1 Heavy metal concentrations in metallurgical soils.....	76
V.4.2 Heavy metal accumulation by plants.....	77
V.4.3 Plant diversity and phytosociological groups growing on metallurgical soils.....	78
V.5 Discussion.....	86
V.6 References.....	89
CHAPITRE VI.....	93
TOLERANCE COMPARATIVE AUX METAUX ET STRATEGIE ADAPTATIVE CHEZ <i>PLANTAGO ARENARIA</i>	93
VI.1 Abstract.....	94
VI.2 Introduction.....	95
VI.3 Material and method.....	97
VI.3.1 Origin of plant material for seed collection.....	97
VI.3.2 Tolerance testing.....	98
VI.3.3 Growth response and metal accumulation pattern in soil culture.....	99
VI.3.4 Statistics.....	100
VI.4 Results.....	100
VI.4.1 Comparative analysis of metal tolerance in <i>P. arenaria</i> , <i>V. densiflorum</i> and <i>C. sumatrensis</i> originated from metallurgical landfill.....	100
VI.4.2 Comparative analysis of metal tolerance in two populations of <i>P. arenaria</i>	101
VI.4.3 Growth response and metal accumulation in <i>P. arenaria</i> in soil cultures.....	102
VI.5 Discussion.....	103
VI.5.1 <i>P. arenaria</i> is a pseudometallophyte species which can tolerate several heavy metals.....	103
VI.5.2 Metal tolerance in <i>P. arenaria</i> could be an adaptative trait for Cu and a constitutive trait for Cd and Ni.....	104
VI.5.3 <i>P. arenaria</i> mainly accumulates metals in roots and behaves like an indicator species.....	105
VI.5.4 Constitutive metal tolerance in <i>P. arenaria</i> might be an inherent attribute of pioneer xerophytic species.....	105
VI.6 References.....	107

CHAPITRE VII	111
<i>PLANTAGO ARENARIA</i> : TOLERANCE ET ACCUMULATION DU CADMIUM	111
VII.1 Abstract.....	112
VII.2 Introduction	113
VII.3 Material and method.....	114
VII.3.1 Biological features of <i>P. arenaria</i>	114
VII.3.2 Prospected site for seeds collection.....	115
VII.3.3 Estimation of Cd tolerance under acute exposure.....	115
VII.3.4 Estimation of Cd tolerance under chronic exposure	116
VII.3.5 Plant digestion and Cd quantification.....	116
VII.3.6 Statistical analysis	117
VII.4 Results	117
VII.4.1 Effects of cadmium in short-term hydroponics	117
VII.4.2 Effects of cadmium in long-term soil cultures.....	121
VII.5 Discussion.....	124
VII.6 References	126
 CHAPITRE VIII.....	 129
EFFET DU CADMIUM CHEZ <i>PLANTAGO ARENARIA</i> : TOLERANCE ET STRESS OXYDANT	129
VIII.1 Résumé.....	130
VIII.2 Introduction	130
VIII.3 Matériel et méthode.....	132
VIII.3.1 Culture hydroponique	132
VIII.3.2 Dosage du Cd accumulé par les plantes	133
VIII.3.3 Dosage des enzymes du système anti-oxydant.....	133
VIII.3.3.1 Préparation des extraits.....	133
VIII.3.3.2 Dosage de l'activité superoxyde-dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)	134
VIII.3.3.3 Dosage de la catalase (CAT) (EC 1.11.1.6).....	134
VIII.3.3.4 Dosage de l'ascorbate peroxydase (APX) (EC1.11.1.11)	135
VIII.3.3.5 Dosage de la glutathion réductase (GR) (EC 1.6.4.2).....	135
VIII.3.3.6 Dosage de la déhydro-ascorbate réductase (DHAR) (EC 1.8.5.1).....	135
VIII.3.3.7 Dosage de la monodéhydro-ascorbate réductase (MDAR) (EC 1.1.5.4).....	136
VIII.3.3.8 Expression des résultats	136
VIII.3.4 Dosage des molécules anti-oxydantes.....	136
VIII.3.4.1 Préparation des extraits.....	136
VIII.3.4.2 Dosage des formes réduites et oxydées de l'ascorbate	136
VIII.3.4.3 Dosage des formes réduites et oxydées du glutathion.....	137
VIII.3.5 Analyses statistiques des résultats.....	138
VIII.4 Résultats	138
VIII.4.1 Effet du cadmium sur la croissance.....	138
VIII.4.2 Le Cd provoque une stimulation du système anti-oxydant racinaire.....	139
VIII.4.3 Réponse du système anti-oxydant foliaire.....	143
VIII.4.4 Accumulation du cadmium	144
VIII.5 Discussion	145
VIII.6 Références	147
 CONCLUSION GENERALE	 151
 RESUME	 158
 ABSTRACT	 159

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LES ENJEUX ENVIRONNEMENTAUX

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, le secteur industriel s'est développé sans préoccupation des rejets d'éléments toxiques dans les sols. De fait, le sol a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir sans conséquence les rejets de nos activités. On sait maintenant que les sols sont caractérisés par un équilibre fragile et sont vulnérables. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel (Lecomte, 1998).

En 1998, le sens des termes pollution et contamination, souvent employés confusément l'un pour l'autre, est fixé par le rapport N°42 de l'Académie des Sciences (Bourrelie & Berthelin, 1998). Le terme de « contamination » qualifie un apport d'éléments, issus de l'extérieur du site ; la conséquence en est une élévation de leur teneur originelle, sans indication sur leurs conséquences sur le comportement des organismes vivants présents sur ou à proximité du site. Le terme de « pollution » par contre, doit être réservé à une contamination qui engendre une perturbation du milieu, ou de l'usage normal qui en est fait habituellement.

Depuis quelques années, les dangers potentiels des pollutions pour l'équilibre écologique et la santé publique sont considérés avec une inquiétude croissante par les pouvoirs publics. En France, la circulaire du 3 décembre 1993, relative à la politique de gestion des sites pollués, marque véritablement la prise de conscience nationale vis-à-vis des problèmes posés par les contaminations du sol. Avec l'adoption du Code de l'Environnement, le 14 septembre 2000, la problématique « sols pollués » devient une préoccupation essentielle.

La méthodologie retenue, dont le but ultime est d'aboutir à la gestion durable des sols, s'articule autour de trois actions séquentielles : « recenser », « sélectionner » et « traiter » les sites potentiellement pollués :

- **Recenser** : La première étape s'adresse de façon comparable aux anciens sites industriels, souvent abandonnés, et aux sites encore en activités. Les premiers recensements de sites pollués, initiés dans les années 70 par les Directions Régionales de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement (DRIRE), faisaient état de 62 sites contaminés ; le bilan sanitaire des sols, à la fois en milieux urbains et périurbains et en zones rurales, est beaucoup plus alarmant de nos jours. Depuis 1994, les inventaires nationaux BASOL et

BASIAS, élaborés sur l'initiative du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Ecologie, rassemblent l'ensemble des données sur les sites pollués répartis sur le territoire. Ces inventaires font actuellement état de plusieurs dizaines de milliers de sites potentiellement pollués pour lesquels une action des pouvoirs publics est nécessaire.

- **Sélectionner** : À l'issue du recensement, il convient de sélectionner les sites à traiter en priorité. Cette sélection se fait sur des critères d'étude de risques où interviennent les notions de cible, de transfert et de source de pollution. Parmi les polluants rencontrés, on retrouve principalement les hydrocarbures, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les éléments traces métalliques (ETM). Les ETM les plus répandus, en terme d'occurrence sur les terrains contaminés sont le plomb (Pb), le chrome (Cr), le cuivre (Cu) et, dans une moindre mesure, l'arsenic (As), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd). Parmi les ETM, les métaux lourds (Pb, As, Hg et Cd) sont considérés avec un très vif intérêt. En concentration oligo-élémentaire, la plupart des métaux sont indispensables au métabolisme cellulaire. Mais leur forte toxicité en fait de véritables poisons pour toutes les espèces animales ainsi que pour la plupart des végétaux si la dose absorbée devient trop importante.
- **Traiter** : Les sites présentant des risques importants doivent être dépollués. De nombreuses techniques physico-chimiques permettent actuellement de traiter les pollutions des sols, et notamment les polluants organiques. Pour les polluants inorganiques tels que les métaux lourds, ces techniques n'offrent cependant pas d'autre solution que l'enlèvement des terres ou l'inertage. Le développement de techniques complémentaires s'avère donc nécessaire.

Parmi les principaux polluants générés par les activités industrielles, les métaux lourds (Cu, le Pb, le Cr, ...) posent effectivement des problèmes particulièrement préoccupants. Ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies (atteintes du système nerveux central, du foie, des reins, mais aussi cancers et malformations embryonnaires ; Abrahams, 2002 ; Adriano, 2001). Ainsi, pour reprendre les termes d'un récent rapport de l'Office Parlementaire des Choix Scientifiques et Technologiques, « si les métaux lourds ont fait la civilisation, ils peuvent aussi la défaire ». Il est donc aujourd'hui indispensable non seulement de mieux connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais aussi de mettre en œuvre des solutions durables, visant à limiter leurs risques. Malgré leur forte toxicité potentielle, la plupart des sites contaminés par des métaux lourds,

présentent souvent une flore diversifiée tolérant apparemment bien de fortes teneurs en métaux. L'étude de ces plantes résistantes, par leurs capacités de détoxification, d'immobilisation ou d'absorption des métaux lourds, pourrait donc constituer un outil intéressant, non seulement pour estimer les risques de transfert potentiel des métaux lourds au sein de l'écosystème (Martin *et al.*, 1996), mais aussi comme outil de réhabilitation des sols.

2. L'UTILISATION DES PLANTES POUR LA REHABILITATION DES SOLS

Afin de pallier les principales limitations des méthodes actuellement disponibles dans les stratégies de dépollution, les recherches s'orientent depuis quelques années vers l'utilisation de plantes supérieures. On sait en effet depuis longtemps que la présence d'un couvert végétal induit ou stimule la biodégradation d'une grande variété de contaminants organiques (Reilley *et al.*, 1996). Par ailleurs, certaines plantes, dites métallobytes, sont capables de se développer normalement sur des sites fortement contaminés par divers métaux et certains de ces végétaux, qualifiés d'hyperaccumulateurs (Brooks, 1998), sont capables de stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes. Ainsi, les études concernant l'écophysiologie et le métabolisme des plantes supérieures en milieu contaminé, ont progressivement permis d'insérer le concept de phytoremédiation à côté de celui de bio-remédiation des sites pollués.

Aujourd'hui, le terme de phytoremédiation est largement accepté et regroupe toutes les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un but de dépollution. Malgré leur développement récent, ces méthodes sont variées et des résultats encourageants ont d'ores et déjà été obtenus pour des problématiques diverses. Plus précisément, les quelques études réalisées à ce jour permettent d'envisager cinq types de stratégies de phytoremédiation particulièrement prometteuses :

- **la phytoextraction** est basée sur l'utilisation de végétaux hyperaccumulateurs, qui absorbent les métaux du sol et les accumulent dans des organes aériens faciles à récolter (McGrath, 1998). Cette méthode, qui se révèle efficace pour une grande variété de métaux lourds (Pb, Cd, Ni, Zn, ...), est aujourd'hui proposée par de nombreuses sociétés américaines.
- **la phytostimulation** exploite l'effet stimulant de la rhizosphère sur la dégradation microbiologique des composés organiques. Cette démarche est notamment utilisée

depuis plusieurs années par l'armée américaine (<http://www.wes.army.mil:el:phyto>) dans le cadre de la dépollution de sites contaminés par des explosifs (TNT) ou par des herbicides.

- **la phytovolatilisation** permet la transformation en produits volatiles puis le relargage dans l'atmosphère d'éléments tels que le mercure ou le sélénium. Cette approche, encore au stade expérimental, fait actuellement l'objet de recherches très actives ; les résultats récents (Bizily *et al.*, 1999) dans ce domaine sont particulièrement encourageants.
- **la rhizofiltration** utilise les capacités élevées du système racinaire de certains végétaux pour fixer les polluants d'un milieu liquide. Cette méthode a notamment été testée en Ukraine dans le cadre de la dépollution du site de Tchernobyl (US EPA, <http://clu-in.org>).
- **la phytostabilisation** n'est pas une méthode de dépollution *sensu stricto*, mais elle permet de diminuer la mobilité des contaminants en limitant l'érosion et le lessivage du sol. Cette approche vise ainsi à limiter les risques de transfert de la pollution en dehors du sol contaminé et permet en même temps une meilleure intégration paysagère pour des sites présentant d'importants volumes impossibles à stocker en décharge de classe I.

Ces quelques exemples, loin d'être exhaustifs, montrent que le recours aux végétaux supérieurs dans les stratégies de dépollution est considéré avec un intérêt croissant. Cette tendance est particulièrement marquée sur le continent Nord-Américain où une vingtaine de brevets a été déposée au cours de ces 7 dernières années. Certains d'entre eux protègent une méthodologie spécifique et bénéficient d'une couverture internationale (Raskin *et al.*, 1994 ; Chaney *et al.*, 1998), alors que les autres ont trait à des mises au point techniques ou à l'utilisation d'espèces végétales. Cependant, à l'heure actuelle, le principal obstacle au développement de la phytoremédiation réside dans le faible nombre d'espèces potentiellement utilisables à l'échelle industrielle. En effet la plupart des métallophytes connues sont caractérisées par un enracinement peu profond, une croissance assez lente et une faible production de biomasse, autant de critères qui limitent considérablement les taux prévisibles d'extraction. Par ailleurs, un rendement optimal nécessite que les conditions de culture (climatiques et édaphiques) sur les sites pollués correspondent aux exigences naturelles des végétaux utilisés ; ce paramètre est par essence très difficile à contrôler et représente une limitation supplémentaire de la méthode. Par conséquent, il est nécessaire de

poursuivre les recherches afin de sélectionner de nouvelles plantes tolérantes et/ou accumulatrices et de mieux comprendre leur comportement sur site pollué.

3. PRESENTATION DE L'ETUDE

Dans ce travail, nous proposons une approche multidisciplinaire réalisée directement sur la végétation spontanée de crassiers métallurgiques hautement contaminés par différents métaux lourds. Cette étude devrait contribuer à mieux comprendre :

- **les phénomènes de tolérance et d'accumulation**, que l'on observe chez certaines espèces dominantes parmi la végétation spontanée de ces terrains contaminés et qui pourraient se révéler de bons modèles pour étudier la tolérance et l'accumulation des métaux lourds.
- **la recolonisation végétale**, afin de pouvoir envisager la sélection de plantes permettant de favoriser l'établissement d'un couvert végétal, dans une optique de phytostabilisation.

Dans un premier temps, un état des connaissances générales sur l'ensemble des aspects de la problématique est présenté. La mobilité des éléments métalliques dans les sols, puis les notions de flore métallicole et d'adaptation, les transferts des métaux lourds dans les plantes et la tolérance aux métaux lourds, sont les critères fondamentaux qui sont abordés.

Dans un deuxième temps, les résultats de l'étude de la végétation spontanée de plusieurs crassiers métallurgiques de la Loire sont présentés en détail, au travers de cinq articles. Les thèmes abordés successivement répondent aux objectifs suivants :

- Etudier la disponibilité des métaux lourds des crassiers métallurgiques sélectionnés
- Déterminer les caractéristiques écologiques et physiologiques de la végétation
- Estimer la tolérance de quelques plantes sélectionnées
- Analyser les stratégies adaptatives de la tolérance métallique chez une espèce pseudo-métallophyte
- Aborder les phénomènes de tolérance et notamment la réponse au stress oxydatif induit par le cadmium chez une espèce tolérante.

4. RÉFÉRENCES

- Abrahams, P.W., 2002. Soils: their implications to human health. *The Science of the Total Environment* 291, 1-32.
- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Bizily, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O., Meagher, R.B., 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6808-6813.
- Bourelhier, P.H., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les elements en trace : les risques et leur gestion. Tec & Doc Lavoisier (Ed.). Paris.
- Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.
- Chaney, R.L., Angle, R.S., Baker, A.J.M., Li, Y.M., 1998. United States Patent 5711784.
- Lecomte, P., 1998. Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Martin, H.W., Young, T.R., Kaplan, D.I., Simon, L., Adriano, D.C., 1996. Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium. *Plant and Soil* 182, 199-207.
- McGrath, S.P., 1998. Phytoextraction for Soil Remediation. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 261-287.
- Raskin, I., Kumar, P.B., Dushenkov, V., 1994. United States Patent 5364451.
- Reilley, K.A., M.K. Banks, and A.P. Schwab. 1996. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, 25, 212-219.

CHAPITRE I

MOBILITÉ DES POLLUANTS MÉTALLIQUES DANS LES SOLS

De nombreuses recherches, dans le domaine de l'écotoxicité des métaux lourds, s'accordent sur le fait que le risque résulte non pas des concentrations totales relevées dans les sols pollués, mais de leur fraction biodisponible (ADEME, 2001 ; Scheifler *et al.*, 2003 ; Adriano, 2001 ; Janssen *et al.*, 2003 ; Mc Laughlin *et al.*, 2000 ; Van Straalen, 2002 ; Hamel *et al.*, 1999). La mobilité des espèces chimiques métalliques peut être définie par leur aptitude à être transférées vers des compartiments du sol où elles sont moins énergiquement retenues, le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol. C'est cette dernière qui constitue le réservoir principal d'alimentation pour les plantes (Kabata-Pendias and Pendias, 2001 ; McLaughlin *et al.*, 2000). Les processus de transferts entre la phase solide et la phase liquide sont multiples ; ils dépendent fortement de la nature de la liaison entre les métaux et la phase solide, appelée également phase porteuse ou phase de rétention, ainsi que des conditions physico-chimiques régnant dans le sol. Il convient alors de traiter séparément ces aspects pour expliquer la mobilité des métaux lourds.

I.1 CONSTITUANTS DES SOLS IMPLIQUES DANS LA MOBILITE DES ELEMENTS METALLIQUES

Les minéraux des sols sont hérités de la roche mère sous-jacente. On distingue les minéraux primaires, hérités sans modification de la roche mère, et les minéraux secondaires, issus de la pédogénèse par des phénomènes d'altération physico-chimiques, mais aussi biologiques. Aux constituants vient s'ajouter une fraction organique héritée de l'activité des organismes vivants. L'ensemble de ces éléments forme la phase de rétention des métaux, en équilibre dynamique avec l'eau du sol.

I.1.1 Les minéraux primaires

Les minéraux primaires des sols sont hérités de la roche mère, d'une part grâce aux processus de désagrégation mécanique, souvent d'origine climatique comme par exemple la succession gel/dégel, d'autre part en raison de leur résistance aux processus d'altération chimique en vigueur dans les conditions environnantes. La structure de la plupart de ces minéraux et leur taille importante ne leur confèrent que de très faibles propriétés réactives vis-à-vis des métaux lourds (Kabata-Pendias and Pendias, 2001 ; Lespagnol, 2003). Lorsque les processus d'altération se poursuivent, ils peuvent être la source des minéraux secondaires (Duchaufour, 1995).

I.1.2 Les minéraux secondaires

Les minéraux créés durant la pédogénèse sont essentiellement des argiles, des (hydr)oxydes de fer (Fe), d'aluminium (Al) et de manganèse (Mn), des carbonates, des sulfates et des phosphates. Issus directement ou indirectement des minéraux primaires de la roche mère, ils sont de très petite taille et considérés comme les principaux constituants minéralogiques des sols ayant un rôle dans la rétention des éléments métalliques.

I.1.2.1 Les argiles

Les argiles présentent surtout deux caractéristiques essentielles qui en font des minéraux diversement réactifs :

D'une part, les argiles ont une structure formée d'une superposition de feuillets (phyllosilicate) qui leur confère une surface spécifique interne très variée (de 0 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour la kaolinite à 750 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour des vermiculites ou des smectites). Cette surface interne vient s'ajouter à une surface externe importante liée à leur très petite taille et à leur morphologie (de moins de 1 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour les vermiculites à 50 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour les smectites).

D'autre part, les argiles se caractérisent par une surface électrique non neutre, qui détermine leurs capacités d'échanges ioniques. Ces minéraux portent en fait deux types de charge. La première, de signe négatif, est structurelle et non modifiable. Elle est liée aux substitutions Al^{3+} - Si^{4+} ou Mg^{2+} , Fe^{2+} - Al^{3+} dans les feuillets de l'argile. La seconde, liée aux réactions chimiques qui se produisent à la surface des minéraux, est une charge de surface variable en fonction du pH du milieu. Pour un pH bas, les ions H^+ majoritaires se lient à l'argile plus que les OH^- . Il en résulte une charge globalement positive et l'argile se caractérise par une capacité d'échange anionique. Pour un pH élevé, les ions OH^- dominants conduisent au phénomène inverse, et l'argile développe une capacité d'échange cationique (CEC). A l'équilibre, point isoélectrique, la capacité d'échange de l'argile devient nulle. La capacité d'échange cationique (CEC) mesure la capacité d'une argile à échanger des cations. Elle varie de 10 meq/100g à 200 meq/100g respectivement pour les chlorites et les vermiculites (Peaver et Eslinger, 1988 ; Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Dans la grande majorité des cas, la charge globalement négative associée à une surface de contact importante confèrent aux argiles une forte réactivité vis-à-vis des métaux.

1.1.2.2 Les oxydes et hydroxydes

Les (hydr)oxydes de fer et d'aluminium, sous forme amorphe ou cristalline, sont des constituants communs dans les sols naturels. Les (hydr)oxydes de fer sont les plus abondants (Fe_2O_3 : hématite et maghémite ; FeOOH : goethite et lepidocrocite et $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: ferrihydrite). Les (hydr)oxydes d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$: gibbsite ; AlOOH : boehmite) sont relativement moins fréquents. Enfin, les (hydr)oxydes de manganèse, relativement mal définis car de structure minérale complexe, sont généralement minoritaires dans les sols naturels.

Comme les argiles, la réactivité des (hydr)oxydes de fer et d'aluminium provient de leur importante surface spécifique et de la charge de surface, variable avec le pH du milieu (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). En effet, suivant les conditions physico-chimiques, ils présentent des charges de surface variables permettant d'adsorber les anions et les cations par des liaisons de haut niveau d'énergie. Le point isoélectrique des (hydr)oxydes de fer et d'aluminium se situe entre pH 7 et pH 9 selon les espèces. Les (hydr)oxydes de manganèse possèdent des propriétés différentes des oxydes de fer et d'aluminium (Sigg *et al.*, 2000). Contrairement aux autres (hydr)oxydes, leur point isoélectrique se situe entre pH 5 et pH 7, ce qui fait d'eux des fixateurs des métaux dans les sols naturels. Ils jouent en conséquence un rôle prépondérant dans la sorption des ions métalliques (Blanchard, 2000).

En outre, les (hydr)oxydes peuvent précipiter en piégeant les métaux à l'intérieur des mailles cristallines, permettant ainsi la fixation de métaux en quantité supérieure à leur CEC. Cette cristallisation peut avoir lieu sous l'influence de microorganismes de genres différents tels que *Thiobacillum* ou encore *Metallogenium* (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

1.1.2.3 Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures

La forme prédominante des carbonates ($\text{R}^{2+}\text{CO}_3^{2-}$; R= Ca, Mg, Fe mais aussi beaucoup de métaux divalents présents dans les sols pollués tels que Pb, Zn, Cu, etc.) dans la plupart des sols est la calcite (CaCO_3). Assez soluble, cette espèce a une influence majeure sur le pH des sols, et par conséquent sur les phénomènes de sorption des métaux. En outre, les réactions de dissolution/précipitation des carbonates favorisent le piégeage des ions métalliques au sein des cristaux formés (Blanchard, 2000).

Les phosphates (groupement PO_4^{3-}) sont des minéraux peu abondants dans les sols, mais susceptibles, comme les carbonates, de substitution du calcium par des éléments métalliques

divalents (*e.g.* Pb, Zn, Cu), en particulier dans des sols à tendance basique (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Les sulfates (généralement de la forme $R^{2+}SO_4^{-2}$) et les arseniates (minéraux d'arsenic As^{+5} comprenant le groupement AsO_4^{-3}), les sulfures (souvent $R^{+2}S^{-2}$), les arseniures (minéraux d' As^{+3}) et les chlorures (principalement $R^{+2}Cl_2$) sont des espèces présentes en quantité généralement négligeable dans la plupart des sols, mais qui peuvent être abondantes en contexte industriel ou minier. Les couples sulfate-sulfure et arseniate-arseniure sont très sensibles aux conditions d'oxydo-réduction du milieu, et les microorganismes peuvent jouer un rôle essentiel à cet égard. En condition anoxique, la réduction du sulfate en sulfure est fréquente, et inversement, l'oxydation de certains sulfures est rapide lorsque la saturation en oxygène est atteinte. Les solubilités des formes réduites et oxydées d'un élément chimique donné lorsqu'elles existent peuvent être très différentes, rendant les cations métalliques plus ou moins disponibles. Or ceux-ci sont facilement assimilables par les plantes, et ils représentent une voie privilégiée de contamination de la chaîne alimentaire.

La spéciation des éléments chimiques dans les phases solide et liquide du sol est donc un critère déterminant de leur disponibilité pour les plantes.

I.1.3 La matière organique

La matière organique désigne différents types de composés carbonés et azotés. Elle est principalement issue de l'activité biologique des végétaux et des animaux et de leurs produits de décomposition, mais peut également avoir une origine anthropique : composts, boues, pesticides, hydrocarbures. Elle se compose de deux fractions :

- **La fraction vivante** (micro-organismes, faune épilithique, rhizosphère des végétaux supérieurs, animaux fouisseurs). Son influence sur la fixation des éléments trace est importante, et elle participe largement aux modifications de certains facteurs pédologiques comme le potentiel redox ou le pH (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).
- **La fraction morte** (débris végétaux et animaux plus ou moins décomposés en humus, carbone rapporté) est représentée par diverses molécules plus complexes et moins bien définies, de masses moléculaires très différentes. Ainsi, on retrouve les cires, les lipides, les protéines, les peptides, les acides organiques, les acides aminés ou encore les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)... (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Ces composés s'associent entre eux pour former les substances humiques (humine, acides humiques, acides fulviques) piégeant différents éléments.

La matière organique est donc un facteur clef des échanges ioniques et des cycles géochimiques des éléments métalliques. Les réactions mises en œuvre sont diverses et font appel à différents aspects physicochimiques que nous allons développer maintenant.

I.2 PHENOMENE DE SORPTION DES ELEMENTS METALLIQUES DANS LES SOLS

L'ensemble des constituants du sol forme le « complexe absorbant » (Blanchard, 2000). Ce complexe est capable de réaliser des échanges entre la phase liquide et la matrice solide du sol, qui dépendent des mécanismes de sorption. Deux types principaux d'interaction matrice solide-phase liquide sont impliqués dans la rétention des métaux lourds : la physisorption et la chimisorption.

I.2.1 La physisorption : une adsorption non spécifique

L'adsorption non spécifique résulte des forces électrostatiques entre atomes portant des charges de signe différent. L'énergie de liaison est alors relativement faible. Par conséquent, les éléments métalliques adsorbés sont facilement mobilisables en cas de changements physicochimiques du milieu.

La matrice du sol, globalement chargée négativement, attire les cations en solution. Ce sont les minéraux argileux et la matière organique, souvent réunis pour former le complexe argilo-humique, qui participent le plus à la charge négative du sol (Chaignon, 2001). La présence des charges de surface peut provenir soit de substitutions isomorphiques dans le réseau cristallin (remplacement d'un cation trivalent par un divalent), soit de réactions chimiques de surface dues aux variations de pH (Delmas-Gadras, 2000).

Pour l'adsorption non spécifique, les atomes de métal ne sont pas directement en contact avec la surface des particules du sol, mais ils sont présents au sein d'une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol, appelées couche d'hydratation. On nomme ce type d'interaction « complexe de sphère externe ».

I.2.2 La chimisorption : une adsorption spécifique

Contrairement à l'adsorption non spécifique, l'adsorption spécifique fait intervenir une liaison chimique forte, sans molécule d'eau interposée entre le groupe fonctionnel et la surface de l'ion adsorbé. Les éléments métalliques ainsi chimisorbés seront ainsi beaucoup moins susceptibles d'être mobilisés. On parle dans ce cas de « complexe de sphère interne ». Trois types de liaison chimique sont à l'origine de la spécificité de la chimisorption entre l'ion et la matrice : les liaisons ionique, covalente et de coordination (Blanchard, 2000). Elles peuvent se produire entre un ion métallique et un ligand organique ou inorganique. On appelle ligand un groupe fonctionnel, un atome ou un ion lié à un groupe central d'atomes ou d'ions. On parle alors de complexation ou de chélation. Les complexes formés peuvent parfois précipiter (Blanchard, 2000). En outre, après avoir été adsorbés en surface, les éléments peuvent diffuser à l'intérieur des particules minérales ; c'est le phénomène d'absorption. Tous ces processus de sorption sont réversibles. La réversibilité est due aux conditions physicochimiques du sol, pH, potentiel redox... que nous allons maintenant aborder.

I.3 FACTEURS MODIFIANT LA MOBILITE DES ELEMENTS METALLIQUES

I.3.1 Le pH

Le pH constitue un facteur dont le rôle est crucial pour la mobilité des ions métalliques, car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution (McLaughlin, *et al.*, 2000). Les protons proviennent majoritairement de la respiration végétale et microbienne, ainsi que de l'oxydation des sulfures. A l'inverse, ils sont consommés par l'hydrolyse des minéraux altérables. D'une façon générale, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles (Blanchard, 2000).

De plus, l'augmentation de pH induit souvent la formation d'espèces précipitées qui peuvent limiter la solubilité et la biodisponibilité de toutes les espèces ioniques (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cependant, elle entraîne également la dissolution de matières organiques et la formation consécutive de complexes organo-métalliques plus solubles (Chaignon, 2001). Les variations de pH ont donc des conséquences complexes et parfois contraires sur la mobilité des métaux lourds, en particulier en présence de ligands organiques et inorganiques.

I.3.2 Le potentiel redox

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les formes oxydées prédominent pour un potentiel redox élevé, alors que les faibles valeurs favorisent l'apparition d'espèces réduites. Les valeurs les plus courantes du potentiel redox dans les sols naturels sont comprises entre -200 et 400 mV, domaine de potentiel qui recouvre des degrés d'oxydation variés de nombreuses espèces en solution, influant ainsi directement ou indirectement sur la mobilité des métaux qui constituent ces espèces minérales. Le Cr^{3+} peut ainsi subir une oxydation directe en Cr^{6+} , plus mobile et plus toxique.

De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. En conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfures qui piègent volontiers les éléments chalcophiles tels que Fe, Zn, Pb, Cd (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). D'autre part, la dissolution des (hydro)oxydes est favorisée entraînant de manière opposée la solubilisation des métaux associés (Chaignon, 2001).

Bien que l'influence des conditions oxydoréductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol donné l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin *et al.*, 2003), en conséquence de quoi l'influence des conditions oxydoréductrices apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. De plus, il est relativement difficile d'interpréter les valeurs obtenues. En raison du nombre important des couples redox et de la cinétique des réactions (Lespagnol, 2003), l'influence du potentiel redox est souvent difficile à comprendre.

I.3.3 L'activité biologique

La compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des métaux lourds dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et interactions à tous les niveaux. Les végétaux supérieurs étant au centre de notre étude, et les microorganismes ayant une influence sur l'ensemble du milieu aux échelles de temps et d'espace considérées, nous nous attacherons à développer principalement l'action des microorganismes et des plantes.

Parmi les microorganismes on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques dont les activités métaboliques influencent la mobilité des métaux lourds. Cependant,

beaucoup de ces phénomènes sont également communs aux plantes. Les principaux phénomènes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation :

- **La solubilisation** provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique. Certaines bactéries chimiolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent les formes réduites du fer et du soufre contenues dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique, susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les métaux lourds contenus. Les champignons et les racines des plantes excrètent eux aussi des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques (Foy *et al.*, 1978 ; Chaignon, 2001 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cette acidification favorise aussi la mobilité des autres éléments qui ne sont pas indispensables pour le métabolisme végétal. D'autre part plusieurs autres molécules organiques, capables de complexer spécifiquement certains éléments en solution, peuvent être également libérées en cas de carence nutritive. Parmi ces agents complexants, les sidérophores, composés organiques de faible masse moléculaire, produits par les bactéries et les champignons mais aussi par les plantes. Ces molécules favorisent les déplacements d'éléments métalliques et un transfert diffusif jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent (Chaignon, 2001).
- **L'insolubilisation** constitue le phénomène opposé. Bien que le phénomène de détoxification externe des métaux lourds par des exudats racinaires n'ait jamais été démontré (Baker & Walker, 1990), certains acides organiques de faible masse moléculaire, comme les acides oxalique, citrique ou fumarique qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur. Ils limiteraient ainsi les transferts par des processus de complexation.
- **La volatilisation** repose sur l'action directe de certains microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure, de l'arsenic et du sélénium (Se). La biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes, Pb, Sn (étain), As, Sb (antimoine) et Se, permettant leur volatilisation dans l'atmosphère.

I.3.4 La température

La température du sol dépend en premier lieu de la météorologie, et donc du climat, mais elle est également liée à l'activité biologique et influence rétroactivement la formation de complexes avec des ligands inorganiques, en modifiant l'activité de l'élément en solution (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). La température a un impact direct sur la mobilité des éléments métalliques en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution - précipitation et co-précipitation, et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol, le pH ou l'Eh.

I.4 ESTIMATION DE LA MOBILITE DES POLLUANTS METALLIQUES

La quantification de la mobilité des polluants métalliques a nécessité la mise en place de modèles mathématiques simplifiés des interactions entre les métaux et les constituants du sol. Toutefois, ces modèles d'isothermes (Langmuir, Freundlich, linéaire...) et/ou cinétiques de sorption/désorption s'avèrent être basés sur des hypothèses trop simplifiées ou parfois irréelles, et ne permettent pas de rendre compte de tous les phénomènes recensés. Afin de compléter cette approche, il est possible de recourir à des tests d'extractions chimiques permettant d'estimer la mobilité des polluants métalliques. Ils reposent sur l'utilisation d'agents chimiques pour isoler et extraire les métaux associés à certaines phases identifiées du sol (Beckett, 1989). Cette extraction est ensuite suivie de la mesure dans la solution de la concentration des métaux extraits. Ces tests sont particulièrement utilisés dans des approches d'analyse de risque ou de transfert vers la chaîne alimentaire (Quevauviller, 1996 ; Quevauviller *et al.*, 1996 ; Leleyter et Baraud, 2005 ; Gupta *et al.*, 1996). Il existe principalement deux types d'extraction :

- **L'extraction spécifique**, ciblant spécifiquement une fraction du sol (Ure, 1996), repose sur l'utilisation d'un seul extractant, qui peut être de l'eau, un solvant organique (éthanol), un sel neutre (KCl, MgCl₂, Ca(NO₃)₂, KNO₃...), un acide faible (acétate, oxalate), un agent complexant (EDTA, DTPA) ou encore un acide fort peu concentré (HCl, HNO₃) (Beckett, 1989 ; McLaughlin *et al.*, 2000).
- **L'extraction séquentielle** fait appel à plusieurs agents chimiques (généralement de trois à huit), utilisés en chaînant les extractions sur un même échantillon (de façon séquentielle) pour déterminer le fractionnement, encore appelé spéciation, des éléments métalliques au sein des principaux constituants des sols. Depuis les travaux de Tessier portant sur les

sédiments de rivières (Tessier *et al.*, 1979), on sépare généralement les éléments en cinq fractions : échangeables, liés aux carbonates, liés aux (hydr)oxydes, liés à la matière organique et les résiduels, piégés dans les silicates. Mais le schéma d'extraction séquentielle de Tessier s'avère souvent inapproprié et nombre d'auteurs ont repris ce protocole en modifiant parfois la liste des agents chimiques utilisés (Ure *et al.*, 1993 ; Tack and Verloo, 1996 ; Li and Thornton, 2001).

Tout comme les modèles mathématiques, l'utilisation d'extractants chimiques peut être remise en cause. Outre leur manque de spécificité, ils sont susceptibles de provoquer une redistribution des éléments chimiques entre les différentes phases porteuses dans le sol, et ils n'évitent donc pas totalement la re-fixation d'une partie des éléments mis en solution (Beckett, 1989 ; Ure, 1996, Clubs Crin, 1999). En ce qui concerne l'évaluation de la phytodisponibilité, les corrélations effectuées entre concentrations mesurées dans les extraits et celles relevées dans les plantes sont souvent mauvaises et dépendent fortement de l'espèce végétale analysée et du métal considéré (Aten and Gupta, 1996 ; Ure, 1996 ; Maiz *et al.*, 2000). L'évaluation de la phytodisponibilité à travers la seule extraction chimique apparaît donc très risquée et il serait préférable de mesurer directement les concentrations obtenues dans les plantes chaque fois qu'il est possible de le faire. Cependant cette approche s'avère elle-même complexe, car chaque espèce présente un comportement d'accumulation spécifique : non-accumulation des métaux toxiques, accumulation à des degrés divers, accumulation dans des organes différents.

Il convient donc de présenter la végétation des sites pollués, ainsi que les phénomènes d'adaptation mis en jeu.

I.5 REFERENCES

ADEME, 2001. Les pratiques de gestion des sites pollués en France. Ademe, Angers.

Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.

Aten, C.F., Gupta, S.K., 1996. On heavy metals in soil; rationalization of extractions by dilute salt solutions, comparison of the extracted concentrations with uptake by ryegrass and lettuce, and the possible influence of pyrophosphate on plant uptake. *The Science of the Total Environment* 178, 45-53.

- Baker, A.J.M., Walker, P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 155-178.
- Beckett, P.H.T., 1989. The use of extractants in studies on trace metals in soils, sewage sludges, and sludge-treated soils. In: Stewart, B.A. (Ed.). Advances in soil science, Vol. 9. Springer-Verlag, New York, pp. 143-176.
- Blanchard, C., 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
- Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Clubs Crin, 1999. Spéciation des métaux dans le sol. Ecrin (Ed).
- Delmas-Gadras, C., 2000. Influence des conditions physico-chimiques sur la mobilité du plomb et du zinc dans un sol et un sédiment en domaine routier. Thèse : Université de Pau et des pays de l'Adour, U.F.R. Sciences.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. TEC & DOC, Paris.
- Duchaufour, PH., 1995. Pédologie : sol, végétation, environnement. Masson, Paris, Milan, Barcelone.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The Physiology of metal toxicity in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 29, 511-566.
- Gupta, S.K., Vollmer, M.K., Krebs, R., 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. The Science of the Total Environment 178, 11-20.
- Hamel, S.C., Ellickson, K.M., Lioy, P.J., 1999. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass-balance and soil recapture. The Science of the Total Environment 243/244, 273-283.

- Janssen, C.R., Hejjerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C., Allen, H.E., 2003. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environment International* 28, 793-800.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Leleyter, L., Baraud, F., 2005. Evaluation de la mobilité des métaux dans les sédiments fluviaux du bassin de la Vire (Normandie, France) par extractions simples ou séquentielles. *C.R. Geoscience* 337, 571-579.
- Lespagnol, G., 2003. Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arsenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois. Thèse : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Université Jean Monnet.
- Li, X., Thornton, I., 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Applied Geochemistry* 16, 1693-1706.
- Maiz, I., Arambarri, I., Garcia, R., Millan, E., 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental Pollution* 110, 3-9.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31 (11-14), 1661-1700.
- Peaver, D., Eslinger, E., 1988. Clay minerals for the petroleum geologists and engineers. SEPM Short Course Notes No. 22, Pp. 343, Tulsa, OK 74159. *Economic Geology* 84(2), 464-465.
- Quevauviller, PH., 1996. Preface. *The Science of the Total Environment* 178, 1.
- Quevauviller, PH., Van Der Sloot, H.A., Ure, A., Muntau, H., Gomez, A., Rauret, G., 1996. Conclusions of the workshop: harmonization of leaching/extraction tests for environmental risk assessment. *The Science of the Total Environment* 178, 133-139.
- Scheifler, R., Schwartz, C., Echevarria, G., De Vaufleury, A., Badot, P-M., Morel, J-L., 2003. "Nonavailable" soil cadmium is bioavailable to snails: Evidence from isotopic dilution experiments. *Environmental Science & Technology* 37, 81-86.

- Sigg L., Behra, P., Stumm, W., 2000. Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. 3^{ème} édition, Dunod, Paris.
- Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 1996. Estimated solid phase distribution of metals released in the acid extractable and reducible steps of a sequential extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 64 171-177.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51 (7), 844-851.
- Ure, A.M., 1996. Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *The Science of the Total Environment* 178, 3-10.
- Ure, A.M., Quevauviller, PH., Muntau, H., Griepink, B., 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 135-151.
- Van Straalen, N.M., 2002. Assessment of soil contamination - a functional perspective. *Biodegradation* 13, 41-52.

CHAPITRE II

LES FLORES MÉTALLICOLES : DIVERSITÉ BOTANIQUE ET PHÉNOMÈNE D'ADAPTATION AUX MÉTAUX LOURDS

II.1 HISTORIQUE

Le phénomène de tolérance vis-à-vis des métaux lourds chez les plantes a focalisé l'intérêt des scientifiques, écologistes, physiologistes et biologistes mais aussi des ingénieurs et des chimistes depuis très longtemps. Dès le XVI^{ème} siècle, le célèbre savant Georgius Agricola rapporte que des végétaux semblent souffrir lorsqu'ils se développent sur des sols riches en minerais (Agricola, 1556). De même lorsque son but est de repérer les veines métallifères intéressantes, il précise qu'une végétation particulière, absente aux alentours, se développe au-dessus de ces ressources. Bien que le concept de tolérance n'apparaisse pas encore, il remarque ainsi l'effet nocif des métaux sur une végétation dite sensible, et la relative tolérance d'une végétation plus adaptée. Dans les années 1950, la prospection de minerais de cuivre en Afrique s'est largement appuyée sur la découverte d'une petite Poacée, *Haumaniastrum katangense* et de deux Lamiacées, *Aeollanthus biformifolius* et *Becium homblei*, toutes trois confinées à des sols riches en cuivre (Brooks, 1998). Avec l'épuisement progressif des minerais de surface, l'intérêt pour des stratégies de repérage des gisements potentiels par la végétation spécifique a fortement diminué, mais pas l'intérêt pour les surfaces contaminées. L'étude des communautés végétales, encore appelée phytosociologie, a permis de poursuivre et d'élargir l'analyse de la végétation des terrains riches en métaux toxiques, d'origine naturelle ou anthropique. Dans le cas des sites à serpentine, par exemple, le sol issu de l'altération de minéraux naturellement riche en métaux de transition, Cr, Ni, Cu et Co porte une flore spécifique adaptée aux fortes teneurs métalliques (Delaigue, 1989). Avec l'avènement de l'ère industrielle et son lot de pollutions métalliques, les observations commencent à s'étendre aux sites anthropisés riches en métaux lourds. Cependant, de nombreuses lacunes persistent encore. Ce chapitre présente les données phytosociologiques disponibles à l'heure actuelle.

II.2 ETUDE GEOBOTANIQUE DES FLORES METALLICOLES : ELEMENTS DE PHYTOSOCIOLOGIE

Par rapport à l'existence et au fonctionnement global d'un écosystème, la végétation est considérée comme fondamentale car elle assure à la fois la fonction primordiale de la production primaire et entretient des relations étroites aussi bien avec le biotope qu'avec les autres composantes de la biocœnose. L'étude descriptive et causale de la végétation est le principe fondamental de la phytosociologie (Gillet *et al.*, 1991). Ainsi, pour un écosystème donné, il existe

une végétation particulière, adaptée aux conditions naturelles dans lesquelles elle se développe et divisée en associations végétales. L'importante diversité des espèces végétales permet de définir des centaines d'associations végétales, qui sont la résultante des conditions climatiques et édaphiques de la zone étudiée (Lahondère, 1997). Par conséquent, l'étude de ces associations, semble être une voie privilégiée pour appréhender un milieu donné de façon heuristique, c'est-à-dire ici fondée sur l'expérience de l'observation.

La technique utilisée consiste à réaliser des relevés floristiques selon une méthode maintenant classique, développée par Braun-Blanquet dans les années 1930. Ces relevés représentent la base de la définition statistique des associations végétales qui repose sur l'estimation, pour chacun des taxons du relevé, de différents paramètres comme l'abondance-dominance. Si les relevés doivent en principe s'intéresser à l'ensemble du règne végétal, la plupart d'entre eux concernent uniquement les plantes supérieures produisant des graines (Spermaphytes). Pour définir une association (ou syntaxon), on utilise le critère statistique de fidélité. Une espèce dite « fidèle » n'est pas toujours présente dans un relevé phytosociologique, elle peut être très rare, mais lorsqu'elle existe, elle est toujours en compagnie d'autres espèces auxquelles elle est ainsi liée ; de telles espèces sont dites « caractéristiques » (Lahondère, 1997). Pour compléter la définition d'une association, le relevé phytosociologique doit comporter aussi des espèces dites « différentielles », qui par leur présence (ou leur absence) différencient un ensemble végétal d'un autre (Gillet, 1998).

Les groupements végétaux sont hiérarchisés au sein d'une « taxonomie », encore appelée « syntaxonomie », qui vise à mettre en évidence des liens entre les communautés végétales et les agents biotiques et abiotiques de leur déterminisme.

II.2.1 Nomenclature

De façon analogue à la nomenclature des espèces végétales, il existe un système binaire pour nommer les syntaxons qui repose sur une, ou le plus souvent, deux espèces caractéristiques. On forme le nom de l'association en ajoutant au premier nom de genre le suffixe **-o** et au second nom de genre le suffixe **-etum**, suivi du nom d'auteur (Guinochet, 1970). Les deux noms d'espèces sont également mis au génitif. Par exemple, l'association à *Crithmum maritimum* L. et *Limonium ovalifolium* (Poir.) Kuntze, se nomme ***Crithmo maritimi-Limonietum ovalifolii*** (Kuhnholz - Lordat 1926).

De la même façon, on nomme les unités d'échelle supérieure en ajoutant le suffixe **-ion** aux alliances, **-etalia** aux ordres et **-etea** aux classes (Guinochet, 1973). Il existe également en synsystème comme en systématique, des unités inférieures à déterminisme spécifique ; la sous-association à déterminisme écologique prend ainsi le suffixe **-etosum**, et l'on distingue divers types de déterminisme, tels que celui de la race (déterminisme géographique par exemple) ou encore celui du faciès, qui dénote la dominance d'une espèce particulière.

II.2.2 Les différentes approches phytosociologiques

On saisit à travers la nomenclature combien la phytosociologie vise à s'intégrer complètement dans une approche écologique systémique globale, et comment elle permet une meilleure compréhension des associations végétales du point de vue de leur structure. Deux « écoles » historiques de la description de cette structure ont conduit à deux approches en phytosociologie :

- **La phytosociologie sigmatiste** est née au tout début du XX^{ème} siècle grâce aux travaux du botaniste suisse Braun-Blanquet. Il créa tout d'abord à Zurich, la Station Internationale de Géobotanique Méditerranéenne et Alpine (SIGMA), puis s'installa à Montpellier ; d'où l'autre nom de cette approche : « la phytosociologie zuricho-montpelliéraine » (Braun-Blanquet ; 1968). Cette approche s'attache moins à la dynamique des communautés végétales qu'à la fidélité des espèces au sein des associations.
- **La phytosociologie synusiale intégrée** (De Foucault, 1986 ; Gillet *et al.*, 1991) est née, quant à elle, dans les années quatre-vingt à partir des travaux de trois chercheurs : Bruno De Foucault, François Gillet et Philippe Julve. Pour ces chercheurs, l'approche synusiale ne s'oppose pas à celle de l'école sigmatiste, mais elle en est complémentaire. La phytosociologie synusiale s'attache à décrire les « synusies » correspondant à toutes les unités visibles sur le terrain, même les plus petites. Les synusies sont des communautés biologiques très homogènes, tant du point de vue de leur structure (dynamique, formelle et architecturale) que de celui de leur écologie. Chaque synusie est décrite indépendamment des autres à partir des écodèmes qui la composent ; un écodème est l'ensemble des individus d'une même espèce, parvenus au même stade de développement et partageant le même biotope. Les relations entre les synusies sont étudiées finement de façon à réaliser une approche systémique de la végétation, en relation avec la dynamique des écosystèmes et avec son déterminisme écologique. Les

complexes de végétation plus importants (phytocénose, tesela, catena) sont ensuite décrits par intégration à partir du niveau de base (la synusie) pour permettre d'une part de mieux appréhender les aspects structuraux et historiques des associations décrites, et d'autre part de mieux prévoir l'évolution possible des associations végétales présentes. Malgré une approche plus heuristique, la phytosociologie synusiale est encore discutée et reste par conséquent très peu utilisée.

En résumé, la phytosociologie paraît représenter un outil puissant pour comprendre à la fois la répartition des espèces et les liens structuraux et fonctionnels qui existent entre elles, mais il impose une connaissance préalable, non seulement en botanique, mais aussi en écologie des taxons végétaux. De plus, la phytosociologie apparaît comme une science inexacte, sujette à des erreurs d'appréciation (Brooks, 1998). C'est probablement pour ces raisons que cette approche est restée confidentielle dans l'étude de la végétation des terrains riches en métaux lourds.

II.3 LES ASSOCIATIONS CARACTERISTIQUES DES SITES EUROPEENS A HAUTES TENEURS EN METAUX LOURDS

D'après la discussion ci-dessus, il apparaît clairement que les sites riches en métaux lourds peuvent abriter une flore spécifique. Afin d'étudier les spécificités de ces communautés végétales, il convient de faire une distinction entre les terrains dont les teneurs élevées en métaux lourds sont naturelles et les terrains contaminés par les activités humaines.

II.3.1 Les sites naturels

Ces sites rassemblent principalement les sols développés sur des roches mères ultrabasiques, péridotites ou serpentine, et les sols développés sur des sites métallifères, terrains miniers potentiels ou exploités.

C'est sur les premiers que l'on retrouve les changements de végétation les plus marqués. Bien souvent, les affleurements de serpentine ou de péridotite apparaissent dénudés et arides et présentent une végétation clairsemée souvent chétive et au port décombrant. Beaucoup de scientifiques à travers le monde se sont intéressés à ce que l'on appelle le « facteur serpentique » (Duvigneaud, 1966 ; Brooks, 1998). Il paraît difficilement concevable qu'une végétation quelconque puisse se développer sur un substrat qui semble être très phytotoxique. En effet, la

caractéristique principale de ces sols est une inversion du rapport calcium/magnésium, associée à de très fortes teneurs en métaux de transition, Fe, Ni, Cr et Co (Delaigue, 1989 ; Shallari *et al.* 1998 ; Abou Auda *et al.* 2002 ; Wenzel *et al.* 2003). Pour survivre, la végétation doit donc s'accommoder au moins partiellement de ces conditions édaphiques très particulières. On distingue communément les espèces végétales en 6 classes différentes, basées sur leur degré de restriction vis-à-vis de ce type de substrat ultrabasique (Duvigneaud, 1966, Delaigue, 1989) :

- **Les plantes serpentinfuges**, fréquentes aux alentours, sont complètement exclues de ce type d'affleurement.
- **Les plantes serpentino-dystolérantes** s'y maintiennent avec difficulté ; elles sont la plupart du temps chétives, elles manquent de vigueur et parfois même ne peuvent pas boucler leur cycle de vie.
- **Les plantes serpentino-phytes locales** sont plus abondantes hors serpentines mais y résistent isolément, souvent en limite de végétation ; leur présence n'est due qu'à la très faible pression de la concurrence qu'elles rencontrent sur ce type de substrat (ex. : *Noccaea montana* (L.) F.K.Mey. subsp. *montana*).
- **Les plantes serpentinovagues** vivent normalement sur la serpentine et montrent par conséquent une certaine capacité d'accommodation ; leur aspect végétatif est normal (ex. : *Juniperus communis* L., *Genista pilosa* L.).
- **Les plantes serpentino-préférentes** offrent des populations plus denses sur serpentines que sur les terrains alentours, écologiquement proches (ex. : *Notholaena marantae* L.).
- **Les plantes serpentino-phytes vraies** beaucoup plus rares, sont des espèces inféodées à ce milieu, et ne sont présentes que très rarement ailleurs (ex. : *Asplenium cuneifolium* Viv.).

Des variations importantes de cette végétation serpentinique peuvent avoir lieu, en fonction des conditions climatiques et de la localisation géographique. Elles permettent de définir plusieurs classes phytosociologiques typiques de ce milieu. Ainsi, l'examen de la végétation du site ardéchois de Savas a permis de rapporter une partie de la végétation recensée à la classe du *Calluno-ulicetae* Br-BI et Tx. 1943 typique de ce milieu, alors que la présence d'autres espèces comme *Bromus erectus* Huds. ou *Sanguisorba minor* Scop. évoque la classe beaucoup plus répandue et moins typique du *Festuco-Brometeae* BrBI et Tx. 1943 (Delaigue, 1989).

De nombreux dépôts miniers de zinc, cuivre et plomb recensés surtout en Europe centrale, montrent une communauté végétale proche de celle des affleurements serpentiniques, mais qui appartient cette fois à la classe *Violetea calaminariae* Br-BI et Tx. 1943. Les principales espèces caractéristiques de cette classe sont *Viola calaminaria* (Ging.) Lej., *Minuartia verna* (L.) Hiern et *Silene vulgaris* (Moench) Garcke (Antonovics *et al.*, 1971 ; Ernst, 1974). D'autres espèces sont souvent rencontrées sur ces sites, telles que *Noccaea caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey. subsp. *calaminare* (Lej.), *Armeria halleri* Wallr., *Armeria maritima* Wild., *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek ou encore *Festuca ovina* L. Ces taxons décrivent plusieurs associations, typiques de ce genre de milieu, mais qui peuvent également se retrouver sur certains sites présentant une forte pollution d'origine anthropique.

II.3.2 Les sites industriels

L'étude de la végétation des sites industriels fortement contaminés par des métaux lourds est en expansion constante mais encore peu de travaux présentent une étude phytosociologique complète. D'une façon générale, la plupart de ces études ne présentent que des listes de « végétaux d'intérêt » en vue d'analyses d'accumulation dans les organes aériens ou souterrains (Boruvka *et al.*, 1997 ; Pitchel *et al.*, 2000 ; Szarek-Lukaszewska et Nilinska, 2002 ; Park *et al.*, 2003).

Néanmoins, beaucoup d'auteurs relèvent que la végétation en place témoigne d'une adaptation d'une part à la sécheresse et d'autre part aux milieux perturbés d'origine anthropique, en associant des plantes xérophytes et des plantes rudérales, par ailleurs caractéristiques d'associations phytosociologiques très diverses et souvent banales (Buondonno *et al.*, 1998 ; Pitchel *et al.*, 2000 ; Szarek-Lukaszewska et Nilinska, 2002). Comme pour les espèces serpentinoxytes, il existe une classification des espèces métallicoles décrite par Lambinon et Auquier (1963). On distingue communément 2 grands types de végétaux :

- **Les métalloytes strictes**, que l'on retrouve uniquement sur des terrains contaminés dans une région donnée, se partagent en deux groupes :
 - **les espèces métalloytes absolues** (e.g. *Viola calaminaria* (Ging.) Lej., *Minuartia verna* (L.) Hiern subsp. *hercynica* (Willk.) O.Schwarz ou *Noccaea caerulescens* (J. & C. Presl.) F.K.Mey. subsp. *calaminare* (Lej.) qui se développent exclusivement sur des sols riches en métaux lourds.

- **les espèces métalrophytes locales** (e.g. *Armeria maritima* Wild.) qui peuvent être retrouvées sur des sites non pollués de certaines régions.
- **Les pseudométalrophytes**, qui regroupent les espèces présentes à la fois sur les sols contaminés et non contaminés de la même région. On différencie trois sous catégories :
 - **Les espèces pseudométalrophytes électives ou préférées**, qui sont abondantes et présentent une plus grande vitalité sur les terrains riches en métaux lourds que sur les terrains non pollués (ex. : *Agrostis capillaris* L., *Thymus pulegioides* L. ou *Rumex acetosa* L.).
 - **Les espèces pseudométalrophytes indifférentes**, qui montrent un développement normal quelle que soit la concentration métallique (ex. : *Plantago lanceolata* L.).
 - **Les espèces pseudométalrophytes accidentelles**, qui ne se développent sur les sols pollués que de façon sporadique, et présentent souvent une plus faible vitalité.

La grande majorité des ces métalrophytes est présente dans les associations de la classe *Violetea calaminariae* Br-BI et Tx. 1943 définie sur les dépôts miniers (§II.3.1). Cette classe ne comprend qu'un seul ordre, celui du *Violetalia calaminariae* Br-BI et Tx. 1943, qui présente lui-même trois alliances :

- *Armerion halleri* Ernst 1965 des pelouses sèches métallicoles d'Europe centrale.
- *Noccaeion caerulescentis* subsp. *calaminaris* Ernst 1965 des pelouses métallicoles d'Europe centrale.
- *Galio anisophylli* - *Minuartion verna* Ernst 1965 des régions alpines.

Les six principales associations dénombrées dans la classe *Violetea calaminariae* Br-BI et Tx. 1943 regroupent des espèces caractéristiques, telles que : *Armeria maritima* , *Armeria halleri* Wallr., *Viola calaminaria* (Ging.) Lej., *Armeria muelleri* A.L.P.Huet, *Noccaea rotundifolia* (L.) Moench, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke subsp. *humilis* (R.Schub.) Rauschert, *Minuartia verna* (L.) Hiern subsp. *hercynica* (Willk.) O.Schwarz, *Noccaea caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey. subsp. *calaminare* (Lej.) ou *Silene otites* (L.) Wibel..

Malgré une sous représentation manifeste des phanérophytes, ces associations présentent une grande diversité taxonomique qui fait de la phytosociologie des sols contaminés un outil

capable d'analyser les variations communautaires rencontrées sur de nombreux sites pollués d'origine variée. Si de grandes différences entre les communautés métallophytes persistent en fonction de l'habitat (Antonovics *et al.*, 1971), certaines associations majoritaires semblent émerger et suggèrent que la présence de métaux lourds toxiques, si elle ne constitue pas toujours le facteur prédominant du déterminisme des communautés végétales, représente tout de même un facteur limitant qui contraint les végétaux à s'adapter.

II.4 ADAPTATION AUX METAUX LOURDS

Seuls certains taxons sont donc observés préférentiellement sur des sites riches en métaux lourds, laissant supposer qu'outre la grande plasticité phénotypique de certains taxons opportunistes, des processus évolutifs sont impliqués dans cette adaptation aux environnements métallifères.

Les bases génétiques de la tolérance ont été largement étudiées (Antonovics *et al.*, 1971 ; Baker, 1987 ; Macnair, 1990 ; Macnair, 1993), mais peu de certitudes existent et beaucoup de travaux supplémentaires sont encore nécessaires. Il est généralement présumé que le phénomène d'adaptation est progressivement acquis selon le processus classique de l'évolution, en réponse à de nombreuses années de pression de sélection. Il en résulterait que seul un petit nombre d'espèces bien définies seraient capables de se développer sur des terrains contaminés. Pourtant, il est maintenant largement reconnu qu'un nombre important d'espèces végétales communes sont capables de coloniser rapidement des milieux nouvellement contaminés. Cette observation soutient l'hypothèse qu'un écotype (ou une population) adapté(e) peut émerger rapidement après quelques années, voire même en une seule génération (Wu *et al.*, 1975). Ce phénomène est classiquement présenté comme un modèle de microévolution (Macnair, 1993) ; il repose sur l'inductibilité de la tolérance, au sein des populations qui se développent habituellement sur des sites non contaminés et présentent une tolérance moyenne plus faible.

Cependant, en plus du phénomène adaptatif, il apparaît maintenant que la tolérance peut être un caractère constitutif. L'une des premières études a été menée sur une espèce des milieux humides, *Typha latifolia* (McNaughton *et al.*, 1974). En comparant deux clones, l'un issu d'un terrain contaminé par du zinc et l'autre issu d'un terrain non pollué, les auteurs ont montré que cette espèce présentait une forte tolérance au zinc, mais aussi au plomb et au cadmium, et ceci sans distinction entre les deux clones. Par la suite, cette observation a été confirmée pour différentes

espèces telles que *Phragmites australis* (Ye *et al.*, 1997b), *Glyceria fluitans* (Matthews *et al.*, 2004), *Carex rostrata* (Matthews *et al.*, 2005), *Andropogon virginicus* (Gibson and Risser, 1982), *Calamagrostis epigejos* (Lehmann and Rebel, 2004), *Calluna vulgaris* (Monni *et al.*, 2000) et *Arabidopsis halleri* (Bert *et al.*, 2000).

Parmi les végétaux tolérants, il est possible de caractériser trois grands types différents de stratégies vis-à-vis des contaminants métalliques, basées sur les rapports entre les teneurs en métaux lourds du sol et celles des organes aériens des plantes considérées (Baker, 1981). On définit alors :

- **Les accumulateurs** pour lesquels les métaux sont concentrés, souvent préférentiellement dans les parties aériennes, quelle que soit la concentration métallique dans le sol.
- **Les « excluders »** qui présentent une faible concentration foliaire, maintenue constante par régulation du transport depuis les racines tant que la concentration dans le sol reste relativement peu élevée. Dans le cas contraire, le mécanisme de régulation est dépassé et une accumulation importante a lieu entraînant la mort de l'individu.
- **Les indicateurs** ne présentent aucun contrôle de la translocation (cf. § III.1.2). Par conséquent, les concentrations racinaires et foliaires sont en équilibre, et proportionnelles aux teneurs du sol. C'est le cas, par exemple, du pissenlit (*Taraxacum officinale*) qui accumule divers métaux lourds en fonction de la pollution environnementale (Kuleff and Djingova, 1984).

Ces stratégies d'adaptation semblent entraîner souvent une contrepartie pour les plantes, que l'on appelle « le coût de la tolérance » (Antonovics *et al.*, 1971 ; Baker, 1987 ; Macnair, 1993). Elles présentent souvent un aspect plus frêle et leur croissance normale paraît devenir metallo-dépendante (Antonovics *et al.*, 1971). Par conséquent, ces écotypes tolérants apparaissent souvent moins compétitifs, face aux « plantes normales », et semblent inféodés aux milieux contaminés, incapables de s'étendre aux terrains alentours.

Le chapitre suivant sera consacré à la description des mécanismes physiologiques de la tolérance rencontrés chez les plantes.

II.5 REFERENCES

- Abou Auda, M.M., Symeonidis, L., Hatzistavrou, E., Yupsanis, T., 2002. Nucleolytic activities and appearance of a new DNase in relation to nickel and manganese accumulation in *Alyssum murale*. *Journal of Plant Physiology* 159, 1087-1095.
- Agricola, G., 1556. *De Re Metallica*. Traduction d'Albert France-Lanord, Gérard Klopp (Ed.), Thionville, 1987.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7, 1-85.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders - Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3 (1-4), 643-654.
- Baker, A.J.M., 1987. Metal tolerance. *New Phytologist* 106, 93-111.
- Bert, V., Macnair, M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D., 2000. Zinc tolerance and accumulation in metalicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *New Phytologist* 146, 225-233.
- Boruvka, L., Kozak, J., Kristoufkova, S., 1997. Distribution of cadmium, lead and zinc in plants grown on heavily polluted soils. *Rostlinna Vyroba* 43 (6), 249-256.
- Braun-Blanquet, J., 1968. L'école phytosociologique Zuricho-Montpelliéraine et la S.I.G.M.A. *Vegetatio* 16, 1-78.
- Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.
- Buondonno, C., Ermice, A., Buondonno, A., Murolo, M., Pugliano, M.L., 1998. Human-influenced soils from an iron and steel works in Naples, Italy. *Soil Science Society of America Journal* 62, 694-700.
- De Foucault, B., 1986. *La phytosociologie sigmatiste : une morpho-physique*. Université de Lille II, laboratoire de Botanique.

- Delaigue, J., 1989. Un îlot floristique : le Suc de Clava, dôme de serpentine de l'Ardèche. Bulletin mensuel Société Linnéenne de Lyon 58 (8), 257-280.
- Duvigneaud, P., 1966. Note sur la biogéochimie des serpentines du sud-ouest de la France. Bulletin de la Société royale de Botanique de Belgique, Tome 99, pp. 271-329.
- Ernst, W., 1974. Schwermetallvegetation der Erde. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Gibson, D.J., Risser, P.G., 1982. Evidence for the absence of ecotypic development in *Andropogon virginicus* (L.) on metalliferous mine wastes. New Phytologist 92, 589-599.
- Gillet, F., De Foucault, B., Julve, P., 1991. La phytosociologie synusiale intégrée : objets et concepts : Candollea 46, 315-340.
- Gillet, F., 1998. La phytosociologie synusiale intégrée : guide méthodologique. Université de Neuchâtel - laboratoire d'écologie végétale et de phytosociologie, Document 1.
- Guinochet, M., 1970. Clé des classes, ordres et alliances phytosociologiques de la France. Naturalia Monspeliensia, ser. Bot. 21, 79-119.
- Guinochet, M., 1973. Phytosociologie. Masson & C^{ie}, Paris.
- Guinochet, M., De Vilmorin, R., 1973. Flore de France. Editions du Centre National de la recherche scientifique, Fascicule 1.
- Kuleff, I., Djingova, R., 1984. The dandelion (*Taraxacum officinale*) - A monitor for environmental pollution ? Water, Air, and Soil Pollution 21, 77-85.
- Lahondere, CH., 1997. Initiation à la phytosociologie sigmatiste. Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest, Nouvelle série, Numéro spécial 16.
- Lambinon, J., Auquier, P., 1963. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhénanie aixoise : Types chorologiques et groupes écologiques. Natura Mosana 16 (4), 113-131.
- Lehmann, C., Rebele, F., 2004. Evaluation of heavy metal tolerance in *Calamagrostis epigejos* and *Elymus repens* revealed copper tolerance in a copper smelter population of *C. epigejos*. Environmental and Experimental Botany 51, 199-213.

- Macnair, M.R., 1990. The genetics of metal tolerance in natural populations. In: Shaw, J. (Ed.). Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Macnair, M.R., 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124, 541-559.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., McCabe, P.F., Otte, M.L., 2004. Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*. *Aquatic Botany* 80, 39-52.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., Otte, M.L., 2005. Screening the wetland plant species *Alisma plantago-aquatica*, *Carex rostrata* and *Phalaris arundinacea* for innate tolerance to zinc and comparison with *Eriophorum angustifolium* and *Festuca rubra* Merlin. *Environmental Pollution* 134, 343-351.
- McNaughton, S.J., Folsom, T.C., Lee, T., Park, F., Price, C., Roeder, D., Schmitz, J., Stockwell, C., 1974. Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races. *Ecology* 55, 1163-1165.
- Monni, S., Salemaa, M., White, C., Tuittila, E., Huopalaainen, M., 2000. Copper resistance of *Calluna vulgaris* originating from the pollution gradient of a Cu-Ni smelter, in southwest Finland. *Environmental Pollution* 109, 211-219.
- Park, J-S., Chang, Y-Y., Bae, B., Kim, O.K., Cho, K-S., Lee, I-S., 2003. Low heavy metal bioavailability in soil at contaminated Korean shooting sites. *Journal of Environmental Science and Health A38* (7), 1285-1297.
- Pichtel, J., Kuroiwa, K., Sawyerr, H.T., 2000. Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution* 110, 171-178.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J.L., 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *The Science of the Total Environment* 209, 133-142.
- Szarek-Lukaszewska, G., Niklinska, M., 2002. Concentration of alkaline and heavy metals in *Biscutella Laevigata* L. and *Plantago Lanceolata* L. Growing on calamine spoils (S. Poland). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 44, 29-38.

- Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M., Horak, O., 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution* 123, 131-138.
- Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis Stolonifera*. *Heredity* 34 (2), 165-187.
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1997b. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Annals of Botany* 80, 363-370.

CHAPITRE III

TOLÉRANCE AUX MÉTAUX LOURDS CHEZ LES VÉGÉTAUX

Certains éléments métalliques sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations. Mais, ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique. Le terme « **sensibilité** » décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante. Par opposition, le terme « **résistance** » fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance (Levitt, 1980). Deux stratégies principales sont impliquées dans ce phénomène de résistance :

- **la stratégie d'évitement** par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption ;
- **la stratégie de tolérance** (terme qui sera utilisé dans la suite de ce travail comme étant synonyme de résistance) qui fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme.

Ces différents aspects sont abordés dans ce chapitre de façon à comprendre la physiologie de la plante vis-à-vis des métaux lourds. Pour terminer, nous développerons les stratégies d'utilisation des plantes dans une optique de phytoremédiation des sols contaminés.

III.1 LES METAUX LOURDS DANS LA PLANTE

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (*e.g.* azote, soufre... ; Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (Rengel, 1999). En outre, certains éléments trace peuvent se présenter sous différents états d'oxydation (*e.g.* $\text{Cu}^{2+} + e^- \leftrightarrow \text{Cu}^+$). Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001). Pour autant, les métaux lourds n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante, et malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent

considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les plus toxiques, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

III.1.1 Absorption racinaire

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines. Cependant, une partie des ions peut être adsorbés par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions (Briat et Lebrun, 1999). Puis au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration. Cependant, les mécanismes exacts de l'absorption sont encore mal connus, en particulier pour certains éléments comme le Cu (Greger, 1999 ; Chaignon, 2001), et différent selon l'espèce métallique. On considère de nos jours que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type porine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Par ailleurs, bien que le transport actif soit en principe spécifique, certains cations toxiques (Cs (césium), Cd, Pb ou Cr) sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis des cations essentiels. Par exemple, le cadmium semble être un compétiteur connu du calcium en empruntant les canaux calciques membranaires (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999 ; Greger, 1999). 70% du Cd entrerait dans la racine par ce biais là (Greger, 1999).

Une partie des métaux apoplastiques peut donc rejoindre la voie symplastique puis le xylème par les plasmodesmes.

III.1.2 Translocation

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, appelé « translocation », peut nécessiter ou non la prise en charge des éléments par des agents complexants, tels que les acides organiques, les acides aminés et divers peptides : le fer est pris en charge par le citrate ; le zinc peut être transporté par un complexe anionique (Alloway,

1995) ; la majorité du cuivre et une partie du nickel sont chélatées par un acide polyamino-polycarboxylique encore non identifié chez la tomate (Foy *et al.*, 1978) ; le cadmium est transporté sous forme libre (Greger, 1999).

Chez certaines espèces la translocation d'éléments toxiques est plus importante que chez d'autres, pouvant conduire à une accumulation des métaux dans les feuilles et les autres parties aériennes, sans que l'on sache avec rigueur si elle est due à un transport plus actif ou une absence d'immobilisation dans les racines (Foy *et al.*, 1978).

Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins évident du fait que les cellules qui le constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire (Greger, 1999). Toutefois, chez certaines plantes, la nicotianamine, dérivée de la méthionine, pourrait être responsable du transport des métaux, Fe, Cu, Zn et Mn, dans la sève du phloème (Briat et Lebrun, 1999).

III.1.3 Accumulation

Certaines plantes accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques ; 100 mg/kg de matière sèche pour le Cd, 1000 mg/kg pour le Ni, le Cu, le Co ainsi que 10 000 mg/kg pour le Zn et le Mn. Ces espèces sont alors qualifiées de plante « hyperaccumulatrice » (*e.g.* *Alyssum bertolonii*, *Sebertia acuminata*, *Silene cobalticola*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica napus*, *Pteris vittata*) (Brooks, 1998). Ainsi, plus de 400 espèces hyperaccumulatrices sont recensées, dont plus de 300 pour le nickel et seulement une pour le cadmium. A part une possible résistance à la sécheresse et aux herbivores (Boyd, 1998), il est encore impossible d'attribuer ce phénomène à un avantage sélectif quelconque. Dans la cellule, les métaux ayant pénétré dans le cytoplasme sont pris en charge par diverses molécules afin de les stocker ou d'éviter tout dommage cellulaire.

III.2 TOXICITE ET TOLERANCE

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage... A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS). Les ROS

altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Devi and Prasad, 1999 ; Dietz *et al.*, 1999 ; Cheng, 2003).

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux. D'efficacité variée selon les espèces, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes, encore mal compris, soient largement prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique.

III.2.1 La membrane plasmique

Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique (Lasat, 2002), même passivement. Le rôle du plasmalemmes dans la régulation du transport métallique est donc primordial.

La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes ultra spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques (Meharg, 1993). Cependant, si la membrane plasmique apparaît comme étant la première barrière face à l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, elle constitue également une cible importante pour la toxicité métallique. En effet, il a été montré que le cuivre pouvait endommager la membrane par oxydation des protéines membranaires, peroxydation lipidique (Dietz *et al.*, 1999) ou inhibition des ATPases (Meharg, 1993). Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion est facilitée (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Dès lors, la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire.

Néanmoins, la fonction des protéines associées au plasmalemmes joue un rôle essentiel dans le transport des métaux à travers la membrane plasmique. Récemment, le gène codant un transporteur du fer, *irt1*, a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* à partir d'une levure (Eide *et al.*,

1996). Il est représenté par un peptide de 339 acides aminés avec 8 domaines transmembranaires. Chez *A. thaliana*, IRT1 est exprimé dans les racines en réponse à une carence en fer. Les caractéristiques de ce transporteur et les données physiologiques indiquent que ce système n'est pas spécifique ; il pourrait également transporter d'autres ions divalents comme le zinc et le cadmium (Briart et Lebrun, 1999). Cette compétition entre différents ions entraînerait une déficience en fer responsable des signes visibles de chlorose. D'autres systèmes comparables ont été mis en évidence par expression fonctionnelle chez *A. thaliana*. Ainsi, COPT1 est un transporteur connu du cuivre, retrouvé dans les fleurs, les tiges et les feuilles, mais pas dans les racines. Ceci suggère que son implication dans l'absorption racinaire est peu probable. Par opposition, ZIP1 et ZIP3, exprimés lors d'une carence en zinc, sont exclusivement racinaires, et seraient par conséquent impliqués dans l'absorption racinaire. Enfin, ZIP4, localisé à la fois dans les parties racinaires et aériennes, jouerait un rôle dans la translocation du zinc. La modulation de l'expression de ces gènes pourrait donc contribuer largement à la tolérance observée chez certaines espèces. Ainsi, le site principal de la toxicité au cuivre chez *Silene vulgaris* est la membrane plasmique racinaire qui est altérée par peroxydation lipidique. Dans une étude menée sur un couple écotype de contrôle-écotype tolérant, la perméabilité membranaire vis-à-vis du cuivre est mise en évidence par un efflux de potassium plus important chez le contrôle que chez l'écotype tolérant. Pourtant les deux écotypes répondent de la même façon à un stress oxydant donné. Par conséquent, la tolérance serait due à un mécanisme limitant l'entrée de cuivre au niveau de la membrane plasmique des cellules (DeVos *et al.*, 1992).

En résumé, la tolérance pourrait être due à la protection de l'intégrité membranaire ou à la protection de la fonction des protéines associées au plasmalemme, tels que les transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons.

III.2.2 Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant jouerait un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress.

III.2.2.1 Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables

de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton (1) qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en radical hydroxyl ([•]OH) et en anion hydroxyl (OH⁻) :



Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire qui, parce qu'il n'est pas apparié à un autre électron de spin opposé, confère à la molécule une très forte réactivité. Le radical hydroxyle [•]OH, produit au cours de cette réaction, est un puissant agent oxydant. D'autres réactions de ce type faisant intervenir des métaux réduits ont également été décrites, telle que la réaction d'Haber-Weiss (2) au cours de laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde [•]O₂⁻, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle.

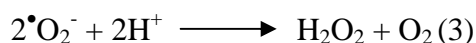


Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que le cadmium et le nickel par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un « down régulation » des enzymes du système anti-oxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui présentent des capacités anti-oxydantes (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

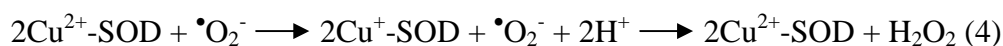
III.2.2.2 Le système anti-oxydant contrôle la production de ROS

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS : il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde [•]O₂⁻ et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

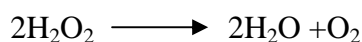
Les superoxyde-dismutases, SODs, sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), selon la réaction (3) :



Ces enzymes existent sous différentes isoformes, dont la structure d'ensemble est très bien conservée au cours de l'évolution : le repliement tridimensionnel forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal divalent situé au cœur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal on distingue les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD), cytosoliques et enfin, les superoxyde-dismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste. L'équation (4) décrit la chaîne catalytique typique avec le cuivre :



Les **catalases**, CATs, sont contenues dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elles agissent en synergie avec les SODs puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Les **peroxydases**, POX, permettent, comme les catalases, la réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules anti-oxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » (Noctor and Foyer, 1998 ; Foyer and Noctor, 2000), dont la première étape consiste en une réduction du peroxyde d'hydrogène en H_2O , couplée à une oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDHA) ; cette étape est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être à nouveau réduit. Pour cela, deux voies (directe et indirecte) de régénération de l'ascorbate coexistent : La réduction directe du MDHA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H. Cependant, le MDHA est une molécule relativement instable qui a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate (DHA) et ascorbate. La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste donc en une réduction du DHA par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à une oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé, produit au cours de cette dernière réaction, est régénéré en GSH grâce la glutathion réductase (GR).

III.2.3 La chélation et la compartimentation cellulaires

III.2.3.1 La chélation

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés :

- **Les métallothionéines (MT)** sont des protéines largement distribuées dans le monde vivant.

On les rencontre chez de nombreux procaryotes et chez la plupart des eucaryotes. Ces protéines sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques (essentiellement Cu et/ou Zn) et par leur forte proportion de résidus cystéines (environ 30 %). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés) et par l'absence de résidus aromatiques. Bien que leurs séquences en acides aminés soient très variables d'un organisme à un autre, il semblerait que la structure tridimensionnelle soit bien conservée. Selon les études actuellement disponibles, la plupart des MT présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition ; chaque domaine est responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents. Le rôle précis des MT dans la réponse aux métaux lourds est encore débattu, mais de nombreuses observations ont montré qu'elles pourraient être impliquées dans certains mécanismes de tolérance, notamment vis-à-vis du cadmium et du cuivre. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, il a été démontré que la présence de cuivre stimule la biosynthèse de MT et que la variation écotypique de la tolérance à ce métal est corrélée au taux de transcription des gènes MT (Murphy and Taiz, 1995). En fait, il est aujourd'hui bien établi que la surexpression de gènes MT, dans des organismes aussi variés que des cyanobactéries, des levures, des cellules de mammifères ou des plantes (Misra and Genamu, 1989), peut s'accompagner d'une augmentation de la tolérance à certains métaux lourds (Cu, Zn et Cd). Des travaux d'ingénierie moléculaire, visant à modifier les capacités de chélation (affinité et spécificité) des MT, sont actuellement en cours. Cependant, il faut souligner que la synthèse de MT ne constitue probablement pas une réponse spécifique ; en effet, ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress (chocs thermiques par ex.) ou sous l'effet de facteurs telles que des hormones et des cytokines. Ainsi, la présence universelle des métallothionéines dans le

monde vivant (chez les organismes sensibles comme chez les résistants) et leur synthèse dans des situations variées, suggèrent que ces protéines seraient plutôt impliquées dans le contrôle général de l'homéostasie cellulaire et non dans les réponses spécifiques aux métaux lourds. A ce propos, on peut remarquer que les hyperaccumulateurs étudiés jusqu'à présent ne semblent pas se distinguer par leur richesse en MT.

- **Les phytochélatines (PC)** représentent le deuxième groupe de chélateurs intracellulaires, uniquement rencontrés dans le règne végétal. De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux MT, avec lesquelles elles partagent d'assez nettes similarités de structure et de fonction : elles sont très riches en Cys [formule générale (Glu-Cys) n -Gly (avec $n = 2$ à 11)] et leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds (Cd, Cu, Zn, etc...). Une différence essentielle avec les autres MT réside dans l'origine biosynthétique des PC ; elles ne sont pas directement codées par le génome mais sont synthétisées par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly). Bien que les PCs soient clairement impliquées dans la liaison des métaux intracellulaires, l'activité PC synthase semble constitutive chez la plupart des plantes. En effet, les écotypes tolérants ne présentent pas de concentrations accrues en PC (De Knecht *et al.*, 1992) ; il est donc difficile d'attribuer la tolérance des phytoextracteurs naturels à la présence de phytochélatines. Néanmoins, Zhu *et al.* (1999) ont montré, à partir de clones transformés de *Brassica juncea*, que la surexpression des gènes intervenant dans la synthèse du glutathion conduit à une augmentation de la tolérance au cadmium via une augmentation du pool de phytochélatines. La stimulation des voies conduisant aux PC représente donc, comme pour les MT, une stratégie de transgénèse potentiellement efficace pour l'amélioration des phytoextracteurs.
- **Les acides organiques** représentent un autre groupe de chélateurs naturels. Sous cette dénomination sont classées des molécules diverses tels que des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation. On observe souvent une stimulation de leur synthèse en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante. De plus, des observations récentes ont clairement montré que, au moins dans certains cas, des acides

organiques pourraient être directement impliqués dans les mécanismes de tolérance. Ainsi, les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique (Ma *et al.*, 1997). De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en Cu et Zn, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie (Harrington *et al.*, 1996). Ces deux exemples suggèrent donc que la tolérance aux métaux chez quelques métallophytes hyperaccumulatrices serait acquise par une synthèse spécifique de petites molécules organiques à fortes capacités de chélation. Néanmoins, les données dans ce domaine sont encore trop fragmentaires pour être généralisées à l'ensemble des métallophytes.

- **Les acides aminés** libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Briat et Lebrun, 1999 ; Bert, 2000). C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine (Krämer *et al.*, 1996).

III.2.3.2 La compartimentation

Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des métaux lourds sous forme ionique dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques. Par exemple, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines GTP a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc. Le transport de zinc sous forme ionique dans les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP et permet la détoxification du zinc plus rapidement que chez l'écotype sensible (Chardonens *et al.*, 1999).

Chez *Rauvolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)), qui s'agrègent les uns aux autres par des pont sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). Les HMW pourraient alors être transportés par un complexe protéique spécifique dans la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (Sanita di Toppi and Gabbriella, 1999).

III.2.4 Autres systèmes de défense au stress métallique

D'autres mécanismes agissant contre les effets néfastes des métaux lourds peuvent être mis en œuvre chez les plantes :

- **Des transporteurs membranaires**, de type pompe ATPasique, spécifiques du cadmium seraient présents chez *A. thaliana* et réaliseraient un efflux actif des ions métalliques à l'extérieur des cellules (Briat et Lebrun, 1999).
- **L'accumulation des métaux dans les feuilles âgées**, juste avant leur abscission diminuerait ainsi les concentrations métalliques dans la plante. En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge. Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb sont 3 à 8 fois celles des jeunes feuilles (Dahmani-Muller, 1999). Cette observation suggère un transport interne depuis des feuilles vertes, encore actives d'un point de vue photosynthétique, vers les feuilles qui sont sur le point de tomber, préservant ainsi la photosynthèse tout en détoxiquant la plante. Une accumulation de Cd a été également observée dans les trichomes de plusieurs espèces (Salt *et al.*, 1995).
- **Les protéines de choc thermique (Hsp)**, déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques. En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ». L'induction des HSP par le stress protéotoxique permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par resolubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation. Ainsi, les résultats obtenus sur des cellules de tomate ont établi que l'action d'H₂O₂ induisait la synthèse de protéines de choc thermique (Banzet *et al.*, 1998). De la même façon, dans les cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1 mM de cadmium, des quantités significatives d'hsp70 ont été relevées au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sièges de multiples dégâts du stress oxydant provoqué par les métaux lourds (Neumann *et al.*, 1994).

- **La biosynthèse d'éthylène** dans les racines et les feuilles est provoquée par certains métaux, comme le cadmium. L'éthylène serait alors un messager stimulant la lignification capable de limiter les flux de métaux dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse anti-oxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase, ainsi que la synthèse de métallothionéines (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

III.3 REFERENCES

- Alloway, B.J., 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B.J. (Ed.). Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London, pp. 11-35.
- Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., Triantaphylides, C., 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptative response in tomato cells. *Plant Journal* 13, 519-527.
- Bert, V., 2000. Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). Thèse : Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie.
- Boyd, R.S., 1998. Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, pp. 181-200.
- Briat, J.F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology* 322, 43-54.
- Brooks, R.R., 1998. Biogeochemistry and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, pp. 95-118.
- Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Chardonnens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 120, 779-785.

- Cheng, S., 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (4), 256-264.
- Dahmani-muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M., 1999. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109, 1-8.
- De Knecht, J.A., Koevoets, P.L.M., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., 1992. Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist* 122, 681-688.
- Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116.
- De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H., 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* 98, 853-858.
- Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 73-97.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 5624-5628.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The Physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29, 511-566.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146, 359-388.
- Greger, M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-27.

- Harrington, C.F., Roberts, D.J., Nickless, G., 1996. The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1742-1752.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C., 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 373, 635-638.
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., 1997. Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570.
- Meharg, A.A., 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88, 191-198.
- Misra, S., Gedamu, L., 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 161-168.
- Murphy, A., Taiz, L., 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109, 945-954.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L., 1994. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194, 360-367.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathion: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 49, 249-279.
- Rengel, Z., 1999. Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 231-251.

Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.

Sanita Di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry N., 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* 121, 1169-1177.

CHAPITRE IV

ÉTUDE PÉDOLOGIQUE ET ENVIRONNEMENTALE D'UN CRASSIER MÉTALLURGIQUE

Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: implications in risk assessment and site restoration

E. Remon, J-L. Bouchardon, B. Cornier, B. Guy, J-C. Leclerc, O. Faure

Article publié dans la revue Environmental Pollution **137** (2005) 316-323

IV.1 ABSTRACT

Pedological and botanical characteristics of a former metallurgical landfill were examined to assess the risks of heavy metals mobility and to evaluate remediation feasibility. In addition to very high heavy metals levels (Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn), the soil was characterized by a lack of clear horizonation, a relatively high pH, a high mineral and organic carbon contents, a low nitrogen level and a high C/N ratio. A two steps sequential extraction showed that heavy metals were poorly labile (*i.e.* not soluble in diluted CaCl₂), indicating that their leaching under natural conditions was probably very low. However extraction with DTPA generated significant amounts of metals (mainly Pb and Cu), suggesting they were potentially mobilisable. A botanical survey of the area showed a biodiverse plant community (28 species and 11 families), with no obvious toxicity symptoms. Measurements of metal contents in dominant species confirmed that they were closely similar to those reported for species growing in unpolluted environments. Consequently, for an effective site restoration, indigenous species could be well suited to cope with local conditions in a phytostabilization strategy.

IV.2 INTRODUCTION

Since the mid-nineteenth century, the growing activity of steel and iron smelting factories in industrialized nations generated large amounts of foundry wastes, which were generally deposited on or close to the sites of production. Although these wastes contain high levels of heavy metals (*e.g.* Pb, Cr, Ni, Zn, Cu) most of the former metallurgical tailing dumps, which may extend over several hectares, are now abandoned without particular safety measures and their

environmental impact has been poorly studied. Consequently, because the potential hazards of these highly polluted sites are still largely unknown, it is very difficult to propose remediation techniques or new occupation plans.

To our knowledge, in Europe, only two sites from iron and steel factories have been extensively examined both for their heavy metals content and speciation, and for their pedological characteristics. One was localized in northeast France (Venditti *et al.*, 2000 a and b) and the other in southern Italy (Buondonno *et al.*, 1998; Adamo *et al.* 2002). These soils were indeed characterized by a very high heavy metal contamination, but the evaluation of the potential mobility of pollutants gave contradictory results. For instance, using a sequential extraction procedure Venditti *et al.* (2000 a) showed a preferential association of metals with carbonates, Fe-Mn oxides, and organic matter, suggesting a possible risk of leaching in a short to medium term; on the contrary, when they used scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray micro-analysis they showed (Venditti *et al.* 2000 b) that carbonates and oxides contained low amounts of metals, suggesting a low metal availability. In another case study, Adamo *et al.* (2002) showed that a significant amount of Zn was associated with the soluble, exchangeable and carbonate fractions, while other heavy metals (*e.g.* Cr, Pb, Ni) were mostly associated with the residual mineral components. This indicated that, although metal remobilization could not be excluded, the risk of leaching under natural conditions was probably very low and was element-dependent.

However an accurate risk assessment on contaminated landfills should consider the risk of vertical heavy metals transfer both to the ground water and to the above ground vegetation. The extend of such a transfer is closely dependent to metal concentration and speciation, but also to soil characteristics and to plant species (Welch, 1995; Ernst, 1996). Consequently, in addition to chemical extraction methods, the study of plant communities in terms of species diversity, toxicity symptoms and metal concentrations in above ground tissues, should be performed to accurately assess soil metal phytoavailability and ecotoxicity. In fact, such an approach has been already performed in a number of potentially hazardous sites, including mine tailings (Cobb *et al.*, 2000; Stoltz and Greger, 2002), municipal waste deposits (Gimmler *et al.*, 2002) or industrially contaminated soils (Dudka *et al.*, 1995; Dudka *et al.*, 1996). However, in previous studies about soils from metallurgical sites, plant communities were not described and their heavy metal contents were not analyzed. It is thus necessary to get a better knowledge concerning both the properties of soils made on wastes from iron and steel factories, and the characteristics and behavior of vegetation communities growing on these highly disturbed sites.

Moreover, in addition to understanding factors governing heavy metals vertical transfers, identification and characterization of plant species capable to grow and survive on polluted area could be very helpful to develop phytostabilization technologies (Kramer *et al.*, 2000; Olson and Fletcher, 2000). Indeed, due to technical and financial considerations, removal of metallurgical landfills for disposal in special sites is clearly unrealistic. Therefore the only way to impede or minimize heavy metals hazards is to control and stabilize existing landfilling areas. In this respect, restoration of an appropriate plant cover (Vangronsveld *et al.*, 1995; Wong, 2003) could be an effective alternative in treating metallurgical landfills, which could fulfill the dual objectives of sustainable site reclamation and visual improvement of highly degraded areas.

In the present paper we investigated the soil and the vegetation at a former metallurgical landfill. Our objectives were to assess heavy metal potential mobility and phytoavailability both by chemical extraction procedures and vegetation analysis, and to identify and characterize plant species, which could be used in a phytostabilization strategy.

IV.3 MATERIAL AND METHOD

IV.3.1 Site description

The studied site (45°26' N, 4°17' E) was located at Firminy, near the city of Saint-Etienne (Loire, France). It was a former landfill used from about 1916 to 1950, to deposit iron and steel foundry wastes from a neighbouring metallurgical factory. The entire landfill covered an area of about 4.5 ha. Although the site has been partially excavated, a large dump (approximately 21 m long × 9 m wide × 4 m height) remained undisturbed since it was abandoned. This area, which showed a well-developed vegetation cover with both trees and herbaceous species, was studied in the present work.

IV.3.2 Soil sampling and analysis

Because polluted sites have often a highly heterogeneous composition, a systematic sampling was designed. The studied area was divided into 3 transects (A, B and C) at 8 m intervals. Soil samples (0-20 cm depth) were taken every meter along each transect, resulting in 28 sampling points. The samples were dried at 60 °C for 48 h, sieved to 2 mm and ground to pass a 250- μ m mesh sieve.

All physical and chemical soil properties described below were determined according to standard procedures published by the French Association for Normalization (AFNOR) in 1999. Soil pH was measured in deionized water with a soil: water ratio of 1:2 following NF ISO 10390 procedure (AFNOR, 1994). Total carbonates were determined by measuring the CO₂ release after HCl treatment (NF ISO 10693, AFNOR, 1995). Organic carbon was determined by sulfochromic oxidation (NF ISO 14235, AFNOR, 1998). The cation exchange capacity was measured after exchange with a 36 mM ammonium oxalate solution (NF X 31-130, AFNOR, 1993). Total nitrogen was measured by the Kjeldahl method (NF ISO 11261, AFNOR, 1995). Particle size distribution was determined by sieving and sedimentation (X 31-107, AFNOR, 1983).

Total major (P, K, Ca, Mg, Si, Al, Fe, Na and Mn) and trace (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb) elements analysis were conducted by X-ray fluorescence spectrometry using a Philips PW 1410/20 apparatus (Claude-Bernard University, Lyon-1). According to the two International Proficiency Tests GeoPT-1 and GeoPT-2, laboratory uncertainties are below the analytical errors expected for XRF analysis, that is, less than 1 %, 1.5 % and 2 % for major elements (above 60 %), near 10 % and near and below 1 % respectively, and less than 5 %, 8 % and 10 % for trace elements, near 1000, 100 and 10 ppm respectively.

The evaluation of heavy metals availability was performed using a two steps sequential extraction procedure, as proposed by Maiz *et al.* (2000). This procedure involved mixing 4 g soil with 20 ml 0.01 M CaCl₂, under agitation for 24 h at room temperature. This first suspension was centrifuged at 3,000 g for 15 min, and the supernatant was collected for the analysis of the mobile fraction. The residue was then rinsed two times with ultra pure water and resuspended in 20 ml of 0.005 M DTPA, 0.01 M CaCl₂ and 0.1 M TEA, pH 7.3, under continuous agitation for 24 h. After centrifugation at 3,000 g for 15 min, the supernatant was removed and analyzed for the mobilisable fraction.

Concentrations of heavy metals in various extracts were measured by inductively coupled optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Jobin-Yvon JY24 apparatus. Wavelengths were chosen by “profile function” to give the highest sensitivity for each element, without interference (Cd: 228.802 nm; Cr: 283.563 nm; Cu: 324.754 nm; Ni: 231.604 nm; Pb: 220.353 nm; Zn: 213.856 nm). Quantitative analyses were performed using calibration curves at appropriate concentration ranges with certified PlasmaCal mono-elementary standard solutions (SCP Sciences - Canada). All calibration standards were prepared in the same matrix used for the extracts. Limits of detection were 0.06, 0.14, 0.27, 1.17, 2.05, 2.38 and 15.51 µg l⁻¹ for Zn, Cd, Fe, Cr, Cu, Pb and Ni,

respectively. To check the analytical precision, randomly chosen samples (about 20% of the total number) were measured in triplicate. The relative standard deviation was routinely between 1 and 8 %, and never higher than 10 %. During the overall process of sample preparation and analysis, special care was taken to minimize contaminants from air, glassware and reagents, which were all of analytical grade.

IV.3.3 Vegetation study and plant analysis

Plant determination and sampling were made at the mid-growing period (May 14th, 2003). The vegetation cover was studied in 50 cm × 50 cm quadrants around each of the 28 soil sampling points. Taxons were named according to Bock (2003), after identification with standard botanical procedures. In each quadrat, the number of individuals of each species and/or the percent coverage estimates was recorded.

Metal accumulation in plant tissues was evaluated from the most abundant species. Plant samples were thoroughly washed in tap water and rinsed three times with distilled water. Samples were then separated into leaves, stems and roots, dried at 40 °C to constant weight and ground to pass a 2 mm sieve. Digestion of plant samples was performed using hot HNO₃, according to Zarcinas *et al.* (1987). The concentration of metals in various extracts was measured by ICP-OES as described above.

IV.4 RESULTS

IV.4.1 Pedological characteristics and mineral composition of the soil

The first visible characteristic of the studied area was the unequal thickness of the A horizon along each transect, and the lack of a B horizon. As a general trend, the first 2 or 3 points of each transect had no, or a very thin (<0.5 cm) A horizon, resulting in a hard and compact granish gray soil (color code of moist sample: 7.5 G 5/1, according to Munsell chart) mainly composed of blocks of more or less cemented parental material; as a consequence, the percents of particles with diameter >2 mm in the surface soil (0-20 cm) were relatively high, varying from about 30 % to 70 %. By contrast, the last points of each transect had a clearly differentiated brownish gray A horizon (moist color: 5.5 R 3/1), about 20 cm depth, with a fine particular and earthy structure and very few blocks of parental residual material (5 to 20 % of particles >2 mm); the underlying C

horizon was dark reddish brown (moist color: 10R1/4) with a coarse particular structure and numerous spoil fragments.

Pedological analysis of the different samples were performed with the <2 mm fractions. The particle size distribution in all these sub-samples corresponded to a sandy texture (Table 4.1). The overall area was characterized (Table 4.2) by an alkaline pH (7.7 to 9.6), which was closely correlated ($R^2 = 0.94$) to a high carbonate content (3.7 to 19.1%). Total organic carbon was also relatively high (5.7 to 10.0%) while total nitrogen was uniformly low (0.1 to 0.2%), resulting in high C/N ratios (39.9 to 92.7). The cation exchange capacity ranged from 11.3 to 20.6 $\text{cmol}^+.\text{kg}^{-1}$.

Table 4.1: Particle size distribution (%) of the < 2mm soil fraction along the three transects of the studied area

Transect	Coarse sand	Fine sand	Coarse lime	Fine lime	Clay	Texture
	(2 – 0.2 mm)	(200 – 50 μm)	(50 – 20 μm)	(20 – 2 μm)	(< 2 μm)	
A	55.3 – 65.4	19.6 – 31.9	3.3 – 5.3	5.2 – 7.0	2.9 – 5.0	sandy
B	41.8 – 72.9	12.5 – 39.9	4.0 – 5.8	7.4 – 8.2	3.1 – 4.2	sandy
C	46.2 – 66.4	19.5 – 35.9	4.1 – 6.1	6.4 – 8.3	3.0 – 3.9	sandy

Table 4.2: Main physico-chemical characteristics of the studied soil samples

Transect	Sample	pH (H ₂ O)	CaCO ₃ (%)	Organic C (%)	C/N	CEC ($\text{cmol}^+.\text{kg}^{-1}$)
A	1	7.80	6.2	8.7	58.6	14.6
	2	8.16	8.2	8.9	56.4	18.9
	3	7.82	3.8	8.0	59.9	11.7
	4	8.00	4.7	7.	59.9	11.3
	5	7.90	4.1	8.9	51.1	12.4
	6	7.83	3.8	8.4	45.3	13.8
	7	7.90	4.0	7.3	44.3	14.4
	8	7.84	4.4	10.0	54.2	13.6
	9	7.83	3.8	8.6	51.5	13.7
	10	7.70	3.9	8.1	36.7	15.6
	11	7.83	4.0	8.4	53.5	16.0
B	1	8.34	8.4	9.0	70.1	14.9
	2	9.61	19.1	6.2	92.7	20.6
	3	8.09	8.2	7.3	58.2	13.4
	4	7.90	4.3	8.7	41.6	15.7
	5	8.04	5.8	9.2	43.8	14.0
	6	7.91	5.5	8.9	51.8	14.9
	7	8.13	6.1	9.0	58.6	14.0
	8	7.74	5.8	8.0	55.5	15.7
	9	7.69	5.0	8.4	48.5	14.8
	10	7.88	6.0	8.2	48.3	15.3
C	1	8.45	11.8	6.8	80.9	14.7
	2	8.53	12.1	5.7	73.3	12.7
	3	8.10	5.8	8.1	40.0	15.4
	4	7.88	4.4	7.4	43.8	14.3
	5	8.13	7.0	8.3	42.2	15.9
	6	8.01	6.5	8.5	46.5	15.9
	7	7.80	5.7	8.9	40.9	16.6

The bulk concentrations in major elements were also relatively similar in the different samples except for the B2 point, which was lower in K, Si and Fe, but higher in Ca (Table 4.3). Also, a few points such as B1 and B3 had respectively high Mn or Al concentrations.

Table 4.3: Concentrations (g kg⁻¹) of major elements in the studied soil samples

Transect	Sample	P	K	Ca	Mg	Si	Al	Fe	Na	Mn
A	1	0.5	8.4	44.3	7.2	245.5	47.6	74.1	3.0	4.6
	2	0.5	8.4	59.3	9.6	232.4	48.7	64.3	3.0	7.0
	3	0.5	7.7	27.9	6.6	274.0	48.7	72.0	2.2	3.9
	4	0.5	7.0	32.2	6.6	287.1	45.0	66.4	2.2	4.6
	5	0.4	8.4	27.2	6.6	283.8	43.9	60.1	2.2	3.1
	6	0.4	7.0	25.7	6.0	288.0	44.5	63.6	2.2	3.1
	7	0.6	7.7	27.2	6.6	284.3	45.0	67.1	3.7	3.9
	8	0.4	7.0	27.9	6.6	280.1	45.0	62.9	2.2	3.1
	9	0.4	7.0	23.6	6.0	284.7	43.9	57.3	2.2	3.1
	10	0.4	7.0	25.7	6.6	286.1	45.0	56.6	2.2	3.1
	11	0.4	7.0	25.7	6.0	290.4	44.5	59.4	2.2	3.1
B	1	0.5	8.4	68.6	12.1	219.8	51.4	63.6	2.2	11.6*
	2	0.3	4.9*	138.0*	10.9	178.1*	48.2	34.3*	2.2	3.1
	3	0.6	9.1	55.8	13.9	301.6	54.5*	79.0	3.0	5.4
	4	0.5	8.4	31.5	7.2	267.4	49.8	58.7	3.0	3.9
	5	0.4	7.0	34.3	7.8	266.0	43.4	69.2	2.2	3.1
	6	0.5	7.0	39.3	7.8	266.0	45.5	65.7	2.2	3.9
	7	0.4	7.7	38.6	7.8	268.4	46.1	62.9	2.2	3.9
	8	0.6	7.7	39.3	7.8	271.2	46.1	66.4	3.0	4.6
	9	0.4	7.0	30.7	7.2	276.3	45.0	57.3	3.0	3.1
	10	0.5	7.0	35.0	7.8	267.4	44.5	62.2	2.2	3.1
C	1	0.4	6.3	77.9	9.0	232.4	47.1	60.8	2.2	3.9
	2	0.5	7.0	62.2	13.9	246.9	45.0	65.0	3.0	7.0
	3	0.6	7.0	39.3	8.4	257.6	45.0	70.6	3.0	3.9
	4	0.5	7.7	30.0	6.6	277.3	47.1	67.1	3.7	3.1
	5	0.5	7.0	47.2	9.0	254.3	43.9	67.8	2.2	4.6
	6	0.4	7.0	42.9	8.4	253.9	44.5	69.2	2.2	4.6
	7	0.4	7.0	41.5	8.4	254.3	45.0	59.4	2.2	3.9

* Grubb's test, significant outlier at p = 0.05

IV.4.2 Heavy metal content and availability

The most obvious feature of the studied area was its high level of contamination by various heavy metals (Table 4.4). This polymetallic pollution was mostly due to Cr, Pb and Ni, whose concentration median values were respectively 1536 mg kg⁻¹, 835 mg kg⁻¹ and 308 mg kg⁻¹, but Zn and Cu were also detected in relatively high levels (respectively 302 mg kg⁻¹ and 183 mg kg⁻¹ for median values). As a general rule, the repartition of heavy metals was homogenous on the overall area with the exception of a few points, such as A1, B2 and C1, which showed a Pb concentration about 2 to 10 fold higher than in the other samples.

Table 4.4: Heavy metals concentrations (mg kg⁻¹) in the studied soil samples

Transect	Sample	Cr	Ni	Cu	Zn	Pb
A	1	1224	321	292	640*	8640*
	2	2286	207	238	545*	1081
	3	1407	291	221	303	928
	4	1645	290	198	308	933
	5	1310	297	170	304	719
	6	1345	319	178	316	823
	7	1315	311	183	355	813
	8	1465	361	180	301	897
	9	1058	291	169	299	706
	10	1200	297	178	294	773
	11	1213	317	183	277	753
B	1	1947	190	304	291	1525*
	2	1367	80*	259	245	7641*
	3	2331	288	174	334	660
	4	1364	290	165	302	804
	5	1426	416	197	300	712
	6	1639	316	184	298	831
	7	1840	305	180	307	784
	8	1914	345	255	330	972
	9	1317	326	177	286	731
	10	1518	305	172	284	745
C	1	1554	249	175	257	3960*
	2	2488	243	178	280	990
	3	1754	367	195	288	925
	4	1809	402	160	268	680
	5	1805	334	204	335	848
	6	1666	347	220	410	1457*
	7	1727	320	196	321	841

* Grubb's test, significant outlier at p = 0.05

Heavy metal potential availability was assessed with the two steps procedure proposed by Maiz *et al.* (2000). This method yields two aqueous solutions, which are assumed to contain respectively the “mobile” and “mobilisable” fractions of metals. Data were expressed as percentages of the different fractions with respect to the total amount in the soil. Results (Table 4.5) showed that metals were virtually insoluble in the first extraction solution. Indeed, whatever the metal considered, the mobile fraction was almost equal to zero (< 0.15 %). However, the “mobilisable” fraction contained much higher metal concentrations, indicating that metals were not wholly insoluble. More precisely, metal potential mobility was clearly element-dependent: in the soil we studied, Pb was the most labile metal (up to 35 % of total content found in the mobilisable fraction), while Cr was almost insoluble (< 0.004 % found in the mobilisable fraction).

Table 4.5: Heavy metal potential availability (expressed in percent of the total metal content \pm standard deviation) in the studied area. Each value represents the arithmetic mean of the 28 sampling points

Metal	mobile (% \pm SD)	mobilisable (% \pm SD)
Cr	0.0014 \pm 0.0005	0.0025 \pm 0.0014
Ni	0.053 \pm 0.081	1.87 \pm 0.80
Zn	0.013 \pm 0.026	2.74 \pm 0.82
Cu	0.136 \pm 0.051	5.49 \pm 1.91
Pb	0.008 \pm 0.007	23.94 \pm 9.88

IV.4.3 Plant communities and heavy metal phytoaccumulation

Botanical examination of the studied area resulted in 28 species and 11 families (Table 4.6). Most of these species were perennial forbs and grasses belonging to the *Asteraceae* and *Poaceae*. There were also a few trees, particularly a well-developed black locusts (*Robinia pseudoacacia*) community. Despite this taxonomic diversity, the vegetation cover was not uniform and, inside each quadrant, the covered ground surface, the number of taxa and the type of dominant species were rather variable. In fact, on a botanical basis, the studied area was clearly divided into two distinct zones: the first one covered the 3 to 4 first points of each transect and was characterized by a more or less important vegetation (from 5 % to 100 % of ground cover), mainly dominated by Canadian bluegrass (*Poa compressa*), orchardgrass (*Dactylis glomerata*) and lemon thyme (*Thymus pulegioides*). The second zone corresponded to the rest of the studied area and was characterized by a dense vegetation cover (close to 100 % ground cover) mainly dominated by black locust and wheatgrass (*Elytrigia campestris*).

Table 4.6: Taxonomical survey of the vegetation of the study area

Family	Species	Life-form	
<i>Apiaceae</i>	<i>Daucus carota</i> L.	Biennial forb	
<i>Asteraceae</i>	<i>Achillea millefolium</i> L.	Perennial forb	
	<i>Artemisia campestris</i> L.	Perennial forb	
	<i>Chondrilla juncea</i> L.	Biennial forb	
	<i>Crepis foetida</i> L.	Annual forb	
	<i>Hieracium pilosella</i> L.	Perennial forb	
	<i>Taraxacum</i> sp.	Perennial forb	
	<i>Tragopogon dubius</i> Scop.	Perennial forb	
	<i>Arenaria serpyllifolia</i> L.	Annual forb	
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	Annual forb	
	<i>Cornus sanguinea</i> L.	Tree	
<i>Cornaceae</i>	<i>Medicago lupulina</i> L.	Biennial forb	
<i>Fabaceae</i>	<i>Melilotus albus</i> Medik.	Biennial forb	
	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Tree	
<i>Hypericaceae</i>	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Perennial forb	
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus pulegioides</i> L.	Perennial forb	
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Perennial forb	
<i>Poaceae</i>	<i>Agrostis stolonifera</i> L.	Perennial grass	
	<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. Beauv. ex J.Presl. & C. Presl.	Perennial grass	
	<i>Dactylis glomerata</i> L.	Perennial grass	
	<i>Elytrigia campestris</i> (Godr. & Gren.) Kerg. ex Car.	Perennial grass	
	<i>Festuca ovina</i> L.	Perennial grass	
	<i>Poa compressa</i> L.	Perennial grass	
	<i>Poa pratensis</i> L.	Perennial grass	
	<i>Vulpia ciliata</i> Dumort.	Annual grass	
	<i>Rosaceae</i>	<i>Rosa canina</i> L.	Shrub
	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	Perennial forb
<i>Veronica arvensis</i> L.		Annual forb	

Heavy metal accumulation by the site's vegetation was checked by measuring metal concentrations in leaves and roots (when possible) from the 7 dominant species taken in various quadrants. Results are shown in Table 4.7. In leaves, the average metal contents were 33.5 mg kg⁻¹ for Zn, 9.5 mg kg⁻¹ for Cu, 4.0 mg kg⁻¹ for Ni, 2.7 mg kg⁻¹ for Pb, and 1.1 mg kg⁻¹ for Cr. As a general trend, root metal concentrations were slightly higher for all metals but Zn, with a mean of 31.8 mg kg⁻¹ for Zn, 12.7 mg kg⁻¹ for Cu, 5.4 mg kg⁻¹ for Ni, 5.1 mg kg⁻¹ for Pb, and 2.0 mg kg⁻¹ for Cr. However, differences between roots and leaves metal contents were not significant (Mann & Whitney test, $p > 0.05$ regardless of the considered metal). This indicates that, in this plant community, metal concentrations were in equilibrium between roots and leaves. Consequently, leaf metal contents were a good reflection of the actually accumulated metals in roots, *i.e.* of metal phytoavailability.

Table 4.7 Heavy metal concentrations in leaves and roots from dominant species taken at different points of the study area

Species ^a	Localization	Metal content in leaves (mg kg ⁻¹)					Metal content in roots (mg kg ⁻¹)				
		Cu	Zn	Pb	Ni	Cr	Cu	Zn	Pb	Ni	Cr
<i>A. millefolium</i>	A1	5.6	11.3	1.3	1.2	1.1	6.4	9.8	4.8	3.1	# 0
	A2	5.8	10.3	1.8	1.2	# 0	5.7	8.7	4.4	1.5	1.1
	B4	7.2	28.3	2.6	3.8	0.6	ND	ND	ND	ND	ND
	B8	10.1	31.2	3.3	2.5	0.8	ND	ND	ND	ND	ND
	C3	12.8	27.5	1.6	2.6	0.5	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. juncea</i>	A1	24.1	66	14.6	8	4.5	30.1	76.4	3.4	6.0	1.2
	A3	9.5	60.7	1.1	4.1	1.0	ND	ND	ND	ND	ND
	A5	13.9	63.9	1.3	2.4	0.7	ND	ND	ND	ND	ND
	B10	21.3	55.9	1.2	7.4	1.5	28.6	51.8	11.4	24.9	5.7
<i>D. glomerata</i>	C5	4.4	14.5	1.9	1.7	0.8	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. campestris</i>	A4	6.5	25.3	1.8	1.4	1.2	11.0	44.9	5.8	3.6	2.7
	A6	5.3	20.4	2.5	1.6	1.6	8.3	33.3	4.4	3.0	1.5
	A11	4.5	18.2	1.2	1.4	1.5	5.2	17.3	1.7	1.5	1.6
	B5	5.5	19.5	0.9	1.0	1.1	ND	ND	ND	ND	ND
	B9	4.4	15.5	1.2	1.1	1.5	ND	ND	ND	ND	ND
	C4	4.0	17.9	1.4	1.4	1.9	ND	ND	ND	ND	ND
<i>H. pilosella</i>	C5	5.1	12.5	1.2	1.1	# 0	4.5	19.8	1.1	1.1	1.0
	A2	8.4	23.5	4.0	2.8	# 0	14.3	24.6	9.2	3.6	2.9
	C4	19.0	42.9	4.6	4.0	1.3	ND	ND	ND	ND	ND
<i>R. pseudoacacia</i>	C5	10.3	35.6	4.6	3.4	1.3	ND	ND	ND	ND	ND
	A4	7.6	30.4	0.9	6.8	# 0	ND	ND	ND	ND	ND
	B4	11.4	67.4	0.4	14.1	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
<i>T. pulegioides</i>	C7	15.5	67.6	0.6	19.4	0.7	ND	ND	ND	ND	ND
	A2	7.3	31.5	5.2	2.6	1.4	ND	ND	ND	ND	ND
	C3	8.0	38.6	7.6	3.3	2.1	ND	ND	ND	ND	ND

a See Table 4.6 for full name

However our results also suggest that, independently of the soil metal content, the different plant species present on the site had varying abilities to take up and accumulate metals (Kruskall-Wallis test, using leaves data and excluding *D. glomerata* and *T. pulegioides* because of the lack of replicates, $p < 0.05$; except for Cr, $p = 0.09$). For instance in *C. juncea* the Zn, Cu and Ni contents were 3 to 5 times higher than in *E. campestris*, whatever the soil metal content.

IV.5 DISCUSSION

In the present study we analyzed a highly disturbed soil at a former landfill used for several decades by an iron and steel plant and abandoned since about fifty years. The most obvious feature of this soil formed by human activities, was the presence of relatively high levels of heavy metals such as chromium ($>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ and up to 2500 mg kg^{-1}), nickel ($>80 \text{ mg kg}^{-1}$ and up to 420 mg kg^{-1}), copper ($>150 \text{ mg kg}^{-1}$ and up to 300 mg kg^{-1}), lead ($>650 \text{ mg kg}^{-1}$ and up to 8600 mg kg^{-1}), manganese ($>3000 \text{ mg kg}^{-1}$ and up to 11600 mg kg^{-1}) and, in a lesser extend, zinc ($>240 \text{ mg kg}^{-1}$ and up to 640 mg kg^{-1}). These metal concentrations were largely above those measured in natural unpolluted French soils (Baize, 2000), confirming a very important polymetallic pollution. Other characteristic features of the studied site were a lack of clear horizonation, a sandy texture, an alkaline pH (> 7.7), a high carbonate content, a relatively high level of organic carbon and a very low nitrogen content, resulting in an unusually high C/N value. Although the reason of such a high C/N ratio is unclear, this could be due to the presence of coke remains and/or hydrocarbon contaminants; this also could suggest poor humification of organic matter, which might be due to low or disturbed soil microbial activity. Interestingly these general characteristics concerning both elemental and chemical composition were also noticed (Buondonno *et al.*, 1998; Venditti *et al.* 2000 a) for other soils of comparable origin. In order to define a clear taxonomic classification for these unusual anthropogenic soils, Buondonno *et al.* (1998) proposed to include them in the order of Entisols and to adopt the foundric subgroup, as a new class of the Xerorthent great group.

In fact, in a few countries regulatory levels concerning soil contamination with heavy metals have yet been established. In Europe for instance, the Dutch guideline proposes a simple formula to calculate the “intervention value” (Netherlands Government Gazette, 2000), that is the maximum tolerable concentration above which remediation is required. For the soil we studied, which had an average of 4% clay and 8% organic matter, these trigger values should be 387 mg kg^{-1}

for Pb, 380 mg kg⁻¹ for Zn, 220 mg kg⁻¹ for Cr, 117 mg kg⁻¹ for Cu and 84 mg kg⁻¹ for Ni. Thus, according to the Dutch regulation the site presented in this study has to be considered as highly polluted and should be cleaned up.

However, in France and in other European countries the regulation is slightly different and remediation works are only carried out when a site poses a risk for human health, water resources or other known targets. Consequently according to this general guideline, an accurate risk assessment must be performed in a case by case approach taking into account not only total concentrations of heavy metals but also their actual mobility.

In our study we used the two step protocol of Maiz *et al.* (2000) to evaluate the most labile forms of heavy metals; using this method we showed that the mobile fractions (extracted with CaCl₂) were insignificant while the mobilisable fractions (extracted with DTPA) were largely element-dependent (from about 24 % of total content for Pb to about 2 % for Ni, and almost 0 for Cr). Using a slightly different extraction protocol, Venditti *et al.* (2000 a) also showed that heavy metals of a siderurgical soil were poorly soluble in water when pH was kept between 6.6 and 7.6; however when they used acidic water (pH 4.5) they obtained an immediate leaching of Cr(VI) whose concentration exceeded the French regulation concerning land filling criteria. Finally, using a third extraction procedure (16 h shaking in 0.1 M acetic acid), Adamo *et al.* (2002) showed that no Cr, Ni, Pb and Cu were present in soluble and exchangeable forms; however they found a significant amount of Zn (>20 % of total content) in the extraction solution.

Thus, although various leaching experiments may lead to the release of different elements, it can be concluded that solubilization of heavy metals from foundric soils is very low under normal neutral conditions but could occur in the presence of chelating agents or after acidification. However because foundric soils are characterized by an alkaline pH and a high carbonate content, they have a strong buffering capacity and it is very unlikely that, under natural conditions, a significant acidification can be achieved. Consequently, although these soils contain very high levels of potentially toxic heavy metals, contaminants can be considered as quite insoluble and their leaching toward ground water due to rainfalls is probably very low.

However, even though metals from foundric soils are poorly leachable, their vertical transfer to above ground vegetation cannot be ruled out. Indeed it is well known that plants can modify metal solubility (McLaughlin *et al.*, 2000; Ge *et al.*, 2000), notably through exudates release and/or modification of soil microbial activity. Consequently, results of sequential extraction

procedures are not inevitably correlated with the levels of heavy metals actually accumulated in plants. Thus determination of metal phytoavailability should be considered in an accurate risk assessment strategy.

In the present study plant metal content varied between species but, whatever the analyzed metal, the highest accumulation levels were measured in skeleton weed, which showed a maximum of 4.5 mg kg⁻¹ Cr, 8.0 mg kg⁻¹ Ni, 14.6 mg kg⁻¹ Pb, 24.1 mg kg⁻¹ Cu and 66.0 mg kg⁻¹ Zn in aerial parts. However, a comparison of these values with known (Kabatias-Pendias and Pendias, 1992; Markert, 1993; Harada and Hatanaka, 2000) background levels of trace elements in plants growing in natural environments, indicates that skeleton weed had quite normal foliar concentrations for Cu and Zn, while Pb, Ni and Cr were just slightly above normal levels. In all the other analyzed species, leaf metal concentrations were not higher than normal background levels, except for black locust, which was slightly higher in Ni. Thus it can be assumed that metals present in our foundric soil are poorly phytoavailable and that their transfer to above ground plant parts doesn't represent a major route of scattering.

Nonetheless, demonstrating that heavy metals are neither leachable nor phytoavailable doesn't mean that pollutants are immobilized and pose no hazard for environment and human health. Indeed the possibility remains of horizontal spreading of metal-rich particles due to mechanical erosion and human activities. In the case of metallurgical landfills, because proper reclamation is technically and economically unrealistic, erosion control could be efficiently achieved by phytostabilization (Wong, 2003), *i.e.* establishing an overall and self-sustainable vegetation cover. In this respect, plant species able to grow on metallurgical soil without metal accumulation should be used. Thus, characterization and cultivation of indigenous plant communities could be an efficient and time-saving approach to establish a "green cover", made of species well suited to cope with local conditions, in a ecologically-sound phytostabilization system.

IV.6 REFERENCES

Adamo, P., Arienzo, M., Bianco, M.R., Terribile, F., Violante, P., 2002. Heavy metal contamination of the soil used for stocking raw materials in the former ILVA iron-steel industrial plant of Bagnoli (southern Italy). *The Science of the Total Environment* 295, 17-34.

- AFNOR, 1999. Recueil de normes : Qualité des sols. Association Française de Normalisation, AFNOR (Ed.), Paris.
- Baize, D., 2000. Teneurs totales en "métaux lourds" dans les sols français - Résultats généraux du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 39, 39-54.
- Bock, B., 2003. Base de données nomenclaturales de la Flore de France, BDNFF-V3.02. (After Kerguelen, M., *Index Synonymique de la Flore de France*, 1999). Tela Botanica, Montpellier. <http://tela-botanica.org/eflore>
- Buondonno, C., Ermice, A., Buondonno, A., Murolo, M., Pugliano, M.L., 1998. Human-influenced soils from an iron and steel works in Naples, Italy. *Soil Sciences Society American Journal* 62, 694-700.
- Cobb, G.P., Sands, K., Waters, M., Wixson, B.G., Dorward-King, E., 2000. Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 600-607.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Chlopecka, A., Witek, T., 1995. Trace metal contamination of soils and crop plants by the mining and smelting industry in Upper Silesia, South Poland. *Journal of Geochemical Exploration* 52, 237-250.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Terelak, H., 1996. Transfer of cadmium, lead, and Zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environmental Pollution* 94, 181-188.
- Ernst, W.H.O., 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Ge, Y., Murray, P., Hendershot, W.H., 2000. Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution* 107, 137-144.
- Gimmler, H., Carandang, J., Boots, A., Reisberg, E., Voitke, M., 2002. Heavy metal content and distribution within a woody plant during and after seven years continuous growth on municipal solid waste (MSW) bottom slag rich in heavy metals. *Journal of Applied Botany* 76, 203-217.
- Harada, H., Hatanaka, T., 2000. Natural background levels of trace elements in wild plants: variation and distribution in plant species. *Soil Sciences and Plant Nutrition* 46, 117-125.

- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1992. Trace elements in soils and plants. 2nd CRC press, Boca Raton, FL.
- Kramer, P.A., Zabowski, D., Scherer, G., Everett, R.L., 2000. Native plant restoration of copper mine tailings: I. Substrate effect on growth and nutritional status in a greenhouse study. *Journal of Environmental Quality* 29, 1762-1769.
- Maiz, I., Arambarri, I., Garcia, R., Millan, E., 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental Pollution* 110, 3-9.
- Markert, B., 1993. Occurrence and distribution of chemical elements in plants - Outlook and further research plans. *Toxicological and Environmental Chemistry* 40, 31-41.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communication in Soil Sciences and Plant Analysis* 31, 1661-1700.
- Netherlands Government Gazette, 2000. Circular on target values and intervention values for soil remediation: DBO/1999226863.
- Olson, P.E., Fletcher, J.S., 2000. Ecological recovery of vegetation at a former industrial sludge basin and its implications to phytoremediation. *Environmental Sciences and Pollution Research* 7, 195-204.
- Stoltz, E., Greger, M., 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb d Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* 47, 271-280.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals. In: *situ metal immobilization and revegetation*. *Environmental Pollution* 87, 51-59.
- Venditti, D., Durécu, S., Berthelin, J., 2000a. A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks and remediation feasibility of soils contaminated by metallurgical activities. Part A: Chemical and physical properties of metals and leaching ability. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38, 411-420.

Venditti, D., Berthelin, J., Durécu, S., 2000b. A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks and remediation feasibility of soils contaminated by metallurgical activities. Part B: Direct metal speciation in the solid phase. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38, 421-427.

Welch, R.M., 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14, 49-82.

Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775-780.

Zarcinas, B.A., Cartwright, B., Spouncer, L.R., 1987. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Communication in Soil Sciences and Plant Analysis* 18, 131-146.

CHAPITRE V

LA VÉGÉTATION DE TROIS CRASSIERS : APPROCHE PHYTOSOCIOLOGIQUE ET OUTIL DE DIAGNOSTIC

Natural vegetation recovery on three metallurgical waste deposits: suitability of plants as bioindicators of heavy metal pollution and their potential use in phytorestoration strategies

E. Remon, B. Cornier, J. Joly, J-L. Bouchardon, O. Faure

Article soumis dans la revue The Science of the Total Environment

V.1 ABSTRACT

Natural spontaneous vegetation on three former metallurgical foundry waste landfills was studied in order to assess the suitability of plants in bioindication and phytorestoration strategies. A comprehensive botanical survey complemented by a phytosociological approach was performed and heavy metal concentrations in some representative species were analysed. Considering measurements of ammonium acetate-EDTA extractable fractions, using a standardized procedure, metals were highly “phytoavailable”, particularly for Cu and Pb, whereas mean leaf metal accumulations in native vegetation were no more important than a reference plant growing in uncontaminated environments, except for Ni. Thus, it can be concluded that, in opposition with chemical estimation, metal phytoavailability was low despite very high total levels. Although poor phytoavailable metal levels were demonstrated, metallurgical waste deposits had clearly an impact on the structure of plant communities. Phytosociological relevés performed on the metallurgical sites evidenced four quite unusual well-marked major vegetation group whose three of them had never been described. These associations can be a useful tool for designing plant communities adapted to metalliferous wastes. Consequently, this vegetation can be very effective in phytostabilisation strategies and sustainable land management.

V.2 INTRODUCTION

Since the industrial revolution, metallurgical industries have been a major source of heavy metals input into the environment (Alloway, 1995a). Indeed, beside emissions of fumes and dusts

contaminating surrounding areas, the production of steels and alloys is generating large amounts of foundry wastes containing high levels of toxic metals. Until recent years, metallurgical wastes were simply disposed of into vast open landfills which often extended over several hectares. Today, regulation in most European countries does not allow waste disposal into open areas and many ancient landfills have been abandoned. With time, these foundry waste deposits have been colonized by a number of plant species, resulting in the progressive formation of metalliferous topsoil (Buondonno *et al.*, 1998; Remon *et al.*, 2005), enriched in various heavy metals. Despite restoration of plant cover, such brownfield sites are potential sources of pollution toward local environment; it is thus necessary to accurately assess their risks and to propose adapted reclamation methods. In this respect, plants could have a great interest both as indicators of the hazard of contaminated soils (Fränzle, 2006), and as efficient reclamation tools (Tordoff *et al.*, 2000).

The main issue to be addressed when studying metal-polluted sites is to know whether contaminants pose a risk to human health, *i.e.* are the pollutants can be transferred to the food chain? This question is however very difficult to answer, because heavy metal mobility depends on multiple factors (Alloway, 1995b), such as the type of metals, their concentration, and the soil's parameters (pH, redox potential, level of organic matter...). During the last two decades, a number of chemical extraction methods (Mc Laughlin *et al.*, 2000) have been developed for assessing metal potential mobility. Basically, these methods are using more or less strong extractants, either in a single step protocol (Beckett, 1989; Houba *et al.*, 1990) or in a sequential fractionation procedure (Teissier *et al.*, 1979; Quevaullier *et al.*, 1997). However, although these approaches have brought important data about factors governing metal interactions with soil particles, extractable metals rarely correlate with bioavailability (Mc Laughlin *et al.*, 2000), *i.e.* metal fraction actually interacting with living organisms. Consequently, chemical extraction procedures seldom permit predictions about the biological accumulation of metals, and the development of complementary methods to evaluate metal bioavailability remains necessary. In this perspective, measurement of metal concentration in above-ground parts of selected plants could be an interesting alternative. In fact, some species have yet been proposed as indicators of soil pollution, *e.g.* Dandelion (Kuleff and Djingova, 1984), Sheperd's purse (Aksoy *et al.*, 1999) or White poplar (Madejon *et al.*, 2004). However the usefulness and accuracy of plants as accumulation indicators is still debated (Mertens *et al.*, 2005) and needs further investigations in various field situations.

The second question regarding polluted soils is to know whether contaminants have an impact on local ecosystem. In this respect it is obvious that studying plant communities living in the

polluted environment could be very helpful. In fact, it is known since a long time that the presence or absence of certain species or plant associations (Braun-Blanquet, 1964) can be good indicator of edaphic constraints, as high metal levels (Brooks, 1983). In Western Europe, some authors have described the vegetation of natural metalliferous soils resulting from the mineralization of near-surface ore bodies, e.g. “calamine” soils in Belgium and Germany, and “serpentine” outcrops in France. These studies led to the identification of characteristic “metallicolous” associations, like the *Violetum calaminariae* and the *Thlaspio-Armerietum plantaginae* (Ernst, 1976). By contrast, this approach has been largely disregarded to investigate the biological impact of recent soil pollutions resulting from human activities. In France, one plant association has been linked to anthropogenic metal pollution (Bardat *et al.*, 2004). That is the *Armerietum halleri*, which forms characteristic grasslands in areas surrounding metallurgical industries in the “Nord-Pas de Calais” region. To our knowledge this association, whose representative species are *Armeria maritima* subsp *halleri* and *Arabidopsis halleri*, is the only one to be considered as bioindicator of anthropogenic heavy metal pollution. Thus, although there is no doubt that recent metal contaminations can have a visible impact on the local flora, available data are still too scarce to use plants as effect indicators in routine procedures.

Last, in addition to their potential use in bioindication, it is important to get a better knowledge of primary plant successions under extreme edaphic conditions. This should led to the identification of plant species (Gemmell, 1977) capable to colonize highly polluted soils, which could be used to achieve or accelerate sustainable phytorestitution of depredated industrial lands in ecological restoration strategies (Bradshaw, 1983; Bradshaw, 1997).

In this work, we studied the vegetation recovery at three former metallurgical landfills. Owing to the high heavy metal concentration of these anthropogenic soils we hypothesized that a specific flora could mark these unusual environments. To check this hypothesis we performed a comprehensive botanical survey complemented by a phytosociological approach, and we analyzed heavy metal concentrations in some representative species. Results are discussed in relation with plant bioindication and phytorestitution strategies.

V.3 MATERIAL AND METHOD

V.3.1 Sites description

Three former metallurgical foundry waste landfills of different oldness were studied. The first one (“Dor” site) was situated near Saint-Etienne (Loire, France); it extended over approximately 2 ha and showed a dense plant cover with many trees and bushes. Although we didn’t have precise historical data about this site, we assumed it was abandoned since more than 60 years. The second landfill (“Lay” site) was located in the same commune, about 5 km apart; it was used from about 1916 to the beginning of the fifties and was since abandoned. The whole area extended over 4.5 ha and showed a relatively homogenous vegetation cover with grasses, shrubs and trees. The third landfill (“Usi” site) was located near Lyon (Rhône, France); it was just behind a steel and iron factory which was still in activity. The site was used from about 1850 to 2001, and extended over 15 ha. The vegetation cover on this site was not homogenous: some areas were still periodically disturbed by engine traffic and were not or very scarcely colonized by plants, while other areas were undisturbed since several years and showed quite high plant diversity.

The three sites were in the hill level, under a temperate continental climate. Mean annual temperature was 10°C, with minimal and maximal values ranging from -26°C to +41°C. Yearly precipitation averages were 750 mm.

V.3.2 Soil analyses

For each site, 12 to 19 soil samples (taken at 0 to 20 cm depth) were collected at random locations. Samples were dried at 60 °C for 48 h and sieved to 2 mm before analyses.

Measurements of pH values were carried out in deionized water with a soil: water ratio of 1:2 following the NF ISO 10390 procedure (AFNOR, 1999a). Metal extraction was performed with aqua regia according to the NF X 31-151 procedure (AFNOR, 1994) for “total fraction”, and with ammonium acetate–EDTA according to the NF X 31-120 procedure (AFNOR, 1999b) for “phytoavailable fraction”.

Concentrations of heavy metals in various extracts were measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Jobin-Yvon JY24 apparatus as previously described (Remon *et al.*, 2005). Limits of detection were 0.06, 0.14, 1.17, 2.05, 2.38 and 15.51 µg l⁻¹

¹ for Zn, Cd, Cr, Cu, Pb and Ni, respectively. To check the analytical precision, randomly chosen samples (about 20% of the total number) were measured in triplicate. The relative standard deviation was routinely between 1 and 8%, and never higher than 10%. During the overall process of sample preparation and analysis, special care was taken to minimize contaminants from air, glassware and reagents, which were all of analytical grade.

V.3.3 Plant analyses

For every prospected site, metal concentration in leaves of 8 to 10 dominant plant species was measured. Specimens of each species were collected from 10 randomly chosen locations over the study sites, resulting in a total of 80 to 100 leaf samples from each site.

Plants samples were thoroughly washed in tap water and rinsed three times with distilled water. They were then dried at 40°C to constant weight and ground to pass a 2 mm sieve. Metal extraction was performed by digestion using hot HNO₃, according to Zarcinas *et al.* (1987). The concentration of metals in various extracts was measured by ICP-OES as described above.

Accumulator or excluder species were identified using the extreme studentized deviate method (Grubb's test) for the detection of outliers. Comparisons of heavy metal accumulation in plants from the different sites were performed by one way ANOVA, followed when necessary by post-hoc comparisons (Scheffé procedure) and Student's t-test. All calculations were made using Statistica V6.1 software (StatSoft). Differences were considered significant for $p < 0.05$.

V.3.4 Phytosociological study

The phytosociological survey was carried out according to the sigmatist method (Braun-Blanquet, 1964) on floristically homogeneous areas. The study was based on 38 relevés scored during the period of optimal vegetation, *i.e.* in May and June 2006. Taxons were named according to the nomenclatural database of the French flora (Bock, 2003), after identification with standard botanical procedures. The contribution of every species in the different relevés was assessed using the abundance/dominance coefficient (Géhu and Rivas-Martinez, 1981; Géhu, 1986), determined by an ocular estimate of percent aerial cover and number of individuals. Syntaxons were then named following the rules of the third edition of the international code of phytosociological nomenclature (Weber *et al.*, 2000).

V.4 RESULTS

V.4.1 Heavy metal concentrations in metallurgical soils

Median pH values and heavy metal concentrations in the studied sites are given in table 5.1. An overview of these results shows that the three metallurgical soils had similar characteristics. They had basic pH, and were highly contaminated with various heavy metals. Regarding total metal concentrations, the most abundant contaminant was Cr, which peaked to more than 1600 mg kg⁻¹ on the “Dor” site. At the opposite the less abundant metal was Cd, whose concentration was 14 mg kg⁻¹ on “Usi”, but which did not exceeded 1 mg kg⁻¹ on the two other sites. In fact, globally the “Usi” site was much higher in Cd and slightly higher in Pb, Cu and Zn than the two other sites. On the other hand the “Dor” site was slightly higher in Cr and Ni, while the “Lay” site was the less contaminated.

Table 5.1: pH and heavy metal concentrations (total¹ and “phytoavailable”² fractions) in three metallurgical dumps (median values; n=19, n=15 and n=12 for Usi, Lay and Dor respectively)

Sites	pH	Fraction	Metals (mg kg ⁻¹)					
			Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Lay	7.90	Total	0.86	305	158	260	581	208
		« phytoavailable »	0.22	0.02	29	3	298	85
Dor	8.25	Total	0.33	1623	208	1357	178	298
		« phytoavailable »	0.20	0.09	25	9	88	29
Usi	8.10	Total	14	1393	501	754	601	1151
		« phytoavailable »	0.58	0.26	39	4	109	156

1 Extracted with aqua regia

2 Extracted with ammonium acetate-EDTA

When the “phytoavailable” fractions were considered metal concentrations followed the order Pb>Zn>Cu>Ni>Cd>Cr except in the “Usi” site where Zn was slightly higher than Pb. With respect to “phytoavailable” metals, the most contaminated site was “Usi” which was higher in Zn, Cu, Cd and Cr, than the two other sites. On the other hand the “Dor” site was higher in Ni and the “Lay” site was higher in Pb.

V.4.2 Heavy metal accumulation by plants

To check whether plants growing on metallurgical landfills could be good indicators of metal potential mobility, we analyzed metal concentrations in leaf samples of the most abundant species found on each site. For every selected species ten independent samples were analyzed, and the median value was estimated (Table 5.2).

Table 5.2: Heavy metal concentrations in leaves of dominant plant species taken on three metallurgical dumps (median values; n=10)

Sites	Species	Metals (mg kg ⁻¹)					
		Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Lay	<i>Acer platanoides</i>	0.05	0.73	4.17	0.81	0.14	14.32
	<i>Artemisia campestris</i>	0.22*	0.99	9.29*	1.61	0.46*	24.54
	<i>Cornus sanguinea</i>	0.06	0.31	1.69	0.32	0.11	12.14
	<i>Crataegus monogyna</i>	0.06	1.73	3.25	0.46	0.09	21.24
	<i>Elytrigia campestris</i>	0.06	1.60	2.05	0.32	0.15	12.51
	<i>Galium aparine</i>	0.06	1.26	2.66	0.52	0.22	20.97
	<i>Melilotus albus</i>	0.08	0.77	4.00	1.86	1.19*	18.62
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	0.04	4.52	4.72	4.52*	0.02	31.05
	<i>Rubus sp.</i>	0.05	3.66	4.95	0.93	0.04	24.34
	<i>Vicia sativa</i>	0.05	0.70	3.22	1.69	0.20	25.38
Dor	<i>Clematis vitalba</i>	0.08	0.53	6.50	5.53*	0.05	27.64
	<i>Hedera helix</i>	0.26*	1.86	2.87	1.54	0.24	44.27
	<i>Acer platanoides</i>	0.07	0.23	3.23	0.96	0.06	19.21
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	0.05	0.56	4.66	11.84*	0.02	25.20
	<i>Rubus sp.</i>	0.07	1.74	3.39	1.63	0.04	17.70
	<i>Taxus baccata</i>	0.06	0.72	1.28	1.68	0.16	30.15
	<i>Chelidonium majus</i>	0.05	0.71	2.87	0.90	0.01	15.95
	<i>Geranium pyrenaicum</i>	0.08	0.71	3.34	0.95	0.14	15.89
Usi	<i>Ailanthus altissima</i>	0.02	0.44	11.60	33.43	0.53	48.60
	<i>Populus nigra</i>	0.54*	0.96	10.36	5.31	0.48	129.93
	<i>Lactuca virosa</i>	0.29	1.01	16.23	10.80	1.28	122.59
	<i>Melilotus albus</i>	0.20	0.95	11.56	33.50	1.10	50.60
	<i>Oenothera biennis</i>	0.03	2.02	10.92	30.43	1.41	88.39
	<i>Plantago arenaria</i>	0.13	3.06	21.64	3.51	1.72	551.16*
	<i>Reseda lutea</i>	0.20	2.58	8.71	4.02	1.25	40.48
	<i>Scrophularia canina</i>	0.12	4.32	10.22	41.66	2.42	42.42
	<i>Verbascum densiflorum</i>	0.04	8.70*	14.12	11.04	3.59	59.25

* Grubb's test, significant outlier at p=0.05

As a general rule, leaf metal concentrations were closely comparable from one species to the other on a given site. However a few species were distinguished because of their higher concentration in one or several metals. Because we used a randomized sampling design to collect leaf samples of each species, it was very unlikely that differences in leaf metal concentrations between species resulted from differences in soil metal contents. Consequently we considered those

species as outliers (Table 5.2, marked values), and we did not use them to assess metal transfer toward the “plant compartment”.

Taken as a whole, results showed that Cd, Pb and Cr were slightly accumulated in plants: their average leaf concentrations were 0.08, 0.62 and 1.49 mg kg⁻¹ respectively. On the other hand, average leaf concentrations in Cu, Ni and Zn were much higher, with respective values of 6.7, 7.9 and 37.8 mg kg⁻¹.

For each studied site, mean leaf metal concentration in native vegetation were calculated and compared with literature data about plants growing in uncontaminated environments (Table 5.3). Results showed that plants from the “Lay” and “Dor” sites had similar metal concentrations which were not higher than those of the “reference plant”. Plants originated from the “Usi” site had generally higher metal concentrations than those from “Lay” and “Dor”, but these differences were not significant for Cd and Cr. In fact, with regard to reference plant, concentrations in Cd, Cr and Pb in the “Usi” vegetation were quite normal. However, when Cu, Ni and Zn were considered, plants from the “Usi” site had significantly higher metal concentration than plants from “Lay” and “Dor” sites and than reference plant. This was particularly marked for Ni, whose mean value was about 13-fold higher than in normal plant.

Table 5.3: Mean heavy metal concentrations in plants from three metallurgical dumps (Lay, Dor and Usi) as compared with reference plant growing in uncontaminated environment

Plant origin	Metals (mg kg ⁻¹)					
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Lay	0.06 ^a	1.63 ^a	3.41 ^a	0.95 ^a	0.12 ^a	20.51 ^a
Dor	0.07 ^a	0.88 ^a	3.52 ^a	1.28 ^a	0.09 ^a	24.50 ^a
Usi	0.13 ^a	1.92 ^a	12.82 ^{b*}	19.30 ^{b**}	1.53 ^b	72.78 ^{b*}
Reference plant ¹	0.08	1.50	8.90	1.50	0.84	40.60

¹ values from Markert (1992) and Harada and Hatanaka (2000)

a,b values followed by different letter in a same column are significantly different at p=0,05

* values above reference plant at p=0,05 or ** at p=0,01

V.4.3 Plant diversity and phytosociological groups growing on metallurgical soils

Phytosociological relevés performed on the metallurgical sites evidenced three well-marked major types of vegetation: pioneer associations (Table 5.4), grassland associations (Table 5.5) and forest associations (Table 5.6).

Typical association of pioneer plants was only found on the “Usi” site (Table 5.4). Only one such pioneer association was identified: it was the *Echio vulgaris-Melilotetum albi* Tuxen 1942, from the class *Artemisietea vulgaris*. This association, whose characteristic species were *Melilotus albus*, *Lactuca serriola*, *Echium vulgare* and *Oenothera biennis*, includes mostly hemicryptophytic, thermophilous, nitrophilous and ruderal plants colonizing open-area with coarse or sandy anthropogenic substrata. It must be noticed that the *Echio-Melilotetum* association found on the “Usi” site was dominated by *Plantago arenaria* which was a transgressive species from the *Sisymbrietea officinalis*. Consequently, *P. arenaria* must be considered as a differential species marking a local sub-association. Interestingly we also noticed the presence of *Atriplex rosea*, a very rare species in the region.

Grassland vegetation (Table 5.5) was present on the “Lay” and “Dor” sites but not on “Usi”. Although grassland plants found on both sites were quite common species, to our knowledge the groups they formed did not correspond to known associations. Two distinct plant groups were identified: one was mostly characterized by *Bromus sterilis* and *Diplotaxis tenuifolia*, and the second was characterized by *Poa pratensis* and *Elytrigia campestris*. The *Bromus-Diplotaxis* group was found both on the “Lay” and “Dor” sites; it could be ascribed to the alliance *Chenopodion muralis* from the class *Sisymbrietea officinalis*. Its characteristic species were *Bromus sterilis*, *Diplotaxis tenuifolia*, *Chondrilla juncea* and *Bromus tectorum*. Most species from this group were annual or biennial, nitrophilous and thermophilous plants colonizing anthropogenic and irregularly disturbed environments. It could be noticed that the predominant companion species were different on both sites: they were mainly perennial pioneer xerophytic species from the class *Sedo albi-Scleranthetea biennis* on the “Lay” site, and forest species from the classes *Quercu roboris-Fageta sylvaticae* and *Crataego monogynae-Prunetea spinosae* on the “Dor” site. The second grassland group was only present on the “Lay” site; it could be ascribed to the alliance *Arrhenatherion elatioris* from the class *Arrhenatheretea elatioris*. Its characteristic species were *Poa pratensis* and *Elytrigia campestris*. This group formed closed grassland mainly constituted of mesophilous and mesotrophic species.

Forest vegetation (Table 5.6) was present on the three study sites, albeit with different percent covering. It occupied almost 95% of the surface of the “Dor” site, about 50% of the “Lay” site and less than 5% of the “Usi” site. Only one plant group was identified: it was characterized by *Robinia pseudoacacia* and *Rubus ulmifolius*. This group could be ascribed to the alliance *Chelidonio majoris-Robinion pseudoacaciae* from the class *Crataego monogynae-Prunetea*

spinosae; however to our knowledge no corresponding association has yet been described. Characteristic species were *Robinia pseudoacacia*, *Rubus ulmifolius*, *Crataegus monogyna*, *Hedera helix*, *Fraxinus excelsior* and *Galium aparine*. In this group, two geographic variants characterized by the presence of subsponaneous species were observed: one on the “Dor” site, with a number of horticultural species, and the other on the “Usi” site, with introduced species such as *Populus nigra* and *Ailanthus altissima*. Whatever it is, these variant groups were closely similar in their ecological structure: they associated pioneer tree species such as Common Ash, Maples and Black Locust and common shrubby species of temperate forests at the hill level; herbaceous species belonged to mesophilous and nitrophilous grass communities.

Table 5.4: Pionner vegetation on a metallurgical dump: the *Echio vulgaris-Melilotetum albi* association (*Plantago arenaria* sub-association)

Relevé number	35	30	31	29	32	28	33	26	25	27	34	36	Steadiness
Plot size (m ²)	12	69	14	15	16	180	95	48	50	30	40	42	
Plant cover (%)	50	90	60	70	50	70	30	40	50	40	25	40	
Slope (°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35°	
Exposure												S	
<i>Echio vulgaris-Melilotetum albi</i> Tuxen 1942													
Characteristic species													
<i>Melilotus albus</i> Medik.	2	r	r	2	r	r	r	+	r	r	i	.	V
<i>Lactuca serriola</i> L.	r	r	i	r	r	r	r	.	r	.	r	r	V
<i>Echium vulgare</i> L.	r	2	r	2	2	r	r	r	r	.	.	.	IV
<i>Oenothera biennis</i> L.	2	1	.	r	2	r	2	r	r	.	.	.	IV
Differential species													
<i>Plantago arenaria</i> Waldst. & Kit.	2	2	2	.	2	2	r	2	2	2	.	.	IV
Alliance species (<i>Dauco carotae-Melilotion albi</i>)													
<i>Reseda lutea</i> L.	2	r	r	r	r	r	r	r	.	r	.	.	IV
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	r	+	r	.	r	r	r	r	r	r	.	.	IV
<i>Bromus tectorum</i> L.	2	.	r	2	.	.	r	II
<i>Carduus nutans</i> L.	r	.	r	r	r	II
<i>Tragopogon dubius</i> Scop.	i	.	I
<i>Cirsium eriophorum</i> (L.) Scop.	r	I
<i>Hordeum murinum</i> L.	i	I
Order species (<i>Onopordetalia acanthii</i>)													
<i>Hypericum perforatum</i> L.	.	2	2	r	r	+	.	r	2	r	r	.	IV
<i>Verbascum densiflorum</i> Bertol.	r	r	r	r	r	r	.	r	r	r	.	.	IV
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	.	i	r	I
<i>Daucus carota</i> L.	r	i	I
<i>Pastinaca sativa</i> L.	i	r	I
<i>Bromus sterilis</i> L.	+	I
Class species (<i>Artemisietea vulgaris</i>)													
<i>Verbena officinalis</i> L.	r	i	.	.	i	II
<i>Chondrilla juncea</i> L.	.	r	r	r	II
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	.	.	.	r	r	I
<i>Crepis capillaris</i> (L.) Wallr.	r	r	.	I
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	r	I
<i>Conyza sumatrensis</i> (Retz.) E.Walker	.	.	i	I
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	.	.	r	I
<i>Saponaria officinalis</i> L.	r	I
<i>Picris hieracioides</i> L.	i	I
<i>Galium aparine</i> L.	r	I
<i>Cichorium intybus</i> L.	r	I
<i>Elytrigia campestris</i> (Godr. & Gren.) Kerguélen ex Carreras	r	I
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	r	I
Annual companion													
<i>Stipo capensis-Trachynietea distachyae & Cardaminetea hirsutae</i> Vegetations													
<i>Arenaria serpyllifolia</i> L.	+	2	2	3	2	1	+	2	1	2	+	+	V
<i>Cerastium semidecandrum</i> L.	r	+	r	+	r	+	r	1	+	+	+	.	V
<i>Saxifraga tridactylites</i> L.	.	+	r	r	+	+	.	1	1	1	+	r	V
<i>Vulpia ciliata</i> Dumort.	.	+	+	+	+	r	r	+	1	r	r	.	V
<i>Veronica arvensis</i> L.	.	+	+	r	.	.	.	r	+	+	r	r	IV
<i>Sagina apetala</i> Ard.	.	2	.	r	.	r	.	+	.	.	r	.	III
<i>Myosotis ramosissima</i> Rochel	.	+	r	r	+	.	.	r	III
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	.	+	r	.	r	r	r	III
<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér.	r	.	.	r	i	II
<i>Erophila verna</i> (L.) Chevall.	.	.	r	r	.	.	.	+	II
<i>Crepis foetida</i> L.	i	r	.	.	i	II
<i>Rostraria cristata</i> (L.) Tzvelev	r	.	.	r	+	.	.	.	II
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	.	.	r	r	r	II
<i>Cardamine hirsuta</i> L.	r	+	+	.	II
<i>Linaria simplex</i> (Willd.) DC.	r	r	.	I
<i>Valerianella carinata</i> Loisel.	r	r	I
Forest companion species													
<i>Querco roboris-Fageta sylvaticae & Crataego monogynae-Prunetea spinosae</i> Vegetations													
<i>Populus nigra</i> L.	.	r	r	.	r	2	i	i	2	.	r	r	IV
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	r	r	.	.	.	r	.	II
<i>Clematis vitalba</i> L.	.	1	r	2	II
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	.	.	i	.	.	.	i	II
<i>Fallopia dumetorum</i> (L.) Holub	r	.	r	II

Table 5.4 continued:

Relevé number	35	30	31	29	32	28	33	26	25	27	34	36	Steadiness
Plot size (m ²)	12	69	14	15	16	180	95	48	50	30	40	42	
Plant cover (%)	50	90	60	70	50	70	30	40	50	40	25	40	
Slope (°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35°	
Exposure												S	
Other species													
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	r	.	+	.	r	.	r	r	III
<i>Geranium molle</i> L.	r	r	.	.	r	r	+	III
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	r	2	2	r	II
<i>Atriplex rosea</i> L.	r	r	.	.	.	r	.	II
<i>Chenopodium botrys</i> L.	r	2	.	.	.	+	.	II
<i>Euphorbia maculata</i> L.	r	r	1	II
<i>Sclerochloa dura</i> (L.) P.Beauv.	r	.	r	I
<i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi	r	.	.	r	I
<i>Buddleja davidii</i> Franch.	i	.	.	.	r	.	I
<i>Dittrichia graveolens</i> (L.) Greuter	2	+	.	I
<i>Chenopodium album</i> L.	r	r	I
<i>Herniaria hirsuta</i> L.	.	+	i	.	I
<i>Chaenorrhinum minus</i> (L.) Lange	r	r	I
<i>Anagallis arvensis</i> L.	r	r	I
<i>Scrophularia canina</i> L.	3	I

Sporadic species: rel. 28: *Petrorhagia prolifera* (L.) P.W.Ball & Heywood (r), *Reynoutria japonica* Houtt. (+); rel. 29: *Ononis spinosa* L. (i), *Euonymus europaeus* L. (i), *Stellaria media* (L.) Vill. (r); rel. 30: *Rosa canina* L. (r); rel. 31: *Teucrium scorodonia* L. (2), *Logfia minima* (Sm.) Dumort. (i); rel. 34: *Holosteum umbellatum* L. (r), *Robinia pseudoacacia* L. (r), *Melica ciliata* L. (r), rel. 35: *Reynoutria sachalinensis* (F.Schmidt) Nakai (r), *Cuscuta scandens* Brot. (r), *Poa compressa* L. (r), *Artemisia annua* L. (r), *Datura stramonium* L. (r), *Setaria viridis* (L.) P.Beauv. (r), *Bromus hordeaceus* L. (r); rel. 36: *Urtica dioica* L. (i), *Rubus caesius* L. (2), *Euphorbia cyparissias* L. (r), *Papaver rhoeas* L. (r), *Dactylis glomerata* L. (r), *Galium mollugo* L. (r).

Rel. 25 to 36: Usi site.

Table 5.5: Grassland vegetation on metallurgical waste dumps: the *Bromus sterilis*-*Diploaxis tenuifolia* and *Poa pratensis*-*Elytrigia campestris* groups.

Relevé number	09	05	08	02	11	17	13	10	21	16	22	12	15	37	38	Steadiness
Plot size (m ²)	4	48	45	30	12	60	15	15	25	20	18	14	450	16	20	
Plant cover (%)	30	60	95	100	100	60	50	95	95	70	90	100	100	90	80	
Slope (°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	
Exposure													S	E	E	
<i>Bromus sterilis</i> and <i>Diploaxis tenuifolia</i> group																
Characteristic species																
<i>Bromus sterilis</i> L.	r	2	2	2	2	2	2	2	.	r	.	r	.	.	.	IV
<i>Diploaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	.	r	r	.	.	i	r	r	i	.	r	III
<i>Chondrilla juncea</i> L.	r	.	2	1	r	r	.	r	.	+	III
<i>Bromus tectorum</i> L.	.	2	2	.	1	r	II
Alliance species (<i>Chenopodion muralis</i>)																
<i>Echium vulgare</i> L.	r	.	r	r	r	II
<i>Reseda lutea</i> L.	.	r	r	I
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	r	.	r	r	I
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	.	.	.	r	I
<i>Oenothera biennis</i> L.	r	I
<i>Lactuca serriola</i> L.	.	r	I
Order species (<i>Sisymbrietalia officinalis</i>)																
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Desf.	r	r	.	.	I
<i>Lepidium virginicum</i> L.	r	r	I
<i>Verbascum thapsus</i> L.	.	.	i	I
<i>Verbena officinalis</i> L.	r	I
Class species (<i>Sisymbrietea officinalis</i>)																
<i>Hypericum perforatum</i> L.	r	r	+	.	r	i	r	II
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	.	r	.	.	i	.	.	r	r	II
<i>Poa pratensis</i> and <i>Elytrigia campestris</i> group																
Characteristic species																
<i>Poa pratensis</i> L.	.	r	.	.	.	+	.	+	3	+	+	2	2	2	3	IV
<i>Elytrigia campestris</i> (Godr. & Gren.) Kerguélen ex Carreras	r	.	.	.	1	2	2	4	3
Alliance species (<i>Arrhenatherion elatioris</i>)																
<i>Daucus carota</i> L.	r	r	r	.	r	r	.	.	r	.	r	.	r	+	r	IV
<i>Dactylis glomerata</i> L.	r	2	.	r	+	+	r	r	r	r	+	IV
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P.Beauv. ex J.Presl & C.Presl	r	.	+	.	2	r	2	i	+	III
Order species (<i>Arrhenatheretalia elatioris</i>)																
<i>Achillea millefolium</i> L.	r	r	1	r	1	i	r	+	+	III
<i>Medicago lupulina</i> L.	r	r	.	r	.	r	.	r	+	+	III
<i>Vicia hirsuta</i> (L.) Gray	r	r	1	+	+	II
<i>Lotus corniculatus</i> L.	r	r	r	I
<i>Trisetum flavescens</i> (L.) P.Beauv.	+	.	I
<i>Avenula pubesens</i> (Huds.) Dumort.	r	I
<i>Trifolium dubium</i> Sibth.	r	I
Class species (<i>Arrhenatheretea elatioris</i>)																
<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	.	r	r	.	.	r	r	r	r	+	r	.	r	r	.	IV
<i>Plantago lanceolata</i> L.	i	+	+	+	1	r	r	.	r	i	i	IV
<i>Vicia sativa</i> L.	r	.	r	i	.	.	.	3	+	+	II
<i>Potentilla reptans</i> L.	.	.	.	r	2	.	i	I
<i>Vicia cracca</i> L.	r	.	r	I
<i>Trifolium pratense</i> L.	r	.	.	I
Annual companion species																
<i>Stipo capensis</i> - <i>Trachymietea distachyae</i> & <i>Cardaminetea hirsutae</i> Vegetations																
<i>Petrorhagia prolifera</i> (L.) P.W.Ball & Heywood	r	i	r	.	.	r	+	r	r	+	r	.	r	.	.	IV
<i>Arenaria serpyllifolia</i> L.	r	+	1	.	.	+	+	r	.	+	.	.	r	.	.	III
<i>Vulpia ciliata</i> Dumort.	.	+	.	.	.	+	+	r	r	+	II
<i>Crepis foetida</i> L.	r	r	r	r	.	r	II
<i>Veronica arvensis</i> L.	r	+	.	+	.	.	+	.	.	II
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	r	+	r	.	.	.	r	II
<i>Trifolium campestre</i> Schreb.	2	1	i	+	II
<i>Sagina apetala</i> Ard.	r	+	.	.	+	I
<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér.	i	r	r	I
<i>Minuartia hybrida</i> (Vill.) Schischk.	i	.	.	.	I
<i>Sclerochloa dura</i> (L.) P.Beauv.	r	1	I
<i>Erophila verna</i> (L.) Chevall.	.	+	r	I
<i>Geranium rotundifolium</i> L.	r	.	+	I
<i>Cardamine hirsuta</i> L.	.	r	.	i	I
<i>Myosotis ramosissima</i> Rochel	.	r	.	r	I

Table 5.5 continued:

Relevé number	09	05	08	02	11	17	13	10	21	16	22	12	15	37	38	Steadiness
Plot size (m ²)	4	48	45	30	12	60	15	15	25	20	18	14	450	16	20	
Plant cover (%)	30	60	95	100	100	60	50	95	95	70	90	100	100	90	80	
Slope (°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	
Exposure													S	E	E	
Forest companion species																
<i>Quercus roboris-Fageta sylvatica</i> & <i>Crataego monogyna-Prunetea spinosae</i> Vegetations																
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	2	.	2	3	2	i	2	.	.	.	II
<i>Clematis vitalba</i> L.	r	r	.	2	r	r	II
<i>Rubus canescens</i> DC.	.	r	l	r	r	i	.	II
<i>Quercus robur</i> L.	.	r	i	r	i	.	.	.	II
<i>Hedera helix</i> L.	.	2	r	r	r	II
<i>Galium aparine</i> L.	.	i	.	+	r	I
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	i	r	.	r	I
<i>Poa nemoralis</i> L.	.	r	2	+	I
<i>Acer platanoides</i> L.	.	i	.	r	I
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	.	r	i	.	.	.	I
<i>Rosa canina</i> L.	.	.	r	i	.	.	.	I
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	i	i	.	.	I
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	.	.	i	i	I
Perennial pioneer xerophytic companion species																
<i>Sedo albi-Scleranthetea biennis</i> Vegetation																
<i>Poa compressa</i> L.	.	.	+	.	3	+	+	r	r	+	.	2	.	.	.	III
<i>Medicago minima</i> (L.) L.	2	r	4	2	2	r	III
<i>Thymus pulegioides</i> L.	+	2	r	2	r	1	III
<i>Poa bulbosa</i> L.	+	.	2	r	2	II
<i>Festuca ovina</i> L.	r	r	.	.	.	2	I
<i>Artemisia campestris</i> L.	r	r	.	.	I
<i>Hieracium pilosella</i> L.	2	I
Other species																
<i>Tragopogon dubius</i> Scop.	.	r	i	.	.	r	.	r	r	r	.	.	r	.	.	III
<i>Melilotus albus</i> Medik.	r	r	r	.	.	.	r	i	.	.	.	II
<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>alba</i> (Mill.) Greuter & Burdet	.	.	r	r	r	r	.	.	.	II
<i>Pastinaca sativa</i> L.	i	.	+	.	r	I
<i>Melilotus officinalis</i> Lam.	r	.	+	I
<i>Cirsium eriophorum</i> (L.) Scop.	i	i	.	.	I
<i>Saponaria officinalis</i> L.	.	.	r	2	I
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke subsp. <i>vulgaris</i>	i	r	I
<i>Linaria repens</i> (L.) Mill.	.	.	+	r	I
<i>Bromus mollis</i> L.	l	r	I

Sporadic species: rel. 02: *Rumex crispus* L. (r), *Holcus lanatus* L. (r), *Taxus baccata* L. (r), *Bryonia dioica* Jacq. (r), *Urtica dioica* L. (r), *Alliaria petiolata* (M.Bieb.) Cavara & Grande (+), *Fallopia dumetorum* (L.) Holub (r), *Geranium robertianum* L. (r), *Chelidonium majus* L. (2), *Geum urbanum* L. (2), *Geranium pyrenaicum* Burm.F. (r), *Lamium purpureum* L. (r), *Stellaria media* (L.) Vill. (+); rel. 05: *Hypochaeris radicata* L. (r), *Cerastium tomentosum* L. (2), *Papaver argemone* L. (r), *Papaver rhoeas* L. (r); rel. 08: *Valerianella carinata* Loisel. (r), *Sedum rupestre* L. (r), *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. (r), *Prunus persica* (L.) Batsch (i), *Cotoneaster horizontalis* Decne. (i), *Torilis japonica* (Houtt.) DC. (r), *Chenopodium album* L. (i); rel. 11: *Prunus spinosa* L. (r), *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P.Beauv. (r); rel. 12: *Melica ciliata* L. (r); rel. 13: *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy (+); rel. 15: *Rumex acetosa* L. (r), *Geranium molle* L. (r), *Tanacetum vulgare* L. (r), *Ranunculus bulbosus* L. (r), *Carlina vulgaris* L. (r), *Genista hispanica* L. (i); rel. 17: *Medicago sativa* L. (i), *Lolium perenne* L. (i); rel. 22: *Catapodium rigidum* (L.) C.E.Hubb. (1); rel. 37: *Trifolium arvense* L. (r); rel. 38: *Cirsium arvense* (L.) Scop. (r).

Rel. 02, 05, 08 and 09: Dor site; rel. 10 to 13, 15 to 17, 21, 22, 37 and 38: Lay site.

Table 5.6: Forest vegetation on metallurgical waste dumps: the *Robinia pseudoacacia-Rubus ulmifolius* group.

Relevé number	06	04	01	03	07	18	14	19	20	24	37	Steadiness
Plot size (m ²)	500	750	500	500	2000	700	250	2400	800	230	600	
Plant cover (%)	100	100	100	100	100	100	95	100	80	90	80	
Slope (°)	0	35	25	0	40	10	20	35	0	0	0	
Exposure		S	S		S	S	S	S				
<i>Robinia pseudoacacia</i> and <i>Rubus ulmifolius</i> group												
Characteristic species												
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	2	4	3	3	3	3	3	4	3	4	2	V
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	2	3	2	2	4	4	3	3	3	r	r	V
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	r	r	r	r	r	2	2	r	r	i	r	V
<i>Hedera helix</i> L.	5	5	5	5	4	2	2	4	r	2	.	V
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	r	r	3	2	+	+	r	r	.	r	r	V
<i>Galium aparine</i> L.	i	r	+	r	+	2	1	r	r	.	r	V
Variant group species												
<i>Populus nigra</i> L.	i	i	2	2	II
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	r	2	I
<i>Mahonia aquifolium</i> (Pursh) Nutt.	r	r	r	r	II
<i>Taxus baccata</i> L.	r	r	+	+	II
<i>Cotoneaster franchetii</i> Bois	2	i	.	2	i	II
<i>Buddleja davidii</i> Franch.	2	2	.	r	2	II
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	r	r	i	.	.	II
<i>Malus domestica</i> Borkh.	r	.	.	.	i	II
<i>Cotoneaster horizontalis</i> Decne.	r	i	II
<i>Ligustrum ovalifolium</i> Hassk	i	I
<i>Calocedrus decurrens</i> (Torr.) Florin.	.	.	i	I
<i>Aesculus hippocastanum</i>	i	I
<i>Pinus sylvestris</i> L.	r	I
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	r	I
<i>Prunus domestica</i> subsp. <i>insititia</i> (L.) Bonnier & Layens	i	I
<i>Cotoneaster salicifolius</i> Franch.	i	I
Arborescent species												
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	2	r	r	r	i	.	+	r	r	.	i	V
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	r	r	+	r	3	i	2	r	i	.	.	V
<i>Acer platanoides</i> L.	2	r	2	r	r	i	.	r	.	.	.	IV
<i>Ulmus minor</i> Mill.	r	I
<i>Betula pendula</i> Roth	.	i	I
Shrubby species (including juveniles)												
<i>Sambucus nigra</i> L.	r	r	r	r	+	r	4	4	r	2	.	V
<i>Clematis vitalba</i> L.	r	2	r	2	r	2	.	1	+	2	2	V
<i>Cornus sanguinea</i> L.	.	i	.	.	r	2	2	r	r	r	2	IV
<i>Rosa canina</i> L.	r	r	r	i	r	r	.	.	r	.	r	IV
<i>Prunus spinosa</i> L.	.	r	i	r	r	r	.	.	r	i	.	IV
<i>Quercus robur</i> L.	r	r	r	r	.	.	r	.	r	.	.	III
<i>Malus sylvestris</i> Mill.	r	r	r	.	r	II
<i>Pyrus pyraister</i> (L.) Du Roi	i	.	r	.	.	i	II
<i>Salix caprea</i> L.	i	.	.	.	i	1	II
<i>Acer campestre</i> L.	.	.	i	r	i	II
<i>Prunus mahaleb</i> L.	r	i	II
<i>Carpinus betulus</i> L.	r	r	II
<i>Prunus laurocerasus</i> L.	i	I
<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	i	.	I
<i>Euonymus europaeus</i> L.	r	.	I
<i>Ribes alpinum</i> L.	r	I
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	2	.	I
<i>Salix alba</i> L.	r	I
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco	i	I
<i>Ilex aquifolium</i> L.	i	I
<i>Juglans regia</i> L.	i	I

Table 5.6 continued:

Relevé number	06	04	01	03	07	18	14	19	20	24	37	Steadiness
Plot size (m ²)	500	750	500	500	2000	700	250	2400	800	230	600	
Plant cover (%)	100	100	100	100	100	100	95	100	80	90	80	
Slope (°)	0	35	25	0	40	10	20	35	0	0	0	
Exposure		S	S		S	S	S	S				
Herbaceous species												
<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	r	r	r	r	r	r	r	i	r	r	.	V
<i>Chelidonium majus</i> L.	.	r	2	r	+	.	1	r	+	2	i	V
<i>Alliaria petiolata</i> (M.Bieb.) Cavara & Grande	.	r	r	r	+	.	r	r	.	r	.	IV
<i>Geum urbanum</i> L.	.	.	+	r	r	.	+	+	.	2	r	IV
<i>Poa nemoralis</i> L.	+	+	+	+	1	r	+	IV
<i>Humulus lupulus</i> L.	.	r	.	2	i	r	r	i	.	.	.	III
<i>Pastinaca sativa</i> L.	r	r	r	i	+	r	III
<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planch.	r	.	.	.	2	.	r	.	i	i	.	III
<i>Urtica dioica</i> L.	2	+	+	.	+	2	.	III
<i>Fallopia dumetorum</i> (L.) Holub	r	.	.	r	.	.	.	i	.	r	.	II
<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	r	r	r	.	r	II
<i>Solanum dulcamara</i> L.	.	r	.	r	II
<i>Reynoutria sachalinensis</i> (F.Schmidt) Nakai	.	.	r	2	I
<i>Geranium robertianum</i> L.	.	r	.	r	I
<i>Torilis japonica</i> (Houtt.) DC.	r	I
<i>Stellaria holostea</i> L.	r	I

Sporadic species: rel. 01: *Lactuca virosa* L. (r), *Veronica hederifolia* L. (r); rel. 03: *Erysimum cheiri* (L.) Crantz (r), *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.) Greuter & Burdet (r), *Galium mollugo* L. (+), *Cardamine hirsuta* L. (r), *Saponaria officinalis* L. (r); rel. 04: *Bromus sterilis* L. (r), *Eupatorium cannabinum* L. (r), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (i), *Erysimum cheiri* (L.) Crantz (r); rel. 06: *Cerastium glomeratum* Thuill. (i), *Holcus lanatus* L. (r), *Deschampsia cespitosa* (L.) P.Beauv. (r), *Genista hispanica* L. (r); rel. 07: *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.) Greuter & Burdet (i); rel. 24: *Lactuca serriola* L. (i), *Dipsacus fullonum* L. (i), *Oenothera biennis* L. (r), *Euphorbia lathyris* L. (i), *Mercurialis annua* L. (i), *Anagallis arvensis* L. (i), *Chenopodium album* L. (i), *Asparagus officinalis* L. (i), *Artemisia annua* L. (r); rel. 37: *Erigeron annuus* (L.) Desf. (i), *Cedrus atlantica* (Manetti ex Endl.) Carrière (i), *Cortaderia selloana* (Schult. & Schult.f.) Asch. & Graebn. (i).

Rel. 01, 03, 04, 06 and 07: Dor site; rel. 14, 18, 19 and 20: Lay site; rel. 24 and 37: Usi site.

V.5 DISCUSSION

In this work we studied native vegetation on three metallurgical waste dumps that we assumed to be highly polluted by heavy metals. Our main aim was to address the two following questions: *i/* might plant analysis be suitable counterpart to chemical extraction procedures to get insight into metal availability, *i.e.* could plants be used as accumulation indicators? and *ii/* might specific plant associations reflect soil pollution with heavy metals, *i.e.* could plants be used as impact indicators?

Our results showed that metallurgical sites were colonized by a number of plant species despite total heavy metal in soils at concentrations near or above those generally recognized (Adriano, 2001) as toxic levels (that is between 1 and 5 mg kg⁻¹ for Cd, above 100 mg kg⁻¹ for Cr and Ni, between 100 and 500 mg kg⁻¹ for Pb, between 150 and 400 mg kg⁻¹ for Cu and between 250 and 1000 mg kg⁻¹ for Zn). Moreover measurements of ammonium acetate-EDTA extractable fractions using a standardized procedure suggested that, except for Cd and Cr, metals were highly “phytoavailable”. This was particularly noticeable for Cu and Pb, whose extractable concentrations were even higher than total levels normally found in unpolluted French soils (Baize, 2000).

Consequently, we expected to find high metal concentrations in native plants colonizing these sites. However we did not evidence any relationship between leaf metal concentrations and soil's "phytoavailable" concentrations. For instance the "Lay" and "Dor" sites had very different ammonium acetate-EDTA extractable levels of Pb, Zn and Ni, but the levels actually accumulated in plants were quite similar on both sites. At the opposite, in a study about plant colonizing mine tailings in China (Shu *et al.*, 2005) foliar concentrations in Zn, Cd and Pb were respectively 25-, 90- and 400-fold higher than those measured in the present work, while concentrations of DTPA-extractable metals and soil pH were closely similar to those of the metallurgical soils we studied. Thus, as already emphasized by a number of authors (Mc Laughlin *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000; Remon *et al.*, 2005), these results indicate that neither total soil concentrations nor "extractable" concentrations give sufficient information to accurately evaluate both the fate and the effects of contaminants. Therefore there is a need today for developing complementary methods that could be used to monitor soil's quality. In this perspective, the study of plant communities living in the polluted environment (Murphy *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2003; Fränzle, 2006) could offer several advantages: they are in close and continuous contact with the polluted substratum, they can accumulate metals in their above ground parts at levels proportional to the soil's available content (Baker, 1981), their taxonomy is well established and they can be quickly recognized by a skilled botanist.

Up to now, most of the studies dealing with the suitability of plants to monitor metal pollutions have focused on the use of one or few precise species (Kulef and Dingova, 1984; Simon *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000; Madejon *et al.*, 2004). However using a single species to monitor soil quality has been criticized (Mertens *et al.*, 2005), mainly because the availability of a given metal, and therefore its leaf concentration, can be species dependant. Consequently in this study we analysed several species, chosen to be representative of the study sites, to get a whole picture of metal availability to the overall plants living on metallurgical soils. Results showed that plants growing on the "Usi" site had significantly higher metal levels than those growing on the "Lay" and "Dor" sites. Consequently, contrary to the results obtained with chemical extraction method, plant analyses clearly demonstrated that metal availability was higher on the "Usi" site. It should be noticed however that leaf metal concentrations of plant growing on metallurgical wastelands were not dramatically different than those of a reference plant growing on an uncontaminated soil (Markert, 1993; Harada and Hatanaka, 2000). Thus, we can conclude that metal phytoavailability was low despite very high total levels.

The second question that should be considered when studying metal contaminated sites is to know whether contaminants have an impact on plant communities. To address this question we studied plant associations, according to a phytosociological approach (Braun-Blanquet, 1964). Results showed that the three metallurgical wastelands supported well developed plant communities. In fact the process of natural succession was apparently normal (Bradshaw, 1983) with pioneer associations colonizing the most recent site (“Usi”) and grassland and forest groups characterizing the “Lay” and “Dor” sites respectively. However, although most of the species were quite common taxa, plant associations were quite unusual and, among the four groups we identified, three of them had never been described. Therefore, although we demonstrated that metals were poorly phytoavailable, metallurgical waste deposits had clearly an impact on the structure of plants communities. In other words the process of plant recovery on metallurgical soils might be not only dependant on metal levels, but also on other edaphic constraints which could play a major role in the selection of specific plant associations. In fact, in addition to high levels of heavy metals, it is obvious that metalliferous wastes are unusual environments for plants (Tordoff *et al.*, 2000) because of the presence of many other growth-limiting factors such as macronutrient deficiencies, high pH, low nitrogen content, and poor water holding capacity (Remon *et al.* 2005; Shu *et al.*, 2005). Thus it is very likely plant associations occurring in such particular habitats are adapted to the whole soil’s parameters rather than to high metal levels only. Whatever it is there is no doubt that studying the process of plant colonization in contaminated anthropogenic soils could be very helpful to better understand the functioning of these complex environments (Gammel, 1977; Bradshaw, 1983; Bradshaw, 1997).

It is now widely accepted that restoration of a plant cover onto abandoned wastelands, in addition to visual improvement, is very effective in reducing wind erosion and water percolation (Wong, 2003). Consequently, the so-called phytorecovery strategies are now considered as efficient and ecological reclamation methods which should be encouraged in the perspective of sustainable land management. It is important to use native plants for phytoremediation because these plants are often better in terms of survival, growth and reproduction than plants introduced from other environment. In this context the understanding of which species are likely to occur together under given circumstances combined with knowledge of successional changes of plant associations can be a useful tool for designing plant communities adapted to metalliferous wastes.

V.6 REFERENCES

- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- AFNOR, 1994. Norme NF X 31-151. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, pp. 123-129.
- AFNOR, 1999a. Norme NF ISO 10390. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, 1, pp. 339-347.
- AFNOR, 1999b. Norme NF X 31-120. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, 1, pp. 237-243.
- Aksoy, A., Hale, W.H.G., Dixon, J.M., 1999. *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic. as a biomonitor of heavy metals. The Science of the Total Environment 226, 177-186.
- Alloway, B.J., 1995a. The origin of heavy metals in soils. In: Alloway, B.J. (Ed.). Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London, pp. 38-57.
- Alloway, B.J., 1995b. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B.J. (Ed.). Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London, pp. 11-34.
- Alvarez, E., Fernandez Marcos M.L., Vaamonde, C., Fernandez-Sanjurjo, M.J., 2003. Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. The Science of the Total Environment 313, 185-197.
- Baize, D., 2000. Teneurs totales en “métaux lourds” dans les sols français – Résultats du programme ASPITET. Courrier de l’Environnement de l’INRA 39, 39-54.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3, 643-654.
- Bardat, J., Bioret, F., Botineau, M., Boulet, V., Delpéch, R., Géhu, J-M., Haury, J., Lacoste, A., Rameau, J-C., Royer, J-M., Roux, G., Touffet, J., 2004. Prodrome des végétations de France. Museum national d’Histoire naturelle, Paris.

- Beckett, P.H.T., 1989. The use of extractants in studies on trace metals in soils, sewage sludges, and sludge-treated soils. In: Stewart, B.A. (Ed.). Advances in soil science, Vol. 9. Springer-Verlag, New York, pp. 143-176.
- Bock, B., 2003. Base de données nomenclaturales de la Flore de France, BDNFF-V3.02. (After Kerguélen, M., Index Synonymique de la Flore de France, 1999). Tela Botanica, Montpellier. <http://tela-botanica.org/eflore>
- Bradshaw, A., 1997. Restoration of mined lands using natural processes. Ecological Engineering 8, 255-269.
- Bradshaw, A.D., 1983. The reconstruction of ecosystems. Journal of Applied Ecology 20, 1-17.
- Braun-Blanquet, J., 1964. Pflanzensoziologie. Springer-Verlag, Vienne.
- Brooks, R.R., 1983. Biological methods of prospecting for minerals. Wiley-Interscience, New York.
- Buondonno, C., Ermice, A., Buondonno, A., Murolo, M., Pugliano, M.L., 1998. Human-influenced soils from an iron and steel works in Naples, Italy. Soil Science Society of America Journal 62, 694-700.
- Ernst, W., 1976. *Violetea calaminariae*. In: Tüxen, R. (Ed.). Prodrome of the European plant communities. Cramer, J., Vaduz, Germany, pp. 1-133.
- Fränze, O., 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. Ecological Indicators 6, 114-136.
- Gehu, J-M., 1986. Des complexes de groupements végétaux à la phytosociologie paysagère contemporaine. Informatore Botanico Italiano 18 (1-2-3), 53-83.
- Gehu, J-M., Rivas-Martinez, S., 1981. Notions fondamentales de phytosociologie. In : Dierschke H. (ed.) : Syntaxonomie. Berichte der internationalen symposien der internationalen vereinigung fur vegetationskunde (Rinteln 31.3-3.4.1980). Vaduz, J. Cramer, p. 5-33.
- Gemmell, R.P., 1977. Natural colonization of industrial wasteland. Edward Arnold, London.
- Harada, H., Hatanaka, T., 2000. Natural background levels of trace elements in wild plants: variation and distribution in plant species. Soil Science and Plant Nutrition 46, 117-125.

- Houba, V.J.G., Novozamski, I., Lexmond, TH.M., Van Der Lee, J.J., 1990. Applicability of 0.01 M CaCl₂ as a single extractant for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21, 2281-2291.
- Kuleff, I., Djingova, R., 1984. The dandelion (*Taraxacum officinale*) - A monitor for environmental pollution ? *Water, Air, and Soil Pollution* 21, 77-85.
- Madejon, P., Maranon, T., Murillo, J.M., Robinson, B., 2004. White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* 132, 145-155.
- Markert, B., 1993. Occurrence and distribution of chemical elements in plants - Outlook and further research plans. *Toxicological and Environmental Chemistry* 40, 31-41.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31 (11-14), 1661-1700.
- Mertens, J., Luyssaert, S., Verheyen, K., 2005. Use and abuse of trace metal concentrations in plant tissue for biomonitoring and phytoextraction. *Environmental Pollution* 138, 1-4.
- Murphy, A.P., Coudert, M., Barker, J., 2000. Plants as biomarkers for monitoring heavy metal contaminants on landfill sites using sequential extraction and inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES). *Journal of Environmental Monitoring* 2, 621-627.
- Quevauviller, PH., Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Rubio, R., Ure, A., Muntau, H., 1997. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three step sequential extraction procedure. *The Science of the Total Environment* 205, 223-234.
- Remon, E., Bouchardon, J-L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J-C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137, 316-323.

- Simon, L., Martin, H.W., Adriano, D.C., 1996. Chicory (*Cichorium intybus* L.) and dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) as phytoindicators of cadmium contamination. *Water, Air and Soil Pollution* 91, 351-362.
- Shu, W.S., Ye, Z.H., Zhang, Z.Q., Lan, C.Y., Wong, M.H., 2005. Natural colonization of plants on five lead/zinc mine tailings in Southern China. *Restoration Ecology* 13 (1), 49-60.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51 (7), 844-851.
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41, 219-228.
- Weber, H.E., Moravec, J., Theurillat, J.P., 2000. International code of phytosociological nomenclature. 3rd ed. *Journal of Vegetation Science* 11, 739-768.
- Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775-780.
- Zarcinas, B.A., Cartwright, B., Spouncer, L.R., 1987. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 18, 131-146.

CHAPITRE VI

TOLÉRANCE COMPARATIVE AUX METAUX ET STRATÉGIE ADAPTATIVE CHEZ *PLANTAGO ARENARIA*

Multi-tolerance to heavy metals in Plantago arenaria Waldst. & Kit.:

adaptative versus constitutive characters

E. Remon, J-L. Bouchardon, O. Faure

Article soumis dans la revue Chemosphere

VI.1 ABSTRACT

Plantago arenaria Waldst. & Kit., is a well developed pioneer species found on heavy metal contaminated landfill but also on natural areas. In order to assess its real heavy metal tolerance and check if it could be constitutionally tolerant to multiple heavy metals, a combined approach was adopted. Heavy metal sensitivity was compared, using Vertical Mesh Transfer procedure, in natural and metallurgical populations of *P. arenaria*. Two other common pioneer species growing in the vicinity: *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker and *Verbascum densiflorum* Bertol. were tested by the same method. Four metal ions were tested: Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ at concentrations ranging respectively from 0 to 400 µM, 0 to 2500 µM, 0 to 2000 µM and 0 to 4000 µM. Results showed that metallurgical *P. arenaria* population was much less sensitive to metal ion toxicity than other species and was equally tolerant as natural population except for Cu²⁺ for which the natural population was much more sensitive. Additionally, metal accumulation patterns were evaluated to determine if metallurgical *P. arenaria* population is able to accumulate and to cope with high internal levels of heavy metal. After 8 weeks of culture on artificially contaminated soil with 2, 5, 10, 20 and 50 mg kg⁻¹ for Cd; 100, 250, 500, 1000 and 2000 mg kg⁻¹ for Cu; 50, 250, 500, 1000 and 2000 mg kg⁻¹ for Ni and 500, 1000, 2000, 4000 and 8000 mg kg⁻¹ for Zn, leaf system growth and leaves and roots accumulation were analysed. Under these conditions, *P. arenaria* accumulated relatively high metal levels, proportionally to phytoavailable fraction, both in roots and leaves, with a moderate growth inhibition. Taken together, these results showed that *P. arenaria* was a pseudometallophyte species which can tolerate several heavy metals. Thus, it can be concluded that *P. arenaria* presents a constitutive tolerance for Cd and Ni and an adaptative

tolerance for Cu. Finally, *P. arenaria* could provide a new and efficient experimental model to get new insights into tolerance phenomenon.

VI.2 INTRODUCTION

It has been early observed that a number of plant species are able to colonize areas containing high levels of toxic heavy metals. These plants were initially identified on naturally metal-enriched soils, where they often form a specific flora, marked by a high degree of endemism. The vegetation of ultramafic rocks (“serpentines”) in New Caledonia, calamine soils in Belgium and cupriferous outcrops in Central Africa, are the best known instances (Brooks, 1998; De Kok, 2002) of such adaptations. Those species, restricted to metalliferous soils, have been named “absolute metallophytes” (Lambinon and Auquier, 1963). It is generally assumed that metal tolerance in absolute metallophytes was progressively acquired, according to a classical evolutionary process, in response to thousands or millions years of selective pressure (Wild and Bradshaw, 1977). In addition, there are also numerous examples where recently contaminated soils, polluted by human activities (e.g. metal smelting factories, motorway soft shoulders, run-off from galvanized fences and pylons, ...), also support well developed plant communities (Al-Hiyaly *et al.*, 1988; Tordoff *et al.*, 2000; Remon *et al.*, 2005). These metal-tolerant populations are generally constituted of common taxa also found on uncontaminated soils in the same geographical region. Such species, which can live both on contaminated and normal soils, are called “pseudometallophytes” (Lambinon and Auquier, 1963). It is obvious that metal tolerance in pseudometallophytes growing in newly polluted environments does not result from a long and gradual evolutionary process. This basic observation has led to the conclusion that tolerant races or ecotypes, can emerge from normal plant populations after a very short time of metal exposure, *i.e.* within a few years (Antonovics *et al.*, 1971) or even a single generation (Wu *et al.*, 1975). As a general rule, the tolerance acquired in selected populations is very specific to metals actually present in soil. This has been clearly demonstrated in a number of studies (Baker, 1987) and the ability to rapidly evolve toward ecotypes, specifically tolerant to one or several metals, is now presented as a classical example of adaptation and microevolution (Macnair, 1993). Hence, there is no doubt that colonization of metal-enriched soils, whatever the age and the origin of the pollution, can be explained, at least in part, with reference to “adaptative tolerance”.

However, in addition to adaptative tolerance, the possibility remains that some pseudometallophytes could be inherently tolerant to metals, that is, tolerant even when not growing under selective pressure. One of the first experimental set of data demonstrating constitutive tolerance in plants was brought by McNaughton *et al.* (1974), in a study about the wetland species *Typha latifolia*. By comparing two clones, taken either from a site contaminated by fall-out of a Zn smelter and from a control unpolluted soil, they showed that this species was able to tolerate high levels of Zn, Cd and Pb, without the evolution of tolerant race. This was later confirmed (Taylor and Crowder, 1884; Ye *et al.*, 1997a) for various populations of the same species and for additional metals, leading to the conclusion that *T. latifolia* has a constitutional multi-metal tolerance throughout its range. Similar findings have been published for a number of other wetland species, *e.g.* *Phragmites australis* (Ye *et al.*, 1997b), *Glyceria fluitans* (Matthews *et al.*, 2004), and *Carex rostrata* (Matthews *et al.*, 2005), suggesting that constitutive tolerance to several metals might be a characteristic feature of wetland angiosperms. However, innate tolerance is clearly not restricted to wetland species. Indeed, this has been also reported in some dryland plant populations, *e.g.* *Andropogon virginicus* for Zn, Pb and Cd (Gibson and Risser, 1982), *Calamagrostis epigejos* for Pb and Cd (Lehmann and Rebel, 2004), *Calluna vulgaris* for Cu (Monni *et al.*, 2000), and in the metal hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* for Zn and Pb (Meerts and Van Isacker, 1997) and *Arabidopsis halleri* for Zn (Bert *et al.*, 2000).

In an effort to gain additional insights into the taxonomic diversity of heavy metal-tolerant plants, we prospected a highly degraded site, contaminated by multiple heavy metals. Among the taxa present at this site, we identified *Plantago arenaria* as the major dominant species. In a preliminary study (unpublished results) we showed that this species had a high tolerance to acute and chronic Cd exposure and we hypothesized it could be constitutionally tolerant to multiple heavy metals. To check this hypothesis we used a three steps approach addressing the following questions: i/ is the *P. arenaria* population growing on contaminated soil more tolerant to heavy metals than other common pioneer species growing in the vicinity ? ii/ is the *P. arenaria* population taken from the polluted site more tolerant to heavy metals than a population of the same species taken from an unpolluted natural environment? and iii/ is the metalliferous population of *P. arenaria* able to accumulate and to cope with high internal levels of heavy metal?

VI.3 MATERIAL AND METHOD

VI.3.1 Origin of plant material for seed collection

To identify potential metallophyte species, we performed a comprehensive botanical survey (unpublished results) of a highly polluted metallurgical landfill, located behind a steel smelting factory, near Lyon, France. The area covered about 15 ha and was used since the 1850s to deposit foundry wastes. The soil at this site was not originated from the underlying bedrock but was resulting from the progressive transformation of the waste deposits. Total and “phytoavailable” metals (Table I) were determined from 20 soil samples, taken at 0 to 20 cm depth at random locations over the site. Measurements were performed by ICP-OES, after aqua regia extraction for total metals (NF X 31-151 procedure; AFNOR, 1994) and after ammonium acetate-EDTA extraction for “phytoavailable” metals (NF X 31-120 procedure; AFNOR, 1999), as previously described (Remon *et al.*, 2005). Because the site was still in activity, it was periodically disturbed, due to engine traffic and new waste deposits. The vegetation was hence maintained in an early state of colonization, mainly constituted of annual and biannual fallow land species. Among the different identified taxa, *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. was the dominant species and was virtually present on the overall area. There were also dispersed populations of common pioneer plants, such as *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker and *Verbascum densiflorum* Bertol. These three species were chosen for comparative analysis of metal tolerance. In each case, bulk seeds were collected from 15 to 20 individuals.

In addition to the metalliferous population, seeds of *P. arenaria* were also collected from plants growing in a natural environment, about 50 km apart. Because no other *P. arenaria* stand was known between the two sites, we assumed the two studied populations were genetically distinct. Soil metal contents were analysed as described above, confirming that the substratum was uncontaminated (Table 7.1).

Table 7.1: Heavy metal concentration (total and “phytoavailable” fraction) in metallurgical and natural stands where seeds of *Plantago arenaria* were collected

Sites	Fraction	Metals (mg.kg ⁻¹)			
		Cd	Cu	Ni	Zn
Metallurgical	Total ¹	43 ± 75	975 ± 1436	950 ± 658	3705 ± 7263
	phytoavailable ²	5 ± 12	52 ± 45	7 ± 6	241 ± 288
Natural	Total ¹	ND	37 ± 1	55 ± 5	37 ± 5
	phytoavailable ²	ND	0.13 ± 0.18	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.03

¹ Extracted with aqua regia

² Extracted with ammonium acetate-EDTA

ND Not Detected

VI.3.2 Tolerance testing

Metal tolerance in selected species and populations was measured by a root bending assay, using the “full plate vertical mesh transfer” (VMT) method (Murphy and Taiz, 1995). VMT assemblies were made of a glass plate (15 × 15 cm), covered with a 3MM chromatography paper saturated with culture medium of the following composition: 625 µM Ca(NO₃)₂, 750 µM KNO₃, 500 µM NH₄NO₃, 187.5 µM KH₂PO₄, 187.5 µM MgSO₄, 50 µM NaCl, 7.5 µM K₂HPO₄, 7.5 µM H₃BO₃, 7.5 µM Fe-EDTA, 1.25 µM MnSO₄, 0.25 µM ZnSO₄, 0.062 µM CuSO₄, 0.062 µM Na₂MoO₄, 0.062 µM NiCl₂. A polyamide nylon mesh (Millipore, 80µm) of the same size as the glass plate was put onto the paper, and three rows of 15 seeds, spaced 3 cm apart, were arranged onto the mesh. The assemblies were then placed in a rack (4 plates per rack) inside a glass container containing 1 L of the same culture medium. The bottom of each plate was submerged on about 1.5 cm height. Containers were sealed with wrap plastic film and placed under dim light (16/8 photoperiod) at 24 + 2°C for seed germination, during 48h for *P. arenaria* and 96h for *C. sumatrensis* and *V. densiflorum*.

After this first growth period, seedlings with roots shorter than 5 mm in length were eliminated. Meshes with germinated seeds were then transferred to a second glass plate-paper assembly, saturated with fresh nutrient medium. During the transfer, the mesh was rotated 90° from its original orientation, so that the roots were horizontal on the plate. The assemblies were then replaced in container containing fresh medium, for an additional 24 h incubation period, under light (36 W fluorescent tubes, 4500 °K, 16/8 photoperiod). At the end of this second growth period most roots showed a right angle gravitropic curvature, about 3 mm in length. Seedlings that did not form

the first right angle turn were discarded, as they were assumed to be variants with perturbed gravitropic response.

After this initial screening, the mesh and seedlings were transferred a last time to a new glass plate-paper assembly, saturated with fresh culture medium supplemented with appropriate metal ion at the desired concentration. The mesh was again rotated 90° to place the newly grown roots in a horizontal position. The assemblies were placed in container containing the same test solution for a further 24 h period. Following this last growth period, seedlings that successfully formed a second right angle with a new root elongation of at least 2 mm in length were scored as “non inhibited”; the others were scored as “inhibited”. As proposed by Murphy and Taiz (1995) we used the terms HNI, I₅₀ and LCI to refer to the highest concentration without inhibitory effect, the concentration causing 50 % inhibition and the lowest concentration causing 100 % inhibition, respectively.

Four metal ions were tested: Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺. Ni and Cd were brought as chloride salts, at concentrations ranging from 0 to 2000 µM and 0 to 400 µM respectively. Zn and Cu were used in their sulphate form, at concentrations ranging from 0 to 4000 µM and 0 to 2500 µM respectively. For each metal treatment actual free ionic concentrations were calculated using the PHREEQC-2 software.

VI.3.3 Growth response and metal accumulation pattern in soil culture

Seeds of *P. arenaria* originated from the metallurgical site, were germinated during 10 days on wet vermiculite. Young plantlets were then transplanted to plastic pots (9 × 9 × 11 cm, one plant per pot) filled with 300 g of commercial compost (pH 7.9, total carbonates 5.65 g kg⁻¹, organic carbon 107.7 g kg⁻¹, total nitrogen 7.6 g kg⁻¹, CEC 23 cmol⁺ kg⁻¹) humidified at 70 % relative water content (RWC). For each metal to test, five contamination levels were prepared: they were 2, 5, 10, 20 and 50 mg kg⁻¹ for Cd; 100, 250, 500, 1000 and 2000 mg kg⁻¹ for Cu; 50, 250, 500, 1000 and 2000 mg kg⁻¹ for Ni and 500, 1000, 2000, 4000 and 8000 mg kg⁻¹ for Zn. Contaminations with metal solutions at appropriate concentrations were performed four weeks before planting. For each treatment, metal “phytoavailability” was determined just before transplanting using an ammonium acetate-EDTA extraction, as described above. Plants were grown for 8 weeks in the greenhouse, at 22 +/- 2°C, under a 16h light / 8h dark photoperiod (metal iodide lamp, 1000W). During the overall experiment, each pot was weighted daily and watered to maintain a 70 % RWC. At the end of the culture period, plants were harvested and roots and leaves were separated. Roots were thoroughly

washed with tap water, carefully rinsed with deionised water and rapidly blotted with paper tissue. Leaves and roots were oven-dried at 70 °C for 72 h, dry weights were determined and samples were ground to pass a 2mm sieve.

Measurements of metal concentrations in root and leaf samples were performed by ICP-OES after digestion in hot HNO₃ (Zarcinas *et al.*, 1987), as previously described (Remon *et al.*, 2005).

VI.3.4 Statistics

Tolerance testing by the root bending assay was repeated in three independent experiments for each species. I₅₀ values were calculated by logistic regression using the logit model. Differences were analysed using one-way ANOVA followed by post-hoc comparisons.

For soil culture experiments, five replicates were performed for each treatment. Results were analysed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney's non parametric procedures to test the effects of metal concentrations on plant growth. Correlations between metal concentrations in plants and metal concentrations in the substratum were also tested.

Differences were considered significant for $p < 0.05$. All calculations were made using Statistica V6.1 software (StatSoft).

VI.4 RESULTS

VI.4.1 Comparative analysis of metal tolerance in *P. arenaria*, *V. densiflorum* and *C. sumatrensis* originated from metallurgical landfill

In the first step of this study, we investigated metal tolerance in a population of *P. arenaria* taken from a metal-contaminated landfill, by comparison with two other common fallow land species (*V. densiflorum* and *C. sumatrensis*) growing on the same site.

Data from experimental dose-response curves were analysed to determine HNI, I₅₀ and LCI values (Table 7.2). Results showed that, whatever the studied species, metal ion toxicity increased in the order Zn²⁺ < Cu²⁺ < Ni²⁺ < Cd²⁺, as indicated by I₅₀ and LCI values. Comparison of toxicity thresholds for the different metal/species couples showed that the response to metal ions

was closely similar in *V. densiflorum* and *C. sumatrensis*. Depending on the metal, HNI values ranged from 10 to 50 μM , I_{50} s ranged from 75 to 215 μM and LCIs were between 145 and 620 μM . On the other hand, the *P. arenaria* population taken from the same site was much less sensitive to metal ion toxicity: HNI values ranged from 95 to 190 μM , I_{50} s were between 165 and 490 μM , and LCIs were between 255 and 1000 μM . Taken together, these results showed that *P. arenaria* tolerated about 2 to 4-fold higher free metal ion concentrations than did *V. densiflorum* and *C. sumatrensis*.

Table 7.2: Comparison of metal sensitivity in *Plantago arenaria*, *Verbascum densiflorum* and *Conyza sumatrensis* as determined by the vertical mesh transfer method. (HNI: highest metal concentration causing no root growth inhibition; I_{50} : concentration causing 50 % inhibition; LCI: Lowest concentration causing complete inhibition. All values are given in μM)

Species	Cd^{2+}			Cu^{2+}			Ni^{2+}			Zn^{2+}		
	HNI	I_{50}	LCI	HNI	I_{50}	LCI	HNI	I_{50}	LCI	HNI	I_{50}	LCI
<i>Plantago arenaria</i> ¹	95	165	255	190	490	960	95	355	735	100	450	1000
<i>Verbascum densiflorum</i> ¹	10	75	145	50	150	410	50	105	355	50	205	605
<i>Conyza sumatrensis</i> ¹	50	95	155	50	145	400	25	100	360	50	215	620
<i>Plantago arenaria</i> ²	70	150	230	10	125	385	95	340	705	100	430	1000

¹ populations from metallurgical site

² population from natural site

VI.4.2 Comparative analysis of metal tolerance in two populations of *P. arenaria*

To determine whether metal tolerance in *P. arenaria* was a constitutive or an adaptative trait, we compared the population originated from the metallurgical landfill with another population taken from a natural unpolluted site (Table 7.2). Comparison of toxicity thresholds on the basis of I_{50} values, indicated that both populations were equally tolerant to metal ions ($p > 0.115$) but Cu^{2+} ($p << 0.001$), for which the “natural” population was much more sensitive. Consequently, because this later population was more sensitive to Cu^{2+} than to Ni^{2+} , metal ion toxicity increased in the order $\text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$. In fact, except for the HNI value, response to Cu^{2+} ions was about the same in the “natural” population of *P. arenaria* and in the populations of *V. densiflorum* and *C. sumatrensis*.

VI.4.3 Growth response and metal accumulation in *P. arenaria* in soil cultures

To check whether *P. arenaria* was able to cope with high internal metal levels, we analysed metal accumulation and growth pattern of plants from the metalliferous population after an eight-week cultivation period in artificially contaminated soils. Metal accumulation was determined both in root and leaf tissues and plant development was estimated by measuring dry weight of above-ground parts; results were plotted against the levels of phytoavailable metal in contaminated soils.

Whatever the tested metal, increasing in soil concentration resulted in a sharp increase in plant concentration (Fig. 7.1). However, despite a significant metal uptake, at the end of the experiment all treated plants were apparently healthy and did not show any sign of chlorosis or wilting, generally associated to metal toxicity. Roots were the main site of metal accumulation, with a mean shoot:root concentration ratio ranging from 0.15 to 0.30, depending on the metal. In all cases, metal accumulation was directly proportional to phytoavailable fraction, both in roots ($r^2 \geq 0.92$, $p \leq 0.003$) and leaves ($R^2 \geq 0.85$, $p \leq 0.008$).

For plants cultivated on Cd contaminated soil (Fig. 7.1a) growth was unaffected ($p=0.11$) in the range of 1.6 to 39 mg kg⁻¹ of extractable Cd, while tissue metal concentrations rose up to 103 mg kg⁻¹ DW and 15 mg kg⁻¹ DW in roots and leaves respectively. Consequently we concluded that *P. arenaria* could cope with those internal Cd levels without any growth reduction. For Cu treatments (Fig. 7.1b), root and leaf metal concentrations reached respectively 800 mg kg⁻¹ and 105 mg kg⁻¹ at the higher metal exposure (1600 mg kg⁻¹ of extractable Cu), resulting in a 2-fold decrease in dry biomass ($p=0.009$). Comparisons of growth data showed that *P. arenaria* could accumulate Cu up to about 93 mg kg⁻¹ DW in roots and 36 mg kg⁻¹ DW in leaves without growth reduction. For Ni treatment (Fig. 7.1c), a growth inhibition ($p=0.009$) was only observed for the higher metal exposure, *i.e.* 1390 mg kg⁻¹ of extractable Ni. In the range of 5 to 660 mg kg⁻¹ of soil Ni, growth was unaffected ($p=0.83$), while Ni tissue levels rose to 245 mg kg⁻¹ DW and 30 mg kg⁻¹ DW in roots and leaves respectively. Last for Zn treatment (Fig. 1d), comparisons of data, showed that growth was unaffected ($p=0.07$) up to internal Zn levels of 2885 mg kg⁻¹ DW in roots and 497 mg kg⁻¹ DW in leaves.

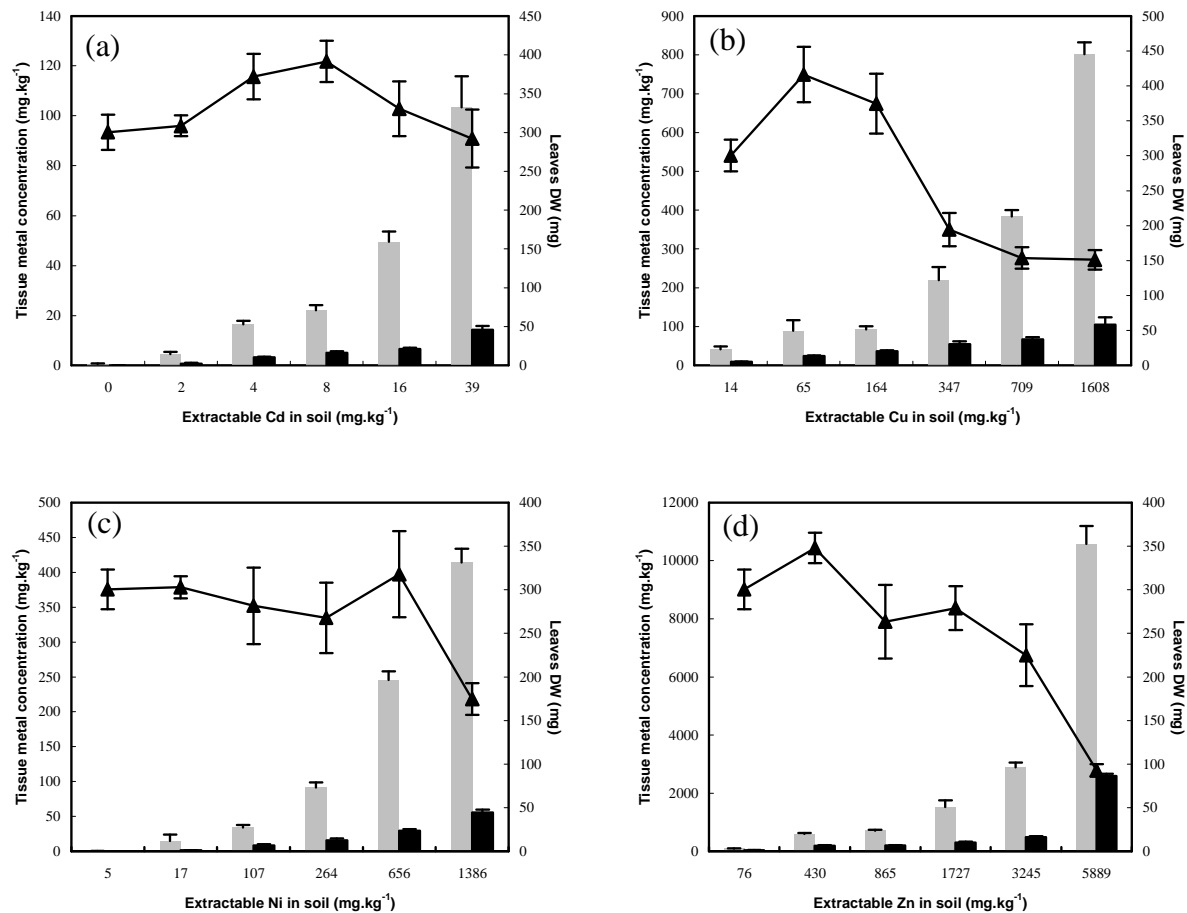


Figure 7.1: Metal accumulation in leaves (■) and roots (■) and growth of leaf system (▲) in *Plantago arenaria* cultivated for 8 weeks on artificially contaminated soils with increasing concentrations of (a): Cd; (b): Cu; (c): Ni and (d): Zn. Bars represent SE, n = 5

VI.5 DISCUSSION

VI.5.1 *P. arenaria* is a pseudometallophyte species which can tolerate several heavy metals

According to Baker (1987), plants growing on metalliferous soils can be arranged into two categories: the pseudometallophytes *sensu* Lambinon and Auquier (1963) and the accidental metallophytes. The formers are truly metal-tolerant and can constitute large and vigorous populations, while the later, albeit being able to partially avoid the effects of metal stress, are not truly tolerant and appear only sporadically with reduced vigour.

Because we found *P. arenaria* to be largely dominant on a highly contaminated metallurgical landfill, we hypothesized it could be a pseudometallophyte species with populations having a high tolerance to various heavy metals. To check this hypothesis we compared its metal tolerance levels with those of *V. densiflorum* and *C. sumatrensis*, taken as controls from the same site and which we assumed to be accidental metallophytes. Our results showed that the metallurgical population of *P. arenaria* was actually from 2 to 4-fold more tolerant to Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} than were *V. densiflorum* and *C. sumatrensis*.

Since there is no standardized procedure to quantify metal tolerance, it is difficult to compare the tolerance levels of *P. arenaria* with those previously published for other species. However, we can notice that in various ecotypes of *Arabidopsis thaliana* studied with the same experimental design (Murphy and Taiz, 1995; Navarro *et al.*, 1999), HNI and LCI values for Cu^{2+} were about 8 to 10-fold lower than in the metallurgical population of *P. arenaria* studied here. Likewise, for Cd^{2+} and Ni^{2+} *A. thaliana* was about 2 to 4-fold more sensitive than *P. arenaria*. At the opposite for Zn^{2+} HNI and LCI values were about the same in *A. thaliana* and *P. arenaria*.

Consequently, taken together these data show that the metallurgical population of *P. arenaria*, when compared to *A. thaliana*, *V. densiflorum* and *C. Canadensis*, is highly tolerant to Cu^{2+} , moderately tolerant to Cd^{2+} and Ni^{2+} , but not particularly tolerant to Zn^{2+} . Thus it can be concluded that *P. arenaria* is indeed a pseudometallophyte species and that the metallurgical population we studied is multi-metal tolerant.

VI.5.2 Metal tolerance in *P. arenaria* could be an adaptative trait for Cu and a constitutive trait for Cd and Ni

One key question to be asked (Baker, 1987) when studying metal-tolerant populations, is to know whether the observed tolerance results from an evolutive process due to the selective pressure exerted by metals, or if it is a constitutive trait present throughout the whole range of the species.

To address this issue, we compared metal tolerance in two distinct populations of *P. arenaria*, taken either from the metallurgical site or from an uncontaminated environment. When Cu was considered, the metallurgical population was much more tolerant, with HNI and LCI values respectively 19 and 2.5-fold higher than in the natural population. Thus it can be concluded that the high Cu tolerance in the metallurgical population of *P. arenaria* is an adaptative trait, as already

shown in many other copper tolerant species (Macnair *et al.*, 1993; Lehman and Rebele, 2004). At the opposite, when Cd²⁺ and Ni²⁺ were considered no difference in metal tolerance was evidenced between the metallurgical and the natural populations of *P. arenaria*. Although other populations from a larger distribution range should be tested, these results strongly suggest that *P. arenaria* could display a constitutive tolerance to Cd²⁺ and Ni²⁺.

VI.5.3 *P. arenaria* mainly accumulates metals in roots and behaves like an indicator species

Our results in pot experiments showed that *P. arenaria* accumulated relatively high metal levels, both in roots and leaves, when growing on artificially polluted soil. This confirmed it was a truly tolerant species, which was capable to alleviate the effects of internal metals. In fact, metal accumulation was always higher in roots than in leaves, and the leaf:root concentration ratios was kept constant over a wide range of soil metal concentrations. This strongly suggests that metal tolerance in *P. arenaria* is closely related to its ability to retain toxic metal ions in roots and to tightly control their translocation to leaves. This is in accordance with the general observation that the level of metal tolerance in pseudometallophytes is generally positively correlated with a greater metal retention in roots (Wojcik *et al.*, 2005). Although the exact mechanisms involved in root retention and internal detoxification have still to be studied, this could be partly achieved by binding in cell walls, compartmentalization in vacuole (Rauser, 1999) and/or modification of metal speciation (Panfili *et al.*, 2005) resulting in a decrease in metal mobility.

It is generally admitted that pseudometallophyte species can be separated into three categories (Baker, 1981) depending on their metal uptake characteristics: (i) “(hyper)-accumulators”, where metal are concentrated in leaves, (ii) “indicators”, where leaf metal concentrations are proportional to the soil concentration, and (iii) “excluders”, where metal concentrations in leaves are maintained constant or low over a wide range of soil concentrations. For *P. arenaria*, our results showed that leaf metal accumulations were directly proportional to soil concentrations. This clearly demonstrates that *P. arenaria* behaves as an “indicator” species.

VI.5.4 Constitutive metal tolerance in *P. arenaria* might be an inherent attribute of pioneer xerophytic species

Although the hypothesis of constitutional traits allowing metal tolerance in plants was originally dismissed in the major review of Antonovics *et al.* (1971), there is no doubt today that

innate tolerance does exist in some metallophyte species (McNaughton *et al.*, 1974; Gibson and Risser, 1982; Meerts and Van Isacker, 1997; Ye *et al.*, 1997b; Bert *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2004; Lehmann and Rebel, 2004). Surprisingly, this phenomenon has been poorly studied and is still considered as a marginal feature occurring in a few particular species. In the present work we showed that *P. arenaria* could display both an adaptative and a constitutive tolerance, depending on the metal.

A hypothesis to explain the scarcity of taxa clearly identified as constitutionally tolerant, might be that colonization of contaminated soils by species showing innate resistance would be a first and transient step of natural revegetation process, preceding development of more competitive populations selected for their adaptative tolerance (Bradshaw, 1983). In this work we studied a highly contaminated metallurgical site which was in a very early stage of plant colonization, and we showed that the pioneer species *P. arenaria* was indeed constitutively tolerant to Ni and Cd. This result is in accordance to the above assumption and suggests that innate metal tolerance might be a trait not as rare as previously thought in a number of pioneer species.

By definition, constitutive metal tolerance is not related to metal exposure and is not detrimental for growth on uncontaminated soil. This is obviously in contrast with adaptative metal tolerance which is assumed to have a biological cost and which is lost under non selective conditions. Consequently the hypothesis has been made (Bert *et al.*, 2000) that constitutive tolerance might be related to factor other than metals, and could be of wider ecological significance. In this context it is interesting to note that constitutively tolerant species identified to date, are either wetland species or xerophytic species, *i.e.* species adapted to water stress. In addition, it is well known that one of the first effects of metal exposure is a perturbation of the plant water balance (Barcelo and Poschenrieder, 1990) and that adaptative metal tolerance could result in an alleviation of metal-induced water stress (Schat *et al.*, 1997). Conversely, it is tempting to speculate that the capacity to alleviate water stress in dryland species could also confer non specific metal tolerance.

Whatever it is, it is obvious that the mechanisms involved in constitutive metal tolerance have been still largely disregarded and should be further investigated. In this respect *P. arenaria* could provide a new and efficient experimental model to get new insights into this complex phenomenon.

VI.6 REFERENCES

- AFNOR, 1994. Norme NF X 31-151. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, pp. 123-129.
- AFNOR, 1999. Norme NF ISO 10390. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, 1, pp. 339-347.
- AFNOR, 1999b. Norme NF X 31-120. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, 1, pp. 237-243.
- Al-Hiyaly, S.A., McNeilly, T., Bradshaw, A.D., 1988. The effects of zinc contamination from electricity pylons – evolution in a replicated situation. *New Phytologist* 110, 571-580.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7, 1-85.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3 (1-4), 643-654.
- Baker, A.J.M., 1987. Metal tolerance. *New Phytologist* 106, 93-111.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* 13, 1-37.
- Bert, V., Macnair, M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D., 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* 146, 225-233.
- Bradshaw, A.D., 1983. The reconstruction of ecosystems. *Journal of Applied Ecology* 20, 1-17.
- Brooks, R.R., 1998. Biogeochemistry and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing Wallingford, pp. 95-118.
- De Kok, R., 2002. Are plant adaptations to growing on serpentine soil rare or common? A few case studies from New Caledonia. *Adansonia* 24 (2), 229-238.

- Gibson, D.J., Risser, P.G., 1982. Evidence for the absence of ecotypic development in *Andropogon virginicus* (L.) on metalliferous mine wastes. *New Phytologist* 92, 589-599.
- Lambinon, J., Auquier, P., 1963. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhénanie aixoise. *Natura Mosana* 16 (4), 113-130.
- Lehmann, C., Rebele, F., 2004. Evaluation of heavy metal tolerance in *Calamagrostis epigejos* and *Elymus repens* revealed copper tolerance in a copper smelter population of *C. epigejos*. *Environmental and Experimental Botany* 51, 199-213.
- Macnair, M.R., 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New phytologist* 124, 541-559.
- Macnair, M.R., Smith, S.E., Cumbes, Q.J., 1993. Heritability and distribution of variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus* at Copperopolis, California. *Heredity* 71, 445-455.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., McCabe, P.F., Otte, M.L., 2004. Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*. *Aquatic Botany* 80, 39-52.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., Otte, M.L., 2005. Screening the wetland plant species *Alisma plantago-aquatica*, *Carex rostrata* and *Phalaris arundinacea* for innate tolerance to zinc and comparison with *Eriophorum angustifolium* and *Festuca rubra* Merlin. *Environmental Pollution* 134, 343-351.
- McNaughton, S.J., Folsom, T.C., Lee, T., Park, F., Price, C., Roeder, D., Schmitz, J., Stockwell, C., 1974. Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races. *Ecology* 55, 1163-1165.
- Meerts, P., Van Isacker, N., 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology* 133, 221-231.
- Monni, S., Salemaa, M., White, C., Tuittila, E., Huopalaainen, M., 2000. Copper resistance of *Calluna vulgaris* originating from the pollution gradient of a Cu-Ni smelter, in southwest Finland. *Environmental Pollution* 109, 211-219.

- Murphy, A., Taiz, L., 1995. A new vertical mesh transfer technique for metal-tolerance studies in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 108, 29-38.
- Navarro, S.X., Dziewatkoski, M.P., Enyedi, A.J. 1999. Isolation of cadmium excluding mutants of *Arabidopsis thaliana* using a vertical mesh transfer system and ICP-MS. *Journal of Environmental Science Health* 34 (A), 1797-1813.
- Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., Laboudigue, A., Marcus, M.A., Ahamdach, N., Libert, M-F., 2005. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69 (9), 2265-2284.
- Rausser, W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31, 19-48.
- Remon, E., Bouchardon, J-L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J-C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137, 316-323.
- Schat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101, 477-482.
- Taylor, G.J., Crowder, A.A., 1984. Copper and nickel tolerance in *Typha latifolia* clones from contaminated and uncontaminated environments. *Canadian Journal of Botany* 62, 1304-1308.
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41, 219-228.
- Wild, H., Bradshaw, A.D., 1977. The evolutionary effects of metalliferous and other anomalous soils in South Central Africa. *Evolution* 31, 282-293.
- Wojcik, M., Vangronsveld, J., Tukiendorf, A., 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* L. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 53, 151-161.

- Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity* 34 (2), 165-187.
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1997a. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*. *New Phytologist* 136, 469-480.
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1997b. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Annals of Botany* 80, 363-370.
- Zarcinas, B.A., Cartwright, B., Spouncer, L.R., 1987. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 18, 131-146.

CHAPITRE VII

PLANTAGO ARENARIA : TOLÉRANCE ET ACCUMULATION DU CADMIUM

Cadmium tolerance and “indicator” strategy in a *Plantago arenaria* population growing on a metallurgical wastes deposit

E. Remon, J-L. Bouchardon, O. Faure

Article soumis dans la revue Journal of Soil Science and Plant Analysis

VII.1 ABSTRACT

A *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. population originated from a Cd-polluted metallurgical landfill was studied, in order to assess its Cd tolerance and accumulation pattern under acute and chronic metal stress. Acute Cd toxicity was evaluated on 20-day old plantlets after 3 days of metal exposure (0 to 400 μM). With respect to root elongation, the concentration causing 50 % growth inhibition (EC50) was 28 μM . Chronic Cd toxicity was evaluated after 8 weeks of culture on artificially contaminated soil (0 to 50 mg kg^{-1}). Under these conditions, the non observed effect concentration (NOEC) was about 20 mg kg^{-1} . Whatever the culture conditions, tissue Cd accumulations were highly correlated to external metal levels. Moreover, Cd was mainly accumulated in roots, with a constant leaf/root concentration ratio for a wide range of metal exposure. Although Cd accumulation induced a significant decrease in tissue water content, treated plants were apparently healthy with no symptom of chlorosis or withering. Taken together, these results showed that *P. arenaria* was able to finely control the entry of Cd into the roots and its translocation toward the leaves. Also, it could alleviate the effects of Cd-induced water loss. Thus, *P. arenaria* is a Cd-tolerant “indicator” species which might resist to both acute and chronic Cd toxicity at levels largely above those found in most polluted sites. This species could be useful in phytoremediation strategies and could provide a new additional model for studying the diversity of the mechanisms involved in Cd tolerance in plants.

VII.2 INTRODUCTION

During the last two decades, soil contamination with cadmium (Cd) has become a growing problem in a number of industrialized nations. Indeed, besides its utilization in various industrial processes (e.g. pigments, plastic stabilizer, electroplating, batteries ...), Cd is a by-product of Zn smelting and steel factories; it is also present in phosphate fertilizers and in sewage sludge. This makes Cd an ubiquitous pollutant that is now widespread both in urban and agricultural areas (He *et al.*, 2005). Moreover, among the main heavy metals found in contaminated soils, Cd is one of the most mobile (Adriano, 2001), it is highly toxic for living organisms and is probably carcinogenic at low concentration (Waalkes, 2003). Thus, its transfer to water resources and/or to the food chain could pose a serious public health problem.

Unfortunately, because of the high costs for excavation/landfilling procedures or chemical treatments, it is obvious that most of Cd-polluted sites will not be cleaned-up in the near future. It is thus necessary to develop low-cost alternative methods which could be used to stabilize metal *in situ* and decrease the potential hazard of Cd-polluted soils.

In this respect, phytostabilization (Vangronsveld *et al.*, 1995; Rock, 2003) could be an effective strategy for treating highly polluted and depredated sites with low commercial value. Indeed, it is largely recognized that plants have a beneficial effect on soil stability and prevent wind and water erosion. Moreover, through the phenomenon of evapotranspiration, plants act as “water pumps” reducing pollutants percolation to the groundwater. Last, vegetation contributes to soil formation and could help to restore a healthier ecosystem at metal contaminated sites (Wong, 2003).

However, many polluted soils are not well fitted for plant cultivation because of compaction, high pH, nutritional imbalances, and dryness (Wong, 2003). In this context, a suited plant species for colonizing polluted and degraded soils should be not only metal resistant, but also tolerant to drought and to lack of nutrients. Additionally, it should be easy to propagate, either by seeds or by vegetative multiplication.

To identify species gathering the above characteristics, undertaking botanical surveys on diverse Cd-polluted sites could be helpful. Indeed, it is obvious that a number of pioneer plant species are able to colonize highly polluted and degraded soils (Antonovics *et al.*, 1971), sometimes forming large populations, actively growing and without stress symptom. Such species, adapted to

extreme edaphic conditions, could be potential candidates for phytostabilization strategies. Also, identification of new species growing on Cd-contaminated soils could provide new experimental models for studying the physiological and biochemical adaptations allowing metal tolerance in plants.

In fact it is well known that different strategies have evolved in plants for survival on metal-contaminated soils (Baker, 1987). Thus, plants can be classified into three main categories (Baker, 1981) according to their metal uptake characteristics: (i) “accumulators”, where metal are concentrated in above-ground plant parts, (ii) “indicators”, where leaf metal accumulations are proportional to the soil concentration and (iii) “excluders”, where metal concentrations in leaves are maintained constant and low over a wide range of soil concentrations. Up to now however, most of the studies have focused on the special case of “accumulators” and only few species, such as *Thlaspi caerulescens* (Roosens et al., 2003) and *Arabidopsis halleri* (Bert et al., 2003), have been used as model systems for studying Cd tolerance. Consequently, more systematic analyses about the native vegetation of polluted areas should be undertaken, in order to get additional insights about the diversity of plants capable to grow on Cd-contaminated soils.

In this perspective, we performed a comprehensive botanical survey of a severely Cd-contaminated site. Among the various taxa present at this site (unpublished results), we identified *Plantago arenaria* as the major dominant species and we postulated that it could have a high tolerance to Cd. To check this hypothesis and to characterize the tolerance strategy involved in this species, we investigated the effects of Cd in controlled conditions, both under acute exposure in hydroponics and under chronic exposure in artificially contaminated soil.

VII.3 MATERIAL AND METHOD

VII.3.1 Biological features of *P. arenaria*

Plantago arenaria (taxonomic synonyms: *P. scabra* Moench.; *P. psyllium* L.) is an annual species whose distribution area extends from Asia to Europe; it is also present in North America, as an introduced taxon. This species mostly colonizes disturbed grounds and sandy soils in sunny locations; it easily withstands drought periods and is considered as a xerophytic species. The plant is self-fertile and pollinated by wind. It flowers from July to August.

VII.3.2 Prospected site for seeds collection

The prospected site was a steel and iron smelting factory located near Lyon, France. Behind the plant, a large landfill (about 15 ha) was used since the fifties to deposit foundry wastes. The soil at this site was not originated from the underlying bedrock but was resulting from the progressive transformation of the waste deposits. This soil was characterized (Remon *et al.*, 2005) by a neutral to alkaline pH (7.2 to 8.9), a high organic carbon content (> 8 %) and a high C/N ratio (> 40). This kind of soil, of anthropogenic origin, can be classified in the foundric subgroup of the Xerorthents (Buondonno *et al.*, 1998). The median value of Cd levels was 13.5 mg kg⁻¹ (n=20).

Although the site was still in activity, with important engine traffic, many places were undisturbed and were colonized by various plant species. Dominant taxons were mostly annual or biannual forbs such as *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker, *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter, *Melilotus albus* Medik., *Oenothera biennis* L., *Plantago arenaria* Waldst. & Kit., and *Scrophularia canina* L.; there were also a few trees such as *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle and *Populus nigra* L. Among these different taxas, *P. arenaria* was virtually present all over the site and was selected for further analysis. For laboratory studies, seeds were taken from mature plants in early September.

VII.3.3 Estimation of Cd tolerance under acute exposure

Seeds of *P. arenaria* were germinated for 10 days on wet vermiculite. Young plantlets with two well developed leaves were then suspended into 4 L culture solution (10 plants per vessel) of the following composition: 2.5 mM Ca(NO₃)₂, 2.0 mM NH₄NO₃, 3.0 mM KNO₃, 750 μM KH₂PO₄, 750 μM MgSO₄, 200 μM NaCl, 30 μM K₂HPO₄, 30 μM Fe-EDTA, 5 μM MnSO₄, 30 μM H₃BO₃, 1 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.25 μM Na₂MoO₄, 0.25 μM NiCl₂. The medium was buffered at pH 6.1 with 2 mM MES. Cultures were continuously aerated and placed at 22 ± 2°C under a 16h illumination period (2 X 30 W “cool-white” fluorescent lights). After one week, roots were blackened with activated charcoal and one leave of each rosette was measured and marked with a thin polypropylene ring. Plants were then transferred to fresh nutrient solutions, supplemented with CdCl₂ at concentrations of 0, 5, 25, 50, 75, 100, 200 and 400 μM. After 72 h of Cd exposure, root and leaf elongations were measured. Mean organ elongation was expressed as percent of control.

At the end of treatment, elongations were scored and roots were rinsed for 15 min in cold 5mM CaCl₂ to desorb external Cd. Plants were then separated into root and leaf parts, and fresh

weights were immediately scored. They were next placed in an oven at 70 °C for 72 h to determine dry weight. Dry samples were stored at 4 °C until Cd quantifications.

VII.3.4 Estimation of Cd tolerance under chronic exposure

Seeds of *P. arenaria* were germinated for 10 days on wet vermiculite. Young plantlets were then transplanted to plastic pots (9 × 9 × 11 cm, one plant per pot) filled with 300 g of commercial compost (pH 7.95, total carbonates 5.65 g kg⁻¹, TOC 107.7 g kg⁻¹, total nitrogen 7.6 g kg⁻¹, CEC 23 cmol⁺.kg⁻¹) humidified at 70% relative water content (RWC). Contaminations with Cd (brought as CdCl₂ solutions) were performed four weeks before planting to obtain final concentrations of 0, 2, 5, 10, 20 and 50 mg kg⁻¹ DW. For each Cd concentration, the “phytoavailable” fraction was determined just before transplanting, using a 24 h extraction in a solution containing 1 M ammonium acetate and 0.01 M EDTA at pH 7, according to the standardized NF X31-120 method (AFNOR, 1999). Plants were grown for 8 weeks in the greenhouse, at 22 ± 2 °C, under a 16 h light / 8 h dark photoperiod (metal iodide lamp, 1000 W). Throughout the experiment, each pot was weighted daily and watered to maintain a 70 % RWC. At harvest, roots and shoots were separated. Roots were carefully washed with tap water and deionised water successively, and rapidly blotted with paper tissue. Shoots and roots were immediately weighted to record fresh weight. They were then oven-dried at 70 °C for 72 h to determine dry weight, and stored at 4 °C before Cd analysis.

VII.3.5 Plant digestion and Cd quantification

Dry root and shoot samples were ground to pass a 2 mm sieve and digested using hot 65 % HNO₃, according to Zarcinas *et al.* (1987). Concentrations of Cd in various extracts were measured by inductively coupled optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Jobin-Yvon JY24 apparatus. Wavelength was chosen by “profile function” to give the highest sensitivity for Cd, without interference (228.802 nm). Quantitative analyses were performed using calibration curves made with a certified PlasmaCal Cd standard solution (SCP Sciences – Canada). The calibration standards were prepared in the same matrix used for the extracts. Limit of detection was 0.14 µg l⁻¹. To check the analytical precision, randomly chosen samples (about 20 % of the total number) were measured in triplicate. The relative standard deviation was routinely between 1 and 5 %, and never higher than 10 %.

VII.3.6 Statistical analysis

For acute toxicity tests in hydroponics, three independent experiments with 10 replicates per condition were carried out. As there was no evidence for significant differences between independent assays, values from individual experiments were combined to increase the power of the analysis. One-way ANOVA, followed when necessary by post-hoc comparisons (Scheffé procedure), and Student's t-test were used to analyse the effect of Cd treatment on plant growth and metal accumulation.

For chronic toxicity tests in soil culture, five replicates were performed for each treatment. Results were analysed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney's non parametric procedures to test the effect of Cd concentration on plant growth and accumulation.

Correlations between Cd concentrations in plants and Cd concentrations in the culture media were also tested. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

VII.4 RESULTS

VII.4.1 Effects of cadmium in short-term hydroponics

The effects of acute Cd exposure were analysed on 20-day old plantlets after three days of metal treatment. At the end of the experiment, Cd exposed plants showed a slightly brownish aspect of their root system. However, leaves of treated plants were closely similar to that of controls, with no sign of chlorosis or wilting.

Although Cd-exposed plants were apparently healthy, the presence of metal induced a marked growth reduction (Fig. 6.1). Root elongation was more sensitive to Cd than leaf elongation, with concentrations causing 50% growth inhibition (EC50) of 28 μM and 86 μM respectively.

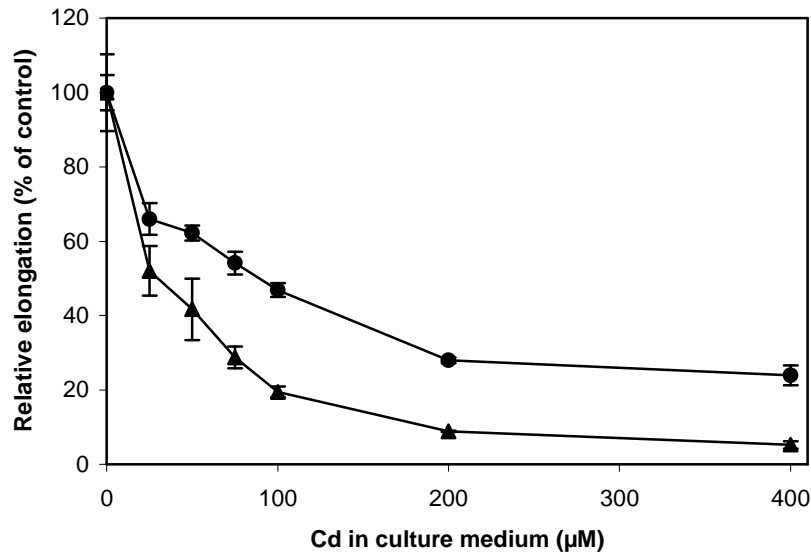


Figure 6.1: Effect of Cd on the growth of 20-day-old *P. arenaria* plantlets after 3 days exposure in hydroponics. Growth was estimated as relative elongation (% of control) of leaves (circles) and roots (triangles). Means \pm SD, n = 30

In addition to growth inhibition, another effect of Cd treatment was a sharp decrease in root and leaf water contents (Fig. 6.2). For roots, Cd-induced water loss was highly significant ($p < 0.0001$) from the 25 μM exposure, where a 30 % decrease was already observed. Under higher Cd treatments the water content kept decreasing and reached a minimal value from 200 μM , which was about 2-fold lower than in controls. In leaves a significant decrease in water content ($p = 0.004$) was also observed as a result of Cd treatment, but this phenomenon was less pronounced than in roots. Maximum water loss was reached from 200 μM Cd; water content was then 35 % lower than in controls.

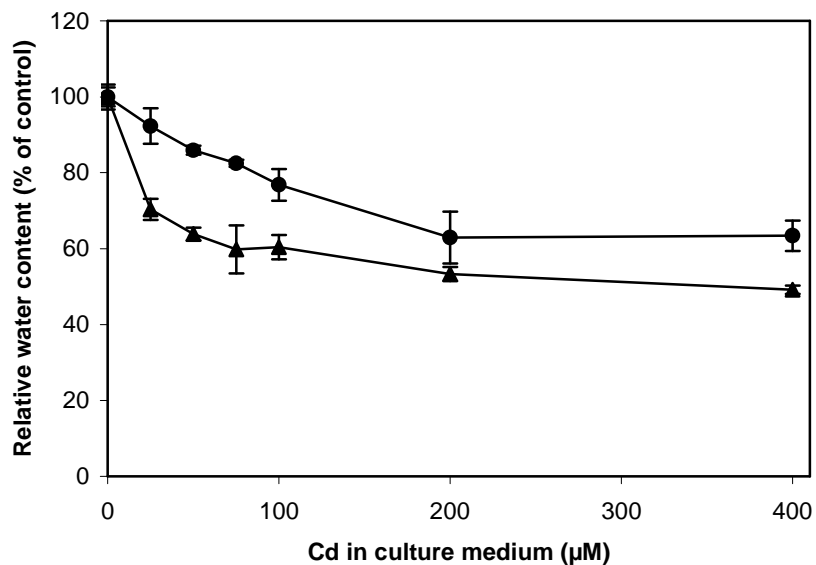


Figure 6.2: Effect of Cd on the water content (% of control) of leaves (circles) and roots (triangles) of 20-day-old *P. arenaria* plantlets after 3 days exposure in hydroponics. Means \pm SD, n = 30

Cd accumulation with increasing concentrations in the culture solution is shown in figure 6.3. In roots (Fig. 6.3a), two distinct steps in Cd uptake were observed. In the range of 0 to 100 μM , Cd concentration increased linearly as a function of external Cd concentration ($R^2 = 0.98$, $p = 0.0007$), reaching about $10,000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$ for the 100 μM exposure. For higher exposures, metal accumulation increased drastically, and reached about $80,000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$ at 400 μM . In leaves (Fig. 6.3b), Cd levels remained much lower than in roots and the pattern of accumulation was different: up to 100 μM Cd in the culture medium, metal concentration was significantly proportional ($R^2 = 0.99$, $p < 0.0001$) to the concentration in the solution, then stabilized to a maximal value (about $900 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) from 200 μM .

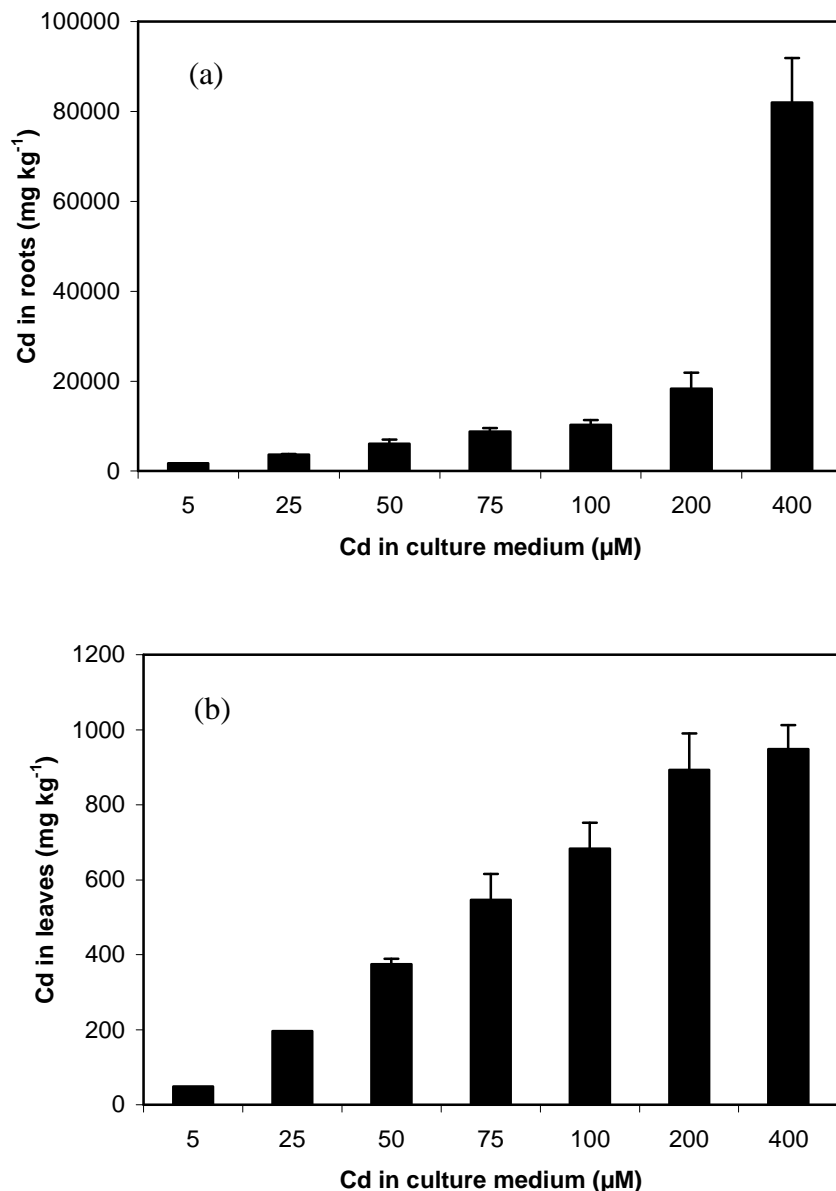


Figure 6.3: Cadmium accumulation in roots (a) and leaves (b) of 20-day-old *P. arenaria* plantlets after 3 days of Cd exposure in hydroponics. Means \pm SD, n = 30

In fact, in the range of 0 to 100 µM exposure, leaf Cd concentrations were directly correlated ($R^2 = 0.99$, $p = 0.0001$) to root concentrations, with Cd levels about 17-fold higher in roots than in leaves. However, at 400 µM Cd, the massive entry of Cd in the root system without concomitant accumulation in leaves, led to a sharp increase of the root/shoot concentration ratio; Cd accumulation was then 95-fold higher in roots than in leaves.

VII.4.2 Effects of cadmium in long-term soil cultures

The effects of chronic Cd exposure were evaluated after an 8-weeks cultivation period in contaminated soil, at metal total levels varying from 0 to 50 mg kg⁻¹. At the onset of the experiment, 75 ± 7 % of the added Cd was extracted with ammonium acetate plus EDTA, whatever the soil total concentration. Although this suggested a high metal phytoavailability, no visible stress symptom was evidenced and, at the end of the experiment, treated plants were indistinguishable from the controls, even at the highest Cd level.

In order to better quantify the effects of Cd on plant growth, leaf and root dry biomass were determined (Fig. 6.4). Results suggested that growth of the leaf system was slightly stimulated at low Cd levels, *i.e.* up to 10 mg/kg. However, the overall results in the range of 0 to 50 mg kg⁻¹ didn't show a significant difference in relative growths. This led to the conclusion that, when the development of the above ground parts was considered, the non observed effect concentration (NOEC) was higher than 50 mg kg⁻¹ of soil total Cd. At the opposite, Cd induced a significant decrease in root development (using either an ANOVA or a KruskalWallis test, $p = 0.0014$ and 0.033 respectively), as shown by the 65 % reduction in dry root biomass of plants exposed to 50 mg kg⁻¹. Using post-hoc pairwise comparisons of data, we estimated the NOEC for root development at 20 mg kg⁻¹.

The increase in soil Cd led to a significant decrease ($p = 0.006$) in root water contents (Fig. 6.5). Thus, in plants exposed to 50 mg kg⁻¹, root water content had decreased by about 30 % relative to the control. However, leaf water content remained unchanged.

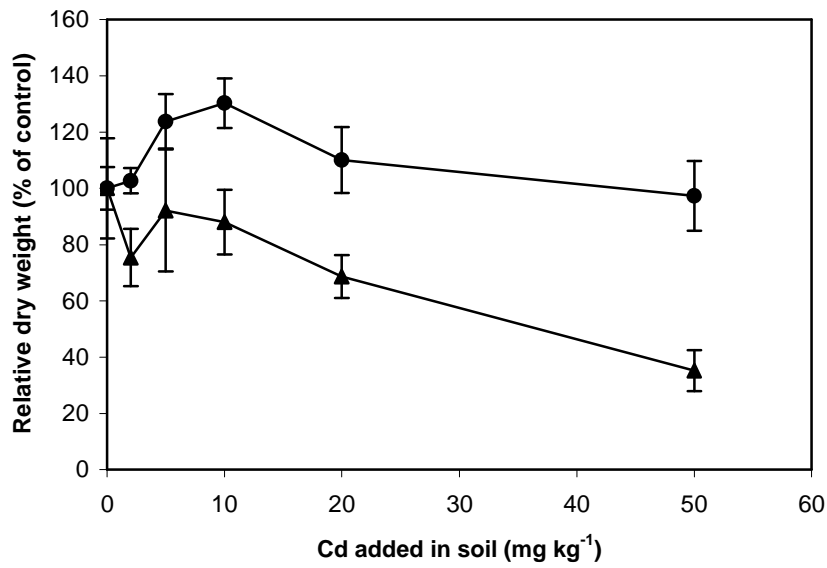


Figure 6.4: Effect of Cd on the growth of *P. arenaria* after 8 weeks of culture on artificially contaminated soil. Growth was estimated as relative dry weight (% of control) of leaves (circles) and roots (triangles). Means \pm SD, n = 5

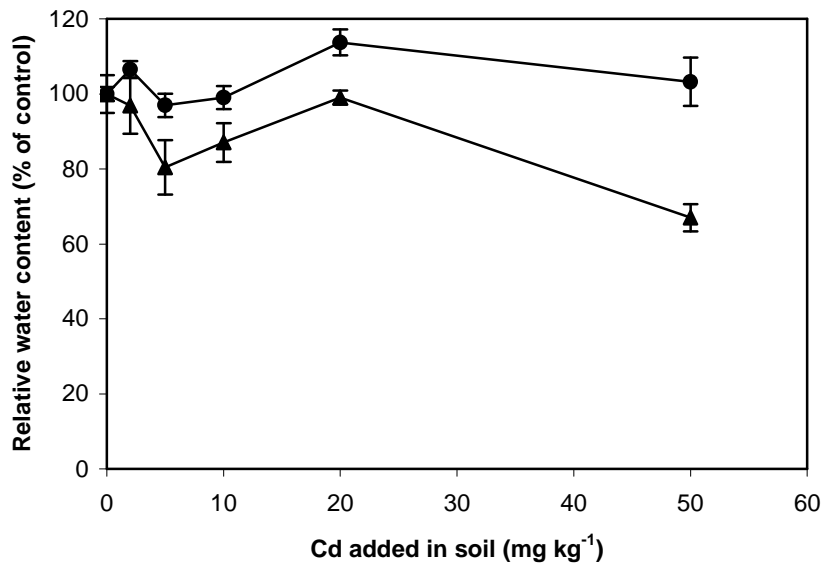


Figure 6.5: Effect of Cd on the water content (% of control) of leaves (circles) and roots (triangles) of *P. arenaria* after 8 weeks of culture on artificially contaminated soil. Means \pm SD, n = 5

Measurements of plant Cd concentrations showed that the increase in soil Cd levels resulted in a proportional increase in Cd concentrations (Fig. 6.6), both in roots ($R^2 = 0.99$, $p < 0.0001$) and in leaves ($R^2 = 0.96$, $p = 0.0004$). When expressed on a dry weight basis, Cd levels were always higher in roots than in leaves and reached respectively 103 mg/kg and 14 mg/kg. In fact there was a direct relationship ($R^2 = 0.97$, $p = 0.0002$) between root and leaf Cd concentrations, and Cd levels were consistently about 4-fold higher in roots than in leaves.

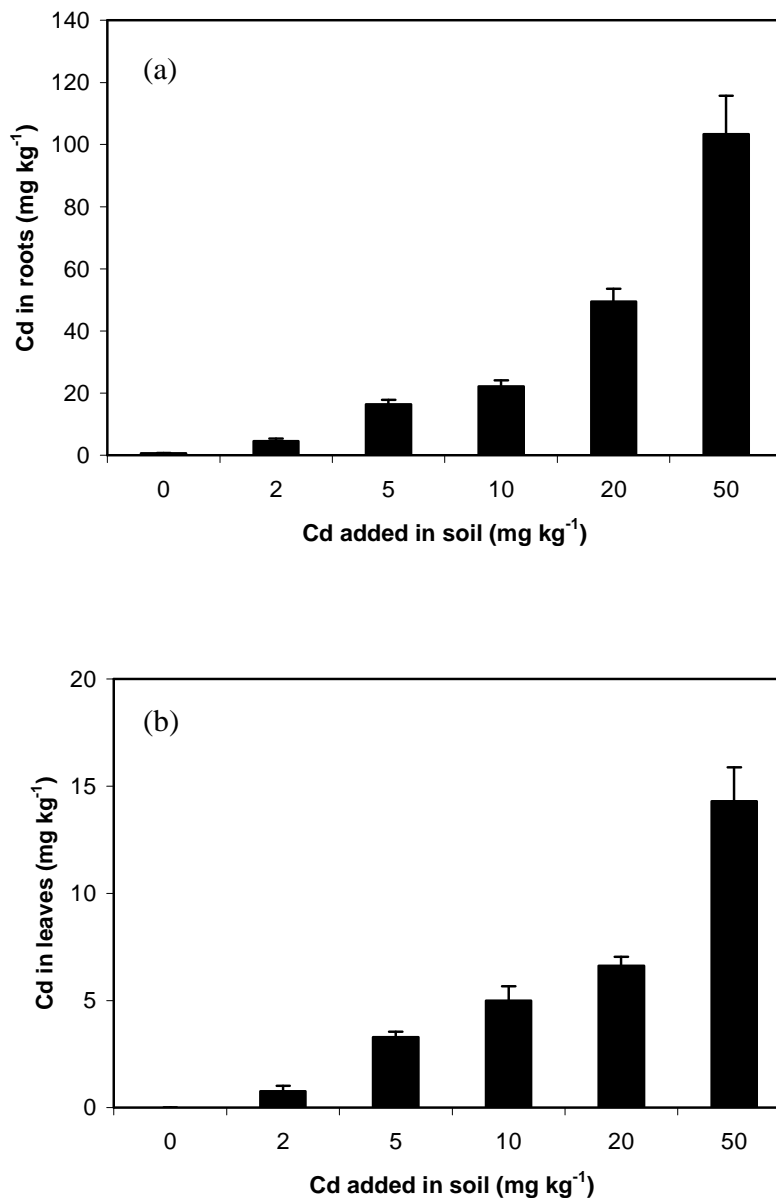


Figure 6.6: Cadmium concentrations in roots (a) and leaves (b) of *P. arenaria* after 8 weeks of culture on artificially contaminated soil. Means \pm SD, $n = 5$

VII.5 DISCUSSION

In most cases, experiments for testing metal tolerance are performed in hydroponics using a short exposition to high metal levels (Macnair, 1993). This approach is very efficient in evaluating acute metal toxicity under perfectly controlled laboratory conditions, but is not relevant to the actual response of plants in their natural habitat. On the other hand, studies with soil cultures are more environmentally realistic (Baryla *et al.*, 2001) since they allow taking into account the multiple interactions between soil parameters, metals and roots, which strongly determine the uptake and the toxicity of pollutants. Unfortunately, the complexity of these interactions makes both result interpretations and inter-laboratory comparisons, very difficult. However, there is no doubt that soil culture experiments remain the best way to evaluate chronic metal toxicity and to understand plant response in their natural environment. Hence, in this study we performed both hydroponics and soil culture experiments to get complementary insights about acute and chronic Cd toxicity in *Plantago arenaria*.

Up to now, no standardized procedure has been published for measuring tolerance to acute metal exposition in plants, and most of the published results have been obtained using very different experimental designs (*e.g.* various plant ages, growth descriptors, culture solutions, and periods of metal exposure ...). As a result, data concerning the degree of metal tolerance in different plant species are very difficult to compare and threshold-values have yet to be proposed to define “non tolerance”, “tolerance” or “hypertolerance” for a given metal. For Cd however, Sanità di Toppi and Gabrielli (1999) highlighted that concentrations above 1 μM in the culture solution can be considered as high expositions, with regard to the actual levels in soil solutions with a moderate Cd pollution. In the present study, the root elongation test gave an EC50 of 28 μM for acute Cd toxicity. Consequently we can assume that *P. arenaria* might tolerate very high available Cd levels when growing on a polluted soil. This was confirmed by long-term soil experiments which gave a NOEC value of 20 mg kg^{-1} for the development of the root system. It must be pointed out that in normal unpolluted soils (Baize, 2000 ; Adriano, 2001) total Cd levels rarely exceed 1 mg kg^{-1} . Thus, taken together, these results suggest that *P. arenaria* might resist to both acute and chronic Cd toxicity at levels largely above those found in most polluted sites.

According to Baker (1987), resistance to heavy metals can be achieved either by “avoidance” (*i.e.* limitation of root uptake due to membrane exclusion and/or to external immobilization by root exudates) or by “true tolerance” (*i.e.* detoxification mechanisms allowing to

alleviate the effects of unusually high intracellular metal levels). As a general rule, mean Cd concentration in plants growing in an unpolluted environment is between 0.05 to 0.30 mg kg⁻¹ (Markert, 1993; Harada and Hatanaka, 2000), and it is admitted that leaf levels higher than 5 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias and Pendias, 2001) are excessive or toxic. In the present study, we showed that *P. arenaria* cultivated on contaminated soil accumulated up to 103 mg kg⁻¹ Cd in roots and up to 14 mg kg⁻¹ in leaves, without any visible sign of phytotoxicity. Thus, although “avoidance” cannot be ruled out, we can assume that a “true tolerance” mechanism allowing coping with high tissue Cd levels does exist in *P. arenaria*.

In fact, whatever the culture conditions, Cd concentrations in roots and leaves of *P. arenaria* were directly proportional to external Cd levels. Moreover, Cd was predominantly accumulated in roots, with a constant leaf/root concentration ratio over a wide range of Cd levels. This clearly shows that *P. arenaria* behaves as a tolerant “indicator” species (Baker, 1987). For extreme Cd exposures however (*i.e.* above 100 µM in hydroponics), a massive accumulation of metal into the roots without concomitant translocation to the leaves was observed. This obviously was a consequence of unrestricted flow of Cd into the roots, likely resulting from membrane damages and severe metal injury (Baker, 1981). This suggested that the entry of Cd into the roots and its translocation toward the leaves were finely controlled up to a threshold of lethal toxicity.

Characterization of the physiological response of *P. arenaria* under Cd stress was not the main aim of this study. Nonetheless, we noticed that Cd induced a significant decrease in tissue water content. This effect was particularly marked in plants submitted to acute Cd exposure, but it was also observed for the root system of plants cultivated under chronic stress. In fact, it is well known (Das *et al.*, 1997; Benavides *et al.*, 2005) that Cd interferes with water uptake, causing a reduction in water content. In most cases the perturbation of the plant water balance goes with a decline in transpiration rate (Haag-Kerwer *et al.*, 1999) and leads to a rapid withering. In the present study however, we didn't notice any symptom of withering, neither in hydroponics, nor in soil experiments. It must be emphasized that in soil cultures leaf water content was unaffected despite a significant water deficit in the root system. Thus we can hypothesize that *P. arenaria* could alleviate Cd-induced water loss in its aerial parts, allowing to carry on a normal growth under chronic metal stress. It is interesting to note that *P. arenaria* is a xerophytic species which, in its native habitat, mostly colonizes sandy soils with very low water retention capacity. Such a relation between Cd tolerance and adaptation to drought has been already suggested for a metal-tolerant ecotype of *Silene vulgaris* (Schat *et al.*, 1997). Hence, it is tempting to speculate that Cd tolerance

in *P. arenaria* could be closely linked to its capacity to cope with severe water deficit stress in its natural environment.

Whatever the physiological basis allowing Cd tolerance in *P. arenaria*, it is clear that this species is well adapted to extreme edaphic conditions and is capable to survive to severe metal stress. Consequently, it could be a good candidate for phytorestauration strategies performed on highly degraded soils. Furthermore, because *P. arenaria* is very easy to grow under laboratory conditions, it could provide an additional model to get further insights into the diversity of mechanisms allowing Cd tolerance in plants.

VII.6 REFERENCES

- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New-York, Berlin, Heidelberg.
- AFNOR, 1999. Norme NF X 31-120. In: AFNOR (Ed.). Recueil de normes, qualité des sols. AFNOR, Paris, 1, pp. 237-243.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7, 1-85.
- Baize, D., 2000. Teneurs totales en “métaux lourds” dans les sols français – résultats du programme ASPITET. *Courrier de l’Environnement de l’INRA* 39, 39-54.
- Baker, A.J.M., 1987. Metal tolerance. *New Phytologist* 106, 93-111.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3, 643-654.
- Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Shut, C., Havaux, M., 2001. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212, 696-709.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. Journal of Plant Physiology* 17, 21-34.

- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N., 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil* 249, 9-18.
- Buondonno, C., Ermice, A., Buondonno, A., Murolo, M., Pugliano, M.L., 1998. Human-influenced soils from an iron and steel works in Naples, Italy. *Soil Science Society of America Journal* 62, 694-700.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98, 29-36.
- Haag-Kerwer, A., Schäfer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 50, 1827-1835.
- Harada, H., Hatanaka, T., 2000. Natural background levels of trace elements in wild plants: variation and distribution in plant species. *Soil Science and Plant Nutrition* 46, 117-125.
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 125-140.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Macnair, M.R., 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124, 541-559.
- Markert, B., 1993. Occurrence and distribution of chemical elements in plants: outlook and further research plans. *Toxicological and Environmental Chemistry* 40, 31-41.
- Remon, E., Bouchardon, J-L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J-C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137, 316-323.
- Rock, S.A., 2003. Vegetative covers for waste containment. In: Scheper, T. (Ed.). *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Vol. 78, Phytoremediation. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, pp. 157-170.

- Roosens, N., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximénez-Embun, P., Smith, J.A.C., 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant Cell and Environment* 26, 1657-1672.
- Sanità di Toppi, L., Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Schat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101, 477-482.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals. In: *situ metal immobilization and revegetation*. *Environmental Pollution* 87, 51-59.
- Waalkes, M.P., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533, 107-120.
- Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775-780.
- Zarcinas, B.A., Cartwright, B., Spouncer, L.R., 1987. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively-coupled plasma spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 18, 131-146.

CHAPITRE VIII

EFFET DU CADMIUM CHEZ *PLANTAGO ARENARIA* : TOLÉRANCE ET STRESS OXYDANT

Effet du cadmium chez *Plantago arenaria* : tolérance et stress oxydant

E. Remon, L. Ogoula, O. Faure

VIII.1 RESUME

Le but de ce travail est de mieux comprendre le rôle de la réponse anti-oxydante dans la tolérance au cadmium (Cd) chez *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. Dans ce cadre, les activités des enzymes du système anti-oxydant racinaire et foliaire et l'accumulation du Cd ont été mesurées en conditions de culture hydroponique.

Les résultats obtenus montrent que *Plantago arenaria* accumule des concentrations très importantes en Cd et qu'il présente une forte tolérance à ce métal. Plus précisément, le Cd provoque un ralentissement transitoire de croissance, mais cette inhibition est rapidement surmontée après 96 heures de culture. Au cours de cette période une stimulation du système anti-oxydant racinaire (augmentation des activités Super Oxyde Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Mono-Déshydro Ascorbate Réductase (MDAR), DésHydro Ascorbate Réductase (DHAR) et Glutathion Réductase (GR)) et une augmentation du pool d'ascorbate réduit ont été mises en évidence. Dans les tissus foliaires, par contre, l'activité du système anti-oxydant reste comparable à celle du témoin. Il apparaît donc que le Cd induit une réponse différente du système anti-oxydant dans les racines et les feuilles.

VIII.2 INTRODUCTION

Parmi tous les métaux lourds, les problèmes liés aux rejets de cadmium dans l'environnement et à son transfert potentiel vers les organismes vivants, sont certainement les plus préoccupants. A ce jour, aucune fonction métabolique connue ne requiert du cadmium, qui présente une importante toxicité, même à faible dose, pour les animaux et les plantes. Son accumulation dans

les différents compartiments des écosystèmes, notamment les plantes, génère par conséquent un risque non négligeable pour les équilibres écologiques et la santé publique. Les principales voies de contamination des sols sont principalement représentées par les fertilisants phosphatés, l'application de boues de stations d'épuration et l'industrie métallurgique qui génère de grandes quantités de déchets fortement chargés en cadmium (Alloway, 1995). Bien que le cadmium soit potentiellement très phytotoxique, il est souvent accumulé par les végétaux (Ianelli *et al.*, 2002). Les plantes se développant sur de tels substrats représentent donc une voie privilégiée de transfert de cet élément vers la chaîne alimentaire (Wagner, 1993).

La toxicité des métaux lourds est intimement liée à leurs propriétés oxydo-réductrices et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, qui possèdent un électron non apparié. Il en résulte un stress oxydant qui correspond à la réaction entre les ROS et les molécules biologiques, dont les propriétés sont altérées. Ainsi, les métaux de transition tels que le fer ou le cuivre, qui présentent plusieurs degrés d'oxydation, sont capables de réagir avec les dérivés de l'oxygène, produisant des ROS à fort pouvoir oxydant. La réaction de Fenton en est le principal exemple. L'ion métallique va réagir avec l'eau oxygénée pour produire un radical hydroxyl, aux propriétés très délétères. Au niveau cellulaire, les principales cibles des ROS sont l'ADN, les phospholipides membranaires et les acides aminés (Kehrer, 2000). Ils provoquent une peroxydation lipidique, des dommages membranaires et une inactivation des enzymes, affectant la viabilité cellulaire (Singh *et al.*, 2006).

Afin de réduire les dégâts causés par les ROS, les défenses anti-onxydatives des végétaux comprennent plusieurs enzymes et molécules anti-oxydantes, capables d'inactiver les ROS en leur attribuant un électron supplémentaire. L'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène par les superoxyde dismutases. Ce dernier, également toxique, est pris en charge par les catalases et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion, telle que l'ascorbate peroxydase pour être réduit en eau. L'ascorbate et le glutathion, jouent un rôle important de donneurs d'électrons et sont régénérés ensuite par trois enzymes différentes : la monodéhydro-ascorbate réductase, la glutathion réductase et la déhydro-ascorbate réductase (Dat *et al.*, 2000).

A la différence des autres métaux, le cadmium, qui présente un faible pouvoir rédox, ne peut pas participer directement aux réactions d'oxydo-réduction. Bien que les mécanismes exacts, impliqués dans la toxicité du cadmium, soient encore mal compris, l'accumulation de cet élément engendre de nombreux troubles au niveau cellulaire correspondant à un stress oxydant. En effet, le cadmium induit par exemple une peroxydation lipidique et une rupture de la chlorophylle, indiquant

de façon significative une production de ROS (Pereira *et al.*, 2002). Ainsi, le cadmium agirait au niveau des sites naturels de production des radicaux libres. En modifiant l'activité de certaines enzymes, il favorise la production naturelle des ROS, notamment au niveau de l'appareil photosynthétique (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002 ; Rosa *et al.* 2003).

Par conséquent, même à faible concentration, le cadmium entraîne chez les plantes sensibles une forte diminution de la croissance, des chloroses et des nécroses et même la mort de la plante (Sanità di Toppi et Gabrielli, 1999 ; Sandalio *et al.*, 2001). Néanmoins, certaines espèces végétales sont capables d'accumuler d'importantes quantités de cadmium sans présenter de signe extérieur d'altération. Chez *Pisum sativum*, Dixit *et al.* (2001) ont montré le rôle du système anti-oxydant dans la réponse au stress oxydant induit par du cadmium. De façon opposée, chez la même espèce, Sandalio *et al.* (2001) ont montré une forte inhibition par le cadmium des activités enzymatiques du système anti-oxydant. Par conséquent, le cadmium inhibe également les enzymes du métabolisme anti-oxydant générant un stress oxydant accru (Schützendübel *et al.*, 2002 ; Vollenweider *et al.*, 2006). Pour résumer, il apparaît que le système anti-oxydant peut être à la fois impliqué dans la tolérance au cadmium, mais qu'il est aussi, dans certaines conditions, une cible privilégiée de la toxicité de ce dernier. Il est alors important de mieux définir le rôle du système anti-oxydant chez les espèces tolérant le cadmium.

Des recherches précédentes sur la végétation des crassiers métallurgiques de la Loire ont permis de mettre en évidence une espèce tolérante au cadmium (résultats non publiés) : *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. A l'heure actuelle, bien qu'aucun mécanisme de tolérance n'ait pu être mis en évidence, il est probable que le système anti-oxydant joue un rôle dans la tolérance au cadmium chez *Plantago arenaria*. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité des principales enzymes et la concentration des molécules impliquées, lors d'un stress non léthal en cadmium.

VIII.3 MATERIEL ET METHODE

VIII.3.1 Culture hydroponique

Les graines de *P. arenaria* sont semées sur de la vermiculite et arrosées à l'aide d'un milieu contenant les éléments suivants : Ca(NO₃)₂, 625 µM ; NH₄NO₃, 500 µM ; KNO₃, 750 µM ; KH₂PO₄, 187.5 µM ; MgSO₄, 187.5 µM ; NaCl, 50 µM ; K₂HPO₄, 7.5 µM ; EDTA, 7.5 µM ; FeSO₄, 7.5 µM ; MnSO₄, 1.25 µM ; H₃BO₃, 7.5 µM ; ZnSO₄, 0.25 µM ; CuSO₄, 62.5 nM ;

Na₂MoO₄, 62.5 nM ; NiCl₂, 62.5 nM. Après une semaine de germination, les plantules sont transférées sur un milieu liquide de composition identique, mais de concentration quatre fois supérieure. La solution est tamponnée à pH 6.1 en utilisant de l'acide 2-morpholinoéthanesulfonic monohydraté MES (2 mM). Chaque bac a un volume de 4 l et 15 plantules sont cultivées par bac. Les cultures sont aérées continuellement et placées à 25°C sous une photopériode de 16 h ; le milieu est renouvelé chaque semaine. Afin d'analyser les mécanismes impliqués dans la tolérance, et non les effets de doses létales de Cd, la gamme de concentration choisie reste inférieure à la HNI (0 à 75 µM) obtenue par VMT (résultats non publiés). Ces conditions ont donc permis d'observer une réelle réponse physiologique. Après quatre semaines de croissance, les milieux sont contaminés par différentes concentrations en Cd (0, 2.5 µM, 25 µM, 50 µM et 75 µM de CdCl₂). Pour chaque concentration en Cd, 30 plantes cultivées dans deux bacs différents ont été étudiées. La croissance en cours de culture est estimée en mesurant l'élongation d'une jeune feuille de la rosette (marquée en début de culture par un anneau en polypropylène). Les prélèvements en vue des différents dosages sont réalisés à intervalles de temps régulier (6 h, 24 h, 48 h et 96 h) après contamination du milieu. Chaque plante prélevée est séparée en deux lots : racines et feuilles.

VIII.3.2 Dosage du Cd accumulé par les plantes

Les échantillons sont séchés à l'étuve à 60°C pendant 48 h. Ils sont ensuite pesés puis broyés (< 2 mm). La digestion est réalisée en utilisant de l'acide nitrique pur durant 12 h à température ambiante, puis durant 45 min à 90°C (Zarcinas *et al.*, 1987). L'acide est alors évaporé jusqu'à un volume final d'environ 1ml et les échantillons ajustés à un volume de 10 ml par de l'acide nitrique à 1%. Les mesures des concentrations en Cd sont réalisées par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES), sur des extraits préalablement filtrés (filtre Watmann sans cendre grade 392).

VIII.3.3 Dosage des enzymes du système anti-oxydant

VIII.3.3.1 Préparation des extraits

Environ 200 à 500 mg de tissu frais sont broyés dans de l'azote liquide, en présence d'une solution d'extraction (tampon K-phosphate 100mM, pH 7.5 ; acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 1mM ; 1,4-dithio-DL-thréitol (DTT) 3mM ; polyvinylpyrrolidone K90 (PVP) 5% (w/v) ; ascorbate 5mM ; triton X100 0.1%). L'extrait ainsi obtenu est ensuite centrifugé à 10 000 g, à 4°C

pendant 30 min. Le surnageant est récupéré et aliquoté en fractions de 100 μ l, puis conservé à -80°C jusqu'aux dosages.

Sur chacun des extraits un dosage des protéines totales est réalisé par la méthode de Bradford (1976), en utilisant une gamme étalon de BSA.

VIII.3.3.2 Dosage de l'activité superoxyde-dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

Les méthodes de dosage des SODs sont indirectes et sont basées sur leur capacité à inhiber des réactions générées par $\text{O}_2^{\bullet -}$. La méthode utilisée est celle de Beauchamp et Fridovitch (1971) : la réduction photochimique des flavines génère des anions superoxydes qui peuvent être mis en évidence par leur capacité à réduire du NBT en bleu de formazan qui absorbe la lumière à 560 nm. L'activité SOD, en détournant les anions superoxydes, inhibe cette réaction et peut être quantifiée sur cette base.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon K-phosphate 50 mM pH 7.8, NBT 56 μ M, méthionine 10 mM, riboflavine 1.2 mM, cyanure de potassium 20 μ M et extrait enzymatique (5 à 75 μ l). La réduction du NBT est estimée après 5 min d'illumination (cuves placées à 5 cm d'un tube fluorescent de 36 W) en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 560 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la coloration est déterminé en fonction de la quantité d'extrait. Une unité d'activité SOD correspond à la quantité d'enzyme provoquant 50% de l'inhibition maximale.

VIII.3.3.3 Dosage de la catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

La CAT catalyse la décomposition du H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. La décomposition de H_2O_2 peut être suivie directement par la diminution de l'absorbance à 240 nm (Aebi, 1984).

Pour un volume final de 3.05 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon K-phosphate 100 mM, pH 7 et de 50 μ l d'extrait enzymatique. La réaction est initiée par addition de 1 ml de H_2O_2 à 30 mM. La vitesse de décomposition de H_2O_2 est déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 1 min. Les calculs d'activité sont réalisés en utilisant un coefficient d'absorption molaire de $0.039 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour H_2O_2 .

VIII.3.3.4 Dosage de l'ascorbate peroxydase (APX) (EC1.11.1.11)

L'APX catalyse la peroxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDA). L'activité APX peut être déterminée en mesurant la diminution de la concentration en ascorbate à 290 nm au cours de la réaction (Nakano et Asada, 1981).

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon K-phosphate 50 mM pH 7, EDTA 0.1 mM, acide ascorbique 0.5 mM et extrait enzymatique (50 µl). La réaction est initiée par addition de 0.3 mM de H₂O₂. La vitesse d'oxydation de l'ascorbate est déterminée en mesurant la diminution de la l'absorbance à 290 nm pendant 1 min. Les calculs d'activité sont réalisés en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 2.8 mM⁻¹.cm⁻¹ pour l'ascorbate.

VIII.3.3.5 Dosage de la glutathion réductase (GR) (EC 1.6.4.2)

La GR est une enzyme NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) dépendante, qui catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion (GSH). Le GSH formé peut réagir avec l'acide 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour produire du thionitrobenzoate (TNB), facilement mesurable à 412 nm (Smith *et al.*, 1988).

Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon K-phosphate 100 mM pH 7.5, EDTA 0.5 mM, DTNB 1 mM, NADPH 0.1 mM, GSSG 1 mM. La réaction est initiée par addition d'extrait enzymatique (50 µl). La vitesse de formation de TNB est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm. Le dosage est calibré par une courbe standard de GR (BioChemika, GR from baker's yeast).

VIII.3.3.6 Dosage de la déhydro-ascorbate réductase (DHAR) (EC 1.8.5.1)

La DHAR catalyse la réduction du déshydro-ascorbate (DHA) en ascorbate, couplée à l'oxydation du GSH en GSSG. La formation de l'ascorbate produit au cours de la réaction peut être suivie par l'augmentation de l'absorbance à 265 nm (Asada, 1994 ; Dalton *et al.*, 1986).

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel est constitué de Tampon K-phosphate 50 mM pH 7.0, EDTA 0,1 mM, DHA 0,2 mM, GSH 2,5 mM. La réaction est initiée par l'addition de l'enzyme (100 µl). La vitesse de production de l'ascorbate est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 265 nm, durant 1 min après addition de l'enzyme. Les calculs d'activité sont réalisés en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 14 mM⁻¹.cm⁻¹ pour l'ascorbate.

VIII.3.3.7 Dosage de la monodéhydro-ascorbate réductase (MDAR) (EC 1.1.5.4)

La MDAR permet la régénération de l'ascorbate par réduction du monodéhydro-ascorbate en présence de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit). L'activité MDAR peut être déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADH. Le MDA, nécessaire à la réaction, est généré par oxydation de l'ascorbate par une ascorbate oxydase (Arrigoni *et al.*, 1981).

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon Tris 50 mM pH 7.6, NADH 0.2 mM, ascorbate 1 mM, ascorbate oxydase 0.33 U/ml, et extrait enzymatique (100 µl). La réaction est initiée par addition de l'ascorbate oxydase. Les calculs d'activité sont réalisés en utilisant un coefficient d'absorption molaire de $6.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour le NADH.

VIII.3.3.8 Expression des résultats

En accord avec le système international (Dibkaer, 2001), les différentes activités enzymatiques ont été exprimées en katal, sauf pour la SOD pour laquelle l'activité est exprimée en Unités, telles que définies dans le paragraphe VIII.3.3.2.

Par ailleurs, les concentrations en protéines des différents échantillons étant variables au cours de la culture (données non présentées), les activités ont été exprimées en fonction de la masse de matière fraîche.

VIII.3.4 Dosage des molécules anti-oxydantes

VIII.3.4.1 Préparation des extraits

Les échantillons (200 à 500 mg de tissus frais) sont broyés dans de l'azote liquide. Les extractions sont ensuite réalisées dans 4 volumes d'une solution d'acide sulfosalicylique (5%, w/v) contenant 6.3 mM de DTPA. Les extraits obtenus sont centrifugés à 10 000 g, à 4°C, pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C jusqu'aux analyses.

VIII.3.4.2 Dosage des formes réduites et oxydées de l'ascorbate

L'ascorbate total a été estimé par un dosage spectrophotométrique en utilisant la méthode de Hodge *et al.* (1996).

Le milieu réactionnel est constitué de 200 µl de surnageant, 500 µl de tampon K-phosphate (150 mM, pH 7,4) contenant 5 mM d'EDTA, et 100 µl de DTT (10 mM). Ce dernier composant permet de réduire l'ascorbate oxydé. Après 10 min d'incubation à température ambiante, 100 µl d'une solution de N-éthymaléimide à 0,5 % (W/V) sont ajoutés afin d'éliminer l'excès de DTT. La coloration est réalisée en ajoutant 400 µl de TCA à 10 % (W/V), 400 µl d'acide ortho-phosphorique à 44 % (W/V), 400 µl de 2,2'-dipyridyl à 4 % (W/V dans éthanol 70°), et 200 µl de FeCl₃ à 30mg/l. Après une heure d'incubation à 40°C, l'absorbance est mesurée à 525 nm. Le dosage est calibré par une courbe standard d'ascorbate (0 à 200 nmoles dans la solution d'extraction).

Le dosage de l'ascorbate réduit est réalisé par la même méthode en remplaçant simplement le DTT et le N-éthymaléimide par le même volume d'eau distillée.

VIII.3.4.3 Dosage des formes réduites et oxydées du glutathion

Le glutathion total (GSH + GSSG) a été estimé par une méthode enzymatique (« DTNB-GSSG Reductase Recycling Assay »), telle que publiée par Anderson (1985). Le principe de cette méthode repose sur une oxydation du GSH par du DTNB, conduisant à la formation de GSSG et TNB. Le GSSG néoformé est alors recyclé en GSH par action d'une GSSG réductase en présence de NADPH. La vitesse de formation du TNB est suivie à 412 nm et est proportionnelle à la quantité de GSH total présent dans l'extrait.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon K-phosphate 120 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, NADPH 280 mM, DTNB 0,6 mM. Le mélange est chauffé à 30°C pendant 12 à 15 min. 25 µl de la solution à doser sont alors ajoutés et la réaction est initiée par addition de 0,75 unités de glutathion réductase. La vitesse de formation du TNB est suivie à 412 nm pendant 30 s. Le dosage est calibré par une courbe standard de GSH (0 à 4 nmoles dans la solution d'extraction).

Le GSSG est déterminé par la même méthode que pour le glutathion total, après blocage de la réaction avec le GSH par action du 2-vinylpyridine.

A 100 µl d'extrait à doser sont ajoutés 2 µl de 2-vinylpyridine. L'échantillon est vortexé et 6 µl de triethanolamine sont ajoutés. Le pH est alors vérifié à l'aide de papier pH ; il doit être compris entre 6 et 7. Après 60 min d'incubation à température ambiante, l'échantillon est dosé par la méthode enzymatique précédemment décrite.

VIII.3.5 Analyses statistiques des résultats

Pour chaque dosage, quatre échantillons indépendants ont été analysés ($n = 4$) ; par ailleurs, chaque mesure a été répétée deux fois. Les résultats présentés correspondent aux moyennes de ces différentes mesures +/- l'erreur standard. La comparaison des moyennes mesurées a été réalisée en utilisant des tests statistiques non paramétriques : les comparaisons multiples de moyennes ont été effectuées par le test H de Kruskal-Wallis, les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test U de Mann-Whitney. Le seuil de signification a été choisi à $p = 0,05$.

VIII.4 RESULTATS

VIII.4.1 Effet du cadmium sur la croissance

Dans un premier temps, l'effet du Cd a été étudié en mesurant l'élongation foliaire de plantes cultivées en présence de différentes concentrations en Cd, sur une période de 96 h. Les résultats sont présentés sur la figure 8.1. Chez les plantes témoins cultivées en absence de Cd, la vitesse d'élongation foliaire en fonction du temps est parfaitement linéaire ($R^2 = 0.998$). Par contre, en présence de Cd, et notamment pour des concentrations comprises entre 2,5 et 50 μM , la vitesse d'élongation foliaire subit un net ralentissement, par rapport au témoin. Ce ralentissement de croissance est bien visible après 48 h de culture, où la longueur des feuilles du témoin est supérieure à celle des plantes traitées (test de Kruskal-Wallis, $p = 0.006$) ; ce ralentissement n'est pourtant que transitoire et, après 96 h de culture, l'élongation foliaire ne diffère plus de celle des témoins ($p > 0.05$). Pour une concentration en Cd de 75 μM l'allure générale de la courbe reste la même, mais ce phénomène de ralentissement de croissance est plus marqué. Ainsi, après 96 h de culture, l'élongation foliaire reste inférieure à celle des autres échantillons ($p = 0.002$).

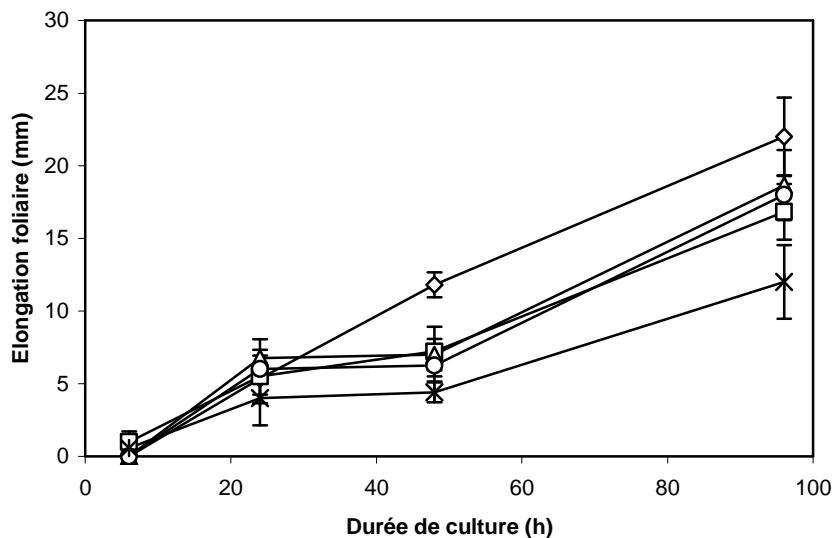


Figure 8.1 : Influence du Cd sur l'élongation foliaire chez *Plantago arenaria* (◇ : 0 ; □ : 2.5 ; △ : 25 ; ○ : 50 ; * : 75 µM)

VIII.4.2 Le Cd provoque une stimulation du système anti-oxydant racinaire

Dans le système racinaire, l'activité SOD (Fig. 8.2) des plantes témoins reste stable au cours des 96 h de culture ($p \gg 0.05$), cette activité est en moyenne de 0.58 U/mg MF. En présence de cadmium, et quelle que soit la concentration testée, une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'activité est enregistrée au cours du temps. C'est ainsi qu'après 96 h de culture l'activité SOD des plantes traitées est d'environ 0.70 U/mg MF, soit une augmentation d'environ 20 % par rapport au témoin.

Comme dans le cas de la SOD, l'activité CAT (Fig. 8.3) reste constante ($p \gg 0.05$) chez les plantes témoins, au cours des 96 h de culture ; l'activité moyenne est d'environ 0.85 nkat/mg MF. Par contre, cette activité augmente de façon significative ($0.005 < p < 0.022$) chez les plantes traitées. En fin d'expérimentation, l'activité CAT est comparable quelle que soit la concentration en Cd testée et est d'environ 2.4 nkat/mg MF, soit une augmentation de 180 % par rapport au témoin.

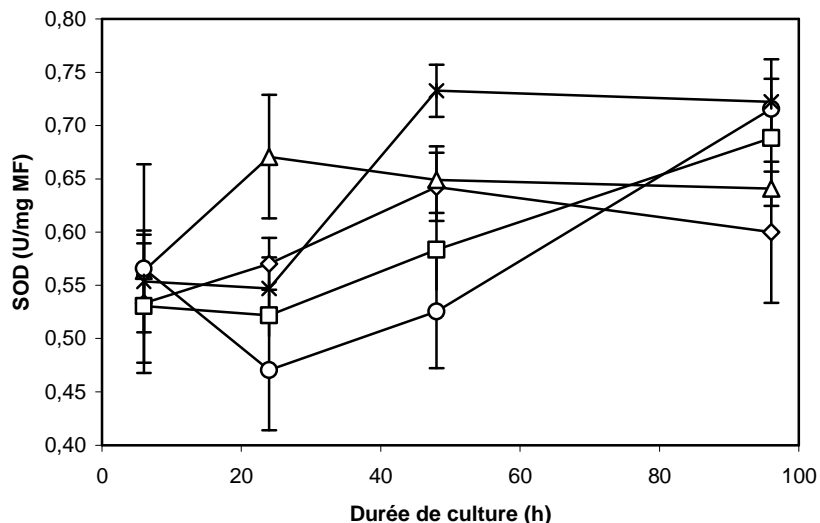


Figure 8.2 : Influence du Cd sur l'activité SOD chez *Plantago arenaria* (MF : matière fraîche) (\diamond : 0 ; \square : 2.5 ; \triangle : 25 ; \circ : 50 ; $*$: 75 μ M)

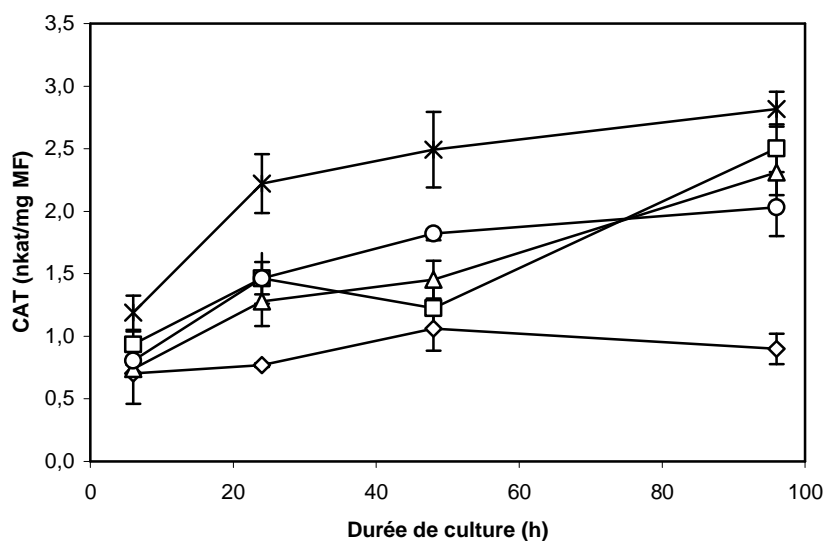


Figure 8.3 : Influence du Cd sur l'activité CAT chez *Plantago arenaria* (MF : matière fraîche) (\diamond : 0 ; \square : 2.5 ; \triangle : 25 ; \circ : 50 ; $*$: 75 μ M)

L'augmentation des activités SOD et CAT racinaires au cours de la culture en présence de Cd, suggère donc que le Cd stimule une production de ROS et que la plante réagit à cette accumulation. On peut donc se demander si cette réaction s'accompagne aussi d'une stimulation du cycle ascorbate/glutathion. L'évolution des activités des principales enzymes impliquées dans ce cycle est présentée dans la figure 8.4.

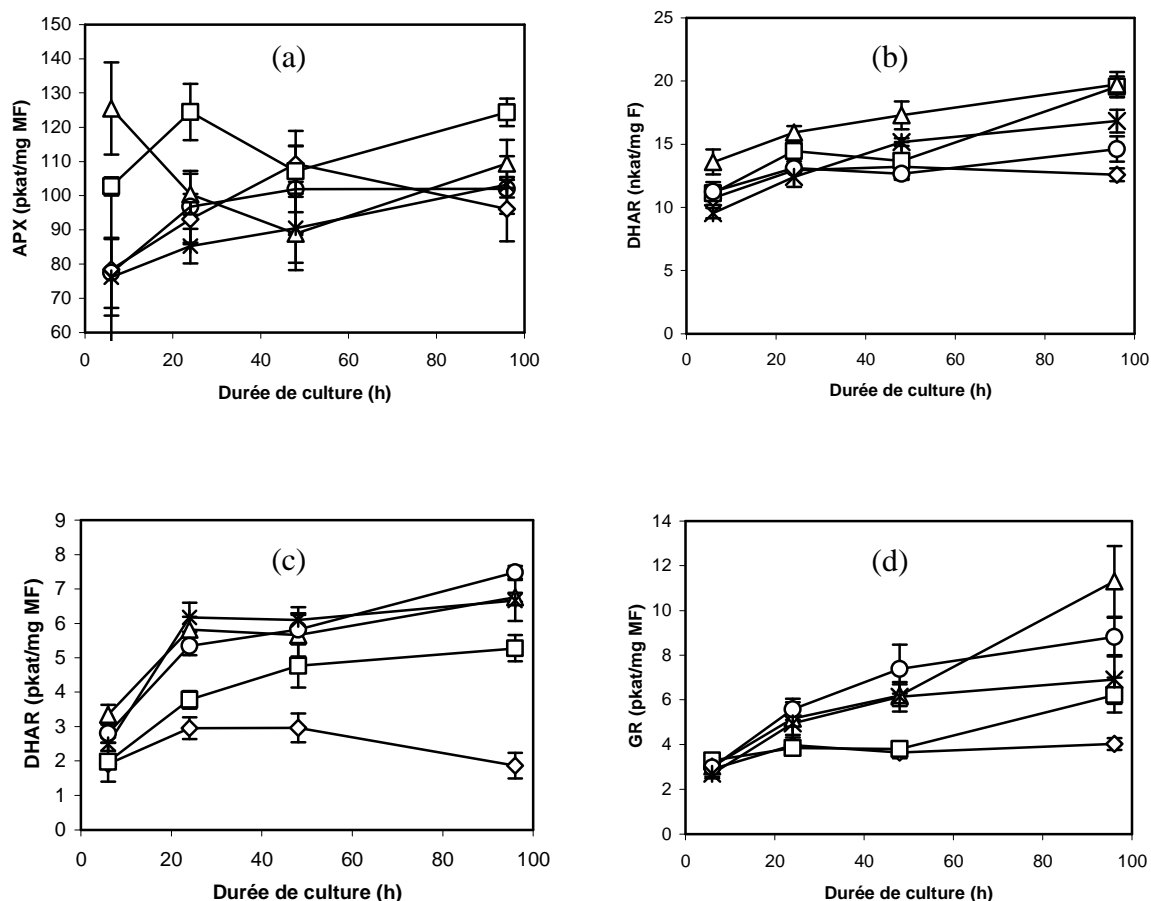


Figure 8.4 : Influence du Cd sur les activités enzymatiques du cycle ascorbate/glutathion chez *Plantago arenaria* (MF : matière fraîche). (a) : ascorbate peroxydase (APX); (b) : monodéshydro-ascorbate réductase (MDAR); (c) : déhydro-ascorbate réductase (DHAR); (d) : glutathion réductase (GR). (\diamond : 0 ; \square : 2.5 ; \triangle : 25 ; \circ : 50 ; $*$: 75 μM)

La première enzyme intervenant dans le cycle ascorbate/glutathion est l'ascorbate peroxydase (APX), qui réduit le peroxyde d'hydrogène en H_2O et oxyde l'ascorbate en MDHA. Les résultats obtenus (Fig. 8.4 a) montrent que l'activité de cette enzyme n'est pas modifiée en présence de Cd. De fait, malgré de légères fluctuations au cours de la culture, les tests statistiques (Test H de Kruskal-Wallis et test U de Mann-Whitney) n'ont montré aucune différence significative au cours du temps. L'activité APX peut donc être considérée constante, elle oscille entre environ 80 et 120 pkat/mg MF.

Par contre, les autres activités enzymatiques du cycle (Fig. 8.4 b, c, d) augmentent en présence de Cd. C'est ainsi que l'activité MDAR (Fig. 8.4 b), constante chez le témoin ($p \gg 0.05$), augmente ($0.004 < p < 0.039$) d'environ 56 % après 96h de culture, quelle que soit la concentration de Cd. De la même façon, l'activité DHAR (Fig. 8.4 c) reste constante chez le témoin, mais

augmente ($0.007 < p < 0.030$) chez les plantes traitées, à toutes les concentrations en Cd testées. En moyenne, cette activité enzymatique augmente de 150 % après 96 h de culture. Enfin, l'activité GR (Fig. 8.4 d) est également constante chez le témoin ($p \gg 0.05$), et subit une nette augmentation ($0.011 < p < 0.019$) en présence de Cd. Cette augmentation est en moyenne de 178 % par rapport au témoin. En d'autres termes ces résultats montrent que, en présence de Cd, les trois activités enzymatiques nécessaires au maintien de l'ascorbate sous sa forme réduite (MDAR, DHAR et GR) augmentent de façon significative.

En ce qui concerne le dosage des formes réduites et oxydées de l'ascorbate, les résultats sont présentés dans la figure 8.5.

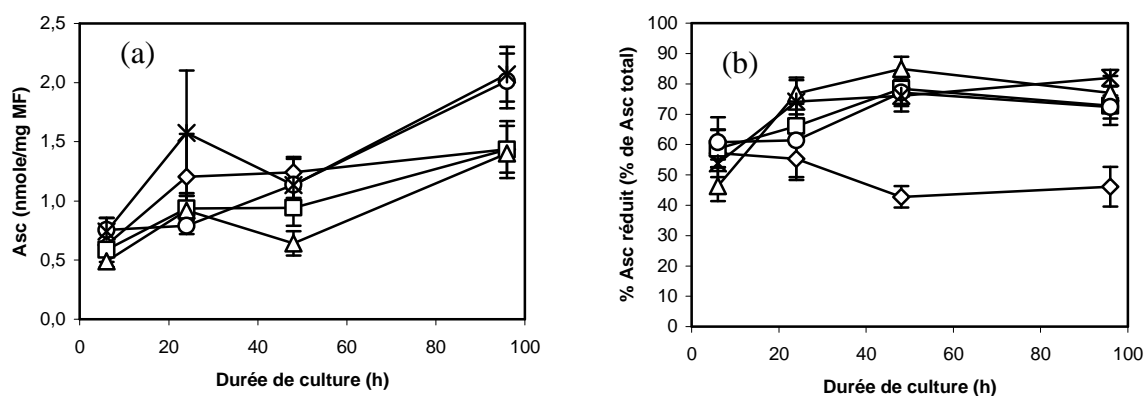


Figure 8.5 : Influence du Cd sur la concentration en ascorbate (Asc) total (a) et ascorbate réduit (b) dans le système racinaire (MF : matière fraîche) de *Plantago arenaria*. (\diamond : 0 ; \square : 2.5 ; \triangle : 25 ; \circ : 50 ; $*$: 75 μM)

La concentration en ascorbate total (Fig. 8.5 a) n'augmente pas de façon significative chez le témoin ($p = 0.114$) et chez les plantes cultivées en présence de 2,5 μM de Cd ($p = 0.094$). Par contre, à partir de 25 μM de Cd, la teneur en ascorbate augmente significativement ($0.021 < p < 0.037$) au cours de la culture ; en moyenne, cette teneur est multipliée par 2,7 durant la période de culture. Dans le même temps, le pool d'ascorbate réduit augmente de façon significative ($0.025 < p < 0.044$), alors qu'il reste stable chez le témoin ($p \gg 0.05$). De fait, la teneur en ascorbate réduit représente environ 50 % de l'ascorbate total chez le témoin, alors qu'elle atteint de 73 à 82 % après 96 h de culture en présence de Cd.

Dans la mesure où le glutathion est indispensable au fonctionnement de la DHAR et donc, à la régénération de l'ascorbate, les teneurs en GSH et GSSG ont été évaluées au cours de la culture. Les résultats sont présentés dans la figure 8.6.

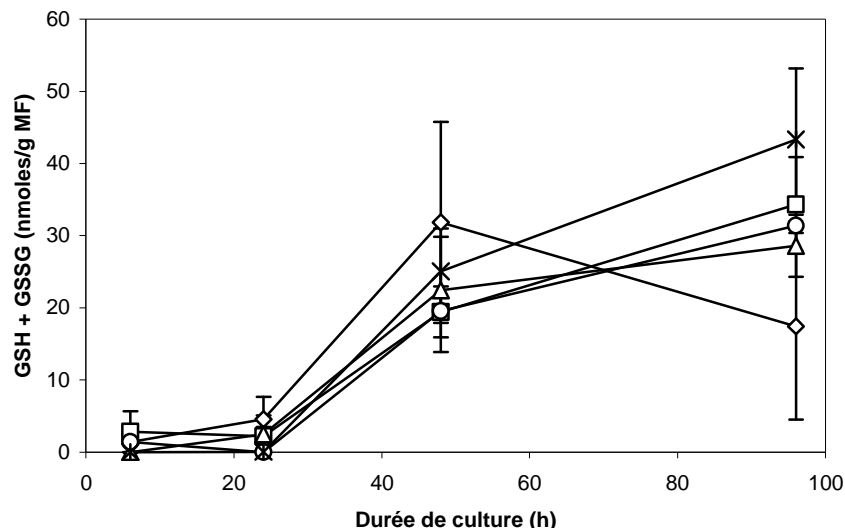


Figure 8.6 : Influence du Cd sur la concentration en glutathion total (forme réduite GSH + forme oxydée GSSG) dans le système racinaire (MF : matière fraîche) de *Plantago arenaria*. (◇ : 0 ; □ : 2.5 ; △ : 25 ; ○ : 50 ; * : 75 µM)

Les teneurs en glutathion total augmentent de façon significative quelles que soient les conditions de culture ($p < 0.01$). Pour les plantes témoins, la teneur en glutathion atteint un maximum après 48 h, puis diminue progressivement. Par contre, en présence de Cd, la quantité d'ascorbate augmente régulièrement durant toute la période de culture. Cependant, à 96 h, aucune différence significative entre les plantes traitées et les plantes témoins n'a pu être mise en évidence ($p \gg 0.05$).

VIII.4.3 Réponse du système anti-oxydant foliaire

L'ensemble des résultats concernant les activités enzymatiques mesurées dans le système foliaire est présenté dans le tableau 8.1. Par souci de simplification, seules les valeurs enregistrées à 6 et 96 h sont présentées.

Tableau 8.1 : Influence du Cd sur les principales activités enzymatiques de la réponse anti-oxydante, dans le système foliaire de *Plantago arenaria*.

Enzyme	Durée de culture (h)	Concentration en Cd (μM)				
		0	2,5	25	50	75
SOD	6	0,50 +/- 0,03	0,49 +/- 0,05	0,52 +/- 0,01	0,52 +/- 0,02	0,66 +/- 0,04
	96	0,45 +/- 0,04	0,61 +/- 0,03	0,53 +/- 0,02	0,49 +/- 0,03	0,64 +/- 0,01
CAT	6	2,00 +/- 0,28	1,22 +/- 0,12	1,39 +/- 0,31	0,72 +/- 0,14	1,17 +/- 0,39
	96	2,20 +/- 0,29	2,90 +/- 0,41	2,31 +/- 0,62	1,46 +/- 0,24	1,77 +/- 0,23
MDHAR	6	3,62 +/- 0,71	2,81 +/- 0,26	3,28 +/- 0,47	3,08 +/- 0,36	3,17 +/- 0,34
	96	3,00 +/- 0,32	3,14 +/- 0,17	3,36 +/- 0,27	3,66 +/- 0,04	3,31 +/- 0,13
APX	6	48,3 +/- 1,5	40,5 +/- 7,7	41,8 +/- 6,1	31,0 +/- 2,9	34,4 +/- 2,8
	96	59,8 +/- 9,8	61,4 +/- 5,5	63,2 +/- 1,5	70,6 +/- 7,2	72,3 +/- 5,1
DHAR	6	6,04 +/- 0,39	3,30 +/- 0,49	5,35 +/- 0,35	6,71 +/- 0,29	6,76 +/- 0,81
	96	6,51 +/- 0,89	2,56 +/- 0,07	4,69 +/- 0,31	5,06 +/- 0,38	5,35 +/- 0,46
GR	6	4,75 +/- 0,51	3,42 +/- 0,24	5,04 +/- 0,62	5,33 +/- 0,37	4,50 +/- 0,26
	96	2,74 +/- 0,31	2,10 +/- 0,23	3,56 +/- 0,40	3,57 +/- 0,43	3,87 +/- 0,18

Les valeurs sont exprimées en U/mg MF pour la superoxyde dismutase (SOD), en nkat/mg MF pour la catalase (CAT) et la monodéhydro-ascorbate réductase (MDHAR) et en pkat/mg MF pour l'ascorbate peroxydase (APX), la déhydro-ascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR). Les résultats sont présentés +/- l'erreur standard.

Contrairement aux observations réalisées pour les racines, l'activité SOD ne subit aucune modification dans le système foliaire, quelle que soit la concentration en Cd ($0.117 < p < 0.637$). En moyenne, cette activité est de 0.55 U/mg MF. A noter que cette activité est comparable à celle mesurée dans les racines témoins. De la même façon, aucune modification significative des activités CAT ($0.460 < p < 0.740$), MDHAR ($0.780 < p < 0.870$), DHAR ($0.303 < p < 0.470$) et GR ($0.059 < p < 0.362$), n'a été enregistrée. L'activité APX par contre, augmente significativement en cours de culture, pour des concentrations de 50 et 75 μM de Cd (respectivement, $p = 0.005$ et $p = 0.016$).

En ce qui concerne les molécules anti-oxydantes tels que l'ascorbate et le glutathion, la réponse des feuilles est également différente de celle des racines. De fait, ces deux molécules augmentent légèrement en cours de culture (données non présentées), mais aucune différence par rapport au témoin n'a pu être mise en évidence.

VIII.4.4 Accumulation du cadmium

La figure 8.7 montre l'évolution des concentrations racinaires (Fig. 8.7 a) et foliaires (Fig. 8.7 b) au cours des 96 h de culture en présence de Cd.

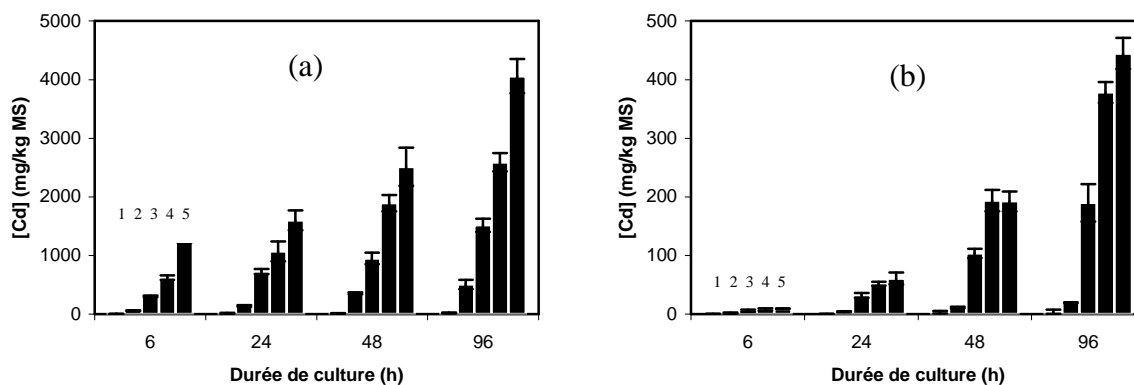


Figure 8.7 : Evolution des concentrations racinaires (a) et foliaires (b) en Cd chez *Plantago arenaria*, cultivé en présence de différentes concentrations en Cd. (1 : 0 ; 2 : 2.5 ; 3 : 25 ; 4 : 50 ; 5 : 75 µM)

Dans les racines, la teneur en Cd augmente rapidement et atteint des valeurs d'autant plus élevées que la concentration du milieu est importante. C'est ainsi qu'après 96 h de culture en présence de 75 µM de Cd, la concentration en métal atteint plus de 4000 mg/kg MS. Dans les feuilles, une évolution comparable est observée, mais les concentrations en Cd restent beaucoup plus faibles : une teneur maximale de 450 mg/kg MS est mesurée dans les échantillons cultivés durant 96 h sur 75 µM de Cd.

VIII.5 DISCUSSION

Dans le cadre de ce travail, la réponse chez *Plantago arenaria* au stress oxydant induit par le cadmium a été estimée par l'analyse des activités des principales enzymes limitant l'action des ROS. Les résultats acquis ont confirmé la tolérance au cadmium observée chez cette espèce. En effet, une inhibition de croissance, qu'il s'agisse d'une élongation racinaire, d'une élongation foliaire ou d'une diminution des masses de matière fraîche ou sèche, est le paramètre le plus directement visible, marquant la toxicité d'un milieu (Macnair, 1993). Or, nous avons observé, en mesurant l'élongation foliaire, un effet toxique précoce chez *P. arenaria*. Cependant, la reprise de croissance après 48 h de culture montre que la toxicité du Cd est rapidement surmontée. Tout se passe donc comme si *P. arenaria* réagissait à la présence du Cd en mettant en place, dans les premiers jours de culture, un système de détoxification du Cd. Parmi les différentes hypothèses possibles, la stimulation du système anti-oxydant peut être envisagée. Les dosages réalisés

séparément dans les racines et dans les feuilles ont montré que cette reprise de croissance s'accompagne d'une stimulation du système anti-oxydant dans les racines.

De fait, à l'exception de l'APX, la totalité des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS, et surtout la catalase, présente une nette augmentation d'activité. En suivant les activités CAT, SOD et GR chez une variété de *Raphanus sativus* tolérante au cadmium, Victoria *et al.* (2001), ont obtenu des résultats comparables. De même, chez *Alyssum sp.* (Schickler et Caspi, 1999), la tolérance au Cd s'accompagne d'une augmentation de l'activité SOD alors que l'activité APX reste constante. Inversement, chez des espèces non tolérantes, telles que *Pinus sylvestris* (Schützendübel *et al.*, 2001), *Pisum sativum* (Sandalio *et al.*, 2001) ou *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah *et al.*, 1992), la présence de Cd inhibe la plupart des enzymes du système anti-oxydant. D'autre part, en ce qui concerne les molécules anti-oxydantes, les concentrations en ascorbate total et en ascorbate réduit augmentent de façon significative en présence de concentrations de cadmium supérieures à 2,5 μM , alors que le pool de glutathion augmente même en absence de cadmium. Cette augmentation ne serait donc pas directement reliée à la présence du Cd. Il est probable que cette augmentation de la concentration en GSH, soit liée au changement de milieu lors de la mise en culture, et donc à un stress transitoire lié à l'afflux d'éléments nutritifs (Tausz *et al.*, 2004).

En d'autres termes, il apparaît donc que deux systèmes majoritaires impliqués dans l'élimination des ROS, via la catalase d'une part et les enzymes du cycle ascorbate/glutathion d'autre part, interviennent simultanément chez *Plantago arenaria*. Il semble donc exister une certaine corrélation entre la tolérance au Cd et l'activation de la réponse anti-oxydante, dans le système racinaire. Il apparaît cependant que le Cd induit une réponse différente du système anti-oxydant dans les racines et les feuilles de *P. arenaria*. Ce type d'observation a déjà été rapportée chez *Pisum sativum* (Dixit *et al.*, 2001), mais la réponse décrite était inverse : les feuilles montrant principalement une stimulation des enzymes du système anti-oxydant et les racines une inhibition de ces enzymes. Chez cette espèce non tolérante au Cd, il semblerait que les concentrations importantes de Cd accumulées dans le système racinaire soient responsables d'une inhibition du système anti-oxydant ; inversement, les plus faibles concentrations accumulées dans les feuilles conduiraient à une stimulation de la réponse anti-oxydante. Chez *P. arenaria*, espèce tolérante au Cd, il nous a donc paru intéressant de mesurer et de comparer les concentrations en Cd dans les racines et les feuilles au cours de la culture.

Les dosages réalisés ont montré que le cadmium était majoritairement accumulé dans les racines. Il existe donc probablement, comme chez beaucoup d'autres espèces (Baker, 1981), un mécanisme permettant de limiter la translocation du Cd du système racinaire vers le système foliaire. Quoiqu'il en soit il faut noter que les concentrations en Cd, atteintes respectivement dans les racines et dans les feuilles, sont très importantes au regard de la toxicité connue du Cd. Ces données confirment donc qu'il existe très probablement chez *P. arenaria* un mécanisme efficace de détoxification intracellulaire de la surcharge métallique.

Pour résumer, une augmentation de l'activité catalase et le maintien d'un fort pool d'ascorbate réduit dans les racines sont les deux aspects les plus marquants de cette réponse. Manifestement, l'activation du système anti-oxydatif pourrait donc représenter un des aspects de la tolérance au Cd chez *P. arenaria*. Cependant il est probable que cette réponse soit associée à d'autres mécanismes de détoxification interne. En particulier, l'implication de molécules chélatrices, tels que des métallothionéines ou des acides organiques libres, peut être envisagée. En revanche, nos données ne nous ont pas permis de mettre en évidence une quelconque modification du pool de glutathion. Cette molécule étant un précurseur indispensable à la biosynthèse des phytochélatines, il serait possible que le Cd intracellulaire ne stimule pas la synthèse de phytochélatines, comme c'est le cas chez l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens* (Ebbs *et al.*, 2002).

VIII.6 REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Alloway, B.J., 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B.J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. Chapman & Hall, London, pp. 11-35.
- Arrigoni, O., Dipierro, S., Borraccino, G., 1981. Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters* 125, 242-244.
- Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C.H. & Mullineaux, P.M. (Eds.). *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC press, Boca Raton, pp. 77-104.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3, 643-654.

- Beauchamp, C., Fridovitch, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assay and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Dalton, D.A., Russel, S.A., Hanus, F.J., Pascoe, G.A., Evans, H.J., 1986. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in Soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83, 3811-3815.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- Dibkaer, R., 2001. Unit "Katal" for catalytic activity. *Pure and Applied Chemistry* 73, 927-931.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52 (358), 1101-1109.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L., 2002. Phytocyclin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* 214, 635-640.
- Hodges, M., Andrews, D., Johnson, J., Hamilton, I., 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiologia Plantarum* 98, 685-692.
- Iannelli, M.A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., Massacci, A., 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 977-982.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.
- Lefèbre, C., Vernet, P., 1990. Microevolutionary processes on contaminated deposits. In: Shaw, J. (Ed.). *Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 285-300.
- Macnair, M. R., 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124, 541-559.

- Nakano, L., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32, 539-548.
- Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil* 239, 123-132.
- Rosa, E.V.C., Valgas, C., Souza-Sierra, M.M., Corrêa, A.X.R., Radetski, C.M., 2003. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia faba* exposed to cadmium in solution. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (3), 645-649.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puerta, M. C., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52 (364), 2115-2126.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Schickler, H., Caspi, H., 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the *genus Alyssum*. *Physiologia Plantarum* 105, 39-44.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative system, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology* 127, 887-898.
- Schützendübel, A., Nikolova, P., Rudolf, C., Polle, A., 2002. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 577-584.
- Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62 (2), 233-246.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A., 1988. Assay of glutathion reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry* 175, 408-413.

- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, k., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean : Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum* 85, 85-89.
- Tausz, M., Sircelj, H., Grill, D., 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* 55, 1955-1962.
- Victoria, P., Lea, J., Azevedo, A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57, 701-710.
- Vollenweider, P., Cosio, C., Günthardt-Goerg, M.S., Keller, C., 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58, 25-40.
- Wagner, G.J., 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* 51, 173-212.
- Zarcinas, B.A., Cartwright, B., Spouncer, L.R., 1987. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 18, 131-146.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La prise de conscience du mauvais état sanitaire des sols conduit évidemment à la question de savoir quels sont les risques, pour la santé publique et pour les écosystèmes, dans chaque situation de pollution. D'une façon générale, la notion de risque inhérent à un polluant quelconque est intimement liée à sa possibilité de transfert vers l'organisme cible. La législation en vigueur (Circulaire du 10 décembre 1999) en tient compte et impose un contrôle strict des sites pollués (surveillance piézométrique, restriction d'usage, interdiction d'accès...), visant à limiter les risques de contamination humaine et à éviter tout problème direct de santé publique. Concernant les métaux lourds, leurs effets sur les écosystèmes locaux et les mécanismes de leur transfert, du sol aux organismes vivants (notamment les plantes), sont encore mal compris. Il est donc très difficile de prévoir leurs effets à long terme, de modéliser le devenir des polluants d'un site contaminé, d'en évaluer les risques et donc de choisir une stratégie de remédiation. L'utilisation des végétaux comme outil de bioindication s'avère être une approche prometteuse pour compléter la démarche classique d'évaluation des risques. En effet, il est largement reconnu que les sites naturels ou anthropiques contaminés par des métaux lourds peuvent accueillir des associations végétales strictement inféodées à ce type de milieu, originales et singulières, parfois qualifiées de « groupements métallicoles ». La détermination de ces associations permet de mieux cerner l'impact des contaminants sur l'écosystème et facilite l'identification des sites contaminés. Le dosage des métaux lourds dans les végétaux de ces sites met en évidence le degré de transfert des métaux et de leur bioaccessibilité pour l'homme. Ces informations pourraient simplifier l'évaluation des risques, en l'affranchissant de la mesure de la biodisponibilité par des tests chimiques complexes, souvent peu corrélés aux contenus chimiques des végétaux. Il paraît donc indispensable de mieux caractériser la végétation spontanée de ces milieux afin de déterminer leurs potentialités en terme de bioindication.

Par ailleurs, si les techniques classiques de dépollution sont très efficaces pour les contaminants organiques, elles s'avèrent lourdes, onéreuses, voire inadaptées pour les métaux lourds qui sont, par définition, non biodégradables. Depuis quelques années, les biotechnologies ont montré que l'utilisation de plantes supérieures peut constituer une solution supplémentaire par rapport aux techniques classiques, offrant deux directions de recherches : le confinement de la pollution, en évitant son transfert par une couvert végétal approprié (phytostabilisation) ; la dépollution des sols, en favorisant le développement d'une population végétale accumulant les métaux lourds (phytoextraction). Ces techniques, dites de phytoremédiation, reposent sur deux axes de recherche principaux : l'utilisation de plantes tolérantes, accumulatrices ou non et le transfert de gènes d'intérêt vers des espèces agronomiques, dont la culture est parfaitement maîtrisée. Les

limites à l'application des recherches menées dans le premier axe résident dans les caractéristiques naturelles de ces végétaux. Les espèces accumulatrices sont souvent caractérisées par un enracinement peu profond, une croissance lente et une faible production de biomasse ; autant de critères qui limitent considérablement les taux prévisibles d'extraction. L'utilisation des plantes phytostabilisatrices quant à elle, reste limitée par le faible nombre d'espèces potentiellement utilisables. Les végétaux susceptibles d'être utilisés afin d'établir un couvert végétal suffisant, sans risque de mobilisation des métaux, doivent présenter trois propriétés essentielles : i) un système racinaire développé ; ii) une translocation limitée ; iii) une importante évapotranspiration. Par ailleurs, l'obtention d'un rendement optimal nécessite que les conditions de culture (climatiques et édaphiques) sur les sites pollués correspondent aux exigences naturelles de ces végétaux ; ce paramètre est par essence très difficile à contrôler et représente une limitation supplémentaire de la méthode. Le second axe de recherche, l'utilisation des méthodes de transgénèse, soulève évidemment le problème éthique et politique des OGM (organismes génétiquement modifiés) mais se heurte surtout au manque de connaissances concernant les mécanismes génétiques impliqués dans la tolérance aux métaux. Cette technique souffre aussi du faible nombre d'espèces potentiellement utilisables à l'échelle industrielle. Il est donc indispensable de poursuivre les recherches afin de sélectionner de nouvelles plantes tolérantes ou accumulatrices et de mieux comprendre les effets des métaux lourds sur la physiologie végétale.

Pour répondre à ces objectifs, la démarche adoptée dans le cadre de ce travail, a consisté à rechercher, *in natura*, des plantes présentant des caractéristiques d'accumulation ou de tolérance et susceptibles de fournir de nouveaux modèles biologiques pour l'étude des phénomènes de tolérance aux métaux lourds. En Rhône-Alpes, de nombreux sites ont été contaminés de longue date par d'importantes activités minières et industrielles, sur lesquels il est vraisemblable qu'une végétation adaptée se soit naturellement développée. En effet, il est bien établi que la résistance à divers métaux lourds peut être rapidement et facilement acquise par « micro-évolution et adaptation », au sein de populations soumises à pression de sélection. Trois crassiers métallurgiques, pour lesquels une autorisation d'accès a pu être obtenue, ont été retenus comme sites pilotes en raison de leur origine comparable, afin d'obtenir le maximum de résultats concordants. S'ils représentent des périodes variées de l'activité industrielle régionale, ils montrent tous trois des concentrations métalliques élevées et un couvert végétal suffisamment développé. Le premier travail réalisé avait donc comme objectif la caractérisation du substrat et de la flore spontanée de ces friches métallurgiques.

Les mesures effectuées sur l'un des sites ont montré que le substrat formé au fil des années est très homogène et constitue un Anthroposol caractérisé par une absence de zonation horizontale claire, comparable aux sols de l'ordre des Entisols dans la nomenclature des sols naturels. Outre des teneurs métalliques élevées, dépassant largement le fond pédogéochimique moyen, le sol constitué à partir des anciennes crasses présente des caractéristiques particulières : texture sableuse, pH alcalin (7,7 à 9,6), taux de carbonates élevé (3,7 à 19,1 %), carbone organique très abondant (5,9 à 10,0 %) et basse teneur en azote total (0,1 à 0,2 %) induisant un rapport C/N élevé (39,9 à 92,7). Malgré une importante pollution polymétallique, les prospections botaniques ont révélé une étonnante diversité floristique, avec un peu plus de 200 espèces de plantes supérieures répertoriées, réparties dans une cinquantaine de familles botaniques. En ce qui concerne l'étude phytosociologique, quatre groupements ont pu être identifiés, qui se rapprochent d'associations communes de terrains rudéraux, mais qui n'ont jamais été décrits en France jusqu'alors. Ainsi, la flore des sites métallurgiques étudiés apparaît comme spécifique et témoigne de l'origine anthropique du substrat. Même après plusieurs dizaines d'années d'inactivité, le caractère pionnier des groupements identifiés reflète la présence d'un facteur limitant l'établissement d'une végétation climacique. Par conséquent, l'approche phytosociologique pourrait être un bon outil permettant d'estimer l'impact des métaux lourds sur l'ensemble de la végétation.

La réglementation européenne sur les sites et sols contaminés ne prévoit pas, pour l'ensemble des pays membres, de cadre commun à la démarche d'analyse de risque. Selon la démarche hollandaise, fixant un seuil de contamination pour les métaux lourds en fonction du fond pédo-géochimique et des conditions pédologiques, les sites étudiés seraient considérés comme lourdement pollués. La loi française n'impose pas de valeurs seuils mais prévoit une analyse au cas par cas, en fonction du niveau d'exposition, des risques de transfert et de la nature des cibles exposées. Par conséquent, l'estimation des fractions mobiles des éléments métalliques apparaît généralement largement préférable à celle des teneurs totales. Cependant, le problème du transfert potentiel des métaux est particulièrement complexe dans la mesure où il dépend non seulement des métaux considérés, de leurs concentrations, mais aussi des propriétés pédo-géochimiques précises du sol. De fait, on admet généralement que les métaux du sol sont distribués en 5 fractions principales (fractions « échangeable », « liée aux carbonates », « liée aux oxydes de Fe et Mn », « liée à la matière organique » et « résiduelle ») caractérisées par des interactions métal/matrice d'énergies croissantes. Sur la base de ces données, de nombreux protocoles d'extractions chimiques ont été mis au point au cours de ces dernières années, et les principaux paramètres physico-chimiques impliqués dans la spéciation des métaux sont aujourd'hui bien compris. Dans le cadre de

notre étude, l'analyse de la mobilité des métaux lourds a montré que, malgré de très fortes concentrations, leur lixiviation est très limitée. Néanmoins, les risques de transfert vers les végétaux ne peuvent être totalement écartés, car les végétaux sont capables de modifier ponctuellement la solubilité des éléments inorganiques, notamment via les exudats racinaires, favorisant leur biodisponibilité. Mais si nos analyses séquentielles montrent, par exemple, que la phytodisponibilité potentielle du plomb est très supérieure à celle du chrome, l'analyse chimique de plusieurs espèces abondantes sur les sites montre, à l'inverse, que le plomb a été globalement moins accumulé que le chrome, confortant la prééminence de l'analyse du végétal sur celle du sol. En outre, la comparaison des teneurs mesurées chez ces espèces à celles d'une plante référence croissant sur terrain non contaminé, montre que d'une façon générale, les métaux ne sont pas accumulés, excepté pour le Ni, le Cu et le Zn, qui dépassent légèrement les valeurs normales sur un site uniquement. Par conséquent, le risque de transfert des métaux lourds vers la végétation apparaît beaucoup plus limité que ne le laisserait prévoir l'analyse de la fraction biodisponible.

Même si, au regard des différents résultats obtenus, les risques de transfert chimique vers les nappes semblent réduits, il reste indispensable de limiter les transferts dus à l'érosion mécanique. Les techniques de phytoremédiation, et en particulier la phytostabilisation, pourraient représenter une solution appropriée, évitant en outre l'excavation totale des terres contaminées, techniquement et économiquement irréaliste compte tenu des volumes impliqués. Afin de pouvoir utiliser au mieux les espèces végétales naturelles retrouvées sur les sites étudiés, dans des programmes de phytoremédiation, il est nécessaire de bien caractériser leurs capacités de tolérance et d'accumulation vis-à-vis des différents éléments toxiques. Pour cela, des tests rapides adoptant la technique de criblage du Vertical Mesh Transfert ont été réalisés. Les premiers résultats obtenus pour trois espèces différentes (*Conyza sumatrensis*, *Verbascum densiflorum* et *Plantago arenaria*) retrouvées en abondance sur un site ont montré que *Plantago arenaria* présente de bonnes capacités de tolérance à divers métaux toxiques. Par ailleurs, les tests de tolérance aiguë et chronique au cadmium ont confirmé que *P. arenaria* résiste à des concentrations élevées et supérieures à celles retrouvées communément sur des sites contaminés.

Chez les végétaux, l'effet le plus directement visible des métaux lourds est une inhibition de la croissance qui s'accompagne très souvent d'une chlorose et d'importantes lésions nécrotiques. A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif qui conduit finalement à l'inhibition de certaines activités physiologiques comme la photosynthèse et la respiration. Dans le cadre de ce

travail, la réponse chez *Plantago arenaria* au stress oxydant induit par le cadmium a été estimée par l'analyse des activités des principales enzymes limitant l'action des ROS. Les résultats acquis ont confirmé la tolérance au cadmium observée chez cette espèce. Il apparaît que deux systèmes majoritaires sont impliqués dans l'élimination des ROS dans les racines, d'une part via la catalase et d'autre part via les enzymes du cycle ascorbate/glutathion qui interviennent simultanément chez *P. arenaria*. De plus, il semblerait que la translocation du cadmium reste assez faible, limitant ainsi l'accumulation du métal dans les feuilles. Ainsi, aucune réponse significative du système anti-oxydant foliaire n'a pu être mise en évidence. L'accumulation importante du cadmium dans les racines suggère que la réponse peut être associée à d'autres mécanismes de détoxification interne. En particulier, l'implication de molécules chélatrices, tels que des métallothionéines ou des acides organiques libres, peut être envisagée. En revanche, ces données n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque modification du pool de glutathion. Cette molécule étant un précurseur indispensable à la biosynthèse des phytochélatines, il serait possible que le Cd intracellulaire ne stimule pas la synthèse de phytochélatines.

En tout état de cause, la diversité des espèces sur ces zones fortement polluées confirme que des teneurs élevées en métaux lourds ne sont pas incompatibles avec un développement végétal « normal ». Selon les espèces, ce développement peut tout simplement traduire une large tolérance écologique vis-à-vis des conditions édaphiques, ou au contraire être le reflet de phénomènes micro-évolutifs intervenus au sein de populations soumises à une forte pression de sélection. Afin de donner les premiers éléments de réponse concernant le caractère adaptatif ou constitutif de la tolérance chez *Plantago arenaria*, la résistance d'une population métallifère retrouvée sur un des sites prospectés a été comparée à celle d'une population éloignée, se développant sur un substrat naturel non contaminé. Après l'analyse des résultats obtenus, il s'avère que la tolérance aux métaux lourds chez *P. arenaria* peut être considérée comme étant largement constitutive, exceptée pour le cuivre pour lequel le caractère serait adaptatif. Cette tolérance constitutive pourrait être due à sa caractéristique de plante pionnière résistant bien à la sécheresse.

Pour résumer, l'ensemble des résultats obtenus a permis d'obtenir de solides données sur la végétation spontanée des crassiers métallurgiques et sur le métabolisme impliqué dans le stress métallique. L'inventaire exhaustif de toutes les espèces vasculaires chlorophylliennes des sites d'étude et l'identification des principales associations végétales ont permis, en parallèle avec des analyses chimiques de la phytodisponibilité et des mesures de concentrations foliaires des espèces abondantes, de caractériser le risque de transfert des polluants métalliques et d'étayer une étude de

risques, dont le bilan apparaît plutôt bon. Par ailleurs, les premiers tests de tolérance et d'accumulation ont abouti au choix d'une espèce modèle : *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. Cette espèce présente à la fois une assez bonne tolérance à divers métaux lourds très phytotoxiques comme le cadmium, et des patterns d'accumulation proches des espèces indicatrices. Le plantain des sables possède par ailleurs un cycle de développement rapide et une production importante de graines sans dormance, rendant sa culture aisée en laboratoire. De plus, l'utilisation de ce modèle pour la mise en place des premières expériences biochimiques a permis de caractériser la réponse végétale au stress oxydatif engendré par les métaux lourds. Enfin, les résultats obtenus permettent d'ores et déjà d'entrevoir les espèces utilisables dans des programmes de phytoremédiation. Si l'absence d'espèces hyperaccumulatrices n'apparaît pas favorable à une phytoextraction, elle peut être en revanche un facteur très positif en vue d'une phytostabilisation, renforcé par le fait que la plupart des plantes étudiées présentent des caractéristiques d'exclusion des métaux lourds. Il est possible, dès lors, de revégétaliser rapidement les zones encore dépourvues de végétation ainsi que de nouveaux sites pollués. Cette stratégie est d'ailleurs la plus adaptée aux importants volumes de ce type de friches qui ne peuvent être entièrement dépollués. Elle permet de stabiliser les crasses, de façon à limiter la production de poussières nocives par les phénomènes d'érosion. La suite possible de ce travail consisterait à orienter les recherches vers les mécanismes complémentaires de la résistance aux métaux lourds chez *P. arenaria* et notamment en ce qui concerne les phénomènes de chélation intracellulaire. D'autre part, il serait intéressant de procéder aux premiers tests de recolonisation en conditions réelles. Dans cette optique, il serait indispensable de compléter les connaissances de la biologie et de l'écologie des espèces retenues comme candidates, de réaliser un suivi des étapes de cette revégétalisation et de contrôler périodiquement les paramètres de mobilité des métaux lourds.

RÉSUMÉ

Parmi les principaux polluants générés par les activités industrielles, les métaux lourds, tels que le Cu, le Pb, le Cr... posent des problèmes particulièrement préoccupants. En effet, ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies. Ainsi, pour reprendre les termes d'un récent rapport de l'Office Parlementaire des Choix Scientifiques et Technologiques : « si les métaux lourds ont fait la civilisation, ils peuvent aussi la défaire ». Il est donc aujourd'hui indispensable non seulement de mieux connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais aussi de mettre en œuvre des solutions durables, visant à limiter leurs risques. Dans ce contexte, les plantes représentent un objet d'étude intéressant. En effet, celles-ci, directement confrontées aux composés toxiques du milieu, pourraient non seulement être utilisées en tant que marqueurs de la toxicité du milieu, mais aussi en tant qu'outil de stabilisation des polluants. Cependant, à l'heure actuelle, les données concernant l'influence des métaux lourds sur les communautés végétales soumises à une exposition chronique de polluants, de même que le rôle des plantes sur le devenir des métaux, sont encore insuffisantes. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches dans ce domaine afin de mieux comprendre les modalités des interactions entre les plantes et les milieux pollués et de trouver de nouvelles espèces utilisables dans des programmes de phytoremédiation.

Pour répondre à cet objectif, l'étude des populations végétales naturelles de trois crassiers métallurgiques de la région Rhône-Alpes a été réalisée. Malgré de fortes teneurs en métaux lourds, les relevés réalisés ont permis de répertorier un peu plus de 200 espèces de plantes supérieures appartenant à une cinquantaine de familles botaniques. Par ailleurs, l'utilisation d'une méthode chimique normalisée a montré que la fraction métallique "phytodisponible" était importante. Par opposition, l'analyse des concentrations foliaires n'a pas permis de mettre en évidence une accumulation métallique supérieure à celle retrouvée dans une plante référence. Par conséquent, le risque de transfert des polluants métalliques apparaît limité. L'analyse des relevés phytosociologique a cependant révélé que le substrat influence l'organisation de groupements végétaux inédits, qui pourraient être utiles pour désigner la végétation la plus adaptée pour un programme de phytoremédiation. Au sein de ces groupements, une espèce abondante, *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. a montré de bonnes capacités de tolérance vis-à-vis de différents métaux lourds, en particulier pour le cadmium. Il s'est révélé que la tolérance de cette espèce est un caractère constitutif pour le Cd et le Ni et un caractère adaptatif pour le Cu. Cette bonne tolérance constitutive pourrait être une caractéristique des plantes pionnières et résistantes à la sécheresse. Chez cette espèce, les mécanismes de résistance au cadmium semblent impliquer une activation du système anti-oxydant racinaire et une limitation de la translocation.

La suite possible de ce travail pourrait consister à orienter les recherches vers les mécanismes complémentaires de la résistance aux métaux lourds chez *P. arenaria* et notamment en ce qui concerne les phénomènes de chélation intracellulaire. Par ailleurs, il serait intéressant de procéder aux premiers tests de recolonisation en conditions réelles.

Mots-clés : Métaux lourds, risques, plantes, tolérance, accumulation, adaptation, stress oxydatif, phytoremédiation.

ABSTRACT

Among the main pollutants generated by industrial activities, heavy metals, such as Cu, Pb or Cr, are of major concern. Indeed, these elements, which are nonbiodegradable, are highly ecotoxic and could be implied in different human diseases. Thus, to resume the terms of a recent report of the Parliamentary Office of the Scientific and Technological Choices, "if heavy metals made civilization, they can also dismantle it". It is today essential not only to better know the effects of these pollutants on the living organisms, but also to develop adapted solutions, in order to limit the risks. In this context, plants are really interesting. Indeed, plants, which are directly confronted with the toxic compounds of the medium, could be not only used as biomarkers of toxicity of the medium, but also as a tool for stabilization of the pollutants. However, data concerning influence of heavy metals on vegetation, subjected to a chronic metal exposure, as well as the role of the plants on metal becoming are still insufficient. Consequently, is necessary to carry on research in this field in order to better understand interactions between plants and pollutants and to find new species usable in phytoremediation programs.

This work presents results of the study of the natural vegetations developing on three metallurgical dumps in Rhone Alpes region. Although heavily polluted soils, more than 200 plant species were identified, belonging to 50 botanical families. Thus, using a standardized procedure, metals were highly "phytoavailable", whereas mean leaf metal concentrations in native vegetation showed no more accumulation than a reference plant growing in uncontaminated environments. Consequently, metal phytoavailability can be considered as low despite very high total levels. Although poor phytoavailable metals levels were demonstrated, metallurgical waste deposits had clearly an impact on the structure of plants communities. Phytosociological relevés performed on the metallurgical sites evidenced four quite unusual well-marked major vegetation group whose three of them had never been described. Among these groupments, the abundant species, *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. showed high metal tolerance, especially for Cd. For Cd and Ni tolerance was a constitutive character and an adaptative trait for Cu. This good constitutive tolerance could be a characteristic of pioneer and dryness resistant species. In *P. scabra*, the mechanisms of Cd resistance to cadmium could imply an activation of the antioxydant root system and a translocation limitation.

To continue this work, it's necessary to get complementary information on resistance mechanisms invovled in heavy metal tolerance in *P. arenaria* and particularly on intracellular chelation. In addition, it would be interesting to carry out the first tests of recolonisation in real conditions.

Key words: Heavy metals, risks, plants, tolerance, accumulation, adaptation, oxydative stress, phytoremediation.