

Effet de la végétation sur la mobilité de l'arsenic dans la rhizosphère.

Carole Obeidy

▶ **To cite this version:**

Carole Obeidy. Effet de la végétation sur la mobilité de l'arsenic dans la rhizosphère.. Autre. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2011. Français. NNT : 2011EMSE0608 . tel-00715910

HAL Id: tel-00715910
https://theses.hal.science/tel-00715910

Submitted on 9 Jul 2012

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.

Ecole Nationale Supérieure des Mines
SAINT-ETIENNE

NNT : *2011 EMSE 0608*

THÈSE

présentée par

Carole OBEIDY

pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des Procédés

ETUDE DE L'EFFET DE LA VEGETATION SUR LA MOBILITE DE L'ARSENIC DANS LA RHIZOSPHERE

soutenue à Saint-Etienne, le 13 mai 2011

Membres du jury

Président :	Gérard LEDOIGT	Professeur de Biologie, Université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	Gérard LEDOIGT	Professeur de Biologie, Université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand
	Michel MENCH	Directeur de recherche HDR, INRA Université de Bordeaux 1
Examinateur(s) :	Jawad AAROUF	Maître de conférence, UAPV, Avignon
	Adnane HITMI	Maître de conférence-HDR, I.U.T., Clermont-Ferrand
Directeur(s) de thèse :	Bernard GUY	Directeur de recherche, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne
	Jean-Luc BOUCHARDON	Maître assistant, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne
	Olivier FAURE	Maître de conférence, Université Jean- Monnet, Saint-Etienne
Invité(s) éventuel(s):	Jean-Claude Leclerc	Professeur émérite, Université Jean- Monnet, Saint-Etienne
	MaTThieu BRAVIN	Chercheur, Cirad, Saint-Denis, la Réunion

Spécialités doctorales :	**Responsables :**
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS
MECANIQUE ET INGENIERIE	A. VAUTRIN Professeur – Centre SMS
GENIE DES PROCEDES	G. THOMAS Professeur – Centre SPIN
SCIENCES DE LA TERRE	B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT	J. BOURGOIS Professeur – Centre SITE
MATHEMATIQUES APPLIQUEES	E. TOUBOUL Ingénieur – Centre G2I
INFORMATIQUE	O. BOISSIER Professeur – Centre G2I
IMAGE, VISION, SIGNAL	JC. PINOLI Professeur – Centre CIS
GENIE INDUSTRIEL	P. BURLAT Professeur – Centre G2I
MICROELECTRONIQUE	Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BENABEN	Patrick	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR 0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 1	Informatique	G2I
BORBELY	Andras	MR	Sciences et Génie des Matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	G2I
BOUDAREL	Marie-Reine	PR 2	Génie Industriel	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 0	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BRODHAG	Christian	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	G2I
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSE	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	G2I
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRIVER	Julian	DR 0	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FEILLET	Dominique	PR 2	Génie Industriel	CMP
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR	Génie des Procédés	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	G2I
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
INAL	Karim	PR 2	Microélectronique	CMP
KLÖCKER	Helmut	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LERICHE	Rodolphe	CR CNRS	Mécanique et Ingénierie	SMS
LI	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
MALLIARAS	George Grégory	PR 1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	MA	Mécanique et Ingénierie	SMS
MONTHEILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 0	Image, Vision, Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
THOMAS	Gérard	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
TRIA	Assia		Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VAUTRIN	Alain	PR 0	Mécanique & Ingénierie	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

Glossaire :

PR 0	Professeur classe exceptionnelle
PR 1	Professeur 1ère classe
PR 2	Professeur 2ème classe
MA(MDC)	Maître assistant
DR	Directeur de recherche
Ing.	Ingénieur
MR(DR2)	Maître de recherche
CR	Chargé de recherche
EC	Enseignant-chercheur
IGM	Ingénieur général des mines

Centres :

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
SITE	Sciences Information et Technologies pour l'Environnement
G2I	Génie Industriel et Informatique
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé

Dernière mise à jour le : 13 septembre 2010

REMERCIEMENTS

La première personne que je tiens à remercier est Bernard Guy, mon directeur de thèse, qui m'a laissée la liberté de conduire et d'orienter mon travail, tout en manifestant sa confiance et son soutien durant cette thèse.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de l'équipe des techniciens de l'Ecole des Mines de St Etienne. C'est une grande famille, chaleureuse et serviable ! Je ne vous oublierai jamais ! J'adresse une pensée particulière à Alain Lallemand, qui m'a énormément aidé pendant ces années, Jean-Pierre Poyet, pour les échanges et les discussions autour de la chromatographie ionique, Fréderic Gallice, pour sa réactivité pour les analyses ICP, Marie-Claude Bartholin, pour son dynamisme et sa gentillesse, Olivier Valfort et Paul Jouffrey pour leurs soutiens dans divers analyses, Marc Doumas, pour les échanges interressants, Jérôme Mancouso, pour tous ses services logistiques et Joëlle Verney, notre aimable secrétaire que j'ai beaucoup appréciée…

Mes remerciements vont également à Jean-Luc Bouchardon, mon encadrant, pour son sens d'humour et son professionalisme. Je tiens aussi à adresser mes remerciements aux personnes qui ont bien voulu relire ce document. Je remercie particulièrement Michel Mench, Matthieu Bravin et Jean-Claude Leclerc pour la pertinence de leurs avis.

Merci aussi à tous les amis qui m'ont aidée et encouragée durant ces années ! Merci à Biba, Franck, Marie, Bassel, Guillaume, Fred junior, Virginie, Geoffroy, Tiphaine, Raquel, Yolanda, Zaher, Jinane, Jing, Jérôme, Marthe, Valentine, Damien, Aurélie, Arthur, Pauline, Evan, Mounir, Lydie et Marie ! Merci d'avoir été là !

Merci aussi à ma petite maman pour sa douceur et sa grande confiance en moi! Merci pour tout Feddo !

Et surtout un grand merci du fond de mon cœur à mon fiancé et futur époux Vincent pour son grand soutien et son amour infini.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I. LA MOBILISATION DE L'ARSENIC DANS LE SYSTEME SOL-RHIZOSPHERE-PLANTE 5

I. L'arsenic dans les sols **7**
I.1. Généralités 7
I.2. Production et utilisation 7
I.3. Les sources de l'As dans l'environnement 8
I.4. La mobilité de l'As dans les sols 9
I.5. Principaux mécanismes de fixation de l'As dans les sols 13

II. Les mécanismes de mobilisation de l'As dans la rhizosphère **19**
II.1. La mobilité de l'As associée aux mécanismes d' « acidification / alkalinisation » de la rhizosphère 19
II.2. Le potentiel redox 23
II.2. Interactions plantes -As – P 24
II.3. L'accumulation de l'As par les plantes : concept « accumulateur –indicateur-excluder » 24

III. Application dans les Phytotechnologies des traitements de sol **27**
III.1. Rôle des plantes dans la dépollution des sols 27

Conclusion de l'étude bibliographique **30**

CHAPITRE II TOLERENCE ET ACCUMULATION DE L'AS CHEZ QUATRE ESPECES VEGETALES 31

Abstract **32**

Introduction **32**

Materials and Methods **34**
VMT technique 34
Soil experimental conditions 34
Plant analysis 35
Statistical analysis 35
Results 36
The level of As tolerance of the selected species 36
Arsenic accumulation in shoots and roots 38
Relationships between As and variables contents (µg) in plants shoots and roots 40
Discussion 41
Conclusion 43

References **43**

CHAPITRE III. ETUDE DE LA SPECIATION MINERALOGIQUE DE L'AS 48

I. Origine, échantillonnage et caractérisation physico-chimique des échantillons de sols sélectionnés **49**
I.1. Prélèvements et échantillonnage 49
I.2. Caractérisation physico-chimique du sol 49
I.3. Analyse multi-élémentaire du sol et de sa pollution 49

II. Etude de la spéciation minéralogique de l'As par extraction chimique 50

III. Etude de la spéciation minéralogique de l'As par la microscopie électronique à balayage (MEB-EDS) 53
III.1. Procédure de préparation de l'échantillon pour l'analyse minéralogique 53
III.2. Inclusion de l'échantillon dans la résine 53
III.3. Microscopie électronique à balayage 54

CHAPITRE IV LA MOBILITE DE L'ARSENIC DANS LA SOLUTION RHIZOSPHERIQUE DE QUATRE ESPECES EN RELATION AVEC L'ACQUISITION DES ELEMENTS NUTRITIFS ET LE CARBONE ORGANIQUE DISSOUS 61

Abstract 62

Introduction 62

Materials and Methods 64
Soil material 64
Plant material and experimental design 64
Extraction and analysis of the soil solution 65
Soil analysis 65
Plant analysis 65
Statistical analysis 65

Results 66
Changes in rhizosphere solutions during plant growth 66
Relationships between Arsenic, mineral nutrients (Ca, Mg, NO_3^-, SO_4^{2-}, Fe), DOC concentrations and pH in rhizosphere and control solution 68
Influence of plants on As and P soil bioavailability 71
Plant As and P uptake 71

Discussion 72

Conclusion 74

References 75

CHAPITRE V L'EFFET DES EXSUDATS RACINAIRES ET DES CONDITIONS VARIEES EN PHOSPHORE SUR LA MOBILITE DE L'ARSENIC DANS LA RHIZOSPHERE DE *PLANTAGO LANCEOLATA* 79

Abstract 80

Introduction 80

Materials and methods 82
Soil material 82
Experimental design 82
Collection and analysis of root organic anions and phosphate 84
Plant and Soil analysis 84
Statistical analysis 84

Results 85
Arsenic mobilization, uptake and distribution of As and P in P. Lanceolata 85
Organic anions and phosphate in root exudates under different As and P soil conditions 85
Relationships between organic anions, phosphate, As in plants and As soil bioavailability 86
Arsenic bioavailability and uptake in the rhizosphere 88
Root exudates and As/ P tolerance strategy in P. Lanceolata 88
P. lanceolata a bioindicator plant species 89

Conclusion 89

CHAPITRE VI. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE 94

I. Les espèces végétales sélectionnées présentent-elles la même tolérance à l'As ? 95

II. Quelles sont les caractéristiques accumulatrices des espèces étudiées? 96

III. Les espèces végétales ont-elle un effet sur la mobilisation potentielle de l'As dans la rhizosphère ? 97
III.1. Etude de l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As par l'approche « rhizopot-rhizons » 97
III.2. Etude de l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As par l'approche « tapis racinaire » ou « root mat approach » 101

ANNEXES 104

ANNEXE I : Résultats des extractions séquentielles : suite du Chapitre IV 105

ANNEXE II. Extraction chimique de l'As par Rhizoextraction 106

ANNEXE III. Propriétés de l'As présentées sous forme de tableaux et de figures 107

ANNEXE IV. Rappels sur les différents mécanismes de fixation des oxyanions dans les sols 111

ANNEXE V. Tableaux et figures correspondant au chapitre de synthèse bibliographique « Mobilisation de l'As dans la rhizosphère » 115

ANNEXE VI : quelques données des expérimentations 117

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 125

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des Figures et Tableaux des chapitres I et III

Figure 1 : Diagramme simplifié de l'origine de l'As et ses mécanismes de mobilisation entre les différents compartiments environnementaux d'après Wang et Mulligan (2006) 9
Figure 2 : les processus géochimiques de transformation des espèces arséniées dans les sols d'après Yamauchi et Yamamura (1983) et Adriano et al. (2001)..... 11
Figure 3 : diagramme Eh-pH pour les espèces aqueuses d'As du système As-O_2-H_2O à 25°C et une pression totale de 1 bar d'après Smedley et Kinniburgh (2002). 11
Figure 4 : les principales formes minérales des oxy(hydroxydes) et oxydes de fer (III). (a) lépidocrocite (γFeOOH) ; (b) goethite (αFeOOH) ; (c) akaganeite (βFeOOH) ; (d) hématite (αFe_2O_3) d'après Manceau et Drits (1993) 14
Figure 5 : structure schématique des substances humiques d'après Chenu et Bruand (1997) 17
Figure 6 : représentation simplifiée des flux d'exsudation, de sorption, d'assimilation et de minéralisation des exsudats racinaires dans la solution du sol d'après Jones et al. (1998)..... 22
Figure 7 : L'assimilation relative et la bioaccumulation potentielle des différentes espèces végétales d'après d'après Baker, 1981) 25
Figure 8 : teneur moyenne en As (mg/Kg) dans les différentes fractions de sol. F1 : fraction non spécifiquement adsorbée, F2 : fraction spécifiquement non adsorbée, F3 : fraction liée aux oxydes et hydroxydes de Fe et d'Al amorphes, F4 : fraction liée aux oxydes et hydroxydes de Fe et d'Al cristallins, F5 : fraction liée à la matière organique, F6 : fraction résiduelle. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne (6 réplicats)..... 52
Figure 9 : teneur en As, S, Oxydes d'Al, de Fe, de Mn et de Ca (%) dans les deux fractions D<2.8 et D>2.8. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de chaque mesure (3 réplicats)..... 53
Figure 10 : MEB-BSE de la poudre de sol (100X) 54
Figure 11 MEB-BSE de la poudre de sol (300 X) 54
Figure 12: spectre EDS de la poudre de sol……...54
Figure 13 : cartographie de répartition de l'As, l'O, l'Al, le Si, le S, le K, le Ca, le Cr et le Fe dans la zone étudiée..... 55
Figure 14 : cartographie de répartition de l'As, l'O, l'Al, le Si, le S, le K, le Ca, le Cr et le Fe dans la sous-zone I..... 56
Figure 15 : spectre EDS obtenu par l'analyse ponctuelle (3 points) au niveau de la sous-zone I..... 57
Figure 16 : cartographie de répartition de l'As, l'O, l'Al, le Si, le S, le K, le Ca, le Cr et le Fe dans la sous-zone II 58
Figure 17 : spectre EDS obtenu par l'analyse ponctuelle (3 points) au niveau de la sous-zone II. 59

Tableau 1 : Principales sources anthropiques de l'As dans les sols d'après Prohaska et Stingeder (2005)..... 9
Tableau 2 : constantes de dissociation des acides phosphorique et arsénique d'après O'Neill et al. (1995). 18
Tableau 3 : composés organiques libérés par les racines en solution nutritive d'après Nguyen C. (2007)... 23
Tableau 4 : Les concentrations en As dans les feuilles, les racines et dans le substrat des plantes hyperaccumulatrices d'As et des plantes tolérantes à l'arsenic d'après Fitz et al. (2002) 26
Tableau 5 : Avantages et limites de la technique de phytoremédiation d'après Ghosh et Singh (2005)..... 29
Tableau 6 : propriétés du sol..... 49
Tableau 7 : la perte au feu (LOI) et la teneur en éléments majeurs (%) du sol de Salsigne..... 50
Tableau 8 : teneur en éléments mineurs (ppm) du sol de Salsigne..... 50
Tableau 9 : procédure d'extraction séquentielle de l'As d'après les travaux de Wenzel et al. (2001) et Tessier et al. (1979)..... 51
Tableau 10 : teneur moyenne de l'As dans les différentes fractions de sol et le taux d'extraction..... 52

Liste des Figures et Tableaux des chapitres II, IV et V

Fig. 1 : the effect of As concentration on plant roots inhibition of the four selected species (a) *H. lanatus*, (b) *P. lanceolata* (c) *L. corniculatus* and (d) *D. viscosa* 37
Fig. 2 : arsenic concentration in shoots (mg kg $^{-1}$ DW) of selected species as a function of As concentration in soil (mg kg^{-1}) 40
Fig. 3 : evolution of As (a), Fe (b), Ca (c), Mg (d), NO_3^- (e) and SO_4^{2-} (f) in control and rhizosphere solution of four plant species during a 90 days cultivation period on As contaminated soil (: Control; : *H. lanatus*; : *D. viscosa*; : *L. corniculatus*; +: *P. lanceolata*). Error bars show the standard error of the mean (n=4). Letter codes denote significant difference (Tukey test, $p< 0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different. 67
Fig. 4 : evolution of DOC (a) and pH (b) in control (c) and rhizosphere solution of four plant species during a 90 days cultivation period on As contaminated soil (: Control; : *H. lanatus*; : *D. viscosa*; : *L. corniculatus*; +: *P. lanceolata*). Error bars show the standard error of the mean (n=4). Letter codes denote significant difference (Tukey test, $p< 0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different. 68
Fig. 5 : first principal plan of principal component analysis performed for As, Fe, Ca, NO_3^-, pH, SO_4^{2-}, Mg and DOC concentrations of the 80 rhizosphere solution samples. Representation of cluster groups on the first plan (a) and relationship between As and measured parameters (b) for the two first principal components (1-Axis versus 2-Axis). Rhizosphere solution samples were identified by the code "XTy" where "X" means H: *H. lanatus* (red), D*: D. viscosa* (yellow), L: *L. corniculatus* (blue) or P: *P. lanceolata* (orange) and "Ty" means T1, T2, T3, T4 and T5). 69
Fig. 6 : As concentration (mg L^{-1}) as a function of (a) Fe concentration (mg l^{-1}) for all studied species (r=0.76*) (: Control; : *H. lanatus*; : *D. viscosa*; : *L. corniculatus*; +: *P. lanceolata*), (b) NO_3^- concentration (mg l^{-1}) for all selected species (r=-0.72*), (c) Mg concentration (mg l^{-1}) for *H. lanatus*, *D. viscosa and L. corniculatus* (r=-0.67*), (d) pH value for *D. viscosa and L.corniculatus* (r=0.65*) and (e) DOC concentration (mg l^{-1}) for *D. viscosa and L. corniculatus* (r=-0.6*). 70
Fig. 7 : the device used during the first step of the "root mat technique" 83
Fig. 8 : the device used during the second step of the "root mat technique" with root bags in contact with sol bags 84
Fig. 9 : the concentration of As readily bioavailable fraction (AsF1) in bulk soil and rhizosphere under the two different solution treatments 85
Fig. 10 : (a) PO_4^{3-} concentrations in root exudates solutions (mg g^{-1} DW) as a function of AsF1 concentration (mg kg^{-1}), (b) Root As concentration (mg kg^{-1} DW) as a function of AsF1 concentration (mg kg^{-1}),(c) Shoot As concentration (mg kg^{-1} DW) as a function of AsF1 concentration (mg kg^{-1}). Data were from two treatment solutions ("+P"; "-P") with three replicates. 87

Table 1 : selected properties of the soil used in the study 35
Table 2 : arsenic (As) seedling toxicity. Table of REGTOX calculation and statistical analysis (EC unit is µM) 37
Table 3 : the mean As concentration in roots and shoots. The BC and TF of As for selected species growing on As contaminated soil (65, 94, 120, 130, 156 and 180 mg kg^{-1}) 39
Table 4 : kendall' tau coefficients (τ) between the quantity of As (µg) and the quantity of Al, Ca, Fe, Mn and P (µg) in the shoots of all selected species and in the roots of *D. viscosa* and *L. corniculatus* (* indicates significant correlation coefficient at $p<0.05$) 41
Table 5 : selected properties of the soil used in this study 64
Table 6 : kendall's tau (τ) correlation coefficients between As and the other measured parameters (pH, DOC, Fe, Ca, Mg, NO_3^- and SO_4^{2-}) in control and rhizosphere solutions 69
Table 7 : kendall's tau (τ) correlation coefficients between pH and Ca, Mg, NO_3^- and SO_4^{2-} ions in control and rhizosphere solutions of all selected species 69
Table 8 : non specifically bound As fraction concentrations (mg kg^{-1}) and readily bioavailable P pool in the control and rhizosphere soil after 90 days of culture. Data are expressed as mean values ± SE (n=4). Letter codes denotes significant difference (Tukey test, $p<0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different 71

Table 9 : plant shoots biomass (dry weight) and As and P accumulation in the shoots of each species after 90 days of growth. Data are expressed as mean values ±SE of four replicates. Letter codes denote significant difference (Tukey test, $p<0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different 71
Table 10 : selected properties of the soil used in this study 82
Table 11 : arsenic concentrations, translocation factors (TF) and the Molar ratio of P to As for *P. lanceolata* exposed to different P soil conditions. Data are expressed as mean values ± SE of three replicates. 85
Table 12 : concentrations of citrate, malate and phosphate in root exudates of *P. lanceolata* from two treatments expressed on a root dry weight (DW) basis. Data are expressed as mean values ±SE of three replicates..... 86

INTRODUCTION

En raison de sa forte toxicité, l'arsenic (As) est au centre des préoccupations environnementales de ces dernières années. La présence de ce métalloïde dans les sols et les nappes phréatiques peut être d'origine naturelle, principalement liée aux minéralisations métalliques, aux roches volcaniques et à leur altération. La part de pollution d'origine anthropique est surtout liée aux activités d'extraction et de traitement des minerais, à la combustion du charbon, à l'utilisation croissante de produits phytosanitaires dans l'agriculture (Adriano, 2001) ou encore à différentes industries telles que les unités de traitement de bois (Bhattacharya et al., 2007). Ces pollutions vont générer des teneurs en As souvent bien supérieures à la valeur guide internationale pour l'eau potable fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé à 10 μg/L (http://www.who.int/fr/). Ces teneurs peuvent atteindre des niveaux de l'ordre du mg/L notamment dans les zones d'activités minières avec des concentrations dans les eaux de drainage comprises dans l'intervalle < 0,5-5000 μg/L (Smedley et Kinniburgh, 2002).
Les opérations minières sur le site de la Combe du Saut (site minéralurgique de Salsigne, Aude, Sud de la France) sont les principales sources de contamination des sols alluviaux par l'As, le long de la rivière Orbiel. Cette dernière, présente une concentration en As comprise entre 110 et 150 mg kg^{-1}. Les sols avoisinants quand à eux ont une teneur en As autour de 300 mg kg^{-1} (Dondon et al., 2005). Des cas de cancer du système respiratoire et digestif ont été observés dans cette région. Ces maladies fatales sont liées principalement à la contamination de l'environnement (Dondon et al., 2005).

C'est pourquoi, il y a une attention grandissante de la part des services publics et sanitaires sur les mécanismes de transfert de l'As vers les eaux superficielles, souterraines et la chaîne alimentaire. Aussi, la gestion de telles pollutions passe par la recherche des techniques de décontamination adaptées.

A l'heure actuelle, les techniques de traitement traditionnelles ont un coût environnemental et financier prohibitif. La dernière décennie a vu l'émergence de nouvelles techniques de traitement basées sur l'utilisation de plantes, qui commencent à se développer et sont même déjà utilisées à grande échelle aux États-Unis (Van Der Lelie et al., 2001) ; ces techniques se regroupent sous le terme de « phytoremédiation » (phytoextraction et phytostabilisation notamment). La découverte récente des fougères hyperaccumulatrices d'As *Pteris vittata* et *Pityrogramma calomelanos* constitue une étape importante vers le développement de la phytoremédiation des sols pollués par l'As (Francesconi et al., 2002). L'efficacité de la phytoextraction repose sur le double caractère « tolérance » et « accumulation» de quelques espèces dites « phytoaccumulatrices » (Cunningham et al., 1995). Alors que celle de la phytostabilisation réside dans la capacité d'autres espèces à réduire le transfert horizontal (transfert dans le sol) et vertical (transfert de l'élément toxique vers les parties aériennes) du polluant (Cunningham et al., 1995). Cette propriété permet donc de diminuer le risque de contamination de la chaîne alimentaire (Porter et Peterson, 1975; Fitz et Wenzel, 2002 ; Mench et al., 2003). Aujourd'hui, l'enjeu est de proposer de nouvelles candidates à la phytoremédiation des sites pollués par l'As. D'où la nécessité de conduire des études approfondies sur la caractérisation de la tolérance à l'As des espèces végétales différentes de celles déjà étudiées et sur les processus de phytoaccumulation de ce dernier.

En France, la réhabilitation du site de La Combe du Saut par la technique de phytostabilisation a été élaborée dans le cadre de deux programmes européens « Difpolmine » (2000-2006) et

« Phytoperf » (2007-2009). Ces programmes supervisés par l'Ademe et ses partenaires (Ecole des Mines de St-Etienne, ICF-IRH, Université Jean Monnet…) visent à tester l'efficacité de cette approche à l'échelle industrielle. De plus, cette stratégie d'étude sur site pollué a été enrichie par un travail de recherche au laboratoire *Sciences des Processus Industriels et Naturels* de l'Ecole Nationale supérieure des Mines de Saint-Etienne (SPIN-EMSE). Le but est de mieux appréhender les aspects « interactions rhizosphériques » dans le système sol-rhizosphère-plante qui affectent la mobilité de l'As.

La rhizosphère est un lieu d'interactions et d'échanges dynamiques entre le milieu aqueux, la matrice organo-minéral et la biosphère. Chacun de ces compartiments est à lui seul un objet complexe, et est donc étudié le plus souvent de façon séparé par des approches généralement disciplinaires (chimie des solutions, minéralogie, biogéochimie, anatomie, physiologie et écotoxicologie végétale...). Les interactions rhizosphériques jouent un rôle important dans les mécanismes de mobilisation de l'As dans le sol (Adriano, 2001, Fitz et Wenzel, 2002, Silva Gonzaga et al., 2006). De plus, l'étude de la mobilité de l'As en relation avec l'acquisition des éléments nutritifs principalement nitrogène (nitrates et ammoniaque), calcium (Ca), magnésium (Mg) et le phosphore (P) par les plantes et la matière organique dissoute dans l'eau du sol n'a pas été suffisamment explorée. Le P et l'As sont chimiquement similaires et présentent les mêmes affinités d'adsorption sur les (oxy) hydroxydes de Fe (Sadiq, 1995 ; Adriano, 2001). Une acidification à l'interface sol-racine peut entraîner une co-dissolution dans des conditions réductrices des (oxy) hydroxydes de Fe par réduction et/ou par chélation avec des anions organiques (citrate ou malate) (Fitz et al., 2002). Une bonne compréhension de la dynamique de l'As à l'interface sol-racines permet d'améliorer et accélérer l'application des techniques de phytoremédiation.

L'objectif général de ce travail de recherche est d'étudier l'effet du végétal sur la mobilité de l'As dans la rhizosphère. Le sol sélectionné pour cette étude provient du site de La Combe du Saut et le projet de recherche s'articule autour de trois volets :

1) caractériser la tolérance à l'As de quatre espèces végétales appartenant à des familles végétales différentes : *Holcus lanatus (Poaceae)*, *Dittrichia viscosa (Asteraceae)*, *Lotus corniculatus* (*Fabaceae*) et *Plantago lanceolata (Plantagenaceae)*. Ces espèces, à l'exception de *H. lanatus*, ont été sélectionnées en raison de leur présence naturelle sur le site de la Combe du saut (Aude, France). *H. lanatus*, quand à elle, a été choisie pour sa tolérance à l'As (Meharg and Macnair, 1992a, b; Quaghebeur and Rengel, 2003; Raab et al., 2004).

2) identifier leur comportement biologique à l'égard de l'As dans un sol atificiellemnt contaminé par l'As. Ce sol présente des caractéristiques physico-chimiques similaires au sol de la Combe du Saut (roche mère carbonatée du Primaire).

3) mieux comprendre l'effet de ces espèces sur la mobilité potentielle de l'As dans la rhizosphère en relation avec la nutrition minérale et la matière organique dissoute et,

4) étudier les variations dans la composition de la solution rhizosphérique tout au long de la période de croissance végétative. Le sol utilisé est celui du site de la Combe du Saut et se caractérise par une pollution anthropique en As de 1900 $mg.kg^{-1}$.

5) explorer les interactions entre l'As et le Phosphore (P) dans la rhizosphère en lien avec les exsudats racinaires.

Dans la première partie du manuscrit, nous proposons une analyse bibliographique, visant à établir un bilan des connaissances actuelles sur le devenir de l'As dans le système sol-rhizosphère-plante et sur les principaux facteurs modulant sa biodisponibilité. Ce bilan permettra de dégager les principales hypothèses et d'étayer les objectifs de la thèse. Nous présentons ensuite les travaux (dispositifs, méthodes et matériels utilisés) ainsi que les principaux résultats discutés. Ces derniers sont rédigés en version article scientifique. Une discussion et conclusion générale synthétisant le travail et ses perspectives sont proposées en fin de document.

CHAPITRE I. LA MOBILISATION DE L'ARSENIC DANS LE SYSTEME SOL-RHIZOSPHERE-PLANTE

I. L'arsenic dans les sols

I.1. Généralités

Protéiforme et remarquablement ubiquitaire, l'arsenic (As) (en latin *arsenicum*), tirerait son nom du mot grec « ρσηυ », qui signifie « mâle » et « υτχάυ », tuer, vaincre (Dolique, 1968). Cette étymologie se rattacherait alors à d'anciennes d'idées philosophiques faisant état de l'antagonisme des sexes jusque dans le monde minéral : l'As principe actif « mâle » dans le langage des alchimistes, aurait été, par exemple, susceptible de s'unir au cuivre (Cu), principe femelle dédié à Vénus, pour donner un alliage blanc comparable à l'argent (Ag) (Dolique, 1968). Geber (Jabir ibn-Haiyan), un alchimiste arabe du huitième siècle, a découvert l'As blanc « l'oxyde d'arsenic (As_2O_3) », en chauffant l'orpiment (As_2S_3) (Nriagu, 2002). Aussi, l'isolation de l'As métallique a été attribuée selon certaines références à Albertus Magnus (1193-1280), un dominicain allemand, qui a chauffé l'orpiment (As_2S_3) avec du savon (Greenwood et Earnshaw, 1990). Au moyen âge, l'As est devenu pratiquement le roi des poisons. Après sa découverte par Geber, l'As, sous forme As_2O_3, était le poison homicide idéal de l'époque. Il est inodore, sans saveur, pas cher et fatale à des faibles doses. Les symptômes d'empoisonnement chronique et aigu ressemblent à ceux des maladies naturelles, obscurcissant ainsi les causes réelles de la mort. Dans *Pharmacologia,* publiée en 1812, John Paris un physicien anglais, a décrit plusieurs cas de cancer chez les ouvriers travaillant dans les fonderies de Cu. Il a attribué l'origine de ces maladies cancéreuses à l'As. Son rapport a attiré l'attention sur l'effet de l'As présent dans les gisements de minerai, sur la santé humaine et sur l'environnement (Nriagu, 2002).

Aujourd'hui, en raison de sa forte toxicité, l'As est au cœur des préoccupations environnementales (Wang et Mulligan, 2006). Plusieurs dizaines de milliers de personnes au Vietnam et au Bangladesh ont été intoxiquées en consommant de l'eau présentant un fort taux d'As (Hudsen-Edwards et al., 2004). L'As est largement présent dans les roches, les sols, les eaux naturelles et à l'état de trace dans toute matière vivante. Sa présence dans l'environnement est d'origine naturelle (volcanisme, altération de la roche mère) et anthropique. Les activités humaines constituent la majorité des apports d'As à l'environnement. Il a été utilisé dans l'industrie et l'agriculture, principalement comme produit phytosanitaire, pour le traitement du bois et dans la verrerie (Laperche et al., 2003).

I.2. Production et utilisation

La production mondiale de l'As est estimée à 75 000 tonnes par an, les Etats- unis en utilisent la moitié (Adriano, 2001). Les principaux pays producteurs sont la Suède (10 000 t/an), la France (10 000 t/an) la Russie (8 000 t/an) et le Chili (7 000 t/an) (Greenwood et Earnshaw, 1990). L'As a de très nombreuses applications industrielles : (i) pour traiter le bois, l'As entre dans la composition du CCA *Chromated Copper Arsenate*, un complexe formé par l'As, le Chrome (Cr) et le Cu, (ii) pour améliorer la résistance des batteries électriques à la corrosion, l'As est

mélangé au Pb et à l'antimoine (Sb) et aussi pour augmenter la dureté des alliages du Pb et Cu (iii) il est aussi utilisé comme semi-conducteur par exemple l'arséniure de gallium (AsGa) et

comme agent de décoloration dans l'industrie du verre (Greenwood et Earnshaw, 1990 ; Cornu et Gillet, 2006).

I.3. Les sources de l'As dans l'environnement

I.3.a. Les sources naturelles

L'As est un élément présent dans l'environnement, en particulier dans les roches qui renferment plus de 99 % de l'As. Les roches sédimentaires contiennent des teneurs en As plus élevées que les roches ignées. En générale, la teneur moyenne de l'As dans les roches ignées varie de 1,5 à 3,0 mg / kg alors que celle des roches sédimentaires est comprise entre 0,3 et 500 mg / kg. L'As est présent dans plus de 245 minéraux : les arséniates (60 %), les sulfures et sulfosels (20%), les arsénites, les oxydes et l'As à l'état pur (Prohaska et Stingeder, 2005). Dans les sols non contaminés, la concentration moyenne d'As excède rarement 10 mg / kg (Adriano, 2001). En France, grâce aux travaux de prospections minières (en raison de son association avec une large variété des minéraux et de son indication de l'or (Au) et l'argent (Ag) en particulier, de très nombreuses données sur l'abondance de l'As dans les sols sont disponibles, indiquant des concentrations comprises entre 2 mg/kg (fond géochimique) et plus de 1000 mg / kg (anomalies géochimiques : en particulier dans les roches sous-jacentes des zones à sulfures ou sulfo-arséniures (arsénopyrite) (Laperche et al., 2003 ; Prohaska et Stingeder, 2005). L'érosion des roches, le lessivage des sols, les réactions d'oxydoréduction et les précipitations entraînent une redistribution de l'As vers les compartiments aquatiques et atmosphériques. D'autres sources naturelles d'émission de l'As dans l'atmosphère sont l'activité volcanique et les feux de forêt (voir annexe III pour plus de détails sur les concentrations de l'As dans les compartiements environnementaux).

I.3.b. Les sources anthropiques

Les activités humaines qui ont contribué aux apports d'As dans les sols et l'environnement sont issues des industries du secteur primaire et du secteur secondaire. L'As est présent naturellement dans de nombreux gisements de Pb, d'Ag, de cobalt (Co), de zinc (Zn), de Cu et d'Au et peut être libéré lors des processus de grillage et de raffinage des minerais. L'As est ainsi principalement extrait en tant que sous-produit de nombreuses exploitations minières et métallurgiques (mines d'or, fonderies de cuivre,…) (Wang et Mulligan, 2006). On le retrouve également en tant que résidu dans les rejets atmosphériques (fonderies, centrales thermiques) et dans de nombreux déchets miniers (Wang et Mulligan, 2006).

D'autre part, l'As a été utilisé comme matière première dans de nombreuses industries (pesticides, traitement du bois, pharmaceutiques,…). Dans les années 1990, 70 % de l'As est utilisé dans le traitement du bois, 22 % en agriculture (Prohaska et Stingeder, 2005). L'utilisation accrue du CCA dans le traitement du bois est à l'origine des concentrations très importantes dans les sols (Bhattacharya et al., 2007). Récemment, la commission européenne a décidé de restreindre

l'utilisation des CCA et de limiter la mise sur le marché et l'emploi de l'As (directive 2003/2/CE, 2003/3/CE, et 2003/11/CE). Le tableau 1 montre les principales sources anthropiques de l'As dans les sols. Un diagramme simplifié du cycle de vie de l'As est présenté dans la figure 1. Ce dernier présente les principales sources, géochimiques et anthropiques de l'As ainsi que ses voies de transformation dans l'environnement. La migration de l'As entre les différents compartiements environnementaux (sols, sédiments, eaux, atmosphère et biote) s'effectue à travers la combinaison des processus géochimiques très complexes (sorption-désorption, précipitation-dissolution, oxydation-réduction (liés à la présence des microorganismes)).

Tableau 1 : Principales sources anthropiques de l'As dans les sols d'après Prohaska et Stingeder (2005)

Source	Contribution (%)
Déchet commercial	40
Cendre du charbon	22
Dépôt atmosphérique des usines de sidérurgie	13
Autres activités minières	16
Autres sources (déchets agricoles, alimentaires…)	5

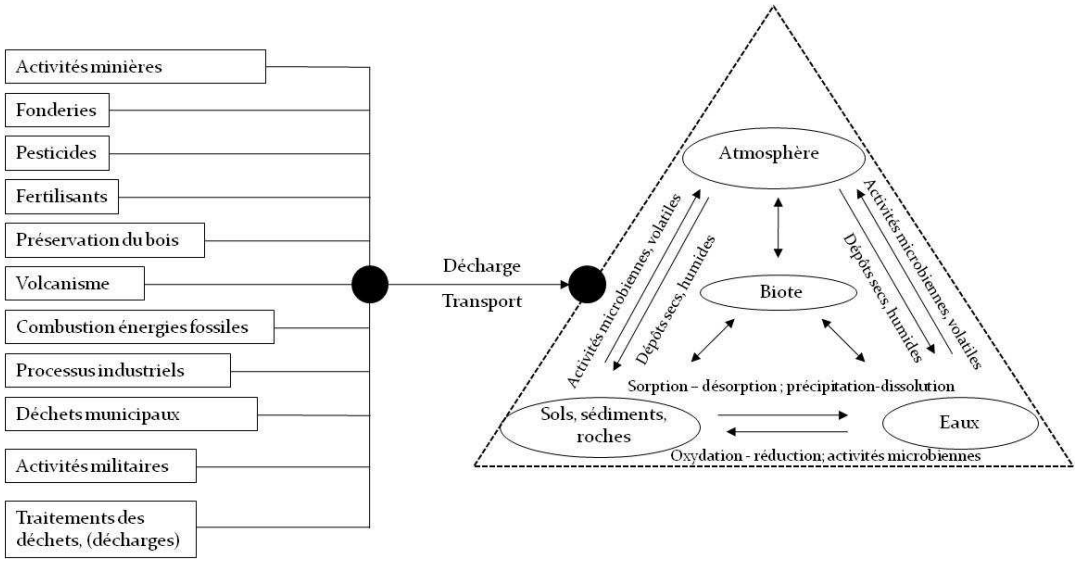


Figure 1 : Diagramme simplifié de l'origine de l'As et ses mécanismes de mobilisation entre les différents compartiments environnementaux d'après Wang et Mulligan (2006)

I.4. La mobilité de l'As dans les sols

I.4.a. Spéciation de l'As

L'As est présent dans l'environnement sous une grande variété d'espèces inorganiques et organiques: l'arséniate As (V), l'arsénite As (III), l'acide monométhylarsonique (MMAA), le diméthylarsine (DMA) et le triméthylarsine (TMA), l'arsénocholine (AsC), l'arsénobétaine (AsB) et les sucres arséniés (Francesconi et Kuehnelt, 2002, Wilson et al., 2010). Ces espèces sont caractérisées par des propriétés physico-chimiques très variées affectant ainsi la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité de l'As (Quaguebeur, 2005). La plupart des investigations sur l'As se sont focalisées sur l'As inorganique, correspondant aux arsénites As (III) ou aux arséniates As (V), du fait que l'As organique est rarement détectable dans les sols (Huang, 2007). En général, les formes inorganiques de l'As sont plus toxiques que les formes organiques. D'autre part, les As (III) sont plus toxiques, plus solubles et plus mobiles que les As(V) du fait de l'adsorption préférentielle des As(V) sur les minéraux du sol (Quaguebeur et Rengel, 2005 ; Fu et al., 2011) (pour plus de détails sur la toxicité des espèces arséniées voir Annexe III).

Les formes organiques de l'As sont issues de la biotransformation de l'As inorganique très toxique en As organique moins toxique (Prohaska et Stingeder, 2005 ; Hartley et al., 2010). Il s'agit des réactions de méthylation qui dépendent à la fois des espèces arséniées, des microorganismes et des conditions physico-chimiques du milieu. La méthylation de l'As induite par certaines levures en conditions aérobiques et par des bactéries méthanogéniques en conditions anaérobiques, entraîne la libération de l'As volatile du sol vers l'atmosphère (Kabata-pendias et Pendias, 2001). La présence de ces composés méthylés dans les sols peut également être lié à un apport anthropique principalement agricole (pesticides, fertilisants, engrais,…) (Laperche et al., 2003). La figure 2 montre d'une façon simplifiée les voies de transformation de l'As dans la rhizosphère. Ces dernières incluent les différents processus géochimiques suivants : oxydation/ réduction (et méthylation), adsorption/désorption et précipitation/dissolution (Fig.2). En effet, les formes inorganiques d'As (arséniate et arsénite) peuvent d'une part s'adsorber sur les oxydes et hydroxydes de Fe ou d'autre part, se précipiter en conditions réductrices avec des ions sulfureux. Les réactions de méthylation de l'As sont aussi présentées dans cette figure avec la formation des composés organiques d'As : MMA : acide monométhyle arsonique, DMA : acide diméthyle arsinique, TMA : triméthyle arsine (voir Annexe III pour plus de détails sur les espèces d'As rencontrées dans l'environnement).

I.4.b. Les espèces inorganique d'As : As (III) et As (V) dans les sols

L'As existe principalement sous quatre états d'oxydation : -III, 0, III et V (O'Neill, 1995). Un diagramme Eh-pH est élaboré afin de définir des zones de stabilité des espèces oxydés et réduites (Fig.3). Les espèces les plus stables thermodynamiquement dans un sol ayant un pH compris entre 2 et 9 sont les suivantes: $H_2AsO_4^-$ (pH 2 à 7) et $HAsO_4^{2-}$ (pH > 7) qui correspondent à l'espèce As (V) et H_3AsO_3 (pH < 9) qui représente l'espèce trivalente As (III) (O'Neill, 1995 ; Sadiq, 1997).

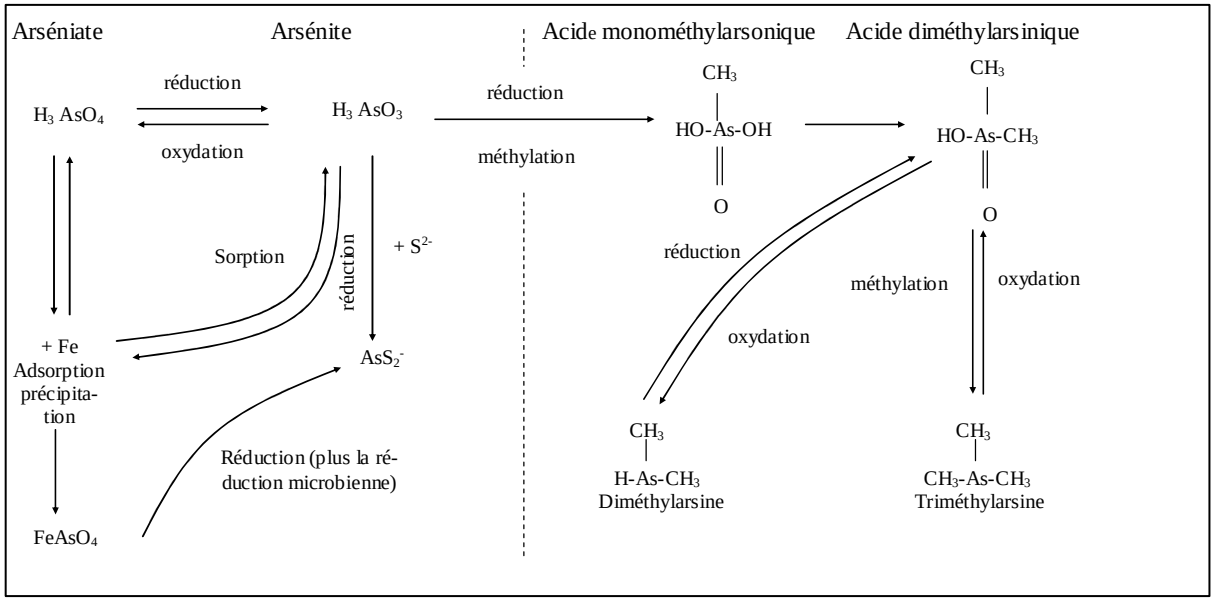


Figure 2 : les processus géochimiques de transformation des espèces arséniées dans les sols d'après Yamauchi et Yamamura (1983) et Adriano et al. (2001).

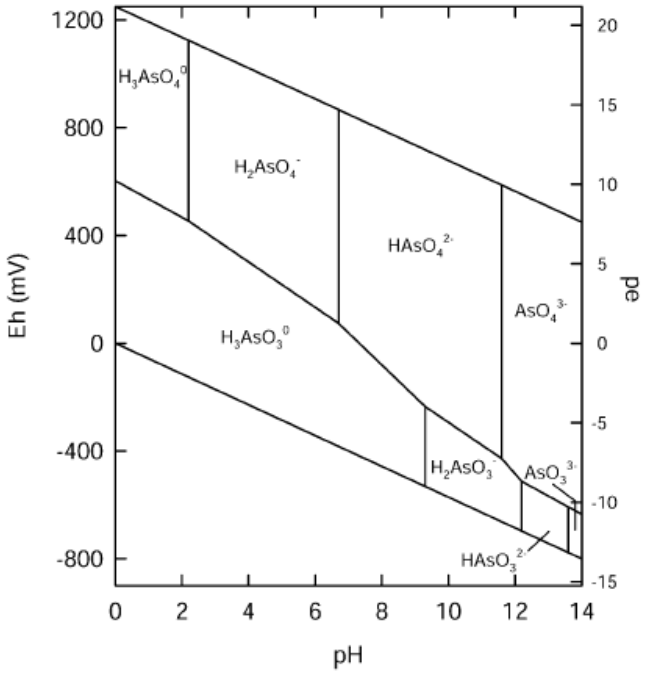


Figure 3 : diagramme Eh-pH pour les espèces aqueuses d'As du système As-O_2-H_2O à 25°C et une pression totale de 1 bar d'après Smedley et Kinniburgh (2002).

Les équilibres en solutions aqueuses de l'acide arsénique As (V) et de l'acide arsénieux As (III) sont donnés dans les équations d'équilibre suivantes (O'Neill, 1995) :

Acide arsénique :

$$H_3AsO_4 + H_2O \leftrightarrow H_2AsO_4^- + H_3O^+ \qquad pK_a = 2,20$$

$$H_2AsO_4^- + H_2O \leftrightarrow HAsO_4^{2-} + H_3O^+ \qquad pK_a = 6,97$$

$$HAsO_4^{2-} + H_2O \leftrightarrow AsO_4^{3-} + H_3O^+ \qquad pK_a = 11,5$$

Acide arsénieux :

$$H_3AsO_3 + H_2O \leftrightarrow H_2AsO_3^- + H_3O^+ \qquad pK_a = 9,22$$

$$H_2AsO_3^- + H_2O \leftrightarrow HAsO_3^{2-} + H_3O^+ \qquad pK_a = 12,13$$

$$HAsO_3^{2-} + H_2O \leftrightarrow AsO_3^{3-} + H_3O^+ \qquad pK_a = 13,40$$

I.4.c. L'influence du Eh et pH sur la solubilité des espèces d'As

La solubilité de As (V) augmente avec l'augmentation du pH sur un intervalle de pH compris entre 3 et 8 (pH habituellement rencontrés dans les sols) par contre As (III) suit la tendance inverse (Manning et Goldberg, 1997 ; Smith et Huyck, 1999 ; Yamaguchi et al., 2011). Les calculs thermodynamiques estiment que l'espèce $H_2AsO_4^-$ domine pour des pH inférieurs à 6,97 alors que $HAsO_4^{2-}$ est majoritaire pour des pH supérieurs à 6,97 (Sadiq, 1997). L'augmentation du pH peut entraîner une augmentation de la charge négative à la surface des sites d'adsorption d'As. Ce processus peut induire donc une désorption de l'As (V) par répulsion électrostatique particulièrement pour des pH supérieurs à 7 (Fitz et Wenzel, 2001).

De plus, la concentration en oxydes dans le sol affecte considérablement l'effet du pH sur la solubilité de l'As. Smith et Huyck (1999) ont démontré que pour des sols ayant des teneurs faibles en oxydes, le pH a un effet faible sur la quantité d'As (V) adsorbée par contre en présence des quantités importantes d'oxydes, l'augmentation du pH entraîne une réduction importante d'As (V) adsorbée.

Concernant la solubilité d'As trivalent As(III), cette espèce est principalement non chargée pour des valeurs de pH inférieures à 9.2 (Fig.3). Ceci contribue généralement à une solubilité plus large d'As (III) dans les sols contrairement à l'As (V) (Sadiq, 1997).

Par ailleurs, le potentiel redox (Eh) influence significativement la solubilité et la spéciation de l'As dans les sols (Masschelyn et al., 1991 ; Stroud et al., 2011). En général, l'As inorganique est principalement présent sous forme d'As (V) en conditions aérobiques (potentiel redox élevé) et sous forme d'As (III) dans des sols inondés (potentiel redox faible). En effet, sous des conditions oxydées, la concentration en As totale dans l'eau du sol est trois fois supérieure à pH 8 qu'à pH 5 de fait de la diminution de la charge positive à la surface des sites d'adsorption pour un pH élevé (Sadiq, 1997). Par contre, sous des conditions réductrices, l'As (III) devient la principale espèce

soluble dans la solution avec une concentration en As totale soluble plus faible à pH 8 (Masschelyn et al., 1991).

I.4.d. Les fractions d'As dans le sol

La procédure de fractionnement opérationnelle de Chang et Jackson (1957) développée pour le phosphore (P) est souvent utilisée pour l'As en raison de la similarité chimique entre ces deux éléments (Fitz et Wenzel, 2001 ; Lu et al., 2010 ; Fu et al., 2011). Plusieurs fractions d'As ont été identifiées : la fraction soluble d'As (solubilisable dans le NH_4Cl), la fraction liée à l'Al (solubilisable dans le NH_4F), la fraction liée au Fe (solubilisable dans le NaOH) et la fraction liée au Ca (solubilisable dans le H_2SO_4). A l'issu de cette étude, les (oxy) hydroxydes de Fe se présentent comme les sites d'adsorption les plus importants de l'As dans les sols. Plus récemment, Wenzel et al. (2001) définissent quand à eux, 5 fractions d'As dans les sols : la fraction non spécifiquement adsorbée, la fraction spécifiquement adsorbée, la fraction liée aux (oxy) hydroxydes de Fe et d'Al amorphes, la fraction liée aux (oxy) hydroxydes de Fe et d'Al cristallins et la fraction résiduelle. Il montre aussi que les (oxy) hydroxydes de Fe sont bien les principaux sites d'adsorption de l'As dans les sols.

Par ailleurs, Thanabalasingam et Pickering (1986) ont démontré que l'As peut s'adsorber également sur la matière organique du sol notamment sur les acides humiques. Par contre, d'autres études ont révélé une augmentation de la solubilité d'As dans les sols forestiers riches en matières organiques. Ce phénomène est lié à la compétition anionique pour les sites d'adsorption entre les composés organiques chargés négativement d'une part et les oxyanions d'As d'autre part (Fitz et Wenzel, 2002 ; Hartley et al., 2010).

Les procédures d'extraction séquentielle d'As permettent de définir les principales formes d'As présentes dans les sols. Leurs applications dans des études rhizosphériques permettent de fournir des informations utiles sur la répartition de l'As entre les différentes fractions et d'estimer la fraction d'As facilement échangeable et donc biodisponible pour les plantes.

I.5. Principaux mécanismes de fixation de l'As dans les sols

La mobilité et le transport de l'As dans l'environnement dépendent principalement des interactions entre les espèces d'As et les phases solides du sol et des sédiments. Les équilibres géochimiques mettent en jeu de nombreux processus (précipitation/dissolution, adsorption/ désorption, volatilisation et des réactions acido-basiques, oxydo-réductrices et microbiologiques) qui conditionnent la mobilité potentielle de l'As dans les sols (Wang et Mulligan, 2006).

I.5.a. Adsorption sur les (oxy) hydroxydes de Fer (OHF) et d'Al (OHA)

Les OHF sont constitués d'unités octaédriques élémentaires Fe $(O, OH)_6$ dans lesquelles le Fe (II ou III) peut être remplacé par d'autres cations tels que l'Al (III) (Schwertmann et Carlson, 1994). Les différences majeures entre ces (oxy) hydroxydes résident dans le mode d'assemblage des unités octaédriques (Fig. 4) et dans le degré d'oxydation du Fe. Dans les sols, la goethite (_ FeOOH), l'hématite (αFe_2O_3) et la ferrihydrite ($Fe_5HO_8 \bullet 4H_2O$) sont les OHF les plus couramment rencontrés.

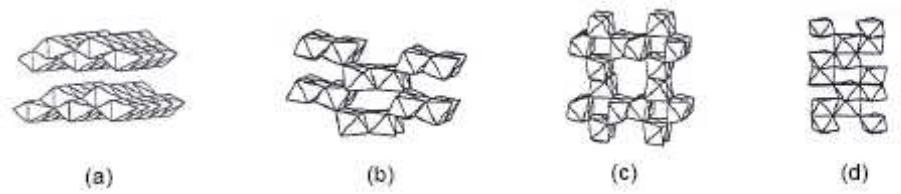


Figure 4 : les principales formes minérales des oxy(hydroxydes) et oxydes de fer (III). (a) lépidocrocite (γFeOOH) ; (b) goethite (αFeOOH) ; (c) akaganeite (βFeOOH) ; (d) hématite (αFe_2O_3) d'après Manceau et Drits (1993)

L'adsorption de l'As sur les oxydes et les hydroxydes métalliques est décrite par des phénomènes de complexation de surface. Dans ce type de réaction, l'As va se fixer à la surface du minéral sur les groupements hydroxyles (Pérez-Lopez et al., 2010). Schématiquement, les anions arséniés comme AsO_4^{3-}, $HAsO_4^{2-}$…peuvent interagir avec les groupements >M-OH de surface, où M peut être l'Al et le Fe dans les oxydes et hydroxydes selon les réactions suivantes (Clozel et al, 2002) :

$$> M - OH + H_2O \Leftrightarrow < M - OH_2^+ + OH^-$$

$$> M - OH_2^+ + H_2AsO_4^- \Leftrightarrow < M - OH_2^+ + ...H_2AsO_4^-$$

ou

$$> M - OH + H_2AsO_4^- \Leftrightarrow M - HAsO_4^- + H_2O$$

Cette adsorption de l'As sur ces phases minérales est difficile à décrire chimiquement du fait de la difficulté à discriminer les phénomènes réactionnels présents, la fixation de l'As étant la résultante à la fois d'une adsorption non spécifique (formation de complexe de sphère externe) mais surtout d'une adsorption spécifique (formation de complexe de sphère interne) (Sadiq, 1997).

La fixation de l'As est principalement liée à la surface spécifique et à la cristallinité des oxydes et des hydroxydes (Bissen et Frimmel, 2003 ; Pérez-Lopez et al., 2010 ; Yamaguchi et al., 2011). Les oxydes de Fe amorphes montrent en effet un pourcentage nettement plus fort de fixation de l'As que les oxydes de Fe cristallisés, en accord avec des surfaces spécifiques plus élevées (Bowell, 1994 ; Yamaguchi et al., 2011). Cette adsorption de l'As par les oxydes de Fe amorphes est liée à leur forme très hydratée qui permet aux autres ions hydratés de diffuser librement à travers la structure sans être limités aux sites de surface externe, comme c'est le cas des solides cristallins (Bhumba et Keefer, 1994).

L'adsorption de l'As sur ces surfaces est également particulièrement dépendante du pH et de la spéciation de l'As dans la solution du sol (Yamaguchi et al., 2011). Les travaux du Pierce et Moore (1982) ont ainsi montré que le maximum d'adsorption d'As (III) sur des hydroxydes de Fe amorphes est situé pour des valeurs du pH comprises entre 5 et 8. Elle diminue pour des pH plus faibles. Le maximum d'adsorption de As (V) est atteint pour des valeurs de pH aux environs de 4 et 5 et diminue ensuite pour des pH plus alcalins (Manning et Goldberg, 1997 ; Smith et Huyck,

1999). De plus, la quantité en As (III) adsorbée sur les hydroxydes de fer amorphes est moindre comparée à celle de As (V) pour une large gamme de pH.

D'autre part, l'As peut être libéré par la dissolution des OHF en conditions réductrices (Yamaguchi et al., 2011). En effet, des corrélations significatives entre le Fe et l'As ont été obtenues dans certaines études (Masschelyn et al., 1991).

Concernant l'adsorption de l'As sur les OHA amorphes, Manning et Golberg (1997), ont montré que le maximum d'adsorption de As (III) est situé pour des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 9 alors que celui de As (V) est compris entre des pH de 7,5 et 9,5. Ce décalage de pH des maxima d'adsorption par rapport aux OHF amorphe s'explique par le point de charge nulle des hydroxydes d'Al amorphes (pcn=9,5) supérieur à celui des hydroxydes de Fe (pcn = 8,5, pour la ferrihydrite par exemple).

I.5.b. Adsorption sur les (oxy) hydroxydes de manganèse (Mn) (OHM)

Les OHM sont composés d'unités octaédriques Mn (O, OH) $_6$. Selon l'agencement des octaèdres (O), deux grandes familles peuvent être identifiées (Post, 1999) :

- Les phyllomanganates : l'association des octaèdres essentiellement par partage d'arrêtes génère une structure en feuillets maintenus entre eux par la présence de cations ou par des liaisons hydrogène.

- Les tectomanganates : ils sont constitués de chaînes d'octaèdres associés par les sommets formant des structures en tunnels.

A l'intérieur des unités octaédriques, le Mn peut se réduire ou s'oxyder (Alloway, 1995). La présence d'ions Mn^{3+} et Mn^{2+} dans la structure cristalline des (oxy) hydroxydes à majorité de Mn^{4+} induit des défauts cristallins (fautes d'empilement pour les phyllomanganates) et des déficits de charges compensés par l'adsorption d'une grande variété de cations. Lorsqu'un nombre suffisant d'atomes a changé d'état de valence, la structure devient instable et un réarrangement se produit. La multiplicité des états de valence possibles pour le Mn, rend l'identification des structures difficile (Alloway, 1995).

L'As peut également être fixé par les OHM mais selon des mécanismes plus complexes que ceux décrits précédemment (Gupta et al., 2010).

L'adsorption de l'As serait liée à des processus d'oxydation de l'As et de réduction du Mn, comme cela a été montré en présence du dioxyde de Mn (la birnessite, δ-MnO_2) selon les équations suivantes (Adriano, 2001):

$$MnO_2 + HAsO_2 + 2H^+ \rightarrow Mn^{2+} + H_3AsO_4;$$

$$2Fe^{3+} + HAsO_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2Fe^{2+} + H_3AsO_4 + 2H^+$$

Du fait d'un pcn relativement faible des hydroxydes de manganèse (pcn = 2,2), la surface souvent chargée négativement de ces hydroxydes rend difficile l'adsorption de As (III) et As (V) (présents sous forme d'oxyanions aux pH habituellement rencontrés). Une barrière d'énergie élevée devra être franchie pour permettre ce phénomène. Leur capacité d'adsorption est donc plus faible que

celle des oxydes de Fe (Oscarson et al., 1981). Cependant, la présence de cations en solution peut inverser cette charge et permettre ainsi l'adsorption de l'As (Takematsu et al, 1985).

I.5.c. Adsorption sur les argiles

Les minéraux argileux sont des silicates hydratés de structure en feuillets (phyllites), formés par l'empilement d'une couche de tétraèdres SiO_4 et d'une couche d'octaèdres (M) $(O, OH)_6$ où M correspond à l'Al, le Fe et / ou au Mg; l'intervalle entre deux feuillets constituent l'espace interfoliaire. Les tétraèdres sont associés entre eux par les sommets, formant des cavités hexagonales et les octaèdres s'associent par leurs arrêtes. Dans les tétraèdres, Si^{4+} peut être remplacé par Al^{3+} et rarement par le Fe^{3+} et dans les octaèdres, Al^{3+}, Fe^{3+}, Fe^{2+} et Mg^{2+} peuvent être remplacés par de nombreux éléments de transition (Zn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}), ce qui induit des déficits de charges permanents (Decarreau, 1985). Lorsque les sites octaédriques sont occupés par des ions trivalents on parle d'argiles dioctaédriques, si tous les sites sont occupés par des ions divalents on parle alors d'argiles trioctaédriques.

Les argiles peuvent adsorber les cations et, dans une moindre mesure, les anions. Placées dans une suspension à pH neutre, les particules argileuses présentent une charge négative sur les faces (charge permanente due à une discontinuité du réseau cristallin) et positive (charges variables dues aux groupements hydroxyles (-OH) dépendants du pH) sur les bords. Les sites d'adsorption des anions sont initialement occupés par des anions tels que des groupements hydroxyles (-OH) et peuvent être activés selon les réactions suivantes (où M est le cation octaédrique exposé) (Frost et Griffin, 1977):

En milieu neutre :

$$> M - OH + H_2O \Leftrightarrow < M - OH_2^+ ... OH^-$$

Et en milieu acide :

$$> M - OH + HX \Leftrightarrow > M - OH_2^+ ... X^-$$

Les argiles alumino-silicatées contribuent donc à l'adsorption des arséniates par des réactions de complexation de surface du type (Laperche et al., 2003 ; Bundschuh et al., 2010) :

$$> M - OH_2^+ ... X^- + H_2AsO_4^- \Leftrightarrow > M - H_2AsO_4 + X^- + H_2O$$

Dans les argiles de type kaolinite, montmorillonite et illite, une adsorption des oxyanions d'As sur les surfaces argileuses a ainsi été décrite par des phénomènes de complexation de surface (Goldberg et Glaubig, 1988 ; Lombi et al., 2000). Il a été montré que le maximum d'adsorption des arséniates à la surface de la montmorillonite et de la kaolinite se situerait pour des valeurs de pH entre 4 et 6, avec une nette diminution pour les valeurs de pH supérieures (Goldberg et Glaubig, 1988 ; Gao et al., 2006). Toutefois l'adsorption des arsénites augmenterait régulièrement dans une plus large gamme de pH comprise entre 4 et 9 avec un maximum d'adsorption autour d'une valeur de pH environ 7,5 (Goldberg et Glaubig, 1988 ; Gao et al., 2006).

Le pH et les espèces arséniées présentes dans la solution du sol (As III et As V) ont donc une influence importante dans les mécanismes de sorption de l'As au niveau des surfaces argileuses.

I.5.d. Adsorption sur les carbonates de calcium

Si les minéraux carbonatés sont instables dans les sols acides, ils jouent par contre un rôle très important dans les mécanismes d'adsorption de l'As dans les sols alcalins, et plus particulièrement, dans les sols calcaires (Bauer et al., 2008). En effet, Goldberg et Glaubig (1988), ont ainsi observé une adsorption croissante des arséniates sur la calcite pour des pH comprises entre 6 et 12 avec un maximum autour de 10. Sadiq (1997) souligne également ce rôle majeur joué par les carbonates de Ca dans l'adsorption de l'As en milieu alcalin, du fait des charges positives portées par les surfaces carbonatées dans les sols dont les pH sont supérieurs à 9.

I.5.e. Rôle de la matière organique

La matière organique (MO) peut être divisée en deux catégories : Les substances humiques et non humiques. Les substances non humiques sont constituées par des composés qui n'ont pas, ou partiellement, été dégradés depuis leur synthèse par les organismes vivants (molécules biologiques) ; On peut citer les acides aminés, les lipides, les lignines, les carbohydrates (Alloway, 1995 ; Nguyen, 2007). La décomposition chimique et biochimique ultime de la matière organique végétale et animale et leur re-polymérisation aboutit à la formation des substances humiques, qui sont des polymères organiques naturels. Elles se classent en trois catégories selon leur solubilité : les humines, insolubles en milieu alcalin et acide ; les acides humiques (AH), solubles en milieu alcalin ; et les acides fulviques (AF), solubles à la fois en milieu acide et alcalin. Le degré de décomposition ou d'humification de ces composés est le suivant : humines > AH > AF. Généralement, plus le processus d'humification est avancé, plus ces polymères ont des masses molaires élevées. Les AH et les AF ont des structures chimiques proches, toutefois les AH ont une masse molaire supérieure (entre 10^4 et 10^5 g/mol pour les AH et entre 10^3 et 10^4 g/mol pour les AF), les humines ont quant à elles une masse molaire encore supérieure (> 10^5 g/mol) (Chenu et Bruand, 1997 ; Nguyen, 2007). Contrairement aux molécules biologiques, les substances humiques ne sont pas la répétition d'une séquence définie, mais elles sont construites à partir de briques élémentaires telles que des unités aromatiques, des sucres, des acides aminés et des chaînes hydrocarbonées qui sont assemblées de manière aléatoire. La figure 5 montre la structure schématique des substances humiques.

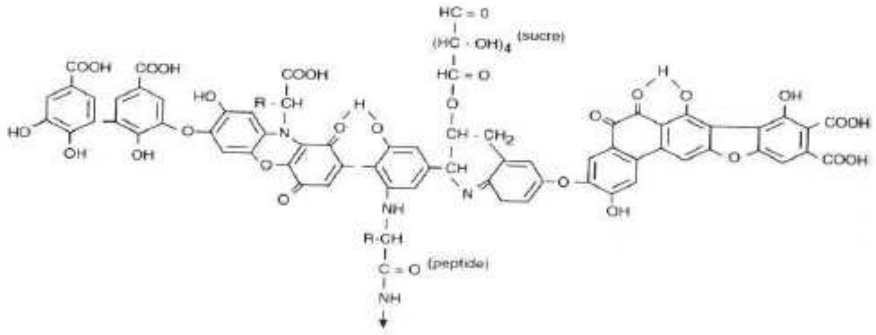


Figure 5 : structure schématique des substances humiques d'après Chenu et Bruand (1997)

Les oxyanions peuvent être liés indirectement aux groupes organiques fonctionnels par l'intermédiaire des cations métalliques de liaisons Al^{3+} ou Fe^{3+} (Thanabalasingam et Pickering, 1986). Un complexe ternaire, par l'intermédiaire des cations métalliques de liaison, peut ainsi être envisagé comme mécanisme potentiel de liaison entre les acides humiques et l'As (Redman et al., 2002). Le pourcentage d'As(III) organiquement complexées apparaît plus important que celui des As(V). Par contre, Ko et al. (2004) a montré une faible formation des complexes ternaires avec les cations métalliques, les acides humiques et l'As(III) en comparaison avec l'As(V) (Ko et al., 2004). La complexation de l'As avec des acides humiques solubles pourraient concerner dans certains sols jusqu'à 40 % et 15 % des As(III) et As(V) respectivement, dissous dans les eaux interstitielles (Ko et al., 2004).

I.5.f. Rôle des phosphates et autres espèces compétitrices

Le phosphore (P) est un constituant mineur des sols qui en contiennent de 0,02 à 0,5 % (0,05 % en moyenne) (Lindsay et al., 1989). Le comportement chimique du P est proche de celui de l'As comme la formation d'oxyanions (arséniate et phosphates) pour les états d'oxydations (V) (Parsons et Jordan, 1985 ; Fitz et Wenzel, 2001 ; Lu et al., 2010 ; Fu et al., 2011). Les phosphates sont cependant stables sur une gamme de pH et d'Eh plus large que les arséniates.

Les constantes de dissociation de l'acide arsénique (H_3AsO_4) et de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) sont très proches. Ainsi du fait de leur charge identique dans des gammes de pH similaires, ces deux espèces chimiques sont en compétition pour les sites d'adsorption disponibles dans les sols (O'Neill, 1995 ; Fitz et Wenzel, 2001). Le tableau 6 montre les constantes de dissociation des acides phosphoriques et arsénique.

Tableau 2 : constantes de dissociation des acides phosphorique et arsénique d'après O'Neill et al. (1995).

	pka1	**pka2**	**pka3**
Acide phosphorique	2,21	7,20	12,40
Acide arsénique	2,20	6,97	11,53

Thanabalasingam et Pickering (1986), ont ainsi mis en évidence le rôle limitant des phosphates dans l'adsorption de l'As par les substances humiques. Selon les auteurs, 60 à 70 % d'As(V) et d'As(III) se sont mobilisés par la mise en contact du sol avec une solution de phosphates de concentration 10^{-6} mol l^{-1}. Bhumbla et Keefer (1994), ont également observé une forte adsorption compétitive des phosphates sur des oxydes de Fe amorphes ainsi qu'une affinité plus grande des phosphates pour les oxydes d'Al par rapport aux As(V).

En se basant sur les propriétés compétitrices des phosphates et des arséniates, des protocoles d'extraction ont été développés afin de quantifier l'As désorbable (Alam et al., 2001). Cet auteur a d'ailleurs montré qu'une solution à 0,9 mol. l^{-1} de phosphate de potassium permet de mobiliser environ 40% de l'As total extrait d'un sol contaminé, pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 8. A cette gamme de pH, la dissolution de l'Al, du Fe, de Ca des phases solides du sol est

minimale. La mobilité de l'As augmente également avec des concentrations croissantes en phosphate avec un optimum à une température de 40 °C (Alam et al., 2001).

I.5.g. Précipitation

Le mécanisme de précipitation/ dissolution est également important à considérer lors de changements de pH et de Eh (Laperche et al., 2003). C'est le cas par exemple des sols à forte teneur en sulfate, où des sulfures d'arsenic très insolubles tels le réalgar (AsS), l'orpiment (As_2S_3) ou l'arsénopyrite (FeAsS), peuvent se former en conditions réductrices selon les équations suivantes (Adriano, 2001) :

$$H_2AsO_4^- + 3\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow H_3AsO_3 + H_2O$$

$$2\ H_3AsO_3 + 6\ H^+ + 3\ S^{2-} \rightarrow As_2S_3 + 6\ H_2O$$

$$2\ As_2S_3 + 4\ e^- \rightarrow 4\ AsS + 2\ S^{2-}$$

La solubilité des précipités arséniés dépend à la fois de leur forme chimique et du pH du sol. Ainsi, la solubilité des sulfures d'As précipités et formés en conditions réductrices, diminue avec l'augmentation de pH ; alors que celle des arséniates ferriques précipités et formés en conditions oxydantes diminue avec la baisse de pH (Gulens et al., 1979).

Selon Le Hécho (2001), la mobilité des As(V) serait plutôt liée à des phénomènes d'adsorption / désorption à l'interface solide/liquide qu'à des réactions de précipitation/dissolution. Des données et des illustrations bibliographiques sur les mécanismes de fixation des oxyanions sont présentées dans l'annexe 4.

II. Les mécanismes de mobilisation de l'As dans la rhizosphère

La rhizosphère est définie comme la région du sol située au voisinage des racines, ce qui correspond approximativement aux premiers millimètres du sol adhérent aux racines (Jones et Hinsinger, 2008). Les conditions physico-chimiques dans la rhizosphère sont drastiquement différentes de celles rencontrées dans le reste du sol. Les conditions biologiques sont également très différentes, puisqu'en enrichissant le milieu en carbone, les racines favorisent l'établissement et la biodiversité des micro-organismes (bactéries, mycorhizes …). Bien que les micro-organismes jouent un rôle important dans le comportement de l'As, cet aspect ne sera pas abordé dans notre étude.

II.1. La mobilité de l'As associée aux mécanismes d'« acidification / alkalinisation » de la rhizosphère

Des modifications du pH rhizosphérique par rapport au reste du sol sont fréquentes pour de nombreuses espèces végétales. L'intensité et le sens de cette modification dépendent principalement de la source d'azote (N) disponible (NO_3^-/ NH_4^+), des conditions nutritives (déficience en Fe et en P), d'exsudation d'acides organiques, de la production de CO_2 par les racines et les microorganismes et de la capacité du sol à tamponner le milieu (Marschner, 1995).

II.1.a. Rôle de la nutrition azotée dans les mécanismes d' « acidification / alkalinisation » et la mobilité de l'As dans la rhizosphère

L'azote (N), nutriment essentiel, est facilement prélevé par les plantes et joue donc un rôle important dans les changements de pH. Mises à part les espèces qui fixent l'N atmosphérique grâce aux symbioses ou d'autres qui sont capables d'absorber directement l'N organique, cet élément est prélevé par la très grande majorité des plantes, sous forme anionique, l'ion nitrate (NO_3^-) ou cationique, l'ion ammonium (NH_4^+). Afin de maintenir un équilibre électrostatique et un pH constant dans le cytosol des cellules racinaires, les prélèvements de cations NH_4^+ sont exactement compensés avec la libération de protons H^+ ou un prélèvement d'anions. Les prélèvements d'anions NO_3^- sont compensés par une libération d'ions OH^-, HCO_3^-, d'anions organiques ou un prélèvement de cations (Marschner, 1995 ; Hinsinger, 2001 ; Hinsinger et al., 2003).

En conséquence, selon la forme azotée disponible dans le milieu, la rhizosphère sera acidifiée ou au contraire alcalinisée. En effet, La fertilisation azotée des plantes se développant sur un site contaminé par l'As et ayant le NO_3^- comme source d'azote, peut augmenter le pH rhizosphérique (Fitz et Wenzel, 2002). Ce phénomène peut entraîner probablement la mobilisation des fractions labiles et échangeables d'As(V) et son assimilation donc par les plantes à l'interface sol-racines.

D'autre part, dans le cas des légumineuses fixatrices d' N atmosphérique, le ratio d'assimilation cation/anion est élevé (Marschner, 1995). Ceci entraîne donc une libération nette de protons H^+ par les plantes. L'acidification de la rhizosphère par les symbiotes fixatrices d'N peut favoriser l'adsorption d'As(V) dans les sols en conditions aérobiques.

II.1.b. Rôle de l'exsudation racinaire dans les mécanismes d'acidification / alkalinisation et la mobilité de l'As dans la rhizosphère

On estime généralement que 30 à 60 % du carbone issu de l'assimilation photosynthétique est alloué aux racines et une part plus ou moins importante est ensuite libérée dans la rhizosphère (Marschner, 1995). On désigne sous le terme de « rhizodéposition » l'ensemble du carbone organique libéré par des racines vivantes (Nguyen, 2007).

Les composés organiques d'origine racinaire sont de nature très variée (tableau 7) et sont classés généralement en trois types de rhizodépôts selon leur mode de libération (Rovira et al., 1969 ; Nguyen, 2007). Il s'agit principalement des exsudats racinaires, du mucilage et des cellules de la coiffe.

Le terme « exsudats racinaires » correspond selon certaines références aux composés organiques qui diffusent passivement du compartiment « cytosolique » vers le compartiment « solution rhizosphérique » en raison d'un gradient de concentration entre le milieu intra et extra- cellulaire et de la perméabilité de la membrane plasmique aux composés de Faibles Poids Moléculaire (FPM) (Nguyen, 2007). La composition de ces exsudats dépend en premier lieu de l'identité de l'espèce végétale, mais également du stade de développement de la plante et de la disponibilité des éléments nutritifs dans la rhizosphère. La libération de ces substances dans la rhizosphère influe sur la mobilité des métaux et métalloïdes (Jones, 1998).

Les acides organiques sont des composés à faible poids moléculaire, rencontrés dans tous les organismes et sont caractérisés par la possession d'un ou de plusieurs groupements « carboxyle ». Selon le nombre de groupements « carboxyle » et leur état de dissociation, les acides organiques peuvent avoir plusieurs charges négatives, entraînant ainsi la complexation des cations métalliques dans la solution et le déplacement des anions de la matrice du sol (Jones, 1998). Les racines contiennent des acides organiques qui varient selon la longueur de leur chaîne de carbone avec : lactate, acétate, oxalate, succinate, fumarate, malate, citrate, isocitrate et aconiate sont parmi les principaux acides organiques rencontrés dans les sols (Jones, 1998). Leurs réactions dans le sol sont extrêmement complexes.

En effet, ils sont impliqués dans des processus: i) de mobilisation et d'assimilation des nutriments par les plantes (notamment le P et le Fe) (Hofland, 1992 ; Jones et Darrah, 1994 ; Kirk et al., 1999 ; Ryan et Jones, 2001), ii) de détoxification des métaux par les plantes (exemple Al)(Pellet et al., 1995 ; Li et al., 2009), iii) de prolifération microbienne, iv) de dissolution des minéraux du sol (la podzolisation) (Marschner, 1995). La figure 6 montre un diagramme des différents flux d'exsudats racinaires dans le sol. Libérées dans l'eau du sol, ces molécules entrent en interaction (sorption par compétition anionique) avec les phases solides du sol (argiles, oxydes et hydroxydes de Fe…). Elles sont ensuite immobilisées et rapidement minéralisées par la biomasse microbienne.

Une acidification du milieu liée à la libération de ces acides organiques a parfois été observée pour certaines espèces végétales (Hinsinger et al., 2003). Toutefois, leur effet sur le pH reste discuté, car il est maintenant établi que les racines exsudent ces molécules organiques sous forme anionique (base conjuguée) et non pas sous la forme d'acide (Hinsinger et al., 2003). Par conséquent, la libération de ces composés n'est pas directement responsable de l'acidification de la rhizosphère. En revanche, comme tous les composés chargés libérés par les cellules racinaires, ils influent sur le mécanisme de régulation qui maintient l'équilibre électrostatique dans les cellules. A ce titre, ces anions ont certainement un effet sur le pH, bien qu'il reste encore mal compris (Hinsinger et al., 2003) (voir annexe V pour plus de détails sur la dynamique des exsudats racinaire à l'interface sol-racines)

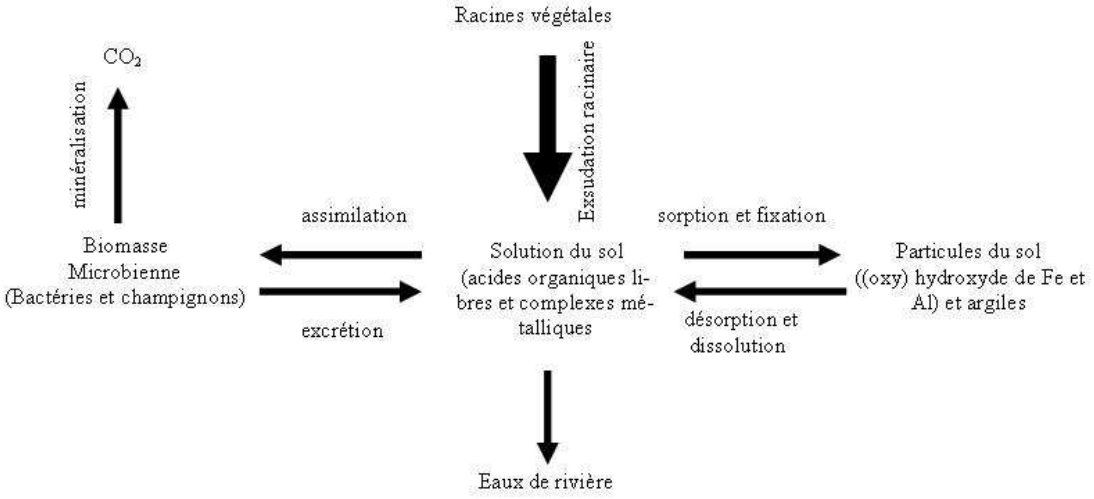


Figure 6 : représentation simplifiée des flux d'exsudation, de sorption, d'assimilation et de minéralisation des exsudats racinaires dans la solution du sol d'après Jones et al. (1998)

D'autre part, certains chercheurs ont montré que des plantes déficientes en P exsudent une quantité importante d'acides carboxyliques comme l'acide malique et citrique (Hoffland, 1992 ; Neumann et Römheld, 1999). Cette réponse peut probablement induire un changement du pH liée à l'excrétion simultanée de protons H^+ et d'anions organiques (Hinsinger, 2001). Ce mécanisme entraîne donc la dissolution du P des précipités « Ca-P » ou des sites d'adsorption (les (oxy) hydroxydes de Fe ou d'Al). Cette dissolution des précipités et des colloïdes est due à un phénomène de complexation entre anions organiques exsudées et cations métalliques (Ca, Fe et Al…). Ces derniers sont responsables en partie de l'immobilisation du P dans la rhizosphère (Jones, 1994 ; Hinsinger, 2001). De plus, les anions organiques peuvent induire la désorption du P des sites d'adsorption par compétition anionique (Hinsinger, 2001). Ces processus combinés entre eux favorisent la biodisponibilité du P (Kirk et al., 1999). D'autre part, l'As et le P sont chimiquement similaires et présentent les mêmes affinités d'adsorption sur les (oxy) hydroxydes de Fe (Sadiq, 1995 ; Adriano, 2001). Une acidification liée à aux exsudats racinaires à l'interface sol-racine peut entraîner une co-dissolution dans des conditions réductrices des (oxy) hydroxydes de Fe par réduction et/ou par chélation avec des anions organiques (citrate ou malate) (Fitz et al., 2002). Pour cela, il est possible que l'exsudation des carboxylates joue un rôle dans la mobilisation de l'As (Fitz et Wenzel, 2002). Par ailleurs, l'As labile empreinte les voies de transport des phosphates au niveau du système racinaire (Quaghebeur et Rengel, 2003). Plusieurs mécanismes de transformation de l'As dans la plante peuvent se réaliser: i) au niveau des racines et/ou des feuilles, la transformation de l'As (V) en As (III) par l'activité de l'enzyme As(V) réductase iii) au niveau des feuilles, la formation de complexes As(III)-PC par réaction entre As(III) et les phytochélatines « PCs » (Quaghebeur et Rengel, 2003 ; Tripathi et al., 2007).

Par ailleurs, l'acquisition du Fe chez les plantes supérieures peut entraîner la co-dissolution réductive de l'As des (oxy) hydroxydes de Fe (Fitz et Wenzel, 2001). En effet, l'excrétion des protons H^+ et /ou la libération des agents chélatants (citrate et malate par exemple) et réducteurs peuvent entraîner la dissolution des colloïdes (Ström et al., 1994 ; Marschnar and Römheld, 1994)

par des processus similaires à ceux décrits pour le P. En conséquence, la solubilité de l'As augmente, aussi sa biodiponibilité pour les végétaux.

En conclusion, le processus de mobilisation de l'As peut être influencé par des mécanismes complexes au niveau de la rhizosphère. Les stratégies d'acquisition des éléments nutritifs par les plantes entraînent des variations plus ou moins importantes des paramètres physico-chimiques dans la rhizosphère. La mobilisation potentielle de l'As résulte de toutes ces variations.

Tableau 3 : composés organiques libérés par les racines en solution nutritive d'après Nguyen C. (2007)

Famille biochimique	Composés
Hydrates de carbone	Arabinose, fructose, galactose, glucose, maltose, raffinose, rhamnose, ribose, saccharose, xylose
Acides aminés	Les 20 essentielles, acide aminobutyrique, homosérine, cystathionine
Acides aliphatiques	Acide acétique, nutyrique, citrique, glycolique, malique, malonique, oxalique, succinique, propionique, tartrique, valérique
Acides aromatiques	P-hydrobenzoïque, caféique, p-coumarique, ferulique, gentistique, protocatéchuique, salicylique, synapique, syringique, vanillique
Acides gras	Linoléique, linolénique, oléique, palmitique, stéarique, phospholipides
Stérols	Campestrol, cholestérol, sitostérol, sigmastérol
Enzymes	Amylase, désoxyribonucléase, inverstase, peroxydase, phosphatase, ribonucléase
Divers	Vitamines, hormones de croissance, auxines, cytokinines, fibbérelines

II.2. Le potentiel redox

La spéciation de l'As et sa dynamique dans les sols sont aussi contrôlées par le potentiel redox (Eh) à travers la dissolution réductive des oxydes de Fe et de Mn (Masschelyn et al., 1991 ; Takahashi et al., 2004). D'autre part, le potentiel redox est affecté par les plantes. La consommation d'O_2 et la production de CO_2 par les racines abaissent légèrement le potentiel redox à l'interface sol-racines. *A contrario*, dans certains cas, la présence de plantes peut augmenter le potentiel redox, soit par un effet physique de l'enfoncement des racines qui décompacte, et donc, aère le milieu (Marseille et al., 2000), soit par un effet chimique. C'est le cas des espèces végétales vivant dans les sols submergés. Dans ces conditions, le milieu est réducteur. Les racines limitent l'entrée massive des ions Fe^{2+}, Mn^{2+} et Mn^{3+} par la formation d'un manchon d'(oxy)hydroxydes de Fe et de Mn. Ces derniers sont formés à partir de l'oxygène transporté par un aérenchyme et libéré au niveau des racines (Marschner, 1995).

Par ailleurs, Marin et al. (1993) ont mis en évidence une augmentation de l'accumulation de l'As dans le riz (*Oryza sativa*) liée à une réduction du potentiel redox. Cet enrichissement en As s'explique par une augmentation de la mobilité d'As (III).

II.2. Interactions plantes -As – P

L'ion phosphate (PO_4^{3-}) joue un rôle important dans la mobilité de l'As dans le sol du fait de leur similarité physicochimique. De plus, l'As(V) est assimilé au niveau racinaire via le système de transport des PO_4^{3-} (Tu et Ma, 2003 ; Geng et al., 2006). Il peut donc affecter la nutrition phosphatée des plantes supérieures (Meharg et Macnair, 1990 ; Abedin et al., 2002). Plusieurs études sur les interactions As - P en culture hydroponique ont été élaborées. Par contre, ces expériences surestiment souvent les cinétiques d'accumulation des éléments dans les plantes (Meharg et Macnair, 1994). En effet, les interactions complexes à l'interface sol-racines (les flux d'eau et d'éléments, la diffusion, l' « adsorption /désorption » et les échanges d'ions) ne sont pas considérés en hydroponie du fait de l'absence des phases solides du sol. L'application du P au milieu de culture réduit l'accumulation d'As et atténue donc les symptômes de phytotoxicité (Meharg et Macnair, 1990).

Les études en pot par contre donnent des indications intéressantes sur les interactions As-P dans le sol. En effet, l'ajout du P, en quantité importante, à un sol contenant de l'As augmente les fractions échangeables d'As et réduit l'adsorption de ce dernier sur le sol (Peryea et Kammereck, 1995 ; Smith et al., 2002).

De plus, dans le cas des expériences en pot, l'accumulation de l'As par les plantes augmente avec l'ajout du P (Creger et Peryea, 1994). En effet, le P est en compétition anionique avec l'As pour les sites d'adsorption. Ceci favorise donc une augmentation de la phytodisponibilité de l'As. Des concentrations significatives d'As dans les différentes parties de *H. lanatus* ont été obtenues après l'application du P à la rhizosphère (Quaghebeur et Rengel, 2001). Par ailleurs, la granulométrie du sol affecte aussi les rapports As - P (Jacobs et Keeney, 1970).

II.3. L'accumulation de l'As par les plantes : concept « accumulateur –indicateur-excluder »

L'As n'est pas un élément essentiel pour les plantes même si la croissance de certaines espèces est stimulée à des faibles concentrations (Carbonell-Barachina et al., 1998 ; Tu et Ma, 2002 ; Silva Gonzaga et al., 2006). Son accumulation par les plantes supérieures dépend de la spéciation chimique de l'As et de sa concentration dans la solution rhizosphérique (Adriano, 2001). En hydroponie, la disponibilité de l'As suit l'ordre suivant : DMAA < As (V) < MMAA < As (III) (Marin et al., 1992). Selon Carbonell-Barachina et al. (1998), l'As(V) est plus mobile que les DMAA et MMAA. Aussi, la répartition de l'As dans les différentes parties de la plante dépend de sa forme chimique dans la solution rhizosphérique. En effet, après l'assimilation des espèces arséniées, les espèces inorganiques et le MMAA se concentrent principalement dans les racines alors que le DMAA s'accumule dans les parties aériennes avec un facteur de translocation (TF) supérieur à 1 (Marin et al., 1992 ; Carbonell-Barachina et al., 1998).

Les plantes qui sont capables d'accumuler de quantités importantes de métaux/métalloïdes sont connues sous le terme d' « hyperaccumulatrices » (Brooks et al., 1977). La découverte récente de fougères « hyperaccumulatrices » d'As : *Pteris vittata et P. calomelanos* constitue une étape importante vers le développement de la phytoextraction d'As des sites contaminés (Francesconi et al., 2002). *P. vittata* peut accumuler jusqu'à 22 630 mg kg^{-1} d'As dans ses feuilles (Tableau 7) (Ma et al., 2001). Par ailleurs, l'As stimule la production de la masse foliaire chez *P. vittata* (Tu et Ma, 2002). Le COD (Carbone Organique Dissous) constituant majeur des rhizodépôts de *P. vittata* augmente la biodisponibilité de l'As et donc son accumulation par les racines (Silva Gonzaga et al., 2006).

Selon le concept accumulateur - excluder de Baker (1981), les accumulatrices d'As sont caractérisées par leur capacité à assimiler efficacement l'As et à le stocker facilement dans leurs parties aériennes. Par contre, les plantes tolérantes dites « excluder » se distinguent par leur aptitude à limiter le transfert de l'As de la rhizosphère vers les racines et son accumulation dans les parties aériennes (Fig.7) . Par exemple, *Agrostis capillaris*, une espèce non accumulatrice d'As est capable de se développer sur un sol excessivement contaminé (jusqu'à 26 500 mg kg^{-1} As). Elle ne concentre par contre qu'environ 3470 mg kg^{-1} d'As (Tableau 7). De plus, les populations tolérantes à l'As des espèces *A. capillaris* et *Holcus lanatus*, assimilent moins d'As que les non tolérantes (Meharg et Macnair, 1990). Ces auteurs ont attribué ce phénomène à la suppression de l'affinité élevée pour le P du système de transport membranaire. Aussi, la tolérance de *H. lanatus* à l'As est d'une part adaptative, associée à la suppression de l'affinité élevée pour le P du système de transport et, d'une autre part, constitutive liée à la production des phytochélatines (PCs) (Hartley-Whitaker et al., 2001).

Le même mécanisme de tolérance adaptative est observé chez les populations tolérantes de *Deschempsia cespitosa* (Meharg et Macnair, 1991). Alors que l'espèce tolérante *Calluna vulgaris* ne présente pas quand à elle, un système de régulation similaire au niveau des transporteurs membranaires des PO_4^{3-} en réponse à la présence des As(V).

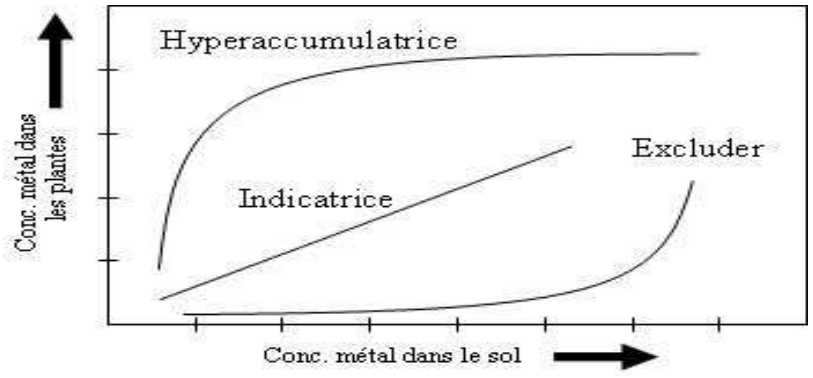


Figure 7 : L'assimilation relative et la bioaccumulation potentielle des différentes espèces végétales d'après d'après Baker, 1981)

Par ailleurs, les PCs sont probablement impliquées dans les processus de détoxification chez les plantes. En effet, l'affinité élevée de l'As au soufre (S) et la formation biologique des composés As-S ont été récemment identifiées (Raab et al., 2007). Aussi, les interactions entre l'As (III) et les groupements thiols (-SH) des molécules peptidiques (la gluthatione (GSH) et les phytochélatines (PC)) jouent un rôle important dans la métabolisation de l'As chez les plantes (Raab et al., 2007).

Deux facteurs sont utilisés pour caractériser le type biologique des espèces végétales vis-à-vis de l'As c'est-à-dire leurs capacités d'accumulation en relation avec la teneur de l'As dans le sol. Il s'agit des facteurs de bioconcentration (BF) et de translocation (TF) (Tableau 4). Le BF correspond à la concentration totale de l'élément dans les feuilles (mg kg^{-1}) par rapport à sa concentration totale dans le sol (mg kg^{-1}). Le TF désigne la concentration totale de l'élément dans les feuilles (mg kg^{-1}) par rapport à sa concentration totale dans les racines (mg kg^{-1}) (Fitz et Wenzel ,2002). Les plantes « hyperaccumulatrices » sont caractérisées par des valeurs de BF et TF largement supérieures à 1 (Tableau 4). Par contre les espèces tolérantes et non accumulatrices « les excluders » présentent quand à elles des valeurs de TF largement inférieures à 1 (Tableau 4).

Tableau 4 : Les concentrations en As dans les feuilles, les racines et dans le substrat des plantes hyperaccumulatrices d'As et des plantes tolérantes à l'arsenic d'après Fitz et al. (2002)

Espèces végétales	**As dans les plantes (mg.kg^{-1})**		**As dans le sol (mg.kg^{-1})**	**BF**	**TF**
	Feuilles	**Racines**			
Hyperaccumulatrices					
Pteris vittata	22630		1500		15
	7234	303	97	74	23,8
	755		6	126	
Pteris calomelanos	8000	88	135	59	91
Plantes tolérantes (non accumulatrices)					
Agrostis capillaris	3470		26500	0,13	
Agrostis catellana	170	1000	17000	0,01	0,17
Agrostis delicatula	300		17000	0,018	0,17
Cynodon dactylon	1800		9535	0,17	0,15
Paspalum tuberosum	1600	10850	7670	0,147	
Spergularia grandis	1130		7670	0,15	

III. Application dans les Phytotechnologies des traitements de sol

Du fait de la complexité des sols et des sédiments, et de la présence simultanée de plusieurs polluants, la décontamination des sites pollués est souvent délicate. Il existe différentes techniques de traitement, qui peuvent être appliquées *in situ* ou *ex situ*. Trois stratégies sont largement utilisées (Fletcher, 2006)) : (1) l'immobilisation ou la rétention des composés toxiques dans un espace confiné in situ ou ex-situ (2) l'élimination des contaminants du sol (3) la destruction des polluants par des moyens physiques, chimiques ou biologiques. Les techniques de remédiation traditionnelles sont largement critiquées du fait qu'elles sont coûteuses, très consommatrices en énergie et sont responsables en grande partie de la destruction écologique du site (McIntyre, 2003).

Une demande croissante de la part du public afin de développer des techniques de remédiation des sols moins coûteuses et respectueuses de l'environnement. Il s'agit par exemple de la bioremédiation (ou l'usage des micro-organismes pour dépolluer tous les types de milieux : l'air, l'eau ou le sol) et la phytoremédiation (Fletcher, 2006).

III.1. Rôle des plantes dans la dépollution des sols

III.1.a. Introduction

Les plantes ont plusieurs propriétés naturelles qui permettent de nettoyer le sol, l'eau et l'air. Les phytotechnologies de remédiation des sols pollués se regroupent sous le terme de « phytoremédiation ». Les caractéristiques de remédiation des plantes se basent sur trois critères : 1) l'immobilisation, 2) l'élimination et 3) la destruction (Fletcher, 2006). Les plantes, par la transpiration végétale, peuvent immobiliser partiellement des contaminants solubles dans l'eau en limitant leur ruissellement vers les eaux de surface et leur infiltration vers les nappes phréatiques. D'autre part, l'élimination du métal/métalloïde toxique par les plantes peut s'expliquer par son assimilation au niveau racinaire. Il sera ensuite transporté via la tige et stocké dans les parties aériennes. Dans la plante, les propriétés cataboliques du végétal sont capables de dégrader les contaminants organiques (Fletcher, 2006).

Par ailleurs, c'est aussi l'activité catabolique des microorganismes dans la rhizosphère et dont leur prolifération est influencée par les molécules chimiques libérées des racines végétales vivantes, qui joue un rôle clé dans les processus de transformations des métaux/ métalloïdes dans le sol (Fletcher, 2006).

Les plantes peuvent être classées en quatre groupes selon leur sensibilité et leur tolérance à l'accumulation des métaux / métalloïdes (Baker, 1981, Tlustos et al., 2006) :

1) Les « excluders » : il s'agit des plantes insensibles à l'assimilation et l'accumulation des éléments toxiques potentiels. Des herbes graminiformes appartiennent souvent à ce groupe (le sudangrass : *Sorghum vulgare*, la fétuque : *Festuca L.*)

2) Les « indicateurs » : il s'agit de la majorité des plantes agricoles dont le contenu en éléments varie plus ou moins avec l'augmentation de la teneur en éléments trace dans le sol (le blé : *Triticum aestivum* ; l'avoine : *Avena sativa* ; le maïs : *Zea mays*)

3) Les « accumulateurs » : c'est le cas des plantes qui accumulent des quantités élevées de polluants dans leurs tissus en fonction de l'augmentation de la teneur du polluant dans le sol. Parmi les accumulatrices, on peut citer les espèces appartenant à la famille des brassicacées (la moutarde : *Sinapis alba* ; *Brassica nigra*) et des astéracées (la laitue : *Lactuca sativa* ; l'épinard : *Spinacia oleracea).*

4) Les « hyperaccumulateurs » : c'est le cas des plantes qui accumulent de quantités importantes d'éléments traces et sont capables de prospérer sur des sols contaminés.

III.1.b. Les technologies de phytoremédiation

La phyotoremédiation est l'utilisation des végétaux supérieurs, des algues et des champignons pour éliminer, contrôler les contaminants environnementaux ou les dégrader par la flore microbienne présente dans la rhizosphère (McCutcheon et Schnoor, 2003). Depuis quelques années cette approche est en plein essor et pourrait permettre de traiter les sols et les eaux contaminées par les métaux / métalloïdes, les radioéléments et les polluants organiques (Van Der Lelie et al., 2001). Le terme générique de phytoremédiation regroupe trois stratégies de remédiation (McIntyre, 2003): la phytoextraction, la phytostabilisation et la rhizofiltration.

La phytoextraction : Elle est définie par l'extraction ou l'élimination des métaux / métalloides par les plantes. Les éléments toxiques sont séquestrés en large quantité au niveau de la biomasse aérienne des plantes dites « hyperaccumulatrices » (Reeves, 2006). Parmi les espèces hyperaccumulatrices les plus connues, *P. vittata* peut accumuler jusqu'à 22 630 mg/ Kg d'As dans sa matière sèche (Ma et al., 2001). Aussi, *Thlaspi caerulescens* connue sous le nom du tabouret bleuâtre est capable d'accumuler quand à elle, plus de 26 000 mg /Kg de Zn et sans manifester de symptômes de phytotoxicité (Fitz et Wenzel, 2001).

La plante phytoextractrice idéale est celle qui est caractérisée par : 1) une biomasse foliaire dense, 2) une croissance rapide pour assurer plusieurs récoltes en une seule saison et 3) une capacité d'accumulation d'éléments toxiques variant de 2 à 5 % dans son tissu (McIntyre, 2003).

La phytostabilisation (in situ immobilisation ou phytorestauration) : La phytostabilisation est une option de remédiation particulièrement indiquée dans le cas des vastes zones industrielles et urbaines contaminées par des métaux /métalloïdes. Elle a pour objectif de réduire la mobilité et la biodisponibilité des métaux / métalloïdes et non de les extraire. Les plantes sont utilisées pour couvrir la surface du sol afin de : 1) prévenir l'érosion et les phénomènes de percolation des eaux, 2) favoriser la biodiversité (Mench et al., 2006). Les plantes candidates à la phytostabilisation doivent avoir : (1) une tolérance aux métaux / métalloïdes, (2) un système racinaire bien développé pour stabiliser efficacement le sol et (3) la capacité de limiter le transfert des éléments toxiques vers les parties aériennes (transfert vertical ascendant) et dans le sol (transfert vertical descendant et horizontal) (Mench et al., 2006).

La rhizofiltration : c'est l'utilisation de plantes terrestres ou aquatiques qui sont capables de développer leur système racinaire dans des eaux polluées et d'y concentrer de grandes quantités de contaminants du fait de leur forte biomasse racinaire. Les graminées, avec leur système racinaire dense, sont parmi les plantes les plus adaptées à la rhizofiltration (McIntyre, 2003)

Les avantages et les limites de la technique de phytoremédiation sont présentés brièvement dans le tableau 5 (Ghosh et Singh, 2005).

Tableau 5 : Avantages et limites de la technique de phytoremédiation d'après Ghosh et Singh (2005)

Avantages	Limites
Amandable pour des composés organiques et inorganiques variés	Limitée aux sites à contamination superficielle (la profondeur de la zone racinaire des plantes)
Application possible in situ/ex situ avec un substrat varié effluent/ sol	Temps de remédiation d'un site contaminé peut atteindre plusieurs années
Application in situ réduit considérablement la déterioration du site en comparaison avec les méthodes conventionnelles	Limitée aux sites avec une faible concentration en contaminants
Réduit la quantité de déchets destinés à l'enfouissement (plus de 95%) et peuvent être éventuellement recyclés en bio-minerai enrichie par des eléments traces métalliques	La biomasse végétale récoltée de la phytoextraction pourrait être classée comme étant un déchet dangereux
Les applications in situ diminuent la dispersion des contaminants via l'air et l'eau	Les conditions climatiques constituent un facteur limitant

Conclusion de l'étude bibliographique

Cette étude bibliographique nous a permis d'apprendre que la mobilité de l'As est étroitement liée aux conditions chimiques du milieu (pH et Eh) induites par des processus biotiques et abiotiques, à la présence d'espèces minérales et organiques telles que les oxydes, les argiles, les sulfures ou la matière organique, pouvant fixer à leur surface l'As. L'impact de la plante est difficilement prévisible car l'activité racinaire induit de nombreuses modifications de la rhizosphère: modifications du pH, du potentiel redox et des concentrations ioniques, exsudation de substances organiques (DOC…), augmentation de l'activité des micro-organismes … Ces modifications rhizosphériques dépendent d'une part de l'identité de l'espèce végétale, son statut nutritif et son âge physiologique et d'autre part, du type de sol. L'effet global des plantes sur la mobilité de l'As résulte de toutes ces variations.

A l'heure actuelle, la mobilité de l'As et son accumulation en rapport avec la stratégie d'acquisition des éléments nutritifs par les plantes et la matière organique dissoute du sol n'ont pas été suffisamment exploré. Une bonne compréhension de la dynamique de l'As à l'interface sol-racines permet de mieux comprendre les facteurs affectant sa mobilité et d'améliorer donc les techniques de phytoremédiation.

L'objectif général de ce travail de recherche est d'étudier l'effet du végétal sur la mobilité de l'As dans la rhizosphère. Cette étude a été conduite sur un sol pollué par l'As et prévoit :

- Une caractérisation de la tolérance à l'As de quatre espèces végétales appartenant à des familles différentes. Cette expérience est complétée par une étude sur la bioaccumulation de l'As dans la plante. L'objectif est d'identifier les types biologiques des espèces sélectionnes vis-à-vis de l'As (Chapitre II).

- Une étude de principales espèces minéralogiques de l'As rencontrées sur le sol en provenance du site de la Combe du Saut (chapitre III).

- Un suivi de l'évolution de la concentration en As dans la solution rhizosphérique tout au long de la période de développement végétatif. Plusieurs autres paramètres en lien avec la nutrition minérale des plantes et l'exsudation racinaire sont contrôlés par l'approche « rhizopot-rhizon » (Chapitre IV).

- Une étude des interactions entre le P et les anions organiques dans la rhizosphère avec l'approche « tapis racinaire » (Chapitre V)

.

CHAPITRE II TOLERENCE ET ACCUMULATION DE L'AS CHEZ QUATRE ESPECES VEGETALES

ARSENIC TOLERANCE AND ACCUMULATION IN FOUR PLANT SPECIES

Carole Obeidy[1] - Jean-Luc Bouchardon[1] - Bernard Guy[1] - Olivier Faure[1&2]

[1]Laboratoire de Géochimie, ENvironnement, Ecoulements, Réacteurs Industriels et Cristallisation (GENERIC), Ecole Nationale Supérieure des Mines, 158 Cours Fauriel, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France ; [2]PRES de l'Université de Lyon, Université Jean Monnet, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France

Keywords: VMT**,** metal contamination, accumulation, bioindication

Abstract

In this study, we investigated tolerance and uptake of arsenic (As) by four plant species. Arsenic tolerance behaviour was characterized by VMT (Vertical Mech Transfer) technique and As uptake kinetics as function of external As soil level were examined. Different As tolerance behaviour has been identified with *Holcus lanatus* exhibiting the highest tolerance to As with EC_{50} up to 730 µM whereas *Plantago lanceolata* exhibiting the lowest tolerance to As with EC_{50} up to 118.64 µM. Studied plants showed low As content in their shoots and roots with low BC (Bioconcentration Factor) and TF (Translocation Factor) (<<1). Only bioindicator biological type was identified within the interval of As soil level [65-180 mg Kg^{-1}]. The results provided more information regarding the tolerance and uptake characteristics of selected species for their possible use in remediating As-contaminated soils.

Introduction

Toxicity properties of arsenic (As) have become a worldwide environmental concern. The causes of extensive contamination of natural sites by As in many countries are both natural (geochemical weathering of rocks and volcanic ash) and anthropogenic inputs (smelters, mining processes and wood preservatives) (O'Neill, 1995; Adriano, 2001). Therefore, managing the As-contaminated sites is necessary to prevent contamination of drinking water and human food-chain. Efficient cost-effective and eco-friendly strategies such as phytoextraction and phytostabilization are developed over the last years in order to limit the detrimental impact of toxic metals and metalloids (Tripathi et al., 2007). The efficiency of phytoextraction is determined by the following plant characteristics: (i) high uptake rate; (ii) high level of tolerance; (iii) high ability to translocate contaminants to the shoots. Furthermore, plants to be employed for phytostabilization should display, among others: (i) high level of tolerance; (ii) high capacity for storing contaminants in roots (Porter and Peterson 1975; Fitz and Wenzel 2002; Mench et al. 2003; Gonzaga et al., 2006).

Arsenic uptake by the majority of terrestrial plants is not very high even on relatively elevated As levels in the soils (O'Neill, 1995; Adriano, 2001). Zabludowska et al. (2009) found that As

content in shoots of four plant species growing on highly As contaminated soil (2000-3500 mg kg^{-1}) was less than 20 mg kg^{-1}. Moreover, the degree of uptake varies widely from species to species (O'Neill, 1995; Adriano, 2001). Mandal and Suzuki (2002), on their study on As around the world, reported that the As concentration in plants varied from less than 0.01 to about 5.0 mg kg^{-1}. The plant roots contain generally higher levels than the other parts (Rahmann et al., 2007; Bhattacharya et al., 2010).

Arsenic uptake by plants depends on the identity of plant species and on As soil sorption characteristics mainly on Fe/Al oxides hydroxides and clay minerals content (Fitz and Wenzel, 2002). The bioavailability of As is most commonly controlled by surface complexation reactions on Fe, Al and Mn oxides/hydroxides (Inskeep et al., 2002). The clay minerals contain large amounts of sorbed As due to the high concentration of sorbing oxides/hydroxides in this small soil fractions (<2 μm) (Lombi et al., 2000). Arsenic accumulation by some plant species is known to correlate with As in the soil (Adriano, 2001). Monitoring the changes in soil As concentration by using bioindicator plants may provide a reliable tool for As risk assessment.

It appears that higher plants may exhibit a basal tolerance for toxic metals/ metalloids and only few plants are characterized by a naturally selected hypertolerance and hyperaccumulation to particular metals/metalloids (Clemens, 2006). Further studies on tolerance and uptake properties of plant species are needed to find new candidates for phytoextraction, phytostabilization and/or bioindication. Good plant candidates for As phytoextraction were likely validated by the discovery of the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. (Ma et al., 2001) which is able to accumulate large quantities of As (up to 2.3 % of dry weight) in its above ground biomass. Other fern species were identified as As hyperaccumulators such as *Pityrogramma calomelanos* (Francesconi et al., 2002), *P. longifolia*, *P. umbrosa* (Zhao et al., 2002; Meharg, 2003) and recently, *P. biaurita* L., *P. quadriaurita* Retz and *P. ryukyuensis* Tagawa (Srivastava et al. 2006). Consequently, these ferns can be potentially used for phytoextraction of As from contaminated sites. Few candidate plants for As phytostabilization were also reported by some authors (Doyle and Otte, 1997; Antosiewicsz et al., 2008).

For this purpose, understanding As plant tolerance and uptake mechanisms is necessary to improve plant remediation strategies. Recent studies have provided new insights into these processes in plants. Competitive inhibition of As uptake with P for root membrane transporters has been reported because of their chemical similarity (Meharg and Macnair, 1990, 1992a, b; Abedin et al., 2002; Tu and Ma, 2003; Geng et al., 2006; Irtelli et al., 2008). The As tolerant plant *Holcus lanatus*, has the ability to suppress the high affinity to P of the phosphate uptake system in response to high As soil level as previously reported by Meharg and Macnair (1990, 1992a, b).

In this study, two major issues are addressed. First, the evaluation of the level of As-tolerance of four plant species belonging to different families: *H. lanatus*, *Dittrichia viscosa*, *Lotus corniculatus* and *Plantago lanceolata*. Second, the determination of As accumulation and translocation efficiency. It was of interest to determine if selected species are suitable for phytostabilization of As-contaminated soil or for bioindication purposes.

Arsenic tolerance behaviour of selected species was firstly characterized by VMT (Vertical Mesh Transfer) technique (Murphy and Taiz, 1995) with *H. lanatus* was taken as positive control. The As uptake kinetics were examined as a function of the external As soil levels. The results provided information regarding the tolerance and uptake characteristics of selected species for their possible use in remediating As-contaminated soils.

Materials and Methods

VMT technique

Arsenic tolerance behaviour of selected species was characterized in hydroponic conditions using Vertical Mesh Transfer (VMT) technique as reported by Murphy and Taiz (1995) and Remon et al. (2007). The VMT method consists of 4 glass plates, with a dimension of 15 x 15 cm, covered firstly by a chromatography paper and then by 80 μm polyamide mesh and mounted on a propylene support. Each plate can accommodate up to 50 seedlings. The assembly glass plate-chromatography paper and polyamide mesh – propylene support was placed inside a glass tank containing 1 L of medium culture and having the following composition: 625μM $Ca(NO_3)_2$; 750 μM KNO_3 ; 500 μM NH_4NO_3 ; 187,5 μM KH_2PO_4 ; 187,5 μM $MgSO_4$; 50 μM NaCl ; 7,5 μM K_2HPO_4 ; 7,5 μM H_3BO_3 ; 7,5 μM Fe-EDTA ; 1,25 μM $MnSO_4$; 0,25 μM $ZnSO_4$; 0,062 μM $CuSO_4$; 0,062 μM Na_2MoO_4 ; 0,062 μM $NiCl_2$. Tanks were then sealed with wrap plastic film and placed under the following experimental conditions: 16h light /8h dark photoperiod, light intensity of 2 x 36 W fluorescent tubes, temperature of 24 ± 2 °C for seed germination.

After germination, seedlings with roots shorter than 5 mm in length were discarded. The assembly glass plate-chromatography paper and polyamide mesh was then rotated 90° from its initial position and left for 24h under the same conditions. After this incubation period, seedlings that did not show a right angle gravitropic curvature, about 2-5 mm, were removed (Murphy and Taiz, 1995). The assembly glass plate-chromatography paper and polyamide mesh was again rotated 90° and transferred in a tank containing the same culture medium supplemented with As brought as sodium arsenate for a further 48h incubation period. The As concentration varied from 0 to 962 μM for *P. lanceolata, D. viscosa and L. corniculatus* whereas for *H. lanatus* As concentration varied from 0 to 10 mM.

After this last growing period, seedlings that formed a second right angle with a new root elongation of at least 2 mm were considered as "non-inhibited" whereas the others as "inhibited"(Murphy and Taiz, 1995; Remon et al., 2007).

Soil experimental conditions

The soil used in the experiment was collected from the sub-surface layer (0-25 cm) of a forest land (Devonian limestones) located at Villeneuve Minervois in the Aude department, France. Once sampled, it was air-dried and sieved at 5 mm. The physical and chemical properties of the soil (Table 1) were determined according to standardized French (NF) and

international procedures (ISO). As shownkin Table 1, the soil is characterized by a geochemical As contamination up to 65 mg kg^{-1}.

Table 1 : selected properties of the soil used in the study

Property	Value
Clay[a] (g kg^{-1})	150
Silt[a] (g kg^{-1})	421
Sand[a] (g kg^{-1})	438
Organic matter content[b] (g kg^{-1})	43
Total $CaCO_3$ [c](g kg^{-1})	16
CEC[d] (cmol(+) kg^{-1})	11.8
pH H_20[e]	8.2
Total As[f] (mg kg^{-1})	65

[a] according to NF X 31-107, [b]according to NF ISO 14 253, [c] according to NF X 10 693, [d] according to NF 31-130, [e] according to NF ISO 10 930, [f] determined by ICP-OES, see Materials and Methods

The soil was then artificially contaminated with As brought as sodium arsenate in laboratory and left to equilibrate for about 6 weeks before the beginning of experiment. The total As concentrations obtained were: 65 (non chemically contaminated), 94, 120, 130, 156 and 180 mg kg^{-1} of As.

Seeds of selected plant species were sown directly in pots (9 x 9 x 11 cm) filled with 340 g of As contaminated soil. After germination period, the seedlings were thinned to only one plant per pot and were grown for up to three months. Each treatment was replicated 5 times.

During the vegetative growing period, the pots were daily hand-watered to maintain 70% water holding capacity. The experiment was conducted in growth chamber with the following conditions: 28 ± 2 °C, under a 16h light/ 8h dark photoperiod (2 metal iodide lamps, 1000 W).

Plant analysis

After 3 months of plant growth, shoots were carefully separated from roots and rinsed with deionised water. Plant roots were collected when it was possible and rinsed like shoots with deionised water. Shoots and roots were air-dried, weighed and ground to pass through a 2 mm sieve. The plant roots and shoots were digested in a hot concentrated HNO_3 according to Zarcinas et al. (1987). Measurements of As, P, Fe, Ca, Al and Mn contents in root and leaf samples were performed by ICP-OES using a Jobin-Yvon "Horiba" apparatus and the limits of detection were 12, 12, 1, 4, 8 and 0.4 ppb respectively.

Statistical analysis

Tolerance testing by VMT technique was replicated three times for each species. Dose-root inhibition curves and statistical analysis were performed with a specific toxicological data processing program REGTOX (Vindimian et al., 1999). We determined three toxicological indices (Effect Calculated): EC_{10}, EC_{50} and EC_{90} which represent As concentrations needed to inhibit the seedlings at 10, 50 and 90 % respectively. The values of the previously defined toxicological indices were determined with the confidence intervals for $\alpha \leq 5\%$.

The non-parametric method "Kruskal-Wallis" was performed in order to assess the effect of external As soil levels and the identity of plant species on As content in plants.
The bioconcentration (BC) (defined as the total element concentration in shoots with respect to total element concentration in soil, both in mg kg^{-1}) and the Translocation Factors (TF) (defined as the total element concentration in shoots with respect to total element concentration in roots, both in mg kg^{-1}) were calculated for As (Fitz and Wenzel, 2002).
Kendall's tau coefficient (τ) was calculated in order to determine the relationships between As content and P, Fe, Ca, Al and Mn contents in shoots and roots as expressed on a shoot dry weight (DW) basis. Significance tests were conducted at $p<0.05$.

Results

The level of As tolerance of the selected species

The sigmoid curves obtained in Figure 1 express the percentage of seedlings inhibited as a function of As concentrations in culture solution for the four selected species *H. lanatus*, *D. viscosa*, *L. corniculatus* and *P. lanceolata*. The table 2 shows the optimal simulated values for the three selected toxicological indices EC_{10}, EC_{50} and EC_{90}. The EC_{10} values varied from 35.99 μM for *D. viscosa* to up to 116.46 μM for *H. lanatus* whereas EC_{90} values varied from 295.78 μM for *P. lanceolata* to up to 4183 μM for *H. lanatus* (Table 2).

Arsenic (As) EC_{50} was calculated in order to characterize and compare tolerance behaviour of selected species. *H. lanatus* presented the highest EC_{50} value up to 698.06 μM with 95% probability to be ranged between 608.61 and 844.80 μM whereas *P. lanceolata* showed the lowest EC_{50} value up to 118.64 μM with 95 % probability to be ranged between 101.91 and 128.40 μM (Fig.8, Table 2).

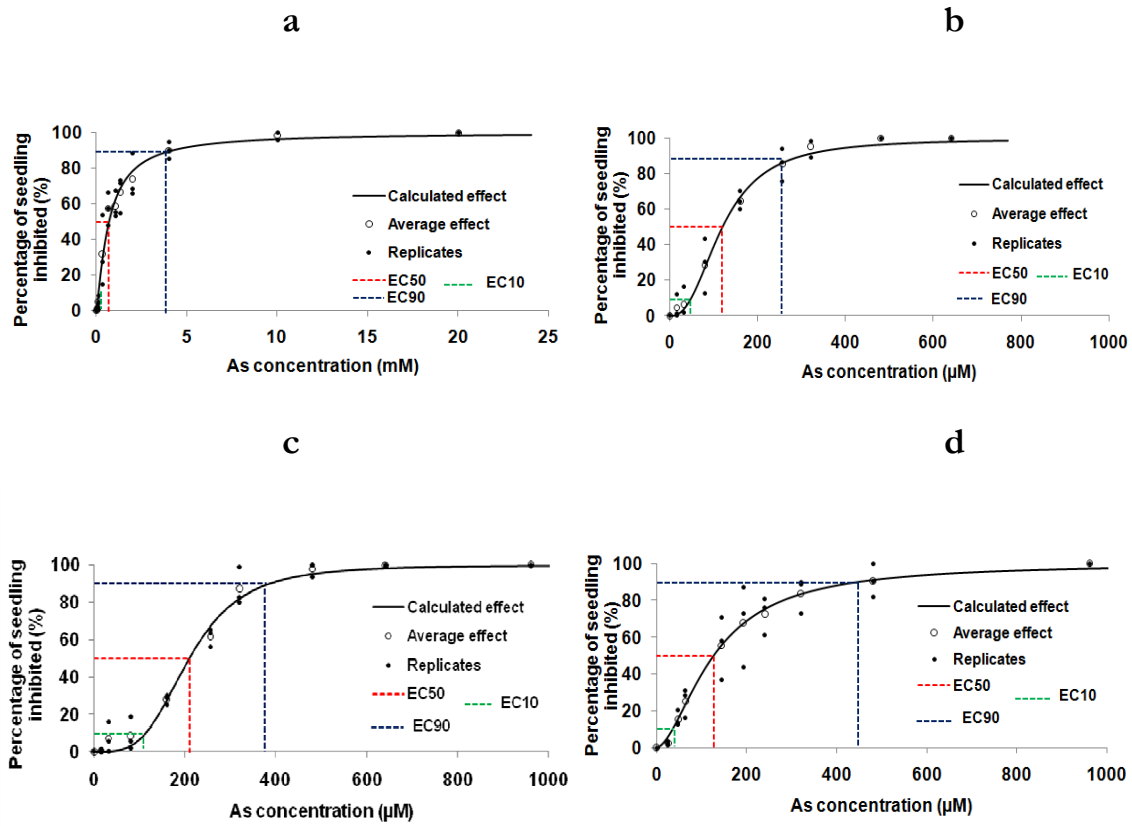


Fig. 1 : the effect of As concentration on plant roots inhibition of the four selected species (a) *H. lanatus*, (b) *P. lanceolata* (c) *L. corniculatus* and (d) *D. viscosa*

Table 2 : arsenic (As) seedling toxicity. Table of REGTOX calculation and statistical analysis (EC unit is µM)

Species	Toxicological indices	Optimal simulated values	Confidence intervals for α ≤ 5 %
H. lanatus	EC10	116.46	[80.02-182.60]
	EC50	698.06	[608.61-844.80]
	EC90	4183	[3085.46-6224.22]
L. corniculatus	EC10	114.23	[92.47-125.56]
	EC50	210.41	[189.09-213.45]
	EC90	387.59	[332.46-413.58]
D. viscosa	EC10	35.99	[26.00-49.49]
	EC50	127.36	112.71-149.20]
	EC90	450.72	[352.02-592.43]
P. lanceolata	EC10	47.59	[36.83-59.17]
	EC50	118.64	[101.91-128.40]
	EC90	295.78	[237.43-338.81]

Arsenic accumulation in shoots and roots

The table 3 shows the mean As concentrations in shoots and roots at each As soil level (65, 94, 120, 130, 156 and 180 mg kg^{-1}) and for each species. Arsenic concentration in shoots increased significantly ($p<0.05$) within the As soil level interval [94; 180 mg kg^{-1}] for *H. lanatus* ($p=0.0034$), *D. viscosa* ($p=0.008$) and *P. Lanceolata* ($p=0.0109$) and not for *L. corniculatus* ($p=0.09$). At the lowest As soil level (65 mg kg^{-1}), As concentration in shoots and roots was not detected (Table 3).

The identity of plant species had a significant effect on As concentration in shoots ($p<0.05$). The variation in shoot As concentration between species started at 120 mg kg^{-1} As soil level ($p=0.01$, 0.02, 0.006 and 0.01 for 120, 130, 156 and 180 mg kg^{-1} As soil level respectively). Whereas at 94 mg kg^{-1} As soil level, no significance differences ($p=0.19$) in shoot As concentration were observed between species (Table 3 and Fig. 2). *H. lanatus* showed the highest As content in shoots at all As soil level in comparison with the other species (Table 3).

Arsenic concentrations in roots varied significantly ($p< 0.05$) within the As soil level interval [94; 180 mg kg^{-1}] for *D. viscosa* ($p=0.014$) and *L. corniculatus* ($p=0.018$) whereas it remained stable for *P. lanceolata* ($p=0.2$) within the As soil level interval [94; 130 mg kg^{-1}]. Arsenic concentration in the roots of *H. lanatus* was not determined at all As soil level and for *P. lanceolata* at 156 and 180 mg Kg^{-1} As soil level only. The reasons were related to the difficulties to separate roots from soil particles under moderate compacted soil conditions (sandy clay loam soil).

Moreover, As concentration in shoots was plotted against the total As soil levels for each species (Fig. 2). The As plant-soil relationships appeared with a linear pattern within the As soil level interval [94; 180 mg Kg^{-1}] for all species with a significant correlation coefficients $r \geq 0.92^*$ ($p<0.05$) (Fig. 2).

Table 3 : the mean As concentration in roots and shoots. The BC and TF of As for selected species growing on As contaminated soil (65, 94, 120, 130, 156 and 180 mg kg^{-1})

Soil As Conc. mg kg^{-1}	Root As Conc. mg kg^{-1} dw	Shoot As Conc. mg kg^{-1} dw	BC	TF
H. lanatus				
65	n.d.*	n.d.	n.c.*	n.c.
94	n.d.	1.64±0.31	0.01	n.c.
120	n.d.	2.86±0.22	0.02	n.c.
130	n.d.	3.86±1.16	0.02	n.c.
156	n.d.	7.49±0.80	0.04	n.c.
180	n.d.	6.54±0.62	0.03	n.c.
D. viscosa				
65	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.
94	4.16±0.45	1.05±0.20	0.01	0.20±0.02
120	6.93±0.91	1.00±0.08	0.008	0.15±0.01
130	8.44±1.05	0.88±0.09	0.006	0.10±0.00
156	10.68±1.58	2.55±0.42	0.01	0.23±0.01
180	8.75±2.18	3.59±0.67	0.01	0.53±0.08
L. corniculatus				
65	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.
94	3.64±0.30	0.90±0.13	0.009	0.25±0.01
120	8.54±2.52	1.02±0.23	0.008	0.14±0.03
130	14.43±1.89	1.06±0.26	0.008	0.07±0.00
156	19.26±4.69	1.26±0.18	0.008	0.11±0.03
180	15.35±3.98	2.03±0.36	0.01	0.14±0.01
P. lanceolata				
65	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.
94	14.55±4.40	0.87±0.08	0.009	0.08±0.01
120	10.84±1.28	0.87±0.18	0.007	0.09±0.00
130	13.48±1.97	1.51±0.34	0.01	0.10±0.01
156	n.d.	1.82±0.42	0.01	n.c.
180	n.d.	3.22±0.56	0.01	n.c.

*n.d.: represented values of As concentration not determined in roots and shoots; *n.c.: represented values of BC and TF not calculated. Data are expressed as mean values ± SE (n=5).

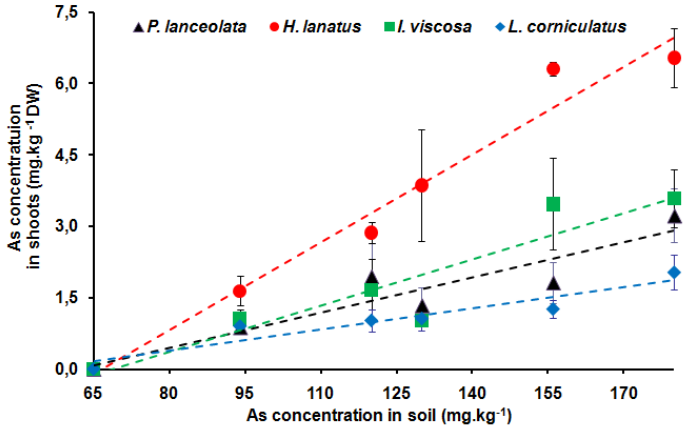


Fig. 2 : arsenic concentration in shoots (mg kg $^{-1}$ DW) of selected species as a function of As concentration in soil (mg kg^{-1})

Arsenic bioconcentration and translocation efficiency of plant species

In order to characterize plant As uptake and translocation, two coefficients BC and TF were calculated when it was possible (Fitz and Wenzel, 2002). The table 3 shows the mean values of BC and TF for each species and at defined As soil level. The BC and TF values for As were less than 1 for all selected species and at all As soil level. Whereas, the BC values did not vary significantly with increasing As soil level for *D. viscosa* (p=0.21), *L. corniculatus* (p=0.64) and *P. lanceolata* (p=0.06). The TF values were calculated when it was possible. TF values varied significantly with increasing As soil level for *D. viscosa* (p=0.02) within the As soil level interval [94; 180 mg Kg^{-1}] (Table 3). This variation was not significant for *L. corniculatus* (p=0.09) within the As soil level interval [94; 180 mg Kg^{-1}] and for *P. lanceolata* (p=0.83) within the As soil level interval [94; 130 mg Kg^{-1}] (Table 3).

Relationships between As and variables contents (µg) in plants shoots and roots

The table 4 shows the calculated kendall's tau coefficients (τ) between As and the following variables: Al, Ca, Fe, Mn and P within the As soil level interval [94; 180 mg Kg^{-1}]. Arsenic content in shoots was significantly positively correlated with all measured variables for *H. lanatus* and *P. lanceolata* (Table 4) whereas in the shoots of *L. corniculatus*, As content was significantly positively correlated with all variables except for Al (p=0.08). Furthermore, for *D. viscosa* shoots, As content was only significantly positively correlated with Al content (Table 4). Moreover, As content in roots of *D. viscosa* and *L. corniculatus* was significantly positively correlated with all measured variables (Table 4).

Table 4 : kendall' tau coefficients (τ) between the quantity of As (µg) and the quantity of Al, Ca, Fe, Mn and P (µg) in the shoots of all selected species and in the roots of *D. viscosa* and *L. corniculatus* (* indicates significant correlation coefficient at $p<0.05$)

Species \ Variables	Al	Ca	Fe	Mn	P
			Shoots		
H. lanatus	0.37*	0.34*	0.35*	0.44*	0.36*
D. viscosa	0.46*	0.01	0.27	0.01	-0.18
L. corniculatus	0.24	0.55*	0.52*	0.57*	0.56*
P. lanceolata	0.35*	0.5*	0.4*	0.53*	0.53*
			Roots		
D. viscosa	0.61*	0.41*	0.67*	0.38*	0.45*
L. corniculatus	0.41*	0.41*	0.43*	0.40*	0.41*

Discussion

The VMT has the great advantage of being rapid and easy method. The VMT approach enabled us to compare the As tolerance of selected species according to defined toxicological indices. *H. lanatus*, an As – tolerant species (Meharg and Macnair, 1992a, b; Quaghebeur and Rengel, 2003; Raab et al., 2004) was taken as positive control. According to EC_{50} values, selected species were classified from higher to lower As tolerance behaviour: *H. lanatus* > *L. corniculatus* > *D. viscosa* > *P. lanceolata*. Under the conditions of the assay, *H. lanatus* exhibited the highest basal tolerance to As whereas *P. lanceolata* exhibited the lowest.

The mechanism of As tolerance in *H. lanatus* has been previously explored and it consists on reduced influx of As (V) due to the constitutive suppression of high phosphorus uptake by the phosphate uptake system (since arsenate and phosphate are chemically analogues) (Meharg and Macnair, 1992; Tripathi et al., 2007). Recently, the discovery of some specific genes (AR genes) implicated in the enzyme As (V) reductase activity and the identification of As (III)- PC complexes in shoots of *H. lanatus* might contribute to its As tolerance characteristics (Quaghebeur and Rengel, 2003, Tripathi et al., 2007).

To our knowledge, this is the first study that compare As tolerance behaviour of *H. lanatus* with that of *D. viscosa*, *L. corniculatus* and *P. lanceolata* by the VMT technique. The values of toxicological indices for tolerance comparison obtained in our study cannot be compared with those from the literature. The data provided from the majority of published results have been conducted under different experimental conditions (physiological plant ages, type of experimental design, and duration of the experimental period…). Further studies on plant As tolerance might be conducted under the VMT experimental conditions in order to study both constitutive and inducible tolerance behaviour in response to As.

To go a step further in the understanding of As tolerance and uptake, plants were grown in soil contaminated artificially with As. Selected species were exposed to increasing toxic As level in the soil from 94 to up to 180 mg Kg^{-1} As soil level. However, we observed that the content of As in their shoots was not very high and varied from 2.03 mg kg^{-1} (*L. corniculatus*) to 6.54 mg kg^{-}

[1] (*H. lanatus*) at the highest As soil level. The calculated BC and TF of selected species were below 1 (Table 3). Other workers have also found similar shoot-to-root ratios of As concentrations: *Lycopersicum esculentum* (TF <0.02), *Brassica juncea* (TF<0.1), and *Oryza sativa* (TF<0.2) (Marin et al., 1992; Burló et al., 1999; Pickering et al., 2000) when arsenate was added to the nutrient solution. Whereas the values of BC and TF of the As hyperaccumulator species *Pteris vittata* were 74 and 23.8 respectively growing on As contaminated soil (Ma et al., 2001). Otherwise, the known As tolerant species *Agrostis capillaris* presented a BC value of 0.13 (Porter and Peterson, 1977). The low BC and TF values obtained in the present study can be related mainly to the biological identity of selected species. Under the conditions of the assay, the low BC and TF obtained (<1) may be explained by the limited ability of selected species to mobilize As in rhizosphere and to translocate it from roots to the shoots in response to elevated As soil level.

Significant positive relationships between As and P content in roots was obtained for *D. viscosa* and *L. corniculatus* (Table 4). Phosphate (PO_4^{3-}) and As (V) are physicochemical analogues and consequently competing directly for binding sites (Adriano, 2001; Abedin et al., 2002; Tu and Ma, 2003; Geng et al., 2006). Moreover, As (V) uptake occurs through the phosphate uptake pathway and may interfere with plant P nutrition (Meharg and Macnair, 1990; Wang et al., 2002; Rahman et al., 2008). We hypothesize that in the present study, the concentrations of bioavailable As and P in rhizosphere are not sufficiently high to induce an antagonistic interaction for root uptake. Consequently, P and As are taken up by root membrane transporters without a real competition.

The table 4 shows also a significant positive correlation between As content and Mn, Al, Ca and Fe contents in the roots of *D. viscosa* and *L. corniculatus*. This result can be explained by the sorption characteristics of As in the soil and by the mechanisms of nutrient uptake at the soil-root interface.

Under aerobic soil conditions, As exists mainly in inorganic oxyanion forms (AsO_4^{3-}) (Sadiq, 1997, Adriano, 2001). Soluble AsO_4^{3-} may react with mobile cations such as Al^{3+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}/Fe^{3+} and Mn^{2+} which are commonly found in soil, to form relatively insoluble arsenate As(V). Soluble As(V) can be also adsorbed onto oxides or hydroxides surfaces of Al, Fe, Mn and Ca carbonates (Sadiq, 1997).

Furthermore, Ca, Fe and Mn are essential elements for plant growth (Marshner, 1995). Plant species can enhance via root exudation process the dissolution of colloidal complexes established between As and oxides/hydroxides cations for further Fe, Ca and Mn uptake. This mechanism may increase indirectly nutrients bioavailability and As mobility and consequently their uptake by plant roots (Hoffland, 1992; Jones, 1994; Jones et al. 1998; Kirk et al., 1999; Hinsinger, 2001; Shen et al., 2005; Johnson and Loeppert, 2006).

It has been reported that cations uptake is compensated by anions uptake in order to equilibrate unbalancing charges in the root cells (Marshner, 1995; Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2003). This phenomenon might explain the simultaneous root intake of Ca, Fe, Al and Mn cations and AsO_4^{3-}oxyanions and their further translocation to the shoots. The significant positive correlation obtained between As and the same above elements in the shoots of *H. Lanatus*, *P. Lanceolata* and *L. corniculatus* suggest this hypothesis.

In the case of *D. viscosa*, As was correlated only with Al in the shoots. Unlike the other species, *D. viscosa* presented a great affinity to Al uptake (up to 75 ± 0.009 µg DW in shoots at the highest As soil level) (data not shown in results). This value corresponded approximately to the twice of the quantity observed in the shoots of the other tested species (up to 28 ± 0.007 µg DW for *H. lanatus*, 29 ± 0.001 µg DW for *L. corniculatus* and 25 ± 0.002 µg DW for *P. lanceolata*). The excess of positive charges entering the roots cells related mainly to Al uptake is probably compensated by As and other anions uptake, these results may explain the strong positive correlation essentially obtained between Al and As in the roots and shoots of *D. viscosa*.
According to Baker concept on plant accumulator-indicator-excluder (Baker, 1981), the selected species showed a linear pattern of plant-soil relationships in response to increasing soil As levels (Figure 2) with a high significant linear correlation coefficient $r \geq 0.92^*$. We conclude that these species may act as bioindicator within the As soil levels interval [65-180 mg kg^{-1}].

Conclusion

Our study enabled us to characterize As tolerance and uptake mechanisms of four different species: *H. lanatus*, *D. viscosa*, *L. corniculatus* and *P. lanceolata*. The As tolerance behavior of selected species was characterized by VMT technique with *H. lanatus* taken as positive control. Further researches on As tolerance might be elaborated on seedlings provided from different sites under various As contamination conditions in order to identify and isolate As-tolerant mutants for their further use in remediating As contaminated site. Arsenic uptake by selected species grown on artificially As contaminated soil was investigated. Studied plants showed low As content in their shoots and roots with low BC and TF values (<1). Only one biological type has been identified under our experimental conditions: the bioindicator pattern. The results highlighted also interesting relationships between As and P, Fe, Mn, Al and Ca content in plants. Further studies might be conducted under a wide range of As soil level in order to determine potential transition between accumulator, indicator and excluder pattern of selected species.

References

Abedin M. J., Feldman J., Meharg A.A. Uptake kinetics of Arsenic Species in Rice Plants. Plant Physiology, 2002, vol. 128, pp. 1120-1128.

Adriano DC (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Second edition Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg p 867

Antosiewicz D.M., Escude-Duran C., Wierzbowska E., Sklodowska A. Indigenous Plant Species with the potential for the Phytoremediation of Arsenic and Metals Contaminated Soil. Water Air Soil Pollut., 2008, vol. 193, pp. 197-210.

Baker A.J.M. Accumulators and excluders-Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of plant nutrition, 1981, vol. 3, pp. 643-654.

Bhattacharya P., Samal A.C., Majumdar J., Santra S.C. Arsenic contamination in Rice, Wheat, Pulses and vegetables: A study in an Arsenic Affected Area of West Bengal, India. Water Air Soil Pollution, 2010, vol. 213, pp. 3-13.

Burlo F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A.A., Valero D., Martinez-Sanchez F. Arsenic Species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants.

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie, 2006, vol. 88, pp. 1707-1719.

Doyle M.O., Otte M.L., Organism-induced accumulation of iron, zinc and arsenic in wetland soils. Environmental Pollution, 1997, vol. 96, pp. 1-11.

Fitz W.J., Wenzel W.W. Arsenic transformations in the soil_ rhizosphere_ plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. Journal of Biotechnology, 2002, vol. 99, pp. 259-278.

Francesconi K. Visoottiviseth P., Sridokchan W., Goessler W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. The Science of the Total Environment, 2002, vol. 284, pp. 27-35.

Geng C.N., Zhu Y.G., Tong Y.P., Smith S.E., Smith F.A. Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat.Chemosphere, 2006, vol. 62, pp. 608-615.

Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant and soil, 2001, vol. 23, pp. 173-195.

Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. Origins of root mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. Plant and Soil, 2003, vol. 248, pp. 43-59.

Hoffland, E. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilisation of rock phosphate by rape. Plant Soil, 1992, vol. 140, pp. 279-289.

Inskeep W.P., McDermott T.R. Arsenic (V)/(III) Cycling in soils and Natural Waters: Chemical and Microbiological Processes. In W.T._Frankenberger (Eds.), Environmental Chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, Inc., 2002, 181 p.

Irtelli B., Navari-Izzo F., Uptake kinetics of different arsenic species by Brassica carinata. Plant Soil, 2008, vol. 303, pp. 105-113.

Johnson S.E., Loeppert R.H. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. Soil Sci. Soc. Am. J., 2006, vol. 70, pp. 222-234.

Jones D.L., Darrah P.R. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and soil, 1994, vol. 166, pp. 247-257.

Jones D.L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil,* 1998, vol. 205, pp. 25–44

Kirk, G.J.D., Santos, E.E., Findenegg, G.R. Phosphate solubilisation by organic anion excretion from rice (Oryza sativa L.) growing in aerobic soil. Plant Soil, 1999, vol. 211, pp. 11-18.

Lombi E., Sletten R.S., Wenzel W.W. Sequentially extracted arsenic from different size fractions of contaminated soils. Water, Air, and Soil Pollution, 2000, vol. 124, pp. 319-332.

Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature, 2001, vol. 409, pp. 579

Mandal B.K., Suzuki K.T. Arsenic round the world: a review. Talanta, 2002, vol. 58, pp. 201-235.

Marin, A.R., Masschenlyn, P.H., Patrick Jr.W.H. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. Plant and soil, 1992, vol. 139, pp. 175-183.

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. Academic Press, London, UK., 1995, 889p.

Meharg A.A., Macnair M.R. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. New Phytol., 1990, vol. 116, pp. 29-35.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in Holcus lanatus L. J. Exp. Bot., 1992a, vol. 43, pp. 519-534.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Polymorphism and physiology of arsenate tolerance in Holcus lanatus L. from an uncontaminated site. Plant and soil, 1992b, vol. 146, pp. 219-225.

Meharg A.A. Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in ferns and their allies. New Phytologist, 2003, vol. 157, pp. 25-31.

Mench M., Bussière S., Boisson J., Castaing E., Vangrosveld J., Ruttens A. et al. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after *in situ* treatments. Plant and soil, 2003, vol., 187, pp. 187-202.

Murphy A., Taiz L., A New Vertical Mesh Transfer Technique for Metal-Tolerance Studies in Arabidopsis. Plant Physiol., 1995, vol. 108, pp. 29-38.

O'Neill P. Arsenic. In : B.J. Alloway (Ed.), Heavy metals in soils. London, UK: Blackie Academic and Professionnal, 1995, pp. 105-121.

Pickering I.J., Prince R.C., George M.J., Smith R.D., George G.N., Salt D.E. Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard. Plant Physiology, 2000, vol. 122, pp. 1171-1177.

Porter, E.K., Peterson, P.J. Arsenic accumulation by plants on mine waste (United Kingdom). Sci. Total Environ, 1975, vol. 4, pp. 365-371.

Porter, E.K., Peterson, P.J. Arsenic tolerance in grasses growing on mine waste. Environ. Pollut., 1977, vol. 14, pp. 255-265.

Quaghebeur M., Rengel Z. The distribution of Arsenate and Arsenite in Shoots and Roots of Holcus lanatus is influenced by Arsenic Tolerance and Arsenate and Phosphate Supply. Plant Physiology, 2003, vol. 132, pp. 1600-1609.

Raab A., Feldmann J., Meharg A.A.The nature of arsenic-phytochelatin complexes in Holcus lanatus and Pteris cretica. Plant Physiology, 2004, vol. 134, pp. 1113-1122.

Rahman M.A., Hasegawa H., Mahfuzur Rahman M. Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain. Chemosphere, 2007, vol. 69, pp. 942-948.

Rahman M.A., Hasegawa H., Ueda K., Maki T., Mahfuzur Rahman M. Influence of phosphate and iron ions in selective uptake of arsenic species by water fern (Salvinia natans L.) Chemical Engineering Journal, 2008, vol. 145, pp. 179-184.

Remon E., Bouchardon J.-L., Faure O. Multi-tolerance to heavy metals in Plantago arenaria Waldst. & Kit. : Adaptative characters. Chemosphere, 2007, vol. 69, pp. 41-47.

Shen J., Li H., Neumann G., Zhang F. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in Lupinus albus as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. Plant Science, 2005, vol. 168, pp. 837-845.

Srivastava M., Ma L.Q., Santos J.A.G. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. Sci Total Environ., 2006, vol. 364, pp. 24-31.

Tripathi R.D., Srivastava S., Mishra S., Singh N., Tuli R. et al. Arsenic hazards : strategies for tolerance and remediation by plants. Trends in Biotechnology, 2007, vol. 25, pp. 158-165.

Tu C., Ma L.Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator Pteris vittata L. under hydroponic conditions. Environmental and Experimental Botany, 2003, vol. 50, pp. 243-251.

Vindimian E., Garric J., Flammarion P., Thybaud E., Babut M. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, vol. 18., pp. 2386-2391.

Zabludowska E., Kowalska J., Jedynak L. et al. Search for a plant for phytoremdiation- What can we learn from field and hydroponic studies? Chemosphere, 2009, vol. 77, pp. 301-307.

Zarcinas B.A., Cartwright B., Spouncer L.R. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. Commun. In Sci. Plant Anal., 1987, vol. 18, pp. 131-146.

Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. New Phytologist, 2002, vol. 156, pp. 27-31.

Conclusion du Chapitre II

L'objectif de ce chapitre était de comparer la tolérance à l'As des espèces sélectionnées en hydroponie et d'identifier leurs traits phénotypiques à l'égard de l'As en sol contaminé artificiellement par l'As.Les résultats expérimentaux ont montré que *H. lanatus* est bien l'espèce la plus tolérante à l'As tandis que *P. lanceolata* se comporte quant à elle, comme l'espèce la moins tolérante parmi les 4 espèces testées. Cette étude montre aussi l'intérêt d'utiliser *L. corniculatus* comme espèce *excluder* pour stabiliser des sols à faible contamination en As. Cette espèce est plus tolérante à l'As que *D. viscosa* et *P. lanceolata* et présente de faibles capacités accumulatrices en comparaison avec *H. lanatus* et se caractérise par une amplitude écologique large. L'expérimentation en sol contaminé a montré que les espèces sélectionnées sont caractérisées par un trait phénotypique « bioindicateur » dans l'intervalle de contamination du sol compris entre 65 et 180 $mg.kg^{-1}$. Au vu de ces éléments, les expériences présentées par la suite visent à mieux comprendre l'impact de la végétation sur la mobilité potentielle de l'As. L'objectif était d'appréhender les processus biogéochimiques affectant la mobilité de l'As dans la rhizosphère. L'approche « rhizopot-rhizons » est donc présentée dans le chapitre III. La question scientifique principale à laquelle on tentera d'y répondre est la suivante : Est-ce que nos espèces mobilisent-elles l'As dans la rhizoshère ?

Le sol utilisé à cet effet, provient du site de la Combe du Saut, un ancien site aurifère. Il est caractérisé par une pollution anthropique en As de 1900 $mg.kg^{-1}$. Une étude préliminaire de la spéciation minéralogique de l'As du sol provenant du site de la Combe du Saut a été réalisée en vue de la détermination des phases porteuses de l'As. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant III.

CHAPITRE III. ETUDE DE LA SPECIATION MINERALOGIQUE DE L'As

L'étude de la spéciation minéralogique du sol permet d'identifier les différentes phases porteuses de l'As dans le sol. Deux approches d'analyse ont été élaborées : l'extraction chimique de l'As selon la procédure de Wenzel et al. (2001) d'une part et l'analyse minéralogique par le MEB-EDS d'autre part. Une caractérisation préliminaire des échantillons de sols sélectionnés a été réalisée. Elle consiste essentiellement en une détermination des paramètres physico-chimiques globaux, une étude de la texture de sol et une analyse minérale multi-élémentaire.

I. Origine, échantillonnage et caractérisation physico-chimique des échantillons de sols sélectionnés

I.1. Prélèvements et échantillonnage

Le sol provient d'un anicien site minier aurifère (Combe du Saut-Aude). Les échantillons sont prélevés dans la zone connue sous le nom de « ZC4 » selon le programme ADEME-Phytoperf (2007). Il s'agit d'une zone boisée, caractérisée par un couvert végétal dense. L'échantillonnage du sol a été réalisé selon les étapes suivantes :

- Prélèvement du sol : après évacuation des 5 premiers centimètres, le sol a été prélevé à la pioche et à la pelle sur une hauteur d'environ 20 à 30 cm et sur une surface d'environ 2 x 4 m.
- Tamisage du sol : le sol sec a été tamisé sur une grille à mailles carrées de 5 mm.
- Homogénéisation du sol : le sol a été homogénéisé dans une bétonnière préalablement nettoyée

I.2. Caractérisation physico-chimique du sol

L'analyse des principaux paramètres physico-chimiques du sol a été réalisée au Laboratoire Agronomique de Normandie selon les normes françaises (Tableau 6).

Tableau 6 : propriétés du sol

Propriétés	Valeur
Argile[a] (g kg^{-1})	377
Limon[a] (g kg^{-1})	372
Sable[a] (g kg^{-1})	251
Matières organiques[b] (g kg^{-1})	60
$CaCO_3$[c] (total) (g kg^{-1})	6
CEC[d] (cmol(+) kg^{-1})	21
pH H_2O[e]	7.7
Total-P[f] (mg kg^{-1})	218
Total-As[f] (mg kg^{-1})	1935

[a] selon NF X 31-107, [b] selon NF ISO 14235, [c] selon NF X 10693, [d] selon NF X 31-130, [e] selon NF ISO 10930, [f] Déterminés par ICP-OES, voir Matériels et Méthodes dans les chapitres précédents.

I.3. Analyse multi-élémentaire du sol et de sa pollution

Fabrication des perles pour le dosage des éléments majeurs :

L'échantillon sec a été finement broyé manuellement au mortier pour obtenir une poudre d'une granulométrie inférieure à 80 µm. Le principe de cette technique consiste à mettre en solution la fine poudre de sol par fusion au tétraborate de lithium ($Li_2B_4O_7$): 1-2 g de poudre sont pesés dans des nacelles en porcelaine et placés au four à 960°C pendant 2 heures ce qui permet de déterminer la perte au feu. Dans un creuset en or – platine, un mélange à base de : nitrate de lithium ($LiNO_3$) (0,4 g), poudre fine de sol (0,4 g) et du fondant tétraborate de lithium ($Li_2B_4O_7$) (7,2 g) est préparé auquel quelques gouttes d'iodure de lithium (LiI) sont ajoutées. La perle est ensuite fabriquée en lançant le programme de la perleuse. Les éléments majeurs suivants : Si, Al, Fe, Mn, Mg, Ca, Na, K, P sont ensuite analysés par le spectromètre de fluorescence X . Les résultats sont indiqués dans le tableau 7.

Tableau 7 : la perte au feu (LOI) et la teneur en éléments majeurs (%) du sol de Salsigne

Ech.	LOI (%)	SiO_2 (%)	Al_2O_3 (%)	Fe_2O_3 (%)	MnO(%)	MgO(%)	CaO(%)	Na2O (%)	K_2O (%)	P_2O_5 (%)
ZC4	12.45	57.89	11.85	10.72	0.31	1.87	2.02	0.36	2.82	0.1

Procédure de mise en solution par attaque acide pour le dosage des éléments mineurs

La méthode consiste à réaliser une minéralisation totale de l'échantillon de sol. La technique propose de chauffer lentement l'échantillon contenu dans un bécher en téflon *Savillex* après ajout d'une façon séquentielle des solutions concentrées d'acides nitrique (HNO_3), chlorhydrique (HCl), et fluorhydrique (HF) jusqu'à évaporation complète. La température et la durée du chauffage dépendent de l'étape de l'attaque acide. Le résidu solide est alors dissout par l'ajout de HCl (25 mL) avant l'analyse par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy ; HORIBA Jobin-Yvon Activa). Les éléments mineurs suivants : As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn sont ensuite déterminés (Tableau 8)

Tableau 8 : teneur en éléments mineurs (ppm) du sol de Salsigne

Ech	As (ppm)	Cd (ppm)	Co (ppm)	Cr (ppm)	Cu (ppm)	Ni (ppm)	Pb (ppm)	V (ppm)	Zn (ppm)
ZC4	1498	60.4	16.8	49.5	202.9	23.05	680.4	147.6	561.7

II. Etude de la spéciation minéralogique de l'As par extraction chimique

La procédure d'extraction séquentielle (S.E.P.) de Wenzel et al. (2001) a été sélectionnée pour déterminer les principales fractions d'As présentes dans le sol. Il s'agit d'une technique à moindre coût et permet d'obtenir rapidement de résultats reproductibles dans le cadre d'analyses de routine de laboratoire. Les principaux avantages de l'approche de Wenzel et al. sont les suivants :

- prend en compte le caractère anionique des espèces d'As dans le sol,
- permet de différencier 5 fractions d'As dans le sol : la fraction non spécifiquement liée (F1), spécifiquement liée (F2), liée aux oxydes et hydroxydes de Fe et d'Al amorphes

(F3), liée aux oxydes et hydroxydes de Fe et d'Al cristallins (F4) et la fraction résiduelle (F5),

- est utile dans le cadre d'évaluation des risques de mobilité potentielle de l'As dans les sols.

Par ailleurs, une fraction d'As supplémentaire a été ajoutée entre les fractions F4 et F5. Elle correspond à la quantité d'As susceptible d'être adsorbée à la matière organique.

Protocole expérimentale

On pèse 1g de sol sec (tamisé 2 mm) dans des tubes de centrifugeuse (50 ml). Puis, on ajoute d'une façon séquentielle les différentes solutions d'extraction (Tableau 9). Après chaque étape d'extraction, on centrifuge l'échantillon à 8000 x g pour une durée de 15 minutes. L'As dans les extraits est ensuite analysé par ICP-OES.

Tableau 9 : procédure d'extraction séquentielle de l'As d'après les travaux de Wenzel et al. (2001) et Tessier et al. (1979)

Fraction	**Solutions d'extraction**	**Conditions d'extraction**	**SSR**	**Rinçage**
F1	$(NH_4)_2SO_4(0.05M)$	4 h d'agitation, 20°C	1 :25	
F2	$(NH_4)H_2PO_4(0.05M)$	16 h d'agitation, 20°C	1 :25	
F3	Oxalate d'ammonium (0.2 M) ; pH 3.25	4 h d'agitation dans le noir, 20°C	1 :25	Oxalate d'ammonium (0.2 M) ; pH 3.25 SSR 1 :12.5 ; 10 min. d'agitation à l'obscurité
F4	Oxalate d'ammonium (0.2 M) ; + acide ascorbique (0.1 M) pH 3.25	30 min. dans un bassin d'eau à 96 ± 3°C à la lumière	1 :25	Oxalate d'ammonium (0.2 M) ; pH 3.25 SSR 1 :12.5 ; 10 min. d'agitation à l'obscurité
F5	HNO_3 (0,02 mol.L^{-1}) H_2O_2 (30 %, pH = 2 avec HNO_3)	2 h, bain-marie à 85 ± 2°C	1 : 3 (HNO_3) et 1: 5 (H_2O_2)	
	H_2O_2 (30 %, pH= 2)	3 h bain-marie à 85± 2°C	1 : 3	
	CH_3COONH_4 (3,2 mol.L^{-1} dans HNO_3 20%	30 min. d'agitation	1:5 + eau UP pour volume final de 20 mL	Eau UP ; SSR 1 : 8 ; 10 min.
F6	HF	48 h. sur la plaque chauffante à env. 140°C	1 :3	

Résultats et discussion

La figure 8 et le tableau 10 montrent les teneurs moyennes d'As (mg kg^{-1}) et l'erreur standard (6 réplicats) des différentes fractions d'As présentes.

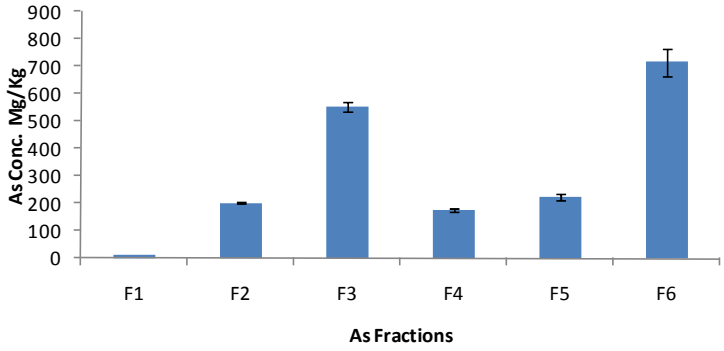


Figure 8 : teneur moyenne en As (mg/Kg) dans les différentes fractions de sol. F1 : fraction non spécifiquement adsorbée, F2 : fraction spécifiquement non adsorbée, F3 : fraction liée aux oxydes et hydroxydes de Fe et d'Al amorphes, F4 : fraction liée aux oxydes et hydroxydes de Fe et d'Al cristallins, F5 : fraction liée à la matière organique, F6 : fraction résiduelle. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne (6 réplicats)

Tableau 10 : teneur moyenne de l'As dans les différentes fractions de sol et le taux d'extraction

Fract. d'As	Conc. (mg kg-1)
F1	9.26 ± 0.16
F2	200.6 ± 3.13
F3	554.12 ± 16.58
F4	177.27 ± 7.54
F5	223.94 ± 13.37
F6	715 ± 48.31
FT	1880.31
As T	1498 ± 2.45
% Extraction	125

Les résultats montrent que l'As est surtout présent sous sa forme résiduelle (fraction non disponible et liée aux argiles, silicates et/ou sous forme de minéraux arséniés comme les arsénopyrites). Une part aussi importante d'As est adsorbée aux (oxy) hydroxydes de Fe et d'Al amorphes. La légère surestimation (+ 25 %) de l'extraction obtenue peut être expliquée par les problèmes d'hétérogénéité des échantillons prélevés d'une part et aussi aux problèmes inhérents à la procédure d'extraction chimique d'autre part (Wenzel et al., 2001).

III.Etude de la spéciation minéralogique de l'As par la microscopie électronique à balayage (MEB-EDS)

III.1. Procédure de préparation de l'échantillon pour l'analyse minéralogique

5 g de sol sec tamisé à 125 µm ont été mélangés avec 50 mL de Bromoforme dans des ampoules à décantation (125 mL). On laisse décanter pendant 24 heures. Les particules de sols sont donc séparées en deux phases en fonction de leur densité (fraction plus dense que le Bromoforme d > 2.81 et fraction moins dense d < 2.81). Plusieurs éléments ont été analysés dans les deux phases par ICP-OES. Il s'agit de l'As, l'oxyde d'Al, de Fe, de Mn et de Ca (Figure 9). De plus, Le Soufre total (S) a été aussi dosé par l'Analyseur Elémentaire, grâce à un doseur Soufre-Carbone. Cet appareil utilise une méthode qui fonctionne par titrage du dioxyde de soufre (SO_2) après vaporisation du soufre dans un four à induction sous flux d'oxygène.

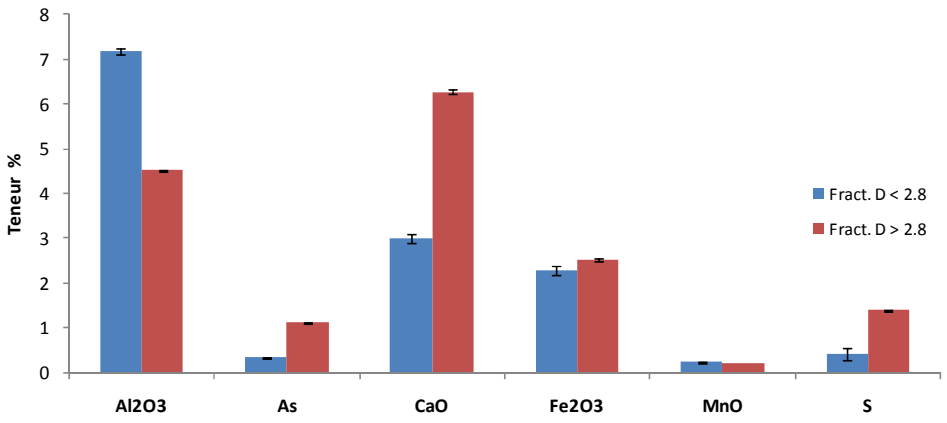


Figure 9 : teneur en As, S, Oxydes d'Al, de Fe, de Mn et de Ca (%) dans les deux fractions D<2.8 et D>2.8. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de chaque mesure (3 réplicats).

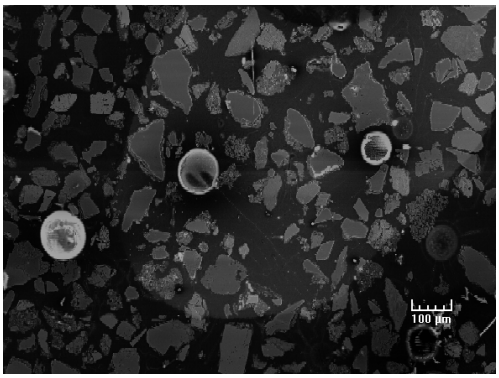
La fig.2 montre que la fraction la plus dense présente des teneurs en As, S, oxydes de Ca et de Fe supérieures à la fraction la moins dense. La fraction du sol la plus concentrée en As est donc retenue pour la suite de l'analyse de spéciation.

III.2. Inclusion de l'échantillon dans la résine

Avant le passage au MEB, on incorpore la fraction dense de l'échantillon de sol dans la résine selon la procédure suivante : dans un moule préalablement graissé, on ajoute 1.5 ml d'un produit durcisseur et on complète avec la résine afin d'obtenir un volume totale de 5 ml. On verse un peu de la poudre de sol et on laisse décanter et sécher pendant 48 h. L'échantillon obtenu a été ensuite poli et métallisé avec du carbone.

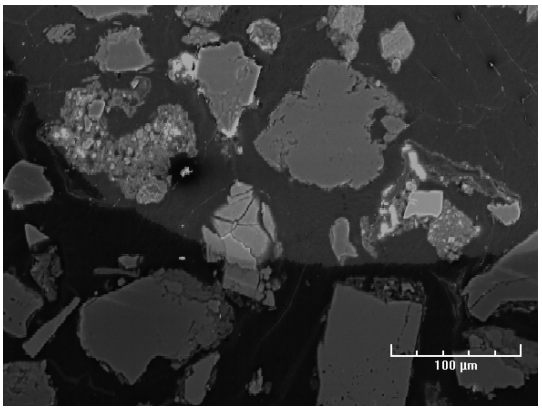
III.3. Microscopie électronique à balayage

Par rapport à la microscopie optique classique, la microscopie électronique à balayage (M.E.B.) permet d'obtenir à fort grossissement des images contrastées en fonction de la masse atomique des éléments constituants les phases minérales, et de réaliser sur de très faibles volumes (quelques μm^3) des analyses chimiques qualitatives ponctuelles à l'aide d'un détecteur EDS (Energy Dispersive Spectrum). Le fonctionnement du MEB est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. La détection d'électrons rétrodiffusés (BS) est sélectionnée car la quantité mesurée d'électrons rétrodiffusés dépend de la densité du matériau. Les zones riches en éléments lourds apparaissent brillantes et celles riches en éléments légers sont plus foncées. L'échantillon a été observé au MEB-EDS (modèle JOEL 6400).
Des microanalyses (analyse ponctuelle ou cartographie de répartition élémentaires) ont été réalisées sur les échantillons inclus dans la résine. Les images obtenues au MEB en détection d'électrons rétrodiffusés (MEB-BSE) (Figure 10 et 11) ainsi que les spectres EDS (Figure 12) sont présentées ci-dessous.



Note : image MEB-BSE obtenus à un grossissement 'x 100'

Figure 10 : MEB-BSE de la poudre de sol (100X)



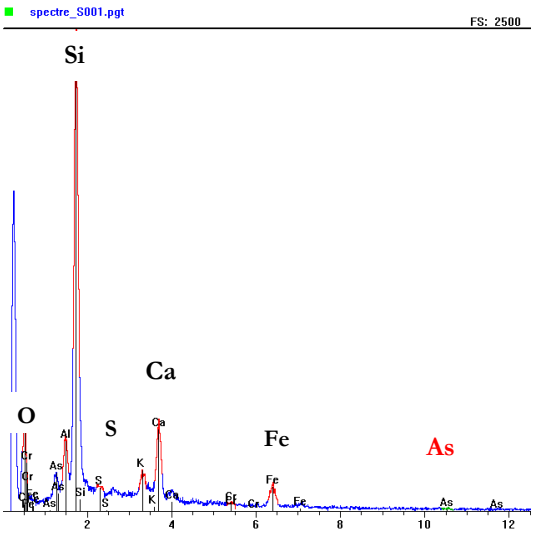


Figure 11 MEB-BSE de la poudre de sol (300 X)

Figure 12 : spectre EDS de la poudre de sol

Note : image MEB-BSE obtenus à un grossissement 'x 300'. Cette image permet d'identifier des zones brillantes qui sont susceptibles de contenir les phases principales de l'As

Note : les spectres EDS obtenus indiquent que les éléments suivants : O, Si, S, Ca, Fe et As sont répartis dans cette zone

Une cartographie de répartition élémentaire a été élaborée afin de visualiser les principales zones de répartition de l'As et des autres éléments (Fig.13: O, Al, Si, S, K, Ca, Cr, Fe, As).

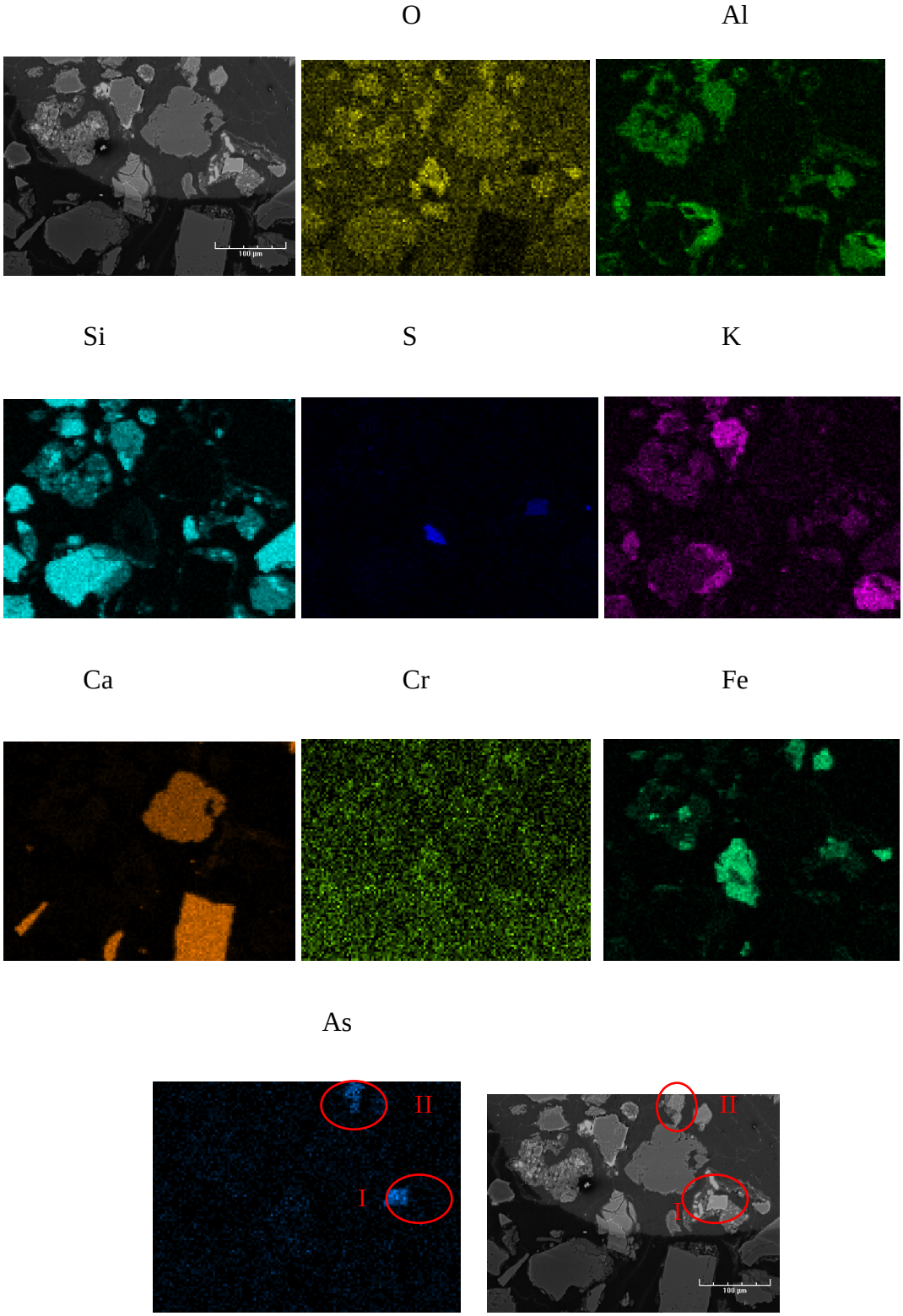


Figure 13 : cartographie de répartition de l'As, l'O, l'Al, le Si, le S, le K, le Ca, le Cr et le Fe dans la zone étudiée.

Cette observation montre que l'As est concentré dans des zones bien définies (Fig.13). Pour prolonger au-delà les résultats de cette partie, on s'est focalisé exclusivement sur les deux sous-zones contenant de l'As (I et II dans la fig.13). La cartographie de répartition élémentaire (750X) a été de nouveau réalisée au niveau de la « sous –zone I ». Les images MEB-BSE obtenues sont illustrées dans la figure 14.

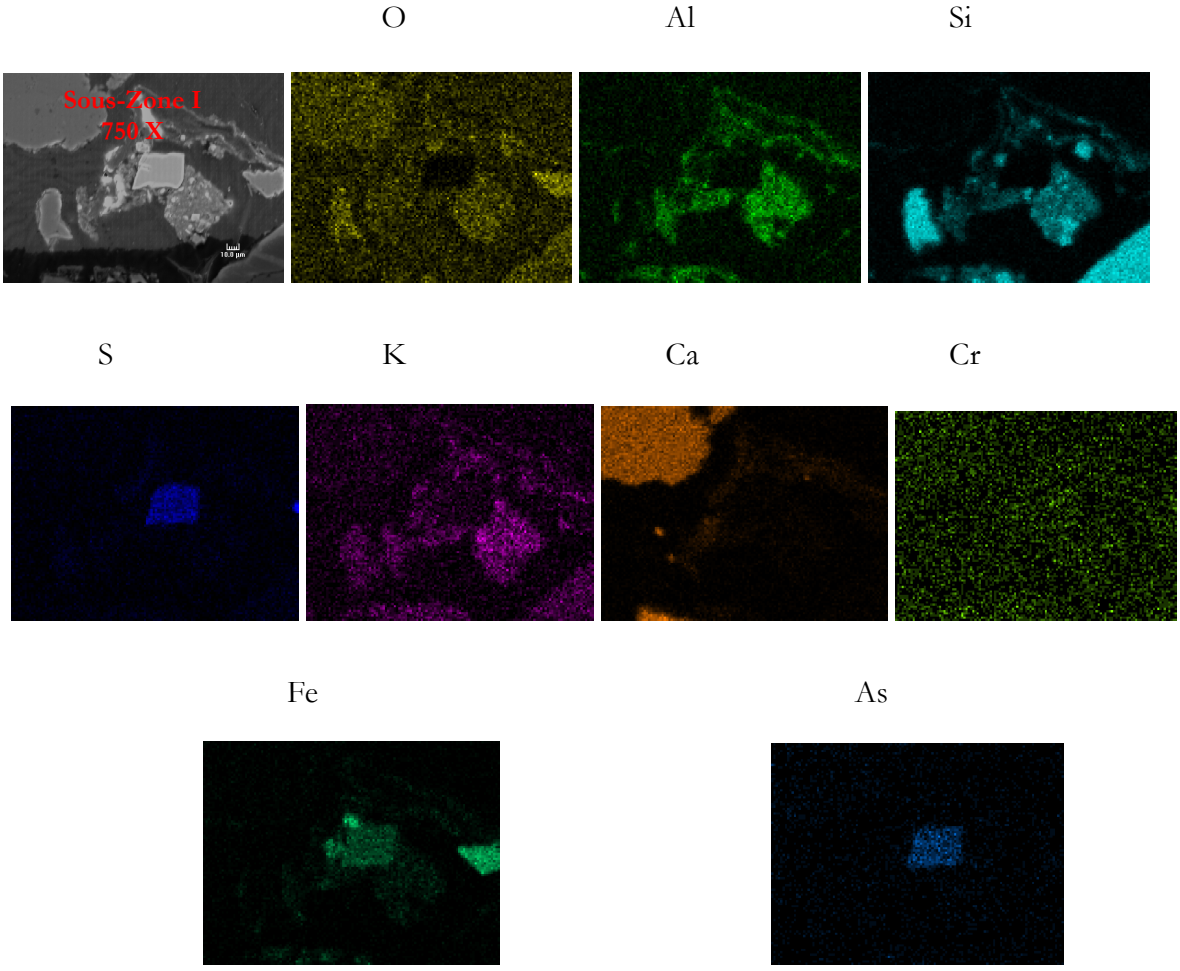


Figure 14 : cartographie de répartition de l'As, l'O, l'Al, le Si, le S, le K, le Ca, le Cr et le Fe **dans la sous-zone I**

La cartographie de répartition élémentaire montre que l'As, le S et le Fe se chevauchent approximativement au même endroit (Figure 14). De plus, la microanalyse élémentaire ponctuelle (3 points, voir figure 15) indique que ces éléments sont bien liés ensemble au niveau de cette zone d'étude. Ce résultat suggère la présence de minéraux arséniés primaires issus de l'altération de la roche mère comme l'arsénopyrite « FeAsS ».

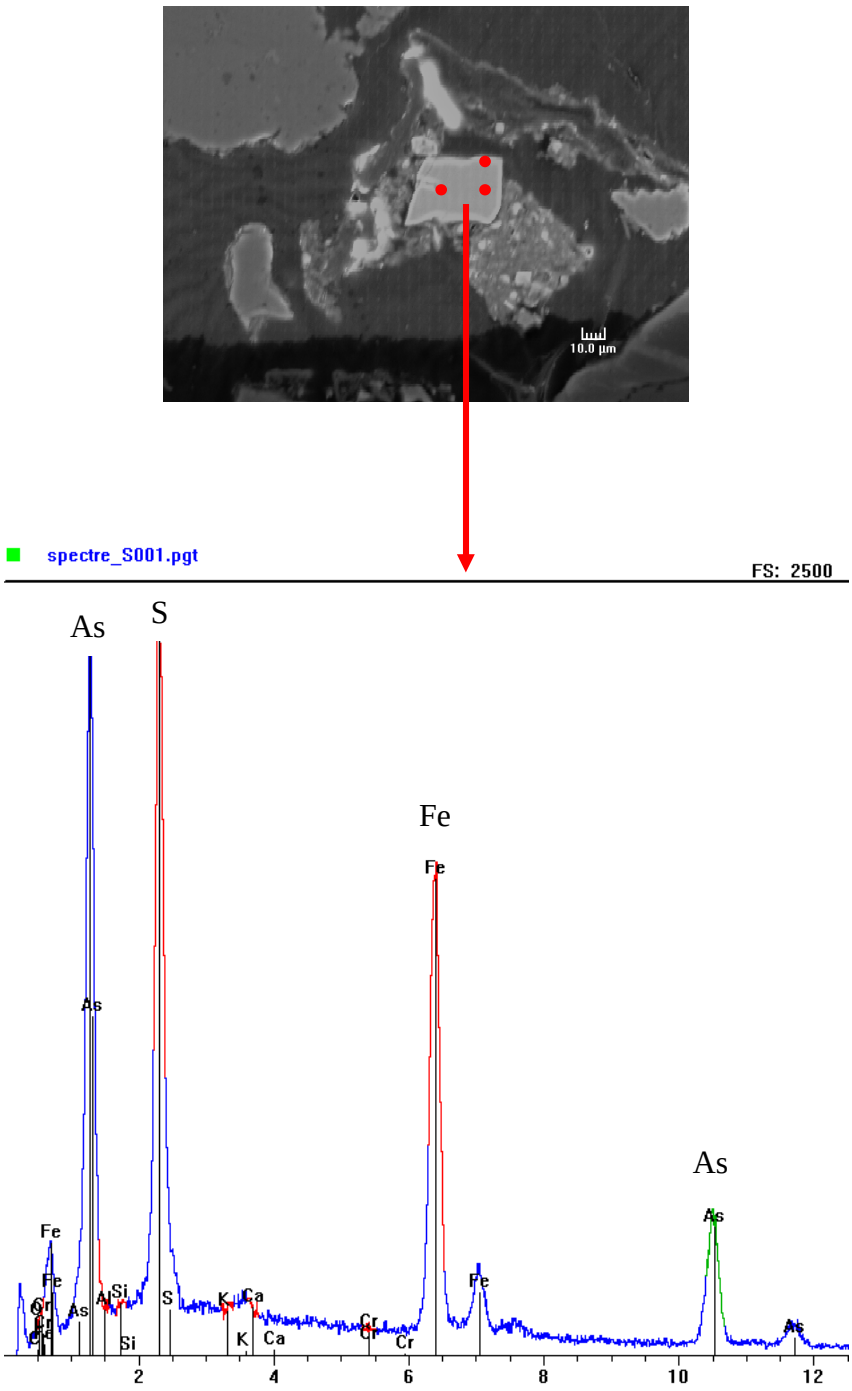


Figure 15 : spectre EDS obtenu par l'analyse ponctuelle (3 points) au niveau de la sous-zone I

D'autre part, la même stratégie d'étude a été élaborée au niveau de la « sous-zone II ».

Une cartographie de répartition élémentaire (750X) est aussi réalisée. Les images MEB-BSE obtenues sont présentées dans la figure 16.

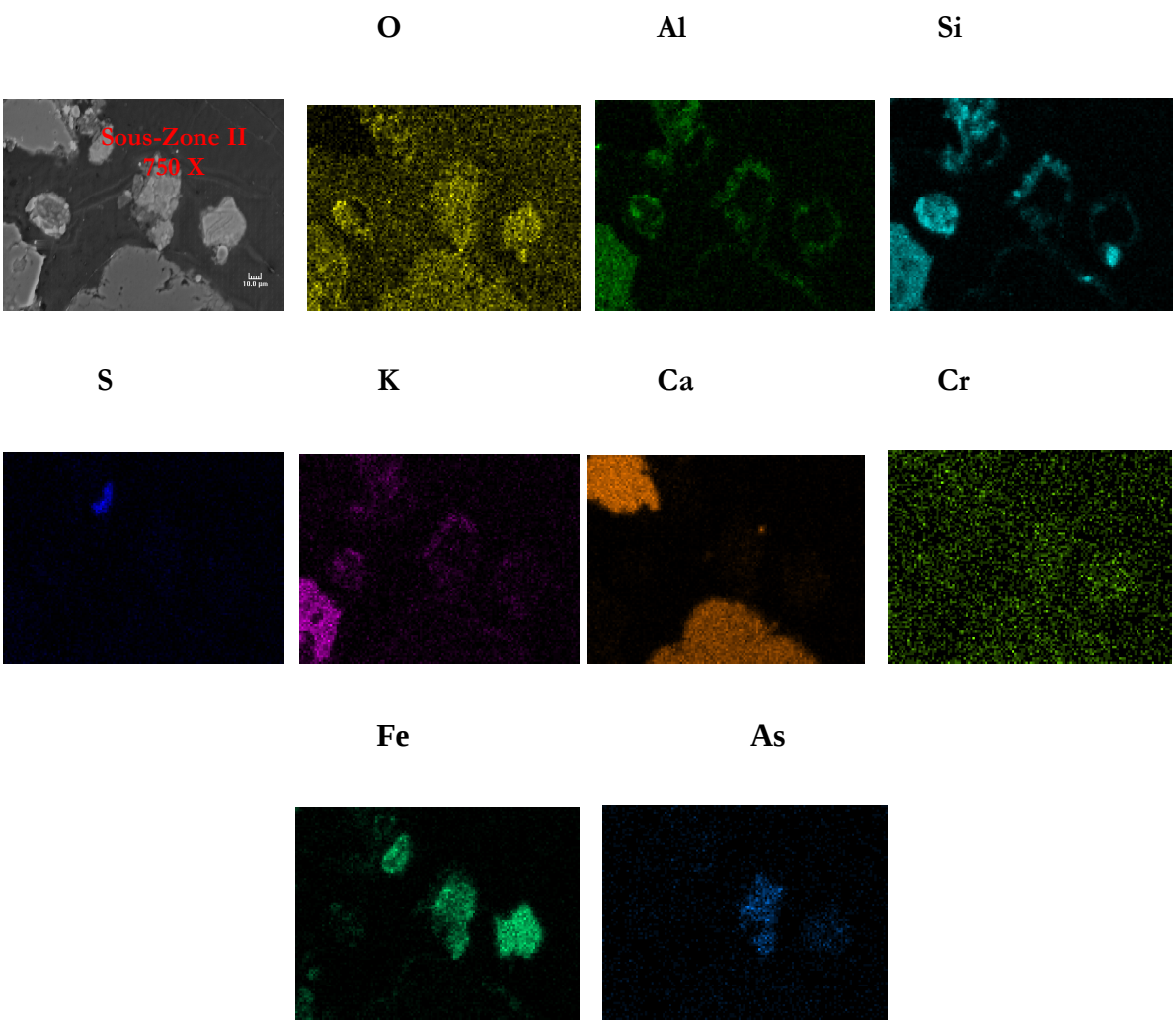


Figure 16 : cartographie de répartition de l'As, l'O, l'Al, le Si, le S, le K, le Ca, le Cr et le Fe dans la sous-zone II

La microanalyse élémentaire ponctuelle (3 points, Fig.17) montre que l'As, le Fe et l'O se chevauchent au niveau de la sous-zone II. Une légère présence de Ca est décelée. Ce résultat suggère la présence des oxydes de Fe et/ou de Ca associés à l'As.

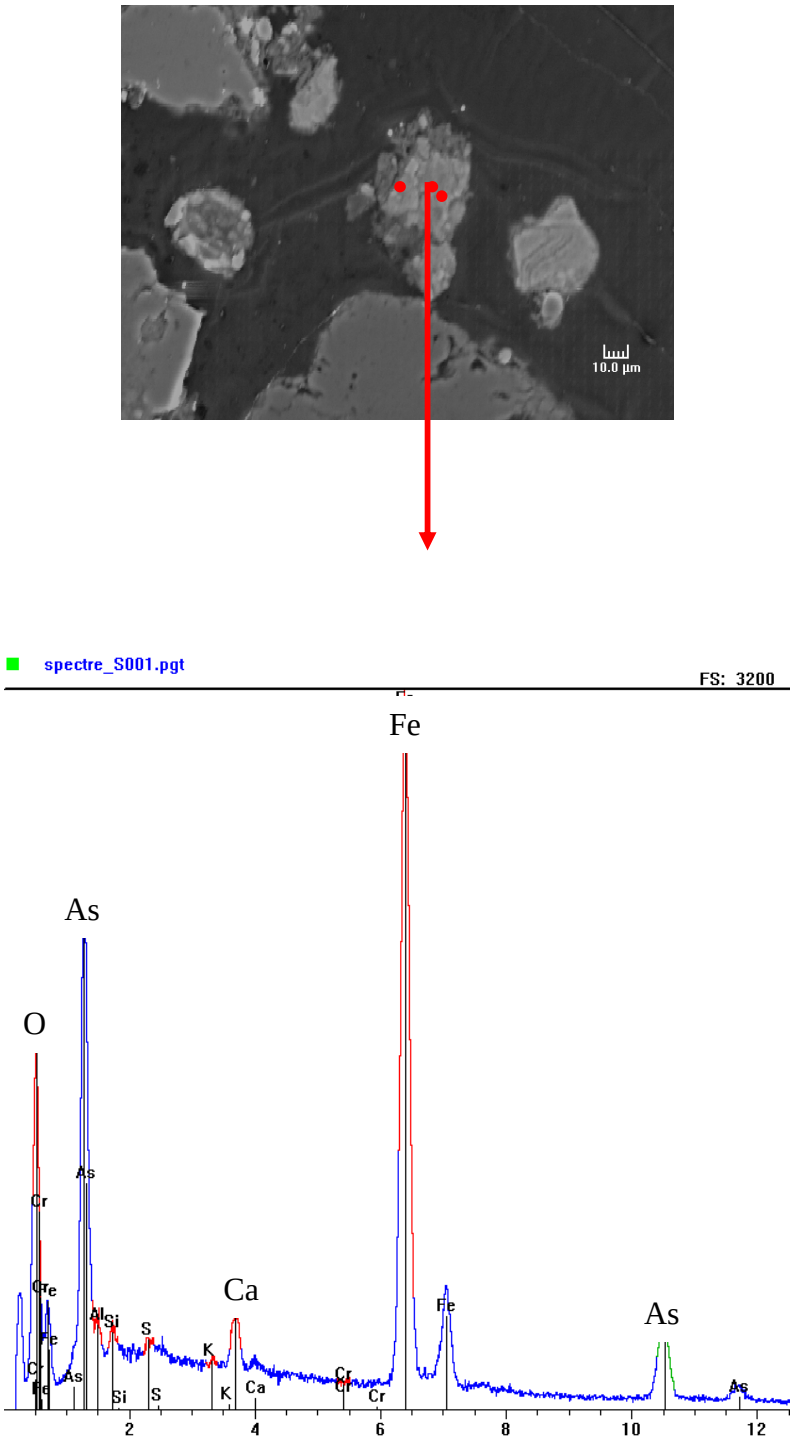


Figure 17 : spectre EDS obtenu par l'analyse ponctuelle (3 points) au niveau de la sous-zone II.

CHAPITRE IV LA MOBILITE DE L'ARSENIC DANS LA SOLUTION RHIZOSPHERIQUE DE QUATRE ESPECES EN RELATION AVEC L'ACQUISITION DES ELEMENTS NUTRITIFS ET LE CARBONE ORGANIQUE DISSOUS

CHAPITRE IV ARSENIC MOBILIZATION IN RHIZOSPHERE SOLUTION OF FOUR PLANT SPECIES IN RELATION TO NUTRIENT AVAILABILITY AND DISSOLVED ORGANIC CARBON

Carole Obeidy[1] - Jean-Luc Bouchardon[1] - Bernard Guy[1] - Olivier Faure[1&2]

[1]Laboratoire de Géochimie, ENvironnement, Ecoulements, Réacteurs Industriels et Cristallisation (GENERIC), Ecole Nationale Supérieure des Mines, 158 Cours Fauriel, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France ; [2]PRES de l'Université de Lyon, Université Jean Monnet, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France

Keywords: Soil**,** Metal contamination, bioavailability, phytostabilization

Abstract We investigated the dynamic patterns of arsenic (As) concentration in rhizosphere solution and its relation with nutrient availability and dissolved organic carbon (DOC). Four plant species (*Holcus lanatus*, *Dittrichia viscosa*, *Lotus corniculatus*, *Plantago lanceolata*) were cultivated for 90 days in a natural soil containing a high As level (1935 mg kg^{-1}). Arsenic concentration in rhizosphere solution increased significantly ($p<<0.01$) whatever the studied species. This increase in soluble As during plant growth was strongly correlated to a decrease in the $(NH_4)_2SO_4$-As fraction concentration, but also to a decrease in NO_3^- and an increase in Fe concentrations in soil water. Moreover plant growth led to significant increase in pH and to a decrease in dissolved organic carbon concentration in the soil solution. This suggested that the uptake of NO_3^- led to an increase in pH, promoting the desorption of the weakly bound As fraction. In addition, the increase in soluble Fe indicated a partial dissolution of Fe oxydes and hydroxides which could result in the leakage of the As pool linked to these minerals. Taken together these results led to the conclusion that displacement of As equilibriums in soil was a side-effect of processes involved in plant nutrition and was an integral feature of plant growth and development on As contaminated soils.

Introduction

Arsenic (As) is a trace element of great public concerns due to its high toxicity and ubiquity. Superficial soils in many regions of the world have been contaminated with As mainly by anthropogenic activities including coal and metal mining, sewage, phosphate fertilizers, pesticides, wood preservatives and paints. However, high concentrations of As are also recorded in natural soils and sediments that are derived from As-rich mineralized rocks (Adriano 2001). These high As concentrations may generate high As levels in water systems exceeding largely the WHO drinking water guideline value of 10 $\mu g\ l^{-1}$ (WHO 2001).

Traditional technologies available for cleaning As contaminated soils are usually expensive, labor intensive and may produce severe disturbance to the soil. More recently, the use of plant based bioremediation technologies collectively termed as phytoremediation, has appeared as an attractive alternative in the removal (phytoextraction) or immobilization (phytostabilisation) of excess contaminant from soil and water (Cunningham et al. 1995). The greatest advantage of phytoremediation compared to convential methods of remediation is

reduced cost (Baldwin et al. 2007) and soil preservation. The recent researches on the As hyperaccumulator *Pteris vittata* (Wang et al. 2002; Ma et al. 2001; Luongo and Ma 2005) and As tolerant species such as *Holcus lanatus* (Meharg and Macnair 1990; 1992a,b; Quaghebeur and Rengel 2003; Raab et al. 2004) are a major steps towards the emergence of phytoremediation of As-contaminated soils.

The rhizosphere is characterized by highly dynamic interactions between various environmental parameters (such as pH, plant nutritional status, redox potential Eh…) at the soil–root interface. These interactions are deemed to play a key role in controlling bioavailability of mineral nutrients to developing plants (Marshner 1995). Arsenic mobilization in rhizosphere soil in relation with plant nutrients uptake and rhizodeposition process has yet not been sufficiently explored. A better understanding of various mechanisms involved in As transformation in soil-rhizosphere-plant system may accelerate implementation of phytoremediation technologies in As soil remediation procedures.

Root-induced changes in rhizosphere pH as related to plant nutritional status (e.g. Fe and P deficiency) and the source of nitrogen supply (NO_3^- or NH_4^+) have been previously reported (Hinsinger 1998; Loosemore et al. 2004; Pushenreiter et al. 2005; Devau et al. 2009; Chaignon et al. 2009; Bravin et al. 2009). An increase or decrease of rhizosphere pH could affect mobilization of labile and exchangeable As^V fractions in the root vicinity and consequently enhance plant uptake or conversely As^V sorption in soils (Fitz and Wenzel 2002; Szegedi et al. 2010).

Nitrogen nutrition greatly affects rhizosphere pH as it is most responsible for unbalanced cation/anion uptake ratio at the soil–root interface (Marshner 1995; Hinsinger 2001; Hinsinger et al. 2003). Hence NO_3^- supply as N source for fertilization of plants grown on As contaminated soil could potentially increase rhizosphere pH, and thus possibly enhance As accumulation in plant tissues (Fitz and Wenzel 2002).

On the other hand, it has been reported that P-deficient plants show an enhanced secretion of protons H^+ and root exudates such as citrate and malate (Hoffland 1992; Jones 1994; Jones 1998; Kirk et al. 1999; Hinsinger 2001; Shen et al. 2005; Johnson and Loeppert 2006). This response may lead to a highly localized acidification even in calcareous soil and to metal complexation (i.e. chelation of Ca, Fe and Al with organic acids) in order to solubilize P from Ca-P precipitates and from sorption sites (Fe and Al oxyhydroxydes). Furthermore, organic anions may enhance competition with P for adsorption onto Fe and Al oxyhydroxydes (Jones 1994; Hinsinger 2001). Due to the physicochemical similarity between P and As in aerobic soils, it is reasonable to assume that soluble rhizodeposits could also play a role in the mobilization of As in the rhizosphere and enhance As uptake (Szegedi et al. 2008; 2010).

Changes in As mobilization and its uptake by roots are also related to the identity of plant species. For instance, the hyperaccumulator *P. vittata* may enhance its capacity to acquire more As by inducing rhizosphere alkalization and by the secretion of soluble rhizodeposits (Silva Gonzaga et al. 2006). Furthermore, for the well known As tolerant species *H. lanatus*, the low As root uptake may be related to both adaptive and constitutive tolerance through the suppression of the high-affinity phosphate uptake system and phytochelatin production (Hartley- Whitaker et al. 2001).

Thus, in the present work we studied the effect of four plant species on As mobilization in soil, and its relation with changes in pH, mineral nutrients and dissolved organic carbon (DOC) concentrations during growth and development. The main objectives were to determine (*i*) whether the presence of plant may promote As displacement toward the soil solution and (*ii*) whether different plant species had different impact on As mobilization.

Materials and Methods

Soil material

The soil used in this study was taken from the topsoil (0-20 cm depth) of an As-rich soil developed from Devonian limestones, located at the Salsigne Au-mining area in the Aude department, France. Collected soil was air-dried, sieved at 5 mm and homogenized by a mechanical mixer to adjust for the effect of local heterogeneity in the field. Soil physicochemical characteristics (Table 5) were determined according to standardized French (NF) and international (ISO) procedures.

Table 5 : selected properties of the soil used in this study

Property	Value
Clay[a] (g kg^{-1})	377
Silt[a] (g kg^{-1})	372
Sand[a] (g kg^{-1})	251
Organic matter content[b] (g kg^{-1})	60
Total $CaCO_3$[c] (g kg^{-1})	6
CEC[d] (cmol(+) kg^{-1})	21
pH H_2O[e]	7.7
Total-P[f] (mg kg^{-1})	218
Total-As[f] (mg kg^{-1})	1935

[a] according to NF X 31-107, [b] according to NF ISO 14235, [c] according to NF X 10693, [d] according to NF X 31-130, [e] according to NF ISO 10930, [f] Determined by ICP-OES, see Materials and Methods

Plant material and experimental design

Four plant species belonging to different families were used: *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter (*Asteraceae*), *Plantago lanceolata* L. (*Plantaginaceae*), *Lotus corniculatus* L. (*Fabaceae*) and *Holcus lanatus* L. (*Poaceae*). All plants were common species at the site where the soil was taken except *H. lanatus* which was chosen for its As tolerance characteristics.

To allow sampling of the rhizosphere solution cultures were performed using a "rhizopot-rhizon" system. The bottom of each pot (10.5 cm in height and 13 cm in diameter) was covered with a 15 μm polyamide mesh in order to prevent roots growth through the drainage holes. Two Rhizon Flex® soil moister samplers (Eijkelkamp Agrisearch Equipment, The Netherland) were placed approximately 1.5 cm above the bottom of each rhizopot. Each pot was filled with 900 g of soil and watered up to 70 % of the water holding capacity. Cultures were conducted in a growth chamber at 25 ± 2°C under a 16:8 (L:D) photoperiod (3 × 1000 W iodide lamp). There were 15 seedlings of *D. viscosa*, 25 of *P. lanceolata*, 30 of *H. lanatus* and 30 of *L. corniculatus* per rhizopot. Plants were grown during three months, with 4 replicates by plant

species. Control pots were prepared in the same way but without plants. During the overall vegetative growing period, the pots were weighed daily and hand-watered to maintain 70% water holding capacity.

Extraction and analysis of the soil solution

In the following, soil solutions collected from sowed and control pots will be respectively named rhizosphere soil solution and control soil solution. Sampling of soil solutions started after one month of culture and was performed every 15 days until the end of the experiment (90 days). Soil solution was extracted through the two rhizon samplers (6-10 ml per rhizon) 6 hours after the daily watering. Element (As, Mn, Fe, P, Ca and Mg) concentrations were measured by inductively coupled optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Jobin-Yvon "Horiba" apparatus. The limits of detection were 10, 10, 1, 10, 5 and 50 µg l^{-1} for As, Mn, Fe, P, Ca and Mg, respectively. Inorganic anions (NO_3^- and SO_4^{2-}) concentrations were measured using ion chromatography (Dionex system DX-500 with GP50 pump, conductivity detector CD20, autosampler AS40, AS 11-HC column, suppressor ASRS300, eluant: sodium hydroxide (1 to 60 mM, flow: 1.5 ml min^{-1}). DOC was measured as non-purgeable organic carbon with a total organic carbon analyzer (TOC-V_{CPH}, auto-sampler ASI-V, Shimadzu, Japan). The pH in the soil solution was measured using a CONSORT C832 electrode.

Soil analysis

At the end of the experiment, the rhizosphere (defined as the soil attached to the root system) was collected, air-dried and sieved at 2 mm. Soils in unplanted pots were also sampled and treated in the same way. Single-step chemical extraction adapted from the sequential procedure of Wenzel et al. (2001a) was then carried out on each sample in order to quantify the "readily bioavailable" As and P pool. For this purpose, 1g soil was mixed with 25 ml $(NH_4)_2SO_4$ (0.05M), shaken at 20°C for 4 h and centrifuged for 15 minutes at 8,000 x *g*. Arsenic concentrations in soil extracts were measured by ICP-OES.

Plant analysis

Plant shoots were collected after 3 months of growth and rinsed with deionized water whereas roots were not preleved due to problems related to soil compaction conditions. The samples were than air-dried, weighed and ground to pass through a 2 mm sieve. They were digested in hot concentrated HNO_3 according to Zarcinas et al. (1987). Arsenic and P were then measured by ICP-OES. Blanks and tobacco standard material (CTA-VTL-2, WARSAW, Poland) were used for quality control.

Statistical analysis

One–way ANOVA were performed in order to assess the dynamic evolution of the variables monitored in the soil solutions (As, Fe, Mg, Ca, P, NO_3^-, SO_4^{2-}, DOC and pH). When necessary, post-hoc tests (Tukey's paired difference test) were used for multiple comparisons of means between two defined sampling dates. The selected sampling dates for statistical comparisons were the beginning (T1) and the end of sampling period (T5), corresponding to 30

and 90 days-old plants. One–way ANOVA were also used to test the "species effect" (identity of plant species) on the variables at T1, T5 and on those measured in plant shoots after the harvest. Multiple comparisons of means were also conducted to detect significant differences between rhizosphere and control soil solutions. For all statistical tests, differences were considered significant at $p<0.01$.

In order to observe whether or not there are some differences between species pattern and to visualize potential relationships between As and the other parameters monitored in soil solutions, principal component analysis (PCA) and simple linear regressions were performed for the 80 rhizosphere solutions samples ($4_{species}$ X $5_{sampling\ dates}$ X $4_{replicates}$). Kendall's tau (τ) coefficients were determined and correlations were considered significant at $p<0.01$.

All statistical analyses were performed using Matlab software (version 7.7.0.473 - R2008b- The Mathworks, Inc., U.S. patents).

Results

Changes in rhizosphere solutions during plant growth

The evolution of element concentration, pH and DOC in control soil and rhizosphere solutions during the culture period is shown in Fig. 3 and 4.

In the unplanted condition, As concentration in the soil solution (Fig. 3a) remained stable during the overall experimental period ($p=0.21$) while it significantly increased in the presence of plants ($p<0.01$). This increase in soluble As was not species dependant ($p=0.39$) and, at the end of the culture period, the concentrations of As in rhizosphere solutions were significantly higher than in the control ($p<0.01$).

Fe concentrations (Fig. 3b) in both control soil and rhizosphere solutions increased during the time course of the experiment. These increases were significant for control, *D. viscosa* and *L. corniculatus* ($p<0.01$) but not for *H. lanatus* ($p=0.03$) and *P. lanceolata* ($p=0.22$). The highest increases in Fe concentrations were observed in the unplanted pots and, at the end of the culture period, Fe concentration in control soil solution was significantly higher ($p<0.01$) than in rhizosphere soil solutions.

Concentrations in Ca, Mg, NO_3^- and SO_4^{2-} (Fig.3c, d, e and f) showed a quite different trend. In the unplanted pots, they significantly increased ($p<0.01$) while they drastically decreased ($p<0.01$) in rhizosphere soil solutions of all plant species. An important point to note is that P concentration in both control and rhizosphere solutions, was not detectable at all sampling dates.

The pattern of DOC appeared more complex (Fig. 4a). In the unplanted pots, DOC concentration increased slightly but this was not significant ($p=0.4$). Likewise, in the presence of plants, DOC concentration in rhizosphere soil solutions slightly decreased during the time course of the experiment, but this decrease was not significant at the probability level ($p<0.01$) retained in this study ($p = 0.02$ for *D. viscosa*, $p = 0.05$ for *L. corniculatus,* $p = 0.09$ for *P. lanceolata* and $p = 0.05$ for *H. lanatus*). However, at the end of the experiment DOC concentration in control soil solution was significantly higher than in rhizosphere solutions for all tested species but *H. lanatus* ($p=0.09$).

pH values in control solutions (Fig. 2b) decreased from about 7.7 to 7.3. At the opposite in the same time it increased to about 8.1 in rhizosphere solutions. At the end of the culture period, difference in pH values between unplanted and planted conditions were highly significant ($p<0.01$) but were not species-dependant ($p=0.19$).

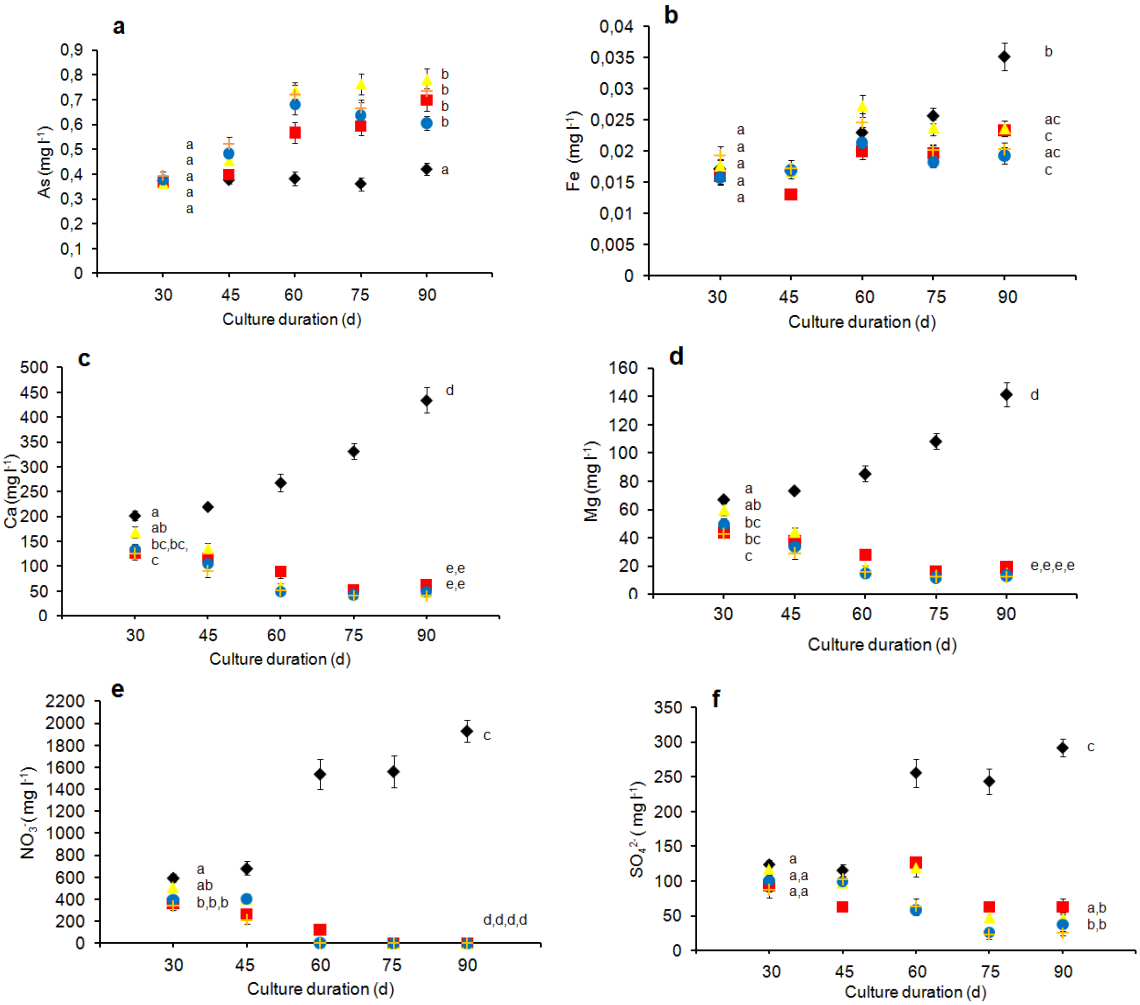


Fig. 3 : evolution of As (a), Fe (b), Ca (c), Mg (d), NO_3^- (e) and SO_4^{2-}(f) in control and rhizosphere solution of four plant species during a 90 days cultivation period on As contaminated soil (◆Control; ■ *H. lanatus*; ▲: *D. viscosa*; ●: *L. corniculatus*; +: *P. lanceolata*). Error bars show the standard error of the mean (n=4). Letter codes denote significant difference (Tukey test, $p< 0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different.

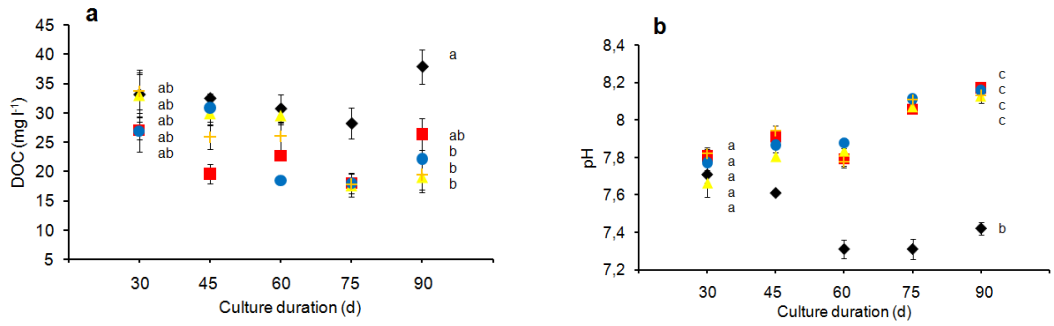


Fig. 4 : evolution of DOC (a) and pH (b) in control (c) and rhizosphere solution of four plant species during a 90 days cultivation period on As contaminated soil (◆Control; ■: *H. lanatus*; ▲: *D. viscosa*; ●: *L. corniculatus*; +: *P. lanceolata*). Error bars show the standard error of the mean (n=4). Letter codes denote significant difference (Tukey test, $p < 0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different.

Relationships between Arsenic, mineral nutrients (Ca, Mg, NO_3^-, SO_4^{2-}, Fe), DOC concentrations and pH in rhizosphere and control solution

To go a step further in the understanding of factors involved in As mobilization, we performed a correlation study between As concentrations in soil solutions and the other measured parameters (Ca, Mg, NO_3^-, SO_4^{2-}, Fe, DOC and pH). In a first approach, we performed a principal components analysis (PCA) on a total of 80 observations (4_{species} X $5_{\text{sampling dates}}$ X $4_{\text{replicates}}$). The percentage of the total variance explained by the two first principal components was 81.6% (Fig. 5a and b). The principal plan plot showed two distinct clusters (Fig. 5a). Cluster 1 contained rhizosphere samples from the T1 and T2 sampling dates. Cluster 2 included rhizosphere solution samples from T3, T4 and T5 sampling dates. The 1-Axis was essentially determined by NO_3^-, Mg, and Ca with PCA correlation coefficients–1-Axis of 0.95, 0.94 and 0.95 respectively and the 2-Axis by Fe with PCA correlation coefficients–2-Axis of -0.9 (Fig. 5a). These observations became clearer when calculating the Kendall's tau (τ) correlation coefficient between variables and testing the significance level at $p<0.01$ (Table 6). Results showed that whatever the studied species, As in rhizosphere solution was significantly positively correlated with Fe (Fig. 6a, Table 6) and negatively correlated with NO_3^- (Fig. 4b, Table 6). A significant negative correlation was also identified for Mg (Fig. 6c, Table 6), except for *P. lanceolata* ($p = 0.04$). In addition, in the case of *D. viscosa* and *L. corniculatus*, As was significantly positively correlated with pH (Fig.6d, Table 6) and negatively correlated with DOC (Fig. 6e, Table 6). Furthermore, the table 7 shows significant negative correlation between pH and Ca, Mg, NO_3^- and SO_4^{2-} in both unplanted and planted conditions.

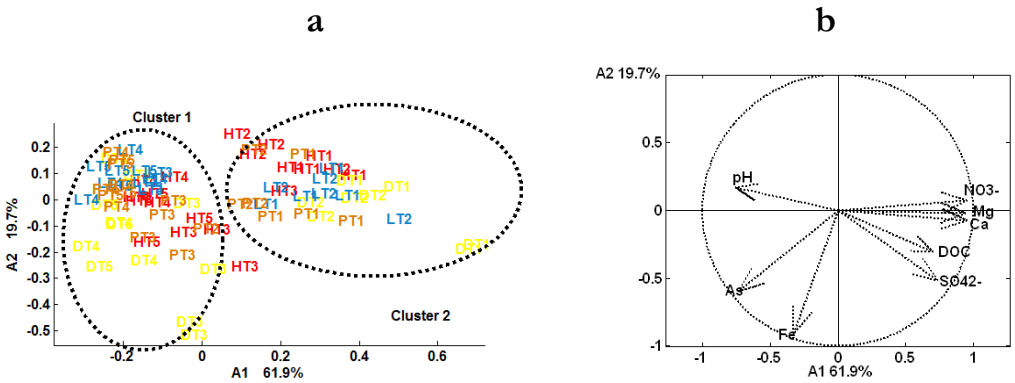


Fig. 5 : first principal plan of principal component analysis performed for As, Fe, Ca, NO_3^-, pH, SO_4^{2-}, Mg and DOC concentrations of the 80 rhizosphere solution samples. Representation of cluster groups on the first plan (a) and relationship between As and measured parameters (b) for the two first principal components (1-Axis versus 2-Axis). Rhizosphere solution samples were identified by the code "XTy" where "X" means H: *H. lanatus* (red), D*: D. viscosa* (yellow), L: *L. corniculatus* (blue) or P: *P. lanceolata* (orange) and "Ty" means T1, T2, T3, T4 and T5).

Table 6 : kendall's tau (τ) correlation coefficients between As and the other measured parameters (pH, DOC, Fe, Ca, Mg, NO_3^- and SO_4^{2-}) in control and rhizosphere solutions

Species	pH	DOC	Fe	Ca	Mg	NO_3^-	SO_4^{2-}
Control							
As	0.25	0.33	0.06	-0.25	-0.22	-0.27	-0.17
H. lanatus							
As	0.25	-0.02	0.66*	-0.44*	-0.48*	-0.50*	0.02
I. viscosa							
As	0.49*	-0.42*	0.61*	-0.37	-0.45*	-0.48*	-0.18
L. corniculatus							
As	0.45*	-0.51*	0.44*	-0.36	-0.45*	-0.49*	-0.53*
P. lanceolata							
As	0.2	-0.09	0.54*	-0.29	-0.34	-0.43*	-0.18

*indicate significant correlations at $p < 0.01$

Table 7 : kendall's tau (τ) correlation coefficients between pH and Ca, Mg, NO_3^- and SO_4^{2-} ions in control and rhizosphere solutions of all selected species

Treatments	Ca	Mg	NO_3^-	SO_4^{2-}
Control				
pH	-0.43*	-0.47*	-0.65*	-0.58*
Rhizopshere				
pH	-0.43*	-0.45*	-0.46*	-0.40*

*indicate significant correlations at $p < 0.01$

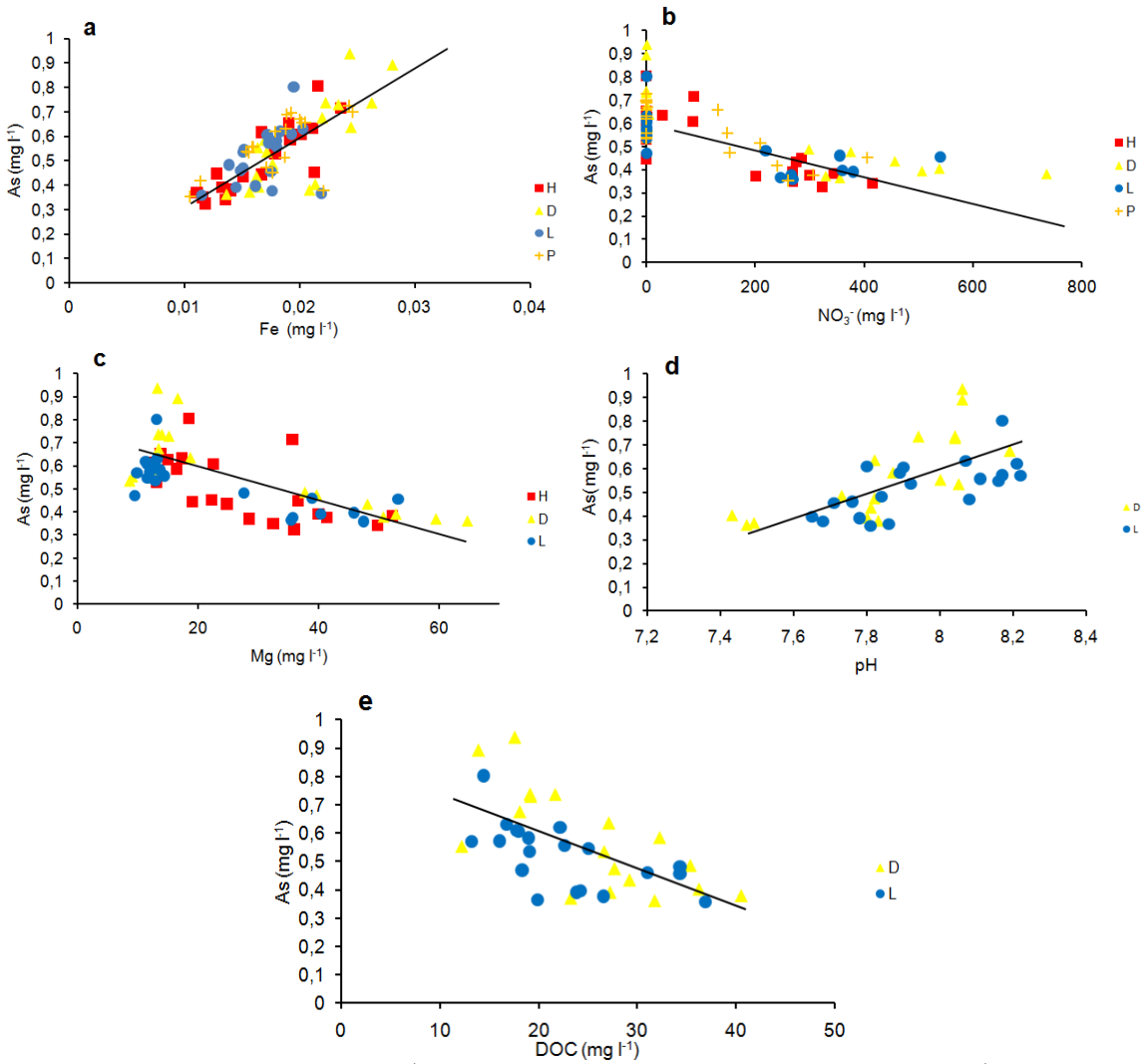


Fig. 6 : As concentration (mg L^{-1}) as a function of (a) Fe concentration (mg l^{-1}) for all studied species (r=0.76*) (: Control; : *H. lanatus*; : *D. viscosa*; : *L. corniculatus*; +: *P. lanceolata*), (b) NO_3^- concentration (mg l^{-1}) for all selected species (r=-0.72*), (c) Mg concentration (mg l^{-1}) for *H. lanatus*, *D. viscosa and L. corniculatus* (r=-0.67*), (d) pH value for *D. viscosa and L.corniculatus* (r=0.65*) and (e) DOC concentration (mg l^{-1}) for *D. viscosa and L. corniculatus* (r=-0.6**).**

Influence of plants on As and P soil bioavailability

The effects of plant on soil arsenic and P bioavailability were evaluated by measuring the non specifically bound As fraction (AsF1) and the P readily bioavailable pool at the end of the culture period. P analysis in soil water is considered a reliable tool for assessing P available to plants because plants take preferentially nutrients from soir water. Results showed (Table 8) that soil from planted pots presented lower As concentrations in comparison with control soil. These differences were significant for *H. lanatus*, *D. viscosa*, *P. lanceolata* ($p<0.01$) and not for *L. corniculatus* ($p=0.21$) whereas bioavailable P concentration was not detectable in both control and rhizosphere soil.

Table 8 : non specifically bound As fraction concentrations (mg kg^{-1}) and readily bioavailable P pool in the control and rhizosphere soil after 90 days of culture. Data are expressed as mean values ± SE (n=4). Letter codes denotes significant difference (Tukey test, $p<0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different

Species	AsF1 mg kg^{-1}	P mg kg^{-1}
Control	9.26 ± 0.16a	n.d.*
H. lanatus	7.28 ± 0.39b	n.d.
I. viscosa	8.01 ± 0.14bc	n.d.
L. corniculatus	8.86 ± 0.26ac	n.d.
P. lanceoata	7.66 ± 0.28b	n.d.

*n.d.: represented values of P concentration not detected in control and rhizosphere soil.

Plant As and P uptake

The production of shoots of *D. viscosa* and *P. lanceolata* was significantly higher ($p<0.01$) than that of *L. corniculatus* and *H. lanatus* (Table 9). After growing in an As-contaminated soil for 90 days, *H. lanatus* and *P. lanceolata* accumulated significantly ($p<0.01$) more As than *D. viscosa* and *L. corniculatus* ($p<0.01$). *D. viscosa* concentrated significantly ($p<0.01$) more P than *H. lanatus*, *L. corniculatus* and *P. lanceolata* (Table 9).

Table 9 : plant shoots biomass (dry weight) and As and P accumulation in the shoots of each species after 90 days of growth. Data are expressed as mean values ±SE of four replicates. Letter codes denote significant difference (Tukey test, $p<0.01$), i.e., values that share letters are not significantly different

Species	Shoots(g pot^{-1})	Elemental accumulation (mg pot^{-1})	
		As	P
H. lanatus	1.6±0.06a[a]	0.04±0.003a	0.62±0.03c
D. viscosa	2.63±0.03b	0.02±0.0007b	0.99±0.02a
L. corniculatus	2.35±0.07c	0.02±0.002b	0.76±0.02b
P. lanceolata	2.62±0.06b	0.05±0.005a	0.77±0.04b

[a]Means of four replicates ±standard error

Discussion

The main objective of this work was to study the effects of plants on As potential mobility and bioavailability in contaminated soil, in relation to nutrient uptake and root exudation. In this attempt, we addressed the two following questions: *i*) what are the changes in the rhizosphere solution during plant growth? and *ii*) do different species have different impact on As mobility?

Concentration of water-soluble As provided by rhizon samplers is considered a reliable indicator of bioavailability since plants take up their nutrients from the soil solution (Linehann et al. 1985). Our results showed that As concentration in the rhizosphere solution of the four selected species increased progressively during the overall growing period while it remained stable in the absence of plants. Thus in our experimental conditions, the presence of plants lead to an increase in As bioavailability. On the other hand, the concentration of the As non-specifically bound fraction, which is also considered as an easily bioavailable pool (Wenzel et al. 2001a) decreased significantly in the presence of plants while it remained unchanged in unplanted conditions. These results show that plants can modify As soil sorption equilibria, and suggest that water soluble As could come, at least in part, from the easily exchangeable As pool. This observation is different from that of Silva Gonzaga et al. (2006) who reported that the As taken up by the fern species *Nephrolepis exaltata*, a non-As accumulator, was preferentially taken from the fraction bound to amorphous Fe and Al hydrous-oxides instead of the most available easily exchangeable pool.

In the studied rhizopot system, plant growth did not seem to be restricted by the increased As concentration in rhizosphere solution and its uptake. The degree of As uptake varied widely between species. Plants with small biomass such as *H. lanatus* presented significantly more As in shoots than plants with large biomass such as *D. viscosa*. It must be noticed that, although we used different species belonging to very different families (*Poaceae*, *Fabacea*, *Plantaginacea* and *Asteraceae*) closely similar changes in the rhizosphere solution were obtained in spite the different plant accumulation behavior. This lead to the conclusion that there was no obvious "species effect" on As mobility in soil.

The increase in water soluble As during plant growth was correlated to a decrease in NO_3^-. In fact, it is well known that nitrate uptake by plants may affect As mobility mainly by altering rhizosphere pH (Hinsinger 2001; Hinsinger et al. 2003; Bravin et al. 2009). In our experiments with *H. lanatus*, *D. viscosa*, *L. corniculatus* and *P. lanceolata* we observed a continuous alkalization of the soil solution during the growth period, resulting in a 0.3-0.4 pH unit increase after 90 days of culture. This pH increase may relate first to the balance between the predominant cations (Ca and Mg) and anions (NO_3^- and SO_4^{2-}) in rhizosphere solution and second to the excretion of hydroxyl groups (OH^-) compensating for the excess of nitrate and other inorganic anions entering the plant root cells (Marschner 1995; Luo et al. 2000; Loosemore et al. 2004). Under the conditions of the assay, we identified significant correlations between the ion depletion related to plant uptake and the increase of pH. Moreover, in unplanted soil conditions, significant correlations were obtained between the increase of ion

concentrations due to the continuous mineral flush and the decrease of pH. These results suggest that plant nutrient assimilation may affect indirectly pH by modifying the balance between the predominant cations and anions in rhizosphere solution.

In turn, an increase of the rhizosphere pH may affect the mobilization of other elements. In particular, alkaline pH may induce desorption of As and P (AsO_4^{3-} and PO_4^{3-} species) due to an increase of negative surface charges of iron oxides and hydroxides, which are the primary sorption sites for As and P, leading to electrostatic repulsions (Manning and Goldberg 1997; Smith et al. 2002; Sadiq 1997, Wenzel et al. 2001a; Fitz and Wenzel 2002). Our results confirmed that there was indeed a clear correlation between the increase of pH and the increase in soluble As in the rhizosphere solution at least in the case of two species *D. viscosa* and *L. corniculatus*. It must be emphasized that water soluble P and readily bioavailable P fraction were not detected in rhizosphere and bulk soil solutions, indicating that the bioavailable P pool was very low (less than 10 $\mu g.l^{-1}$) in the soil used in this study. Phosphorus is characterized by its low solubility in forest soils (with an average value about 0,05 $mg.l^{-1}$ in soil solution). Furthermore, P concentration in plant shoots was less than the range of 0.3-0.5% of the plant dry matter required for optimal growth (Marschner, 1995). However plants were healthy and grew without any visible sign of P deficiency during the overall culture period. It has been reported that plants growing under P deficiency enhanced proton H^+ excretion and root exudates secretion (Hoffland 1992; Jones 1994; Jones et al. 1998; Kirk et al. 1999; Hinsinger 2001; Shen et al. 2005; Johnson and Loeppert 2006). These mechanisms may induce a highly localized acidification in the root vicinity resulting in the solublization of P from Ca-P precipitates. Also a decrease of pH may help P desorption from Fe and Al oxides and hydroxides by promoting the reductive co-dissolution of colloids. It is reasonable to admit that As adsorbed onto or co-precipitated with Fe and Al oxides and hydroxides could be also mobilized by the dissolution of colloids as in the case of P. In this context, the positive correlation found between As and Fe concentrations in rhizosphere solutions of the four selected species strongly suggests a co-dissolution of As and Fe during the growing period. Thus it can be assumed that, despite the progressive alkalization process evidenced in soil solution during plants growth, roots may induce a highly localized acidification in the rhizosphere in response to low P bioavailability. However the "rhizopot/rhizon" sampling method we used in this study was not designed to detect such local changes in pH around the root tips.

Beside local acidification, secretion of organic anions is another adaptative strategy developed by plants for the acquisition of nutrients such as P (Jones and Darrah 1994; Kirk et al. 1999; Fitz and Wenzel 2002). Organic anions can displace P adsorbed onto Fe and Al oxides and hydroxides by anionic competition for sorption sites (Redman et al. 2002) but, due to the close geochemical similarity between phosphate and arsenate, they may also promote As desorption.

In this study we showed that DOC in rhizosphere solutions slightly decreased (although not significantly at $p<0.01$) over time in the presence of plants, but remained stable in the control unplanted condition. This result differs from those obtained by numerous authors who

reported an increase in DOC concentration in the rhizosphere when compared to uncultivated soils (Wenzel at al. 2001b; Tu et al. 2004; Silva Gonzaga et al. 2006). In fact, the amount of

DOC in rhizosphere solution results from an equilibrium between the input of organic C, mainly due to passive root exudation of low molecular weight organic acids and sugars, and its output due to adsorption onto the solid phase and/or metabolic activity of rhizosphere microflora. Dissolved organic carbon is known as the principal source of carbone for soil microorganisms (Pelz et al. 2005; Boddy et al. 2007). Therefore in our experiments the lower DOC concentration in rhizosphere solutions compared to unplanted soil could be attributed to the so-called rhizosphere priming effect (Kuzyakov 2002), *i.e.* a higher bacterial growth in rhizosphere of planted soils as compared to control soil. However it also possible that part of the DOC decrease in rhizosphere solution be related to its adsorption on to the solid phase. At least in the case of *D. viscosa* and *L. corniculatus* the significant negative correlations observed between soluble As and DOC may suggest such anionic competition.

Conclusion

This study shows that there is a significant increase in As concentration in soil water during the process of plant growth and development on an As contaminated soil. Comparison of four species belonging to four different families indicates that there is no obvious "species effect", i.e. the increase in soluble As is the same whatever the species considered. Arsenic solubilization is strongly correlated to the decrease in NO_3^- and to the increase in soluble Fe concentrations in soil water. This suggests that displacement of As equilibriums in soil is a side-effect of processes involved in plant nutrition. This suggested that the uptake of NO_3^- led to an increase in pH, promoting the desorption of the weakly bound As fraction. Likewise it may be thought that the process of P acquisition, especially under conditions of P deficiency, may lead to a partial dissolution of Fe oxydes and hydroxides resulting in the leakage of the As pool linked to these minerals. This led to the conclusion that an increase in As mobility is an integral feature of phytostabilization of As contaminated soils. However phytostabilization also decreases rain water infiltrations and had a protecting effect against mechanical and wind-driven soil erosion. Thus the benefits of a phytostabilization treatment in terms of reduction of pollutant migration must be assessed by considering these overall parameters. To our knowledge such a systemic approach has never been performed in field conditions and is yet a challenging issue to promote the use of phytostabilization at an industrial scale.

Acknowledgments: This work was partly financially supported by French Environment Agency ADEME. The authors would like to thank Frederic Gallice, Jean-Pierre Poyet, Alain Lallemand and Marie-Claude Bartholin for technical assistance and Mathieu Bravin (UMR6635 CEREGE - Equipe SE3D) for fruitful discussions on rhizosphere chemistry.

References

Adriano DC (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Second edition Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg p 867

Baldwin PR, Butcher DJ (2001) Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. Microchem J 85:297–300

Bravin MN, Marti AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalization- a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. Plant Soil 318:257–268

Boddy E, Hill PW, Farrar J, Jones DL (2007) Fast turnover of low molecular weight components of the dissolved organic carbon pool of temperate grassland field soils. Soil Biol Biochem 39:827–835

Chaignon V, Quesnoit M, Hinsinger P (2009) Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. Environ Poll 157: 3363–3369

Cunningham SD, Berti WR, Huang JW (1995) Phytoremediation of contaminated soil. Trends Biotechnol 13: 393–397

Devau N, Le Cadre E, Hinsinger P, Jaillard B, Gérard F (2009) Soil pH controls the environmental availability of phosphors: Experimental and mechanistic modelling approaches. Appl Geochem 24: 2163–2174

Fitz WJ, Wenzel WW (2002) Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. J Biotech 99:259–278

Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Voojis R, Bookum WT, Schat H, Meharg AA (2001) Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. Plant Physiol 126: 299–306

Hinsinger P (1998) How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the Rhizosphere. Adv Agro 64: 225–265

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil 23: 173–195

Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. Plant Soil 248: 43–59

Hoffland E (1992) Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilisation of rock phosphate by rape. Plant Soil 140: 279–289

Johnson SE, Loeppert RH (2006) Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. Soil Sci Soc Am J 70: 222–234

Jones DL, Darrah PR (1994) Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant Soil 166: 247–257

Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant Soil 205:25–44

Kirk GJD, Santos EE, Findenegg GR (1999) Phosphate solubilisation by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. Plant Soil 211:11–18

Kuzyakov Y (2002) Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. J Plant Nutr Soil Sci 165: 382–396

Linehan DJ, Sinclair AH, Mitchell MC (1985) Mobilisation of Cu, Mn and Zn in the soil solutions of barley rhizosphere. Plant Soil 86: 147–149

Loosemore N, Straczek A, Hinsinger P, Jaillard B (2004) Zinc mobilization from a contaminated soil by three genotypes of tobacco as affected by soil and rhizosphere pH. Plant Soil 260: 19–32

Luo YM, Christie P, Baker AJM (2000) Soil solution Zn and pH dynamics in non-rhizosphere soil and in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* grown in a Zn/Cd-contaminated soil. Chemosphere 41: 164–164

Luongo T, Ma LQ (2005) Characteristics of arsenic accumulation by *Pteris* and non-*Pteris* ferns. Plant Soil 277: 117–126

Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature 409:579

Manning BA, Goldberg S (1997) Adsorption and stability of arsenic (III) at the clay mineral-water interface. Environ Sci Technol 31: 2005–2011

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn Academic Press, London, UK p 889

Meharg AA, Macnair MR (1990) An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant (*Holcus lanatus* L.). New Phytol 116: 29–35

Meharg, AA, Macnair MR (1992a) Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in (*Holcus lanatus* L.). J Exp Bot 43: 519–534

Meharg AA, Macnair MR (1992b) Polymorphism and physiology of arsenate tolerance in (*Holcus lanatus* L.) from an uncontaminated site. Plant Soil 146: 219–225

Pelz O, Abraham WR, Saurer M, Siegwolf R, Zeyer J (2005) Microbial assimilation of plant-derived carbon in soil traced by isotope analysis. Biol Fertil Soils 41: 153–162

Puschenreiter M, Schnepf A, Millan IM, Fitz WJ, Horak O, Klepp J, et al (2005) Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Plant Soil 271: 205–218

Quaghebeur M, Rengel Z (2003) The distribution of Arsenate and Arsenite in Shoots and Roots of *Holcus lanatus* is influenced by Arsenic Tolerance and Arsenate and Phosphate Supply. Plant Physiol 132: 1600–1609

Raab A, Feldmann J, Meharg AA (2004) The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. Plant Physiol 134: 1113–1122

Redman AD, Macalady DL, Ahmann D (2002) Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. Environ Sci Technol 36: 2889–2896

Sadiq M (1997) Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and field observations. Water Air Soil Poll 93: 117–136

Shen J, Li H, Neumann G, Zhang F (2005) Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. Plant Sci 168: 837–845

Silva Gonzaga M, Santos AG, Ma LQ (2006) Arsenic chemistry in the rhizosphere of (*Pteris vittata* L.) and (*Nephrolepis exaltata* L.). Environ Poll 143: 254–260

Smith E, Naidu R, Alston AM (2002) Chemistry of arsenic in soils: II Effect of phosphorous, sodium and calcium on arsenic sorption. J Environ Qual 31: 557–563

Szegedi K, Vetterlin D, Jahn R (2010) Modelling rhizosphere transport in the presence of goethite, including competitive uptake of phosphate and arsenate. Plant Soil 330: 481–501

Szegedi K, Vetterlin D, Nietfeld H, Jahn R (2008) New Tool Rhizomath for Modeling Coupled Transport and Speciation in the Rhizosphere. Soil Sci Soc Am 7: 712–720

Tu C, Ma LQ (2003) Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator (*Pteris vittata* L.) under hydroponic conditions. Env Exp Bot 50: 243–251

WHO (2001) Arsenic and arsenic compounds. 2nd ed. Environmental Health criteria 224 Geneva

Wang J, Zhao FJ, Meharg AA, Raab A, Feldmann J, McGrath SP (2002) Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. Plant Physiol 130: 1552–1561

Wenzel WW, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano DC (2001) Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. Anal Chim Acta 436: 309–323

Wenzel WW, Kirchbaumer N, Fitz WJ & Puschenreiter M (2001) Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. Plant Soil 237: 37–45

Zarcinas BA, Cartwright B, Spouncer LR (1987) Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. Commun In Sci Plant Anal 18: 131–146

Conclusion du Chapitre IV

L'objectif de cette partie était d'étudier l'effet des espèces sélectionnées sur la mobilité de l'As dans la rhizosphère. L'approche « rhizopot-rhizons » a été utilisée pour assurer un développement végétatif optimal et suivre les variations de la composition de la solution rhizosphérique tout au long de la période de croissance végétatative. En conclusion, cette partie nous a permis de mieux appréhender l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As à l'interface sol-racines. Les résultats obtenus ont permis d'identifier d'intéressantes corrélations entre l'As et les paramètres suivis (NO_3^-, SO_4^{2-}, Ca, Mg, P, pH, COD…) tout au long de la période d'échantillonnage. Nous avons identifié et caractérisé plusieurs processus influençant la mobilisation de l'As dans la rhizosphère (alcalinisation/acidification, compétition anionique…). L'avantage de l'approche « rhizopot-rhizons » réside dans le fait que les plantes se sont développées sans prétraitement du substrat de croissance (contamination artificielle, ajout de solutions nutritives…). C'est pourquoi, cette approche semble être adaptée pour suivre les variations temporelles de la composition de la solution rhizosphérique. En outre, elle permet d'approcher quantitativement l'impact du végétal sur la biodisponibilité de l'As à long terme. Par contre, l'inconvénient de cette approche réside principalement dans la procédure d'échantillonnage. En effet, les rhizons utilisés assurent l'échantillonnage d'une solution rhizosphérique représentative de tout le système racinaire. Aussi, la détection des exsudats racinaires et des variations très localisées à l'interface sol-racines, liées à des conditions particulières de déficience en P et/ou en Fe, ne seront probablement pas détectées. Pour cela, nous proposons par la suite une étude exploratoire sur la mobilisation de l'As en lien avec les anions organiques sous des conditions variées en P. L'approche sélectionnée est la technique de « tapis racianire » ou « root mat approach ». Elle permet une séparation physique complète du compartiment racinaire de la rhizosphère. Cette dernière présente comme principal avantage de : collecter facilement le système racinaire et la rhizosphère. Par contre, l'inconvénient principal de cette approche est l'apparition probable de symptômes de stress induits par une croissance racinaire hors sol et dans un espace très restreint. Par ailleurs, certaines espèces n'ont pas la capacité de développer un tapis racinaire dense en une période de croissance courte (15-20 jours). Cette problématique risque de limiter le champ d'application de l'approche.

La plante modèle utilisée pour appliquer cette aproche est *P. lanceolata*. Les essais au laboratoire sur les quatres espèces sélectionnées ont montré que pour une durée de 15 jours, *P. lanceolata* a la double caractéristique de former d'une part un tapis racinaire dense et de tolérer le stress physique induit par la croissance racinaire dans un espace restreint d'autre part.

Par ailleurs, le sol provient aussi du site de la Combe du Saut qui se caractérise par une pollution anthropique en As de 1900 $mg.kg^{-1}$ et par une faible teneur en P labile (<10 $\mu g.l^{-1}$).

CHAPITRE V L'EFFET DES EXSUDATS RACINAIRES ET DES CONDITIONS VARIEES EN PHOSPHORE SUR LA MOBILITE DE L'ARSENIC DANS LA RHIZOSPHERE DE *PLANTAGO LANCEOLATA*

ARSENIC MOBILITY IN THE RHIZOSPHERE OF PLANTAGO LANCEOLATA AS RELATED TO ROOT EXUDATES AND VARIOUS SOIL P CONDITIONS

Carole Obeidy[1] - Jean-Luc Bouchardon[1] - Bernard Guy[1] - Olivier Faure[1&2]

[1]Laboratoire de Géochimie, ENvironnement, Ecoulements, Réacteurs Industriels et Cristallisation (GENERIC), Ecole Nationale Supérieure des Mines, 158 Cours Fauriel, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France ; [2]PRES de l'Université de Lyon, Université Jean Monnet, F-42023 Saint Etienne Cedex 2, France

Abstract

The changes in As bioavailable concentration that occur in the rhizosphere may arise from several processes including pH, redox potential and As soil sorption characteristics (Fe oxides/hydroxides content…). These factors can be influenced by the P status of the plant. The aim of this study was first to investigate As mobilization and uptake by *Plantago lanceolata* species as related to P soil conditions and second, to identify if root exudation process constitutes a tolerance strategy in response to low-P and As stress conditions. The As bioavailable fraction as evaluated by the As non-specifically bound fraction from the chemical extraction of Wenzel et al. (2001) was analyzed under various As and P conditions. Root exudates, As and P contents in plants were determined. The results showed that P application has enhanced As mobilization and uptake by plants. The root exudates identified in the present study did not affect As and P mobilization in rhizosphere. Furthermore, *P. lanceolata* may act as bioindicator to monitor the changes in the As bioavailable in soil. Further experiments might be conducted in order to test the applicability of the "root mat approach" for other plant species belonging to different families and to demonstrate if the process of root exudation is among tolerance strategies developed by higher plants under As stress conditions.

Introduction

Arsenic (As) has been recognized as a major toxic contaminant and a global environmental problem in many regions including the USA, Canada, Mexico, China, Bangladesh, Vietnam and India (Tu et al., 2004; Silva Gonzaga et al., 2006; Geng et al., 2006; Lee et al., 2010). The sources of As emission in soils, groundwater and surface water were derived from both geogenic and anthropogenic such as mining, wood preservatives and agricultural activities (Adriano, 2001). Mining operations at the *La Combe du Saut* site (Aude, south of France) were the main origin of As contamination in the alluvial soils along the Orbiel river, which show As concentrations in the range of 110 to 150 mg kg^{-1} and 300 mg kg^{-1} in the soils of the surrounding communes (Dondon et al., 2005). Various types of cancer diseases mainly lung and digestive system cancers were recorded in this region due to environmental

contamination (Dondon et al., 2005). Thus, there is an increasing attention about the factors controlling As mobility in soils and its transfer into the food chain.

Recently, the Plant-Based cleanup approaches such as phytoextraction and phytostabilization were emerged in order to reduce the toxic impact of metals and metalloids in soils and waters (Cunningham et al., 1995). The development of phytoremediation of As polluted soils depends on the both basic and applied research that includes: screening of plant species for genes of As hypertolerance and hyperaccumulation, investigating factors affecting As mobility in rhizosphere and understanding plant As tolerance strategies. Various plant species were reported by many authors as good candidates for As phytoextraction and phytostabilisation (Ma et al., 2001; Francesconi et al., 2002; Srivastava et al., 2006; Antosiewicsz et al., 2008). Other researches were focused on plant tolerance strategies in response to As stress (Meharg and Macnair, 1990; 1992a; Wang et al., 2002; Quaghebeur and Rengel, 2003; Raab et al., 2004; Irtelli and Navari-Izzo, 2008). Several studies on As in the soil-plant system are available (Fitz and Wenzel, 2002, 2003; Tu et al., 2004; Lyubun et al., 2006; Silva Gonzaga et al., 2006; Vetterlein et al., 2007 ; Lee et al., 2010). However, researches on As mobility related to interactions between root organic anions, As and P at soil-root interface has yet not been sufficiently explored. A better understanding of these mechanisms may enhance our knowledge on As soil phytoremediation procedures.

The mobility of As at the soil-root interface depends on various factors, including pH, redox potential and As soil sorption characteristics (mineralogy, Fe-oxides and ligands (oxyanions) contents…) (Sadiq et al., 1997; Vetterlein at al., 2007). Root activities may alter soil physico-chemical conditions as pH in response to low P and Fe conditions and nutrient intake (source of nitrogen supply: NO_3^- or NH_4^+) (Loosemore et al., 2004; Pushenreiter et al., 2005; Devau et al., 2009; Chaignon et al., 2009; Bravin et al., 2009). Plant roots have also the ability to exude organic anions such as citrate and malate in order to increase P and Fe phytoavailability (Hoffland, 1992; Jones, 1994; Kirk et al., 1999) and to chelate toxic metals such as Al (Pellet et al., 1995; Li et al., 2009). Among plant species, the cluster roots of *Lupinus albus* were known to exude strong organic anions and phenolic compounds under low P soil conditions as a tolerance mechanism to P stress (Shen et al., 2005; Johnson et al., 2006; Dessureault-Rompré, 2007). Arsenic and P are chemically analogues and compete for sorption sites on mineral surfaces and for root membrane transporters (Meharg and Macnair, 1990, 1992a,b; Wang et al., 2002; Vetterlein et al., 2001; Irtelli and Navari-Izzo, 2008). Thus suggesting that carboxylate exudation could play a role in the mobilization of As in the rhizosphere. Furthermore, Tu et al. (2004) have been demonstrated that the As hyperaccumulator species, *Pteris vittata* has the ability to exude organic acids in order to increase As-bioavailability with a high molar ratio of phosphorus to arsenic (P/As) in roots (Tu et al., 2004).

Thus, our objective was to examine the mechanism of As mobilization and uptake in rhizosphere of *Plantago lanceolata* in relation to root organic anions production under various soil P conditions and to demonstrate if organic anions production by the roots of *P. lanceolata* constitutes a strategy of tolerance in response to the low-P stress conditions.

A special approach, the "root mat approach" was developed in laboratory for the investigation of rhizosphere processes.

Materials and methods

Soil material

The soil used in this study was taken from the topsoil (0-20 cm depth) of an As polluted soil (Devonian limestones) located at the *La Combe du Saut* Au-mining area in the Aude department, France. Collected soil was air-dried, sieved at 2 mm and homogenized by a mechanical mixer to adjust for the effect of local heterogeneity in the field. Soil physicochemical characteristics (Table 10) were determined according to standardized French (NF) and international procedures (ISO).

Table 10 : selected properties of the soil used in this study

Property	Value
Clay[a] (g kg^{-1})	377
Silt[a] (g kg^{-1})	372
Sand[a] (g kg^{-1})	251
Organic matter content[b] (g kg^{-1})	60
Total $CaCO_3$[c] (g kg^{-1})	6
CEC[d] (cmol(+) kg^{-1})	21
pH H_2O[e]	7.7
Total-P[f] (mg kg^{-1})	218
Total-As[f] (mg kg^{-1})	1935

[a] according to NF X 31-107, [b] according to NF ISO 14235, [c] according to NF X 10693, [d] according to NF X 31-130, [e] according to NF ISO 10930, [f] Determined by ICP-OES, see Materials and Methods

Experimental design

We developed a version of the "root mat" technique to allow the formation of a dense root system physically separated from soil to facilitate the collection of roots and rhizosphere (Chaignon and Hinsinger, 2003; Bravin et al., 2008).

Root mat establishment

The system consisted of glass plates (15 cm wide x 5 cm height) covered by chromatography papers with the same dimensions. Then, twelve '45 µm polyamide bags' (2cm wide x 1.5 cm height) (hereafter called root bags) were placed vertically on the assembly: glass

plate-chromatography paper (3 root bags/ glass plate). The root bags and the chromatography papers were moistened with a complete nutrient solution having the following composition: 625µM $Ca(NO_3)_2$; 750 µM KNO_3 ; 500 µM NH_4NO_3 ; 187,5 µM KH_2PO_4 ; 187,5 µM $MgSO_4$; 50 µM NaCl ; 7,5 µM K_2HPO_4 ; 7,5 µM H_3BO_3 ; 7,5 µM Fe-EDTA ; 1,25 µM $MnSO_4$; 0,25 µM $ZnSO_4$; 0,062 µM $CuSO_4$; 0,062 µM Na_2MoO_4 ; 0,062 µM $NiCl_2$.

Fifteen seeds of *P. lanceolata* were germinated at the top of each root bag to allow roots to grow inside. The assembly glass plate-chromatography paper – root bags was mounted on a propylene support and placed inside a glass tank containing 1.5 L of the complete nutrient solution (Fig. 7).

The root bags were maintained wet via the chromatography paper immersed in the nutrient solution. Tanks were then sealed with wrap plastic film. After germination, *P. lanceolata* seedlings were grown for 15 days and the solution was renewed every two days. There were a total of 12 root bags.

The system was conducted in a growth chamber with the following conditions: long-day photoperiod (16h light/ 8h dark) under a light intensity of 3 × 1000 W iodide lamp and temperature about 28+/-2°C.

Soil incubation stage

Twelve polyamide bags (2cm wide x 1.5 cm height) were filled with 0.3 g of soils (hereafter called soil bags) and fixed on the assembly glass plate-chromatography paper (15 cm wide X 15 cm height). The soil bags were maintained wet via the chromatography paper immersed in 1.5 L of nutrient solution. Two nutrient solution treatments were used to moisturize soil bags: treatment "+P" (KH_2PO_4 and K_2HPO_4) and "-P" treatment. There were three soil bags per treatment. The soil bags were left to equilibrate during one week.

After the soil incubation and seedling growth periods, the root bags were placed in contact with the soil bags (Fig. 8). After 10 days of contact, the soil was considered as rhizosphere (Chaignon and Hinsinger, 2003; Bravin et al., 2008). The changes in the rhizosphere were measured relative to control soils which had been incubated in the same way but without root bags (hereafter called bulk-soil).

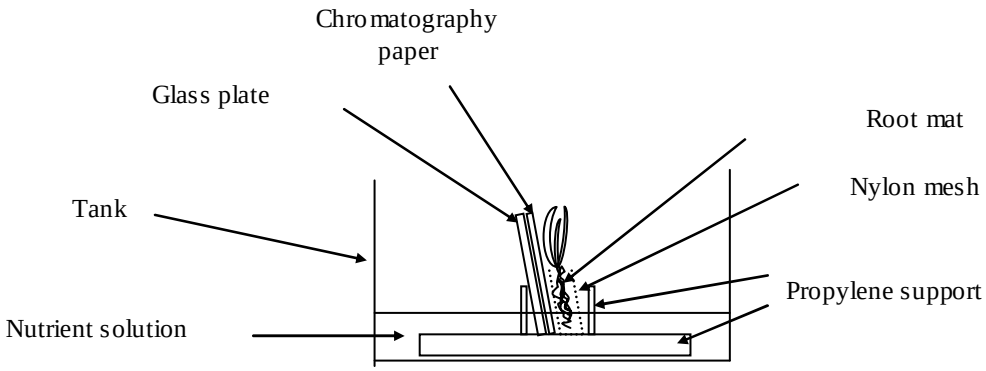


Fig. 7 : the device used during the first step of the "root mat technique"

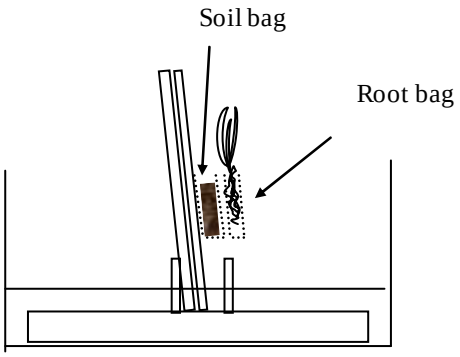


Fig. 8 : the device used during the second step of the "root mat technique" with root bags in contact with sol bags

Collection and analysis of root organic anions and phosphate

Prior to collection of root exudates, roots were washed carefully with deionized water and then immersed in 8 ml of $CaCl_2$ (1 mM) for 2 h. The solutions obtained were immediately stored at -80°C for further analysis. Citrate, malate and phosphate concentrations were determined using ion chromatography (Dionex system DX-500 with GP50 pump, conductivity detector CD20, autosampler AS40, AS 11-HC column, suppressor ASRS300, eluant: sodium hydroxide (1 to 60 mM, flow: 1.5 ml min^{-1}). The limits of detection for citrate, malate and phosphate were 44, 46 and 14 $\mu g\ l^{-1}$ respectively.

Plant and Soil analysis

Plant shoots and roots were separated, air-dried and ground to pass through a 2 mm sieve. They were digested in hot concentrated HNO_3 according to Zarcinas et al. (1987). Total As and P concentrations were measured by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) using Jobin-Yvon "Horiba" apparatus. The limits of detection were 12 ppb. The rhizosphere and Bulk soils were collected and air-dried. Single-step chemical extraction adapted from the sequential procedure of Wenzel et al. (2001) was carried out on soil samples to quantify readily bioavailable As : 0.3g soil was mixed with 7.5 mL $(NH_4)_2SO_4$ (0.05M), shaken at 20°C for 4 h and then centrifuged for 15 minutes at 8,000 x g. Arsenic concentrations in soil extracts were measured by ICP-OES.

Statistical analysis

Kruskal-Wallis was performed in order to assess the effect of *P. lanceolata* on As bioavailability in rhizosphere and to test the effect of the two treatments "+P" and "-P" on organic anions production, As bioavailability and As and P contents in plant shoots and roots. Simple linear regressions were performed and Kendall's tau coefficients were determined in order to assess possible correlations between the As readily bioavailable fraction and the remaining variables. Significance tests were conducted at $p<0.05$.

Results

Arsenic mobilization, uptake and distribution of As and P in P. Lanceolata

The presence of P in the nutrient solution increased significantly the As readily bioavailable fraction (AsF1) in rhizosphere and bulk soil (p=0.02) in comparison to the no P treatment (Fig. 9).

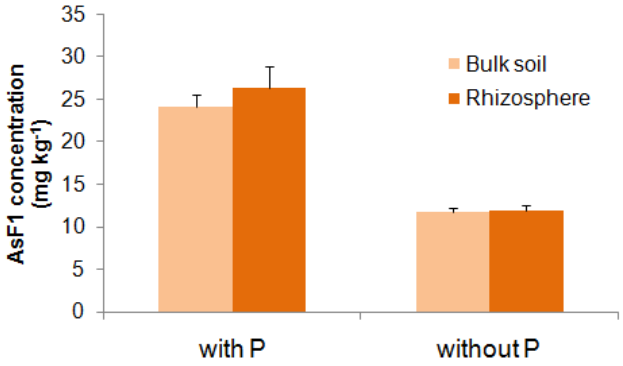


Fig. 9 : the concentration of As readily bioavailable fraction (AsF1) in bulk soil and rhizosphere under the two different solution treatments

No significant differences in AsF1 concentration were obtained between rhizosphere and bulk soil in the two P treatments. However, *P. lanceolata* took small quantities of As under the different P soil conditions (Table 11).The translocation factor (TF), defined as the ratio of As concentrations in fronds to that in roots, was calculated to compare As distribution between plant shoots and roots under various As and P soil conditions. The results showed that *P. lanceolata* transported relatively a very small quantity of As to the fronds (TF= 0.04) (Table 11).

Table 11 : arsenic concentrations, translocation factors (TF) and the Molar ratio of P to As for *P. lanceolata* exposed to different P soil conditions. Data are expressed as mean values ± SE of three replicates.

Treatments	Roots mg kg^{-1} DW			Shoots mg kg^{-1} DW			TF[a]
	As	P	P/As	As	P	P/As	
+P	380.12 ± 66.1	5173 ± 729	32,48	14.75 ± 2.95	3214 ± 21.26	520,14	0,04
-P	243.5 ± 4.42	3559 ± 342	34,88	10.58 ± 0.55	2523 ± 149	569,25	0,04

[a] TF was calculated as the ratio of As concentrations in fronds to that in roots

P and As were more concentrated in the roots, with root P concentration ranging from 3559 to 5173 mg kg^{-1} and As concentration from 243.5 to 380,12 mg kg^{-1} . The concentration and the distribution patterns of As and P were further confirmed by calculating the molar ratios of P/As. Clearly, the molar ratios of P/As in the fronds were greater than those in the roots.

Organic anions and phosphate in root exudates under different As and P soil conditions

The ion chromatography analysis identified only two LMW organic anions citrate and malate (Table 12). Although no significant difference in citrate and malate concentrations

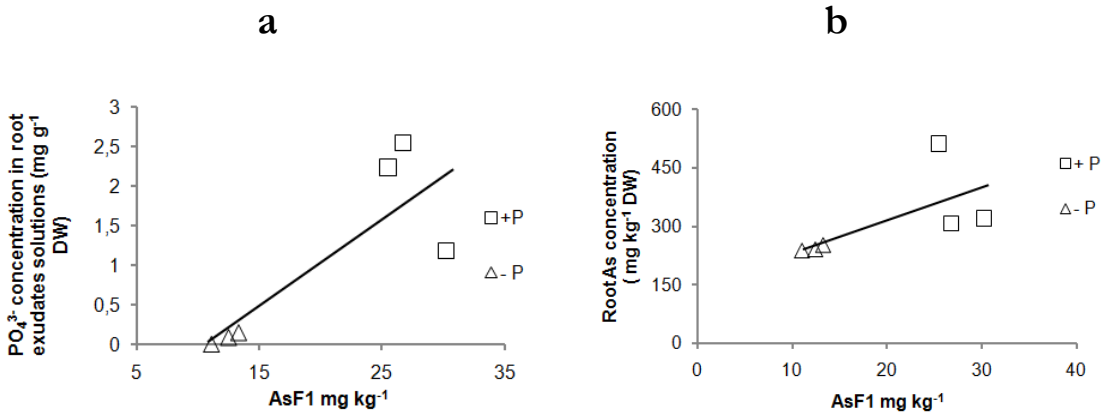
(p>0.05) was found between treatments. Concerning PO_4^{3-} concentration in root exudates solutions, significant difference (p=0.02) was obtained between treatments with the highest concentration (up to 1.99 mg g^{-1} DW) detected in the "+P" treatment (Table 12).

Table 12 : concentrations of citrate, malate and phosphate in root exudates of *P. lanceolata* from two treatments expressed on a root dry weight (DW) basis. Data are expressed as mean values ±SE of three replicates.

Treatments	Citrate µmol g^{-1} DW	Malate µmol g^{-1} DW	PO_4^{3-} mg g^{-1} DW
+P	2.01 ± 0.46	1.57 ± 0.74	1.99 ± 0.41
-P	0.16 ± 0.02	0.66 ± 0.27	0.34 ± 0.12

Relationships between organic anions, phosphate, As in plants and As soil bioavailability

The kendall' tau coefficients (τ) were calculated for assessing the correlations between AsF1, As in plants (shoots and roots), PO_4^{3-}, citrate and malate concentrations in root exudates solutions. AsF1 concentration was not significantly correlated with citrate and malate concentrations with τ values of 0.36 (p=0.11) and -0.05 (p=0.91) respectively whereas it was significantly correlated with As in roots (τ=0.57 and p= 0.008), As in shoots (τ=0.48 and p=0.03) and PO_4^{3-} concentration (τ=0.54 and p=0.01). Linear regressions were plotted to visualize the strongest correlations between parameters (Fig. 10 a, b and c).



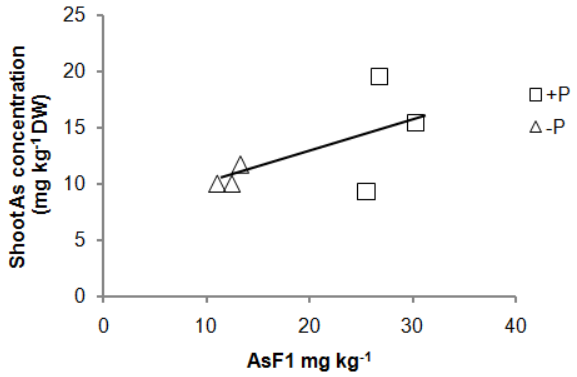


Fig. 10 : (a) PO_4^{3-} concentrations in root exudates solutions (mg g^{-1} DW) as a function of AsF1 concentration (mg kg^{-1}), (b) Root As concentration (mg kg^{-1} DW) as a function of AsF1 concentration (mg kg^{-1}),(c) Shoot As concentration (mg kg^{-1} DW) as a function of AsF1 concentration (mg kg^{-1}). Data were from two treatment solutions ("+P"; "-P") with three replicates.

Discussion

Arsenic bioavailability and uptake in the rhizosphere

The present study revealed significant increase in As bioavailability in bulk soil and rhizosphere in response to P application. P and As are chemically analogues (Adriano, 2001). P might displace As adsorbed on Fe oxides/ hydroxides which are the primary sorption sites for As (Wenzel et al., 2001; Fitz et al., 2002). Consequently, the application of phosphate as nutrient solutions and/or fertilizers to soils contaminated with As may enhance As mobilization in soil and subsequently its uptake by roots (Ultra Jr et al., 2007; Houssain et al., 2009). We observed a little increase in As bioavailability in rhizosphere relative to bulk soil. This increase was not related to citrate and malate exudation suggesting that root activity may alter indirectly the solid-phase speciation of As through nutrient intake mechanism (PO_4^{3-}, NO_3^-…) thus may affect pH and consequently increase the easily exchangeable As fraction (Fitz and Wenzel, 2001).

P addition positively impacted As an P uptake. There was a clear increase of As in roots of *P. lanceolata* in response to P application with a molar ratio of P/As in roots lower than that in shoots. This result indicated that *P. lanceolata* concentrated more As in roots and minimized the translocation of As to the shoots with a translocation factor (TF) less than 1, indicating that As allocation to the aboveground is relatively low. Other workers have also found similar shoot-to-root ratios of As concentrations for *Lycopersicum esculentum* (<0.02), *Brassica juncea* (<0.1) and *Oryza sativa* (<0.2) when As (V) was supplied (Marin et al., 1992; Burlò et al., 1999; Pickering et al., 2000). Thus may exacerbate the toxic effect of As in roots.

In the other hand, As application may affect P uptake in plants. The positive correlation between the As non-specifically bound fraction (AsF1) and phosphate concentration in root exudates solution suggest this hypothesis.

Arsenic and P are believed to be taken up by roots through the same carrier system and competitive interactions have been reported from higher plants (Tu and Ma, 2003; Geng et al., 2006). Many authors were reported that P can effectively reduce plant As uptake, and As can inhibit plant P uptake (Abedin et al., 2002; Tu and Ma, 2003; Geng et al., 2006). We hypothesize that in our study, the concentrations of As and P in soil are not sufficiently high to induce an antagonistic interactions for root uptake. Consequently, P application to soil had promoted an increase in As phytoavailability which led to the increased As content in shoots and roots.

Root exudates and As/ P tolerance strategy in P. Lanceolata

In order to identify low molecular weight organic anions exuded by *P. lanceolata*, roots were placed in $CaCl_2$ solution for 2h and the obtained solution was analyzed as above. This technique has been used previously with roots immersed in deionised water as reported by Mucha et al. (2005) and Tu et al. (2004). We identified only citrate and malate. These two organic ligands have been most often reported as plant exudates (Jones, 1988). Previous data

on exudation of *P. lanceolata* were not found in literature. It has been reported that the composition and the concentration of root exudates depend on the identity of plant species, physiological age and the physico-chemical environment (Jones, 1988; Mucha et al., 2005). Some plant species are known to produce relatively large quantities of organic anions in response to P deficiency conditions such as the white lupin (*Lupinus albus*) (Gardner et al., 1983; Dinkelaker et al., 1989; Kihara et al., 2003; Wang et al., 2007) and the chickpea (*Cicer arietinum*) (Ohwaki and Hirata, 1992). Whereas the Chinese Brake fern, an As hyperaccumulator species, is known to exude large amounts of phytic and oxalic acids in the presence of As (Tu et al., 2004). In other cases, the secretion of organic anions mainly citrate has been reported to be a specific response to Al (Li et al., 2009). In the present study, the variation in P and As soil conditions did not affect malate and citrate production in roots. Thus could be explained by two hypothesis related both to plant identity and/ or the duration of exposure to stress conditions. We considered that *P. lanceolata* does not have a specific root exudation strategy in response to low-P or As stress conditions. Consequently, further studies are needed in order to identify the mechanisms of P tolerance in *P. lanceolata*. Another alternative hypothesis could be also proposed to clarify this result. *P. lanceolata* species may require more than 10 days of exposure to low-P and As stress conditions to react by producing organic anions. Thus may explain a possible delayed of the production of citrate or malate in *P. Lanceolata* roots (Li et al., 2009).

P. lanceolata a bioindicator plant species

Arsenic bioavailability in rhizosphere and bulk soil was indicated by the As non specifically bound fraction (AsF1) from the sequential extraction procedure of Wenzel et al. (2001). We identified positive relationships between this fraction and arsenic concentrations in roots and shoots. This result suggests that *P. lanceolata* may act as bioindicator species and could be used to monitor changing in As available fraction in soils.

Conclusion

Our objective was to study the mechanism of As mobilization in the rhizosphere of *P. lanceolata* and its uptake in relation to root exudates under different As and P soil conditions. The results showed that P application has enhanced As mobilization in the rhizosphere and bulk soil and its accumulation in the plant. The root exudates identified in the present study did not affect As and P mobilization in the rhizosphere. Further studies were needed in order to identify the importance of root exudates in the mechanism of As and P tolerance in *P. lanceolata*. Furthermore, *P. lanceolata* may act as bioindicator to monitor the changes in the As available fraction in soils.

As reported previously by Chaignon et al. (2003), the "root mat approach" presented several advantages to investigate rhizosphere processes: i) easy collection of the entire root system, ii) the experiment does not require a daily manual watering, ii) this technique can be adapted

according to the number of replicates and treatments over a small surface area. The main disadvantages of this technique are that the polyamide bags may induce a physical stress for root development in comparison with experiments conducted in pot where roots are grown directly in the soil. Thus may overestimate plant responses to different treatments. Some plant species are not able to grow in this specific device and require a long time period to form a dense mat of roots. Further experiments might be conducted in order to test the applicability of the "root mat approach" on other plant species belonging to different families and to demonstrate if root exudation process is among the existing tolerance strategies to As stress and low P conditions in higher plants.

References

Abedin M. J., Feldman J., Meharg A.A. Uptake kinetics of Arsenic Species in Rice Plants. Plant Physiology, 2002, vol. 128, pp. 1120-1128.

Adriano D.C. Trace Elements in Terrestrial Environments Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, second edition. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, 2001, 867p.

Antosiewicz D.M., Escude-Duran C., Wierzbowska E., Sklodowska A. Indigenous Plant Species with the potential for the Phytoremediation of Arsenic and Metals Contaminated Soil. Water Air Soil Pollut., 2008, vol. 193, pp. 197-210.

Bravin M., Travassac F., Le Floch M., Hinsinger P., Garnier J. Oxygen input controls the spatial and temporal dynamics of arsenic at the surface of a flooded paddy soil and in the rhizosphere of lowland rice (*Oryza sativa* L.) : a microcosm study. Plant and Soil, 2008, vol. 312, pp. 207-218.

Bravin M.N., Marti A.L., Clairotte M., Hinsinger P. Rhizosphere alkalization- a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. Plant and Soil, 2009, vol. 318, pp. 257-268.

Burlo F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A.A., Valero D., Martinez-Sanchez F. Arsenic Species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants.

Chaignon V., Hinsinger P. Heavy Metals in the Environment A Biotest for Evaluating Copper Bioavailability to Plants in a Contaminated Soil. J. Environ. Qual., 2003, vol. 32, pp. 824-833.

Chaignon V., Quesnoit M., Hinsinger P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. Environmental Pollution, 2009, vol. 157, pp. 3363-3369.

Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. Phytoremediation of contaminated soil. Trends Biotechnol., 1995, vol., 13 pp. 393–397

Dessureault-rompré J., Nowack B., Schulin R., Luster J. Spatial and temporal variation in organic anion exudation and nutrient anion uptake in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. Plant Soil, 2007, vol. 301, pp. 123-134.

Devau N., Le Cadre E., Hinsinger P., Jaillard B., Gérard F. Soil pH controls the environmental availability of phosphors : Experimental and mechanistic modelling approaches. Applied Geochemistry, 2009, vol. 24, pp. 2163-2174.

Dinkelaker B., Römheld V. & Marschner H. Citrate acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (Lupinus albus L.). Plant, Cell and Environment, 1989, vol. 12, pp. 285-292.

Dondon M-G., de Vathaire F., Quénel P., Fréry N. Cancer mortality during the 1968-1994 period in a mining area in France. European Journal of Cancer Prevention, 2005, vol. 14, pp. 297-301

Fitz W.J., Wenzel W.W. Arsenic transformations in the soil_ rhizosphere_ plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. Journal of Biotechnology, 2002, vol. 99, pp. 259-278.

Francesconi K. Visoottiviseth P., Sridokchan W., Goessler W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. The Science of the Total Environment, 2002, vol. 284, pp. 27-35.

Gardner W.K., Barber D.A., Parbery D.G. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. Plant and Soil, 1983, vol. 70, pp. 107-124.

Geng C.N., Zhu Y.G., Tong Y.P., Smith S.E., Smith F.A. Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat.Chemosphere, 2006, vol. 62, pp. 608-615.

Hoffland, E. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilisation of rock phosphate by rape. Plant Soil, 1992, vol. 140, pp. 279-289.

Hossain M.B., Jahiruddin M., Loeppert R.H., Panaullah G.M., Islam M.R., Duxbury J.M. the effects of iron plaque and phosphorus on yield and arsenic accumulation in rice. Plant Soil, 2009, vol. 317, pp. 167-176.

Irtelli B., Navari-Izzo F., Uptake kinetics of different arsenic species by Brassica carinata. Plant Soil, 2008, vol. 303, pp. 105-113.

Johnson S.E., Loeppert R.H. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. Soil Sci. Soc. Am. J., 2006, vol. 70, pp. 222-234.

Jones D.L., Darrah P.R. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and soil, 1994, vol. 166, pp. 247-257.

Kabata-Pendias A., Pendias H., Trace Elements in soils and Plants. CRC Press LLC, 2001, 403p.

Kihara T., Wada T., Suzuki Y., Hara T., Koyama H. Alteration of Citrate Metabolism in Cluster Roots of White Lupin. Plant Cell Physiol., 2003, vol. 44, pp. 901-908.

Kirk, G.J.D., Santos, E.E., Findenegg, G.R. Phosphate solubilisation by organic anion excretion from rice (Oryza sativa L.) growing in aerobic soil. Plant Soil, 1999, vol. 211, pp. 11-18.

Lee K.Y., Kim K.W., Kim S.O. Geochemical and microbial effects on the mobilization of arsenic in mine tailing soils. Environ. Geochem. Health, 2010, vol. 32, pp. 31-44.

Li X.F., Zuo F.H., Ling G.Z., Li Y.Y., Yu Y.X. et al. Secretion of citrate in response to aluminum and low phosphorus stresses in *Stylosanthes*. Plant and soil, 2009, vol. 325, pp. 219-229.

Loosemore N., Straczek A., Hinsinger P. & Jaillard B. Zinc mobilization from a contaminated soil by three genotypes of tobacco as affected by soil and rhizosphere pH. Plant and Soil, 2004, vol. 260, pp. 19-32.

Lyubun Y.V., Fritzsche A., Chernyshova M.P., Dudel E.G., Fedorov E.E. Arsenic transformation by Azospirillum brasilense Sp245 in association with wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. Plant Soil, 2006, vol. 286, pp. 219-227.

Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature, 2001, vol. 409, pp. 579.

Marin, A.R., Masschenlyn, P.H., Patrick Jr.W.H. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. Plant and soil, 1992, vol. 139, pp. 175-183.

Meharg A.A., Macnair M.R. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. New Phytol., 1990, vol. 116, pp. 29-35.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in Holcus lanatus L. J. Exp. Bot., 1992a, vol. 43, pp. 519-534.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Polymorphism and physiology of arsenate tolerance in Holcus lanatus L. from an uncontaminated site. Plant and soil, 1992b, vol. 146, pp. 219-225.

Mucha A.P., Almeida C.M.R., Bordalo A.A., Vasconcelos M.T.S.D. Exudation of organic acids by a marsh plant and implications on trace metal availability in the rhizosphere of estuarine sediments. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2005, vol. 65, pp. 191-198.

Ohwaki Y., Hirata H. Differences in Carboxylic Acid Exudation among P-Starved Leguminous Crops in Relation to Carboxylic Acid Contents in Plant Tissues and Phospholipid level in roots. Soil Sci. Plant Nutr., 1992, vol. 38, pp. 235-243.

Pellet D.M., Grunes D. L., Kochian L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (Zea mays L.). Planta, 1995, vol. 196, pp. 788-795.

Pickering I.J., Prince R.C., George M.J., Smith R.D., George G.N., Salt D.E. Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard. Plant Physiology, 2000, vol. 122, pp. 1171-1177.

Puschenreiter M., Schnepf A., Millan I.M., Fitz W.J., Horak O., Klepp J., et al. Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Plant and Soil, 2005, vol. 271, pp. 205-218.

Quaghebeur M., Rengel Z. The distribution of Arsenate and Arsenite in Shoots and Roots of Holcus lanatus is influenced by Arsenic Tolerance and Arsenate and Phosphate Supply. Plant Physiology, 2003, vol. 132, pp. 1600-1609.

Raab A., Feldmann J., Meharg A.A.The nature of arsenic-phytochelatin complexes in Holcus lanatus and Pteris cretica. Plant Physiology, 2004, vol. 134, pp. 1113-1122.

Sadiq M. Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and field observations. Water, Air, and Soil Pollution, 1997, vol. 93, pp. 117-136.

Shen J., Li H., Neumann G., Zhang F. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in Lupinus albus as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. Plant Science, 2005, vol. 168, pp. 837-845.

Silva Gonzaga M., Santos A.G., Ma L.Q. Arsenic chemistry in the rhizosphere of Pteris vittata L. and Nephrolepis exaltata L. Environmental pollution, 2006, vol. 143, pp. 254-260.

Srivastava M., Ma L.Q., Santos J.A.G. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. Sci Total Environ., 2006, vol. 364, pp. 24-31.

Tu C., Ma L.Q., Luongo T. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. Plant and Soil, 2004, vol. 258, pp. 9-19.

Ultra Jr V.U., Sanaka S., Sakurai K., Iwasaki K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. Plant Soil, 2007, vol. 290, pp. 29-41.

Vetterlein D., Szegedi K., Ackermann J. Competitive Mobilization of Phosphate and Arsenate Associated with Goethite by root Activity. J. Environ. Qual., 2007, vol. 36, pp. 1811-1820.

Wang J., Zhao F.-J., Meharg A.A., Raab A., Feldmann J., McGrath S.P., Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in Pteris vittata. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. Plant Physiology, 2002, vol. 130, pp. 1552-1561.

Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., Adriano, D.C.. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure.Anal. Chim. Acta, 2001, vol. 436, pp. 309- 323.

Wilson, S., Lockwood P.V., Ashley P.M. The chemistry and behavior of antimony in the soil environement with comparison to arsenic: A critical review. Environmental pollution, 2010, vol. 158, pp.1169-1181.

Zarcinas B.A., Cartwright B., Spouncer L.R. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. Commun. In Sci. Plant Anal., 1987, vol. 18, pp. 131-146.

CHAPITRE VI. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Discussion générale

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'effet de la végétation sur la mobilité potentielle de l'Arsenic (As) dans la rhizosphère. Quatre espèces végétales ont été donc sélectionnées : *H. lanatus (Poaceae)*, *D. viscosa (Asteraceae)*, *L. corniculatus* (*Fabaceae*) et *P. lanceolaat (Plantagenaceae)*. Elles appartiennent à des familles végétales différentes. *H. lanatus* est connue pour sa tolérance à l'As et les trois autres espèces poussent naturellement sur le site de la Combe du saut (Aude, France). Les questions scientifiques qui en découlent sont les suivantes :

1) Quelles sont les caractéristiques des espèces sélectionnées concernant leur tolérance à l'As ?

2) Quel est leur capacité accumulatrice vis-à-vis de cet élément ?

3) Les espèces végétales ont-elle un effet sur la mobilité potentielle de l'As dans la rhizosphère ?

Les réponses à ces questions permettent d'éclaircir quelques aspects sur les différentes interactions entre les espèces étudiées d'une part et l'As dans la rhizosphère d'une autre part.

I. Les espèces végétales sélectionnées présentent-elles la même tolérance à l'As ?

Pour répondre à cette question, le choix s'est porté sur une expérimentation en culture hydroponique par VMT : Vertical Mesh Transfer Technique (Murphy et Taiz, 1995, Remon et al., 2007). En effet, cette technique à moindre coût permet d'obtenir rapidement de résultats interprétables. De plus, elle présente l'avantage d'être reproductible dans le cadre d'analyses de routine de laboratoire. Cette technique se base sur le principe de la courbure gravitropique des racines, évaluée par des indices toxicologiques bien définis : EC_{10}, EC_{50} et EC_{90}. Ces derniers correspondent à la concentration d'As capable d'inhiber la croissance de 10, 50 et 90% des racines. La valeur EC_{50} est souvent retenue afin de classer les espèces selon une échelle de tolérance. Selon les conditions opératoires, les résultats expérimentaux montrent que *H. lanatus* est bien l'espèce la plus tolérante à l'As (Meharg and Macnair, 1990, 1992a, b) tandis que *P. lanceolata* se comporte quant à elle, comme l'espèce la moins tolérante parmi les 4 espèces testées. La tolérance de *H. lanatus* peut s'expliquer par les mécanismes suivants i) au niveau des racines, la réduction du flux d'As (AsO_4^{3-}) par suppression de l'affinité élevée au P (PO_4^{3-}) de leur système de transport membranaire (Tripathi et al., 2007), ii) au niveau des racines et/ou des feuilles, la transformation de l'As (V) en As (III) par l'activité de l'enzyme As(V) réductase iii) au niveau des feuilles, la formation de complexes As(III)-PC par réaction entre As(III) et les phytochélatines « PCs » (Quaghebeur et Rengel, 2003 ; Tripathi et al., 2007).

D'après nos recherches bibliographiques, la technique de VMT a été utilisée par Murphy et Taiz (1995) pour caractériser la tolérance de différents clones d'*Arabidopsis thaliana* aux différents métaux en solution. De plus, Remon et al. (2007) ont choisi cette procédure pour comparer la tolérance aux métaux de trois espèces végétales *Plantago arenaria*, *Coniza sumatrensis* et *Verbascum densiflorum*. La présente étude permet de caractériser la tolérance à l'As de *H. lanatus*, *D. viscosa*,

L. corniculatus et *P. lanceolata* par la technique de VMT. Aussi, les valeurs toxicologiques obtenues dans cette étude ne peuvent être comparées à celles issues d'autres études de tolérance publiées.

En effet, elles sont souvent conduites selon différentes approches expérimentales (âge physiologique, choix du dispositif expérimental, durée de l'expérimentation…).

Au regard de tous ces éléments, un des enjeux pourrait être de mener des études complémentaires afin de mieux appréhender les mécanismes de tolérance des espèces étudiées en provenance des sites à contamination variable en As. L'objectif serait notamment de discerner la part constitutive de la tolérance et la part inductible.

II. Quelles sont les caractéristiques accumulatrices des espèces étudiées?

Dans un deuxième temps, il est proposé d'étudier l'accumulation de l'As au niveau des racines et des feuilles des espèces sélectionnées : S'agit-il d'espèces « excluder » adaptées à la phytostabilisation ? Sont-elles des espèces « accumulatrices » favorables à la phytoextraction? Ont-elles les caractéristiques des espèces « bioindicateurs » pour le suivi de la variation de la teneur de l'As dans le sol ?

Les espèces testées ont été exposées à des concentrations croissantes en As dans le sol. Après trois mois de croissance végétative, l'accumulation de cet élément au niveau des racines et des feuilles était relativement faible. On constate par ailleurs que les facteurs de bioconcentration (BC) et de translocation (TF) de l'As sont largement inférieurs à 1. Certaines études ont montré des valeurs semblables de TF mais en culture hydroponique, par exemple pour la tomate (*Lycopersicum esculentum*) : TF <0.02, la moutarde brune (*Brassica juncea)* TF <0.1 et le riz (*Oryza sativa*) TF<0.2 (Marin et al., 1992 ; Burlò et al., 1999 ; Pickering et al., 2000).

D'autres études mettent en évidence le caractère hyperaccumulateur d'As de *Pteris vittata* avec des valeurs de BC et TF respectivement de 74 et 23.8 (Ma et al., 2001a, b). Par ailleurs, Porter et Peterson (1975) ont montré que l'espèce tolérante à l'As *Agrostis capillaris* présente une valeur de BC de 0.13.

Les faibles valeurs de BC et TF obtenues dans notre essai, indiquent que les espèces testées ne sont pas des « accumulatrices » d'As (Baker, 1981 ; Fitz et al., 2002). Par ailleurs, le rapport de linéarité obtenu entre la teneur totale de l'As dans les feuilles et dans le sol tend à prouver que les espèces ne présentent pas les caractéristiques des « excluders » (Baker, 1981). Au final, elles se comportent plutôt comme des « bioindicateurs » de la concentration de l'As dans le sol dans l'intervalle compris entre 65 et 180 mg kg^{-1}.

Dans le cadre de nos conditions opératoires, on peut donc conclure à l'issue des parties 1 et 2 que les espèces sélectionnées ne présentent pas les mêmes caractéristiques de tolérance à l'As et qu'elles se comportent toutes comme des « bioindicatrices » de la variation de la teneur du sol en As.

Dans ce cadre, nos futures expériences seraient de rechercher s'il peut exister une transition dans le comportement biologique des espèces en fonction de la teneur en As dans le sol. Par

exemple, *H. lanatus* peut-elle passer d'un type biologique « bioindicateur » à celui d' « excluder » pour des teneurs plus élevées en As ?

III. Les espèces végétales ont-elle un effet sur la mobilisation potentielle de l'As dans la rhizosphère ?

Afin de répondre à cette question, deux approches ont été élaborées : celle de « rhizopot-rhizons » et celle du « tapis racinaire ».

La première présente comme avantage de :

- permettre un développement végétatif pour une longue durée (3-4 mois) dans un système de culture comparable aux conditions naturelles de croissance, c'est à dire avec des racines qui croissent directement dans le sol,
- contrôler le changement dans la composition de la solution rhizosphérique tout au long de la période de croissance.

Par contre, l'inconvénient de cette approche réside principalement dans la procédure d'échantillonnage. En effet, les rhizons utilisés assurent l'échantillonnage d'une solution rhizosphérique représentative de tout le système racinaire. Aussi, les variations très localisées à l'interface sol-racines, liées à des conditions particulières de déficience en P et/ou en Fe, ne seront probablement pas détectées.

La deuxième approche « tapis racinaire » ou « root mat approach » permet quant à elle, une séparation physique complète du compartiment racinaire de la rhizosphère. Cette dernière présente comme avantage de :

- collecter facilement le système racinaire et la rhizosphère tout en limitant les artefacts liés à la contamination des racines par le sol,
- disposer d'un nombre conséquent de réplicats et d'avoir la possibilité de varier leurs traitements, avec une faible occupation de l'espace d'expérience.

Par contre, l'inconvénient principal de cette approche est l'apparition probable de symptômes de stress induits par une croissance racinaire hors sol et dans un espace très restreint. Par ailleurs, certaines espèces n'ont pas la capacité de développer un tapis racinaire dense en une période de croissance courte (15-20 jours). Cette problématique risque de limiter le champ d'application de l'approche.

III.1. Etude de l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As par l'approche « rhizopot-rhizons »

III.1.a. H. lanatus, D. viscosa, L. corniculatus et P. lanceolata mobilisent-elles l'As à l'interface sol-racine ?

Pour cela, nous avons effectué un suivi de la variation temporelle de la concentration d'As dans la solution rhizosphérique tout au long de la période de croissance. De plus, à la fin

de l'expérience, la rhizosphère correspondante à chaque espèce a été échantillonnée afin d'analyser la fraction d'As non spécifiquement adsorbée (AsF1) selon la procédure d'extraction séquentielle de Wenzel et al. (2001).

Nos résultats ont montré que la concentration d'As dans la solution rhizosphérique augmente progressivement tout au long de la période d'échantillonnage. Par contre, AsF1 diminue significativement en présence des plantes à la fin de la période de croissance. Ceci suggère que les espèces étudiées ont la capacité de mobiliser l'As des fractions facilement échangeables. D'autre part, Silva Gonzaga et al. (2006) ont démontré que les deux fougères *Pteris vittata* et *Nephrolepis exaltata* mobilisent l'As des fractions adsorbées aux oxy (hydroxydes) de Fe et d'Al amorphes de préférence à celles facilement échangeables.

Dans les démarches expérimentales futures, il faudrait conduire une étude approfondie sur la capacité du végétal à mobiliser l'As de différentes fractions disponibles dans le sol. Wenzel et al. (2001) en définit 5 : la fraction non spécifiquement adsorbée, la fraction spécifiquement adsorbée, la fraction liée aux (oxy) hydroxydes de Fe et d'Al amorphes, la fraction liée aux (oxy) hydroxydes de Fe et d'Al cristallins et la fraction résiduelle.

Pour cela, des analyses de la spéciation minéralogique et chimique de l'As peuvent être envisagées. L'objectif sera de déterminer par combinaison de toutes les approches possibles, les changements dans la répartition d'As entre les différentes fractions dans la rhizosphère, en comparaison avec le sol non rhizosphérique.

III.1.b. Comment les plantes mobilisent-elles l'As à l'interface sol-racine ?

L'objectif principal de cette partie est de mieux comprendre les interactions à l'interface sol-racines entre l'As et certains paramètres. Les derniers sont en lien avec la l'acquisition des éléments nutritifs par les plantes supérieures (NO_3^- et P principalement), le pH et la matière organique dissoute évaluée en tant que COD (Carbone Organique Dissous).

Tout au long de la période du développement végétatif, l'As dans la solution rhizosphérique des quatre espèces sélectionnées est négativement corrélé avec le NO_3^- et positivement corrélé avec le Fe. En plus, dans le cas de D. *viscosa* et *L. corniculatus*, l'As est négativement corrélé avec le COD et positivement corrélé avec le pH. De plus, le P n'a pas été détecté dans la solution rhizosphérique tout au long de la période d'échantillonnage. Par ailleurs, l'alcalinisation de la solution rhizosphérique liée à l'activité racinaire a été mise en évidence dans la rhizosphère des quatre espèces étudiées.

Les questions spécifiques auxquelles nous allons répondre, sont les suivantes :

i) Comment la nutrition azotée affectera-t-elle la mobilité d'As ?

La nutrition azotée par l'assimilation racinaire des NO_3^- peut influencer la mobilité de l'As en modifiant le pH rhizosphérique (Marshner, 1999 ; Hinsinger 2001 ; Hinsinger et al., 2003 ; Bravin et al., 2009). Pour sa part, l'augmentation du pH est principalement liée à

l'excrétion par les racines des groupements hydroxyles (OH^-) afin de compenser l'excès des anions inorganiques assimilés. Ce phénomène permet aussi de maintenir l'équilibre électrostatique au niveau du cytosol (Luo et al., 2000, Chaignon et al., 2002a, Bravin et al., 2009).

ii) Quel est le rôle du pH dans la mobilité d'As, Fe et P ?

L'augmentation du pH obtenue peut entraîner la désorption de l'As (AsO_4^{3-}) des (oxy) hydroxydes de Fe par répulsion électrostatique entre charges négatives (Manning et Goldberg, 1997, Sadiq, 1997, Smith et al., 1999, Fitz et al., 2002). Aussi la corrélation positive obtenu entre l'As et le pH dans la solution rhizosphérique de D. *viscosa* et *L. corniculatus* suggère que la variation du pH rhizosphérique est à l'origine de l'augmentation de la biodisponibilité de l'As tout au long de la période de croissance.

Selon d'autres études, les racines peuvent induire une diminution du pH au voisinage de l'apex en réponse à des conditions particulières de déficience en P (Kirk et al., 1999 ; Shen et al., 2005 ; Johnson et al., 2006). Le P et l'As sont chimiquement similaires et présentent les mêmes affinités d'adsorption sur les (oxy) hydroxydes de Fe (Sadiq, 1995 ; Adriano, 2001). Une acidification à l'interface sol-racine peut entraîner une co-dissolution dans des conditions réductrices des (oxy) hydroxydes de Fe par réduction et/ou par chélation avec des anions organiques (citrate ou malate) (Fitz et al., 2002). Dans notre cas, la corrélation positive obtenue entre l'As et le Fe suggère une augmentation progressive de la dissolution de ces deux éléments au cours du temps.

Par contre, l'acidification de la solution rhizosphérique n'a pas été identifiée par nos analyses. En plus, la concentration du P n'a pas été détectée dans l'eau du sol tout au long de la période d'échantillonnage. Dans le cadre de cette expérimentation, la concentration du P dans l'eau du sol est conidérée comme représentative du P assimilable. Il existe une autre méthode de dosage du P assimilable, internationallement reconnue pour sa fiabilité : la méthode Olsen. Celle-ci est très représentative des échanges sols-racines pour la majorité des situations pédologiques. Nous l'avions pas utilisée dans cette étude parce que l'analyse est destructive (NF ISO 11263). Par ailleurs, la teneur du P dans la biomasse aérienne des quatre espèces testées est inférieure à celle obtenue dans des conditions optimales de croissance. Nous pouvons donc conclure que les espèces testées se sont développées dans des conditions déficientes en P mais sans l'apparition de symptômes de carence. L'observation d'une alcalinisation progressive de la solution rhizosphérique (et non d'une acidification) suppose que les deux rhizons prélèvent une solution rhizosphérique représentative de tout le système racinaire. Au final, les possibles variations très localisées du pH seront donc diluées et non détectées.

iii) Le COD a-t-il un effet sur la mobilité de l'As dans la rhizosphère ?

La matière organique dissoute dans l'eau du sol a été évaluée par le suivi du carbone organique dissous COD tout au long de la croissance végétative.

Dans la solution rhizosphérique de D. *viscosa* et *L. corniculatus*, une corrélation négative entre l'As et le COD a été relevée. Ces deux paramètres peuvent entrer en compétition anionique pour les sites d'adsorption (hématite). Ce phénomène peut être un des facteurs qui contribuent à une augmentation de la biodisponibilité de l'As dans la rhizosphère (Redman et al., 2002).

Par ailleurs, à la fin de la période d'échantillonnage, la concentration en COD obtenue en présence des plantes est significativement inférieure à celle constatée dans la solution non rhizosphérique (ou le contrôle). Par contre, d'autres recherches ont montré une augmentation de la concentration du COD dans la rhizosphère par rapport au contrôle (Wenzel et al., 2003 ; Tu et al., 2004 ; Silva Gonzaga et al., 2006). Ce résultat peut s'expliquer par la présence d'une quantité de COD en solution en équilibre entre les puits de production (racines et matières organiques) et de décomposition (microbes). Via le processus d'exsudation des composés à faible poids moléculaire (sucres, acides organiques et acides aminés), les racines végétales enrichissent la rhizosphère en COD au cours du temps. Facilement biodisponible, le COD ainsi produit est consommé pour tout ou partie, par la microflore microbienne. Dans une rhizosphère appauvrie en éléments minéraux, surtout en azote (N), la consommation du COD produit peut être très intense du fait d'une activité microbienne importante (Kuzyakov, 2002). A la fin de la période d'expérience, le flux de décomposition de COD peut donc dépasser celui de sa production. Dans notre cas, ce mécanisme est probablement favorisé par la baisse drastique de la teneur en N du fait de sa forte consommation par les plantes. Cette tendance peut donc entraîner une baisse significative de la concentration de COD en solution rhizosphérique par rapport à celle du contrôle.

En conclusion, cette partie nous a permis de mieux appréhender l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As à l'interface sol-racines. Les résultats obtenus ont permis d'identifier d'intéressantes corrélations entre l'As et les paramètres suivis (NO_3^-, SO_4^{2-}, Ca, Mg, P, pH, COD…) tout au long de la période d'échantillonnage. Nous avons identifié et caractérisé plusieurs processus influençant la mobilisation de l'As dans la rhizosphère (alcalinisation/acidification, compétition anionique…). L'avantage de l'approche « rhizopot-rhizons » réside dans le fait que les plantes se sont développées sans prétraitement du substrat de croissance (contamination artificielle, ajout de solutions nutritives…). C'est pourquoi, cette approche semble être adaptée pour suivre les variations temporelles de la composition de la solution rhizosphérique. En outre, elle permet d'approcher quantitativement l'impact du végétal sur la biodisponibilité de l'As à long terme.

Les résultats de notre expérience pourraient tout aussi bien être discutées au regard de la sensibilité du dispositif expérimental. Pour l'améliorer, il peut être proposé par exemple, une modification de la structure interne du rhizopot (tout en préservant ses dimensions externes). Dans ce cadre, deux compartiments peuvent être crées : la « rhizosphère » localisée au centre du pot et la « non rhizosphère » située à la périphérie du rhizopot. Ils seront séparés par une toile en nylon (3 µm) qui limitera le développement des racines hors du compartiment « rhizosphère ». De plus, elle permettra les échanges d'eaux et de solutés entre les deux compartiments. Cette caractéristique favorisera un développement végétatif proche des

conditions normales de croissance. Deux rhizons par compartiment seront déposés : le premier à mi-distance entre la surface et le fond du rhizopot, le deuxième localisé à quelques centimètres du fond du rhizopot.

L'objectif sera alors de suivre les variations spatiales et temporelles de la composition de la solution rhizosphérique tout au long de la période de croissance végétative. De plus, le

protocole ainsi envisagé amplifiera d'avantage la pression d'un système racinaire sur une zone rhizosphérique restreinte.

A chaque date de prélèvement, le suivi des matrices 'biomasses végétales' et 'rhizosphère' complètera les analyses d'ores et déjà menées selon une méthode d'échantillonnage 'destructive'. En effet, un certain nombre de rhizopot sera 'sacrifié' à chaque prélèvement.

Mettant en œuvre ces deux adaptations expérimentales, les objectifs spécifiques suivants pourront être poursuivis:

- Quantifier les variations temporelles et spatiales de l'As dans le système sol/rhizosphère/solution rhizosphérique/racines/plante,
- évaluer l'impact de la rhizodéposition sur le devenir de l'As dans le système rhizosphère/solution rhizosphérique/racine.

III.2. Etude de l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As par l'approche « tapis racinaire » ou « root mat approach »

L'approche « tapis racinaire » a été sélectionnée afin d'étudier les mécanismes de mobilisation et d'accumulation de l'As en fonction de la production des anions organiques sous des conditions variées en P et As. Les questions spécifiques sont les suivantes :

- Quels sont les facteurs qui affectent la mobilité de l'As dans la rhizosphère de *P. lanceolata*?
- La production d'anions organiques résulte-t-elle d'une stratégie de tolérance de *P. lanceolata* en réponse à la déficience de P ?
- Quel est le comportement de *P. lanceolata* vis-à vis de l'As dans le sol ?

Les résultats obtenus montrent que :

- L'ajout du P a permis de mobiliser l'As dans la rhizosphère et donc de favoriser son accumulation au niveau des racines,
- *P. lanceolata* se comporte comme un bioindicateur de la variation de la teneur en As dans la rhizosphère.
- Les exsudats racinaires identifiés n'influencent pas la mobilité de l'As et du P,

Dans le cadre de cette étude, le P a induit une augmentation de la biodisponibilité de l'As dans la rhizosphère d'une part et, d'autre part, son accumulation dans les racines. Par contre, Nous n'avons pas identifié des interactions antagonistes entre le P et l'As pour les systèmes de transport racinaires. Ce mécanisme a été observé dans d'autres expériences (Abedin et al., 2002, Tu et Ma, 2003 ; Geng et al., 2006). Nous suggérons donc, que dans notre cas, les concentrations en P et As dans la rhizosphère ne sont pas suffisamment élevées pour qu'il y ait une compétition entre les deux au niveau des racines.

D'autres études devront être élaborées afin de mieux cerner l'importance des exsudats racinaires dans des conditions particulières de stress induites par non biodisponibilité du P et/ou par la présence de l'As. Par ailleurs, le dispositif expérimental peut être amélioré afin de stimuler la formation d'un système racinaire plus dense que celui obtenu dans la présente étude.

L'objectif du protocole proposé, sera de concentrer l'effet du tapis racinaire sur une fine couche de sol. Le temps de contact entre les racines et leur rhizosphère devra être suffisamment long afin d'identifier de probables interactions entre les exsudats racinaires d'une part et l'As et le P d'autre part.

Les résultats obtenus peuvent être mis en perspective en déposant des microrhizons au voisinage du système racinaire. En effet, ces derniers assureront la collecte de la solution rhizosphérique. Il sera alors possible de suivre la variation de la composition et de la concentration d'anions organiques en fonction des conditions variées en As et en P.

Enfin, le champ d'application de cette approche serait étendu à d'autres espèces appartenant à des familles végétales différentes. Contrairement à *P. lanceolata*, le processus d'exsudation pourrait constituer, dans leur cas, une stratégie de tolérance en réponse à des conditions de stress.

Conclusion générale

Notre étude a permis au départ de comparer et de caractériser la tolérance et la capacité accumulatrice des espèces séléctionnées à l'égard de l'As en milieu de culture et en sol contaminé chimiquement par l'As. Ensuite, l'étude de la mobilisation de l'As dans la rhizosphère a été réalisée par deux approches d'étude complémentaires : l'approche « rhizopot-rhizons » et l'approche « tapis racinaire ». L'approche « rhizopot-rhizons » nous a permis d'identifier d'intéressantes corrélations entre l'As et les paramètres suivis (NO_3^-, SO_4^{2-} , Ca, Mg, P, pH, COD) tout au long de la période de croissance. Nous avons identifié et caractérisé plusieurs processus ifluençant la mobilisation de l'As dans la rhizosphère (alcalinisation/acidification, compétition anionique…). L'avantage de l'approche « rhizopot-rhizons » réside dans le fait que les plantes se sont développées sans prétraitement du substrat de croissance (contamination artificielle, ajout de solutions nutritives…). Par ailleurs, l'approche « tapis racinaire » a permis d'identifier quelques anions organiques dans les racines de *P. lanceolata* et de mettre en évidence le rôle du phosphore dans la mobilisation de l'As dans la rhizosphère. Elle permet d'amplifier l'effet du système racinaire sur la mobilité de l'As dans le sol d'une part, et de récupérer entièrement le système racinaire tout en limitant les artefacts liés

à la contamination des racines par le sol d'autre part. Au regard de tous ces élements, les perspectives expérimentales proposées dans la partie discussion pourront être conduites au laboratoire dans l'objectif de mieux comprendre l'effet de la végétation sur la mobilité de l'As à l'interface sol-racines.Par ailleurs, il est utile d'élaborer une « approche de modélisation » pour étudier la faisabilité de la technologie de phytostabilisation sur l'ancien site minier de la Combe du Saut. L'objectif sera de simuler la dynamique de l'As labile et de la croissance végétatitive au cours du temps dans un contexte de changement climatique. Un modèle dynamique avec des variables abiotiques (climatiques, pédologiques, minéralogiques…) et biotiques (type de végétation, microflore) en entrée du modèle permettra de prédire les variations dans la concentration en As dans la solution du sol et dans les plantes d'une part et les formes chimiques et minéralogiques d'As d'autre part. Aussi, la simulation de la croissance de la biomasse aérienne et racinaire pourrait être d'un grand intérêt pour prédire l'efficacité de la phytostabilisation.

ANNEXES

ANNEXE I : Résultats des extractions séquentielles : suite du Chapitre IV

Après trois mois de croissance, le sol situé au voisinage des racines et des rhizons a été prélevé et la procédure d'extraction séquentielle de Wenzel et al. (2001) a été appliquée. Le taux d'extraction est supérieur à 70% pour l'ensemble de traitements. Les résultats sont présentés dans la figure 1 ci-dessous. Nous constatons que la concentration de l'As dans les différentes fractions ne varie pas significativement entre les différents traitements à l'exception de la fraction AsF1 (voir chapitre IV)

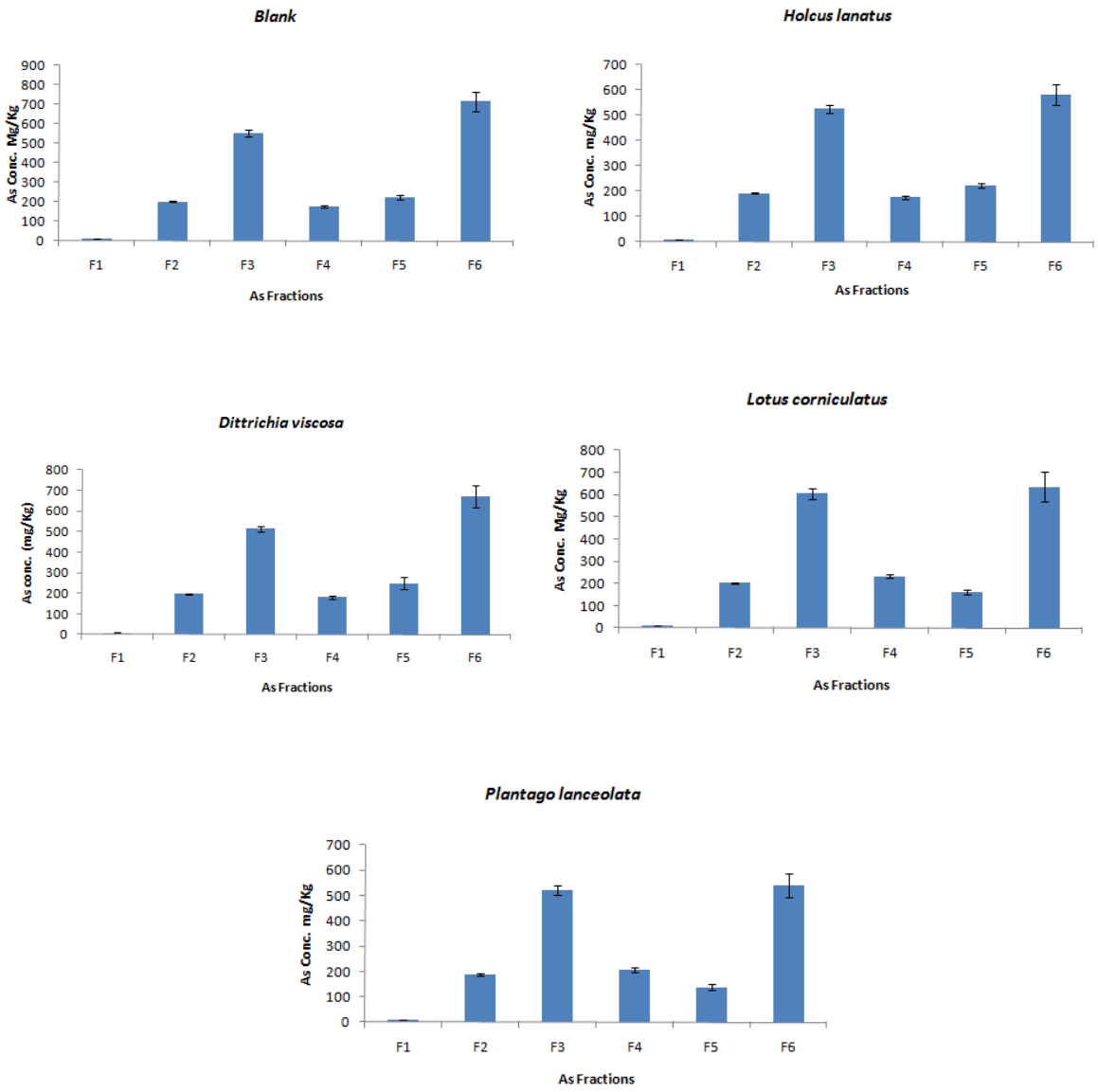


Fig.1 : la concentration des différentes fractions d'As après trois mois de croissance dans la rhizosphère de *H. lanatus, D. viscosa, L. corniculatus et P. lanceolata* et dans le sol sans plantes *(Blank)*

ANNEXE II. Extraction chimique de l'As par Rhizoextraction

L'extraction chimique simple par l'ajout de solutions d'acides organiques ou *Rhizoextraction* est utilisée afin de vérifier si les acides organiques suivants : acide acétatique, citratique, formique et oxalique mobilisent efficacement l'As du sol de Salsigne (Feng et al., 2005). Le protocole expérimental est le suivant:

Cinq solutions d'acides organiques standards (1mM) sont préparées,

on pèse 2 g de sol (séché à l'air et tamisé 5 mm) dans des tubes de centrifugeuse (50 ml). On ajoute ensuite 20 ml de solutions d'acide acétique, citrique, formique et oxalique respectivement dans chaque tube. On agite ensuite pendant 16h avec un agitateur à mouvement rotatoire (40t/min),

on centrifuge à 8000 x g pendant 15 minutes,

5 ml du surnageant sont prélevés et dilués avec de l'acide nitrique HNO_3 (2%) dans des fioles jaugées de 10 ml,

Les éléments suivants : As, Fe, Al et Mn sont ensuite analysés par ICP-OES.

Krusskal-wallis anova est utilisé afin d'évaluer l'effet des acides organiques sur la mobilité de l'As, du Fe, d'Al, et du Mn dans le sol de Salsigne. Le seuil de signification est fixé à 0.01.

La figure 2 montre la concentration moyenne en As, Fe, Al et Mn obtenue en fonction du type d'acide organique utilisé. Les résultats montrent que l'acide citrique mobilise significativement plus d'As (p=0.004), d'Al (p=0.008), de Fe (p=0.011) et de Mn (p=0.001) que les autres acides organiques et l'eau Ultra-pure.

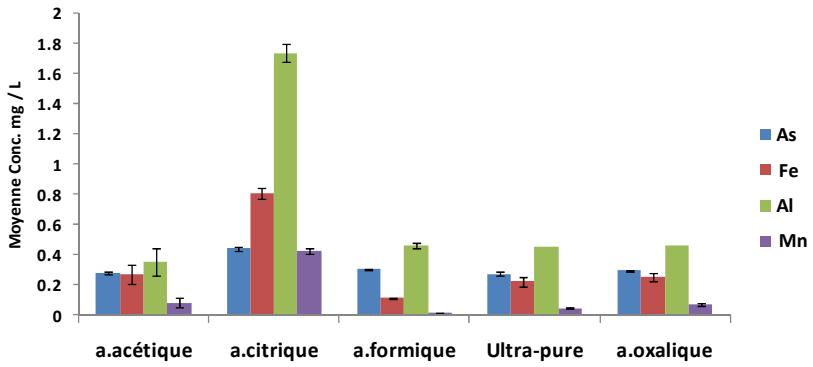


Fig.2 Concentration en As (mg/l) en fonction du type d'acide organique et de l'eau Ultra-pure

ANNEXE III. Propriétés de l'As présentées sous forme de tableaux et de figures

Tableau 1 : principaux minéraux contenant de l'arsenic d'après Othmer K. (2001)

Nom	Formule	Nom	Formule
Lollingite	$FeAs_2$	Sperrylite	$PtAs_2$
Safforlite	$CoAs_2$	Arsénoprite (mispickel)	FeAsS
Niccolite	NiAs	Cobaltite	CoAsS
Rammelsbergite	$NiAs_2$	Enargite	Cu_3AsS_4
Réalgar	AsS	Gersdorffite	NiAsS
Orpiment	As_2S_3	Glaucodot	$(Co_2Fe)AsS$

Tableau 2 : concentrations en As dans des milieux variés d'après Adriano D.C. (2001)

Milieu	Concentration moyenne mg / Kg	Gamme mg / Kg
Roches ignées	1,5-3	0,06 - 113
Roches calcaires	1,7	0,1- 20
Roches gréseuses	4,1	0,6 - 120
Schistes	14,5	0,3 - 500
Roches phosphatées	22,6	0,4-188
Pétrole	0,18	< 0,003 – 1,11
Charbon	13	Trace - 2000
Sols mondiaux	7,2	0,1-55
Récoltes courantes		0,03 - 3,50
Eaux potables (O.M.S.) (en µg / l) (Bhattacharya, 2007)	10	
Eaux de rivière (µg / l)		≤ 5
Estuaire du Rhône, France (µg / L) (Seyler and Martin, 1990)	2,2	1,1-3,8
Estuaire de la Loire, France (µg / L) (Seyler and Martin, 1990)		≥16

Tableau 3: principaux composés d'As avec des valeurs de LD50 pour certains d'après Prohaska et al. (2005)

Espèces	LD_{50} (mg/Kg)	Structure
As (Eléments)	763	As
Espèces inorganiques d'arsenic As (III)		
Trioxyde d'arsenic	14	As_2O_3
Acide arsénieux	14	$HAsO_2$
Arsénite (As III)	14	AsO_3^{3-}
Chlorure d'arsenic	14	$AsCl_3$
Sulfure d'arsenic	14	As_2S_3
Arsine	3	AsH_3
Espèces inorganiques d'arsenic As (V)		
Pentoxyde d'arsenic	20	As_2O_5
Acide orthoarsénique	20	H_3AsO_4
Acide métaarsénique	20	$HAsO_3$
Arséniate	20	AsO_4^{3-}
Espèces organiques d'arsenic		
Arsenic monométhyl (MMA)		CH_3AsH_2
Arsenic diméthyl (DMA)		$(CH_3)_2AsH$
Arsenic triméthyl (TMA)		$(CH_3)_3As$
Acide monométhylarsonique (MMAA)	1800	$CH_3AsO(OH)_2$
Acide diméthylarsonique (acide cacodylique) (DMAA)	2600	$(CH_3)_2AsO(OH)_2$
Oxyde arsine triméthyl (TMAO)		$(CH_3)_3AsO$
Arsénobétaine (AsB)		$(CH_3)_3As^+ CH_2COOH$
Arsénocholine (AsC)		$(CH_3)_3As^+ CH_2CH_2OH$
Ethanol Diméthyl-arsinoyl		$(CH_3)_2AsO\ CH_2CH_2OH$
Arsénosucres (R-diméthyl arsinoyl-riboside) 1-6		*Voir la structure ci-dessous*

La figure 3 montre la structure développée des espèces d'As rencontrées dans l'environnement

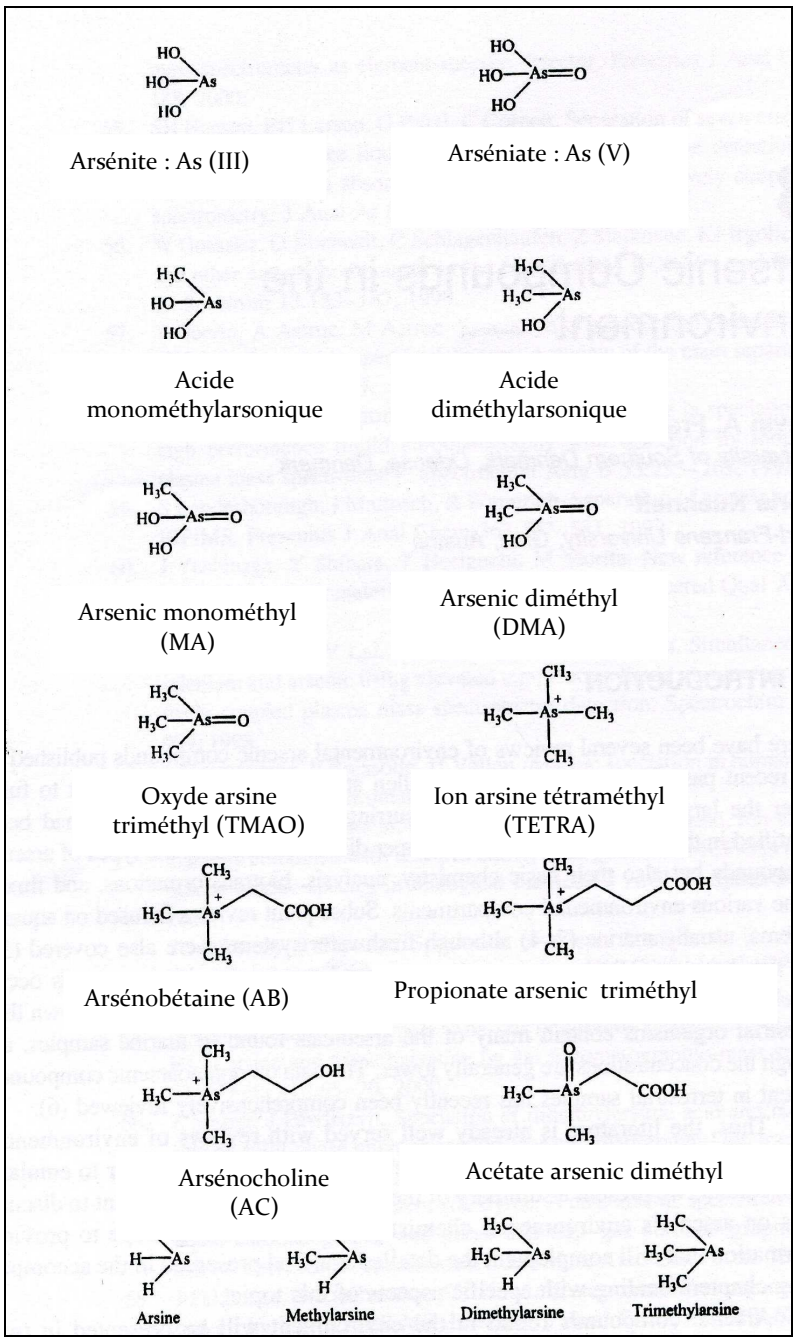


Fig. 3 : structure développée des principaux composés d'As rencontrés dans l'environnement d'après Francesconi et al. (2002)

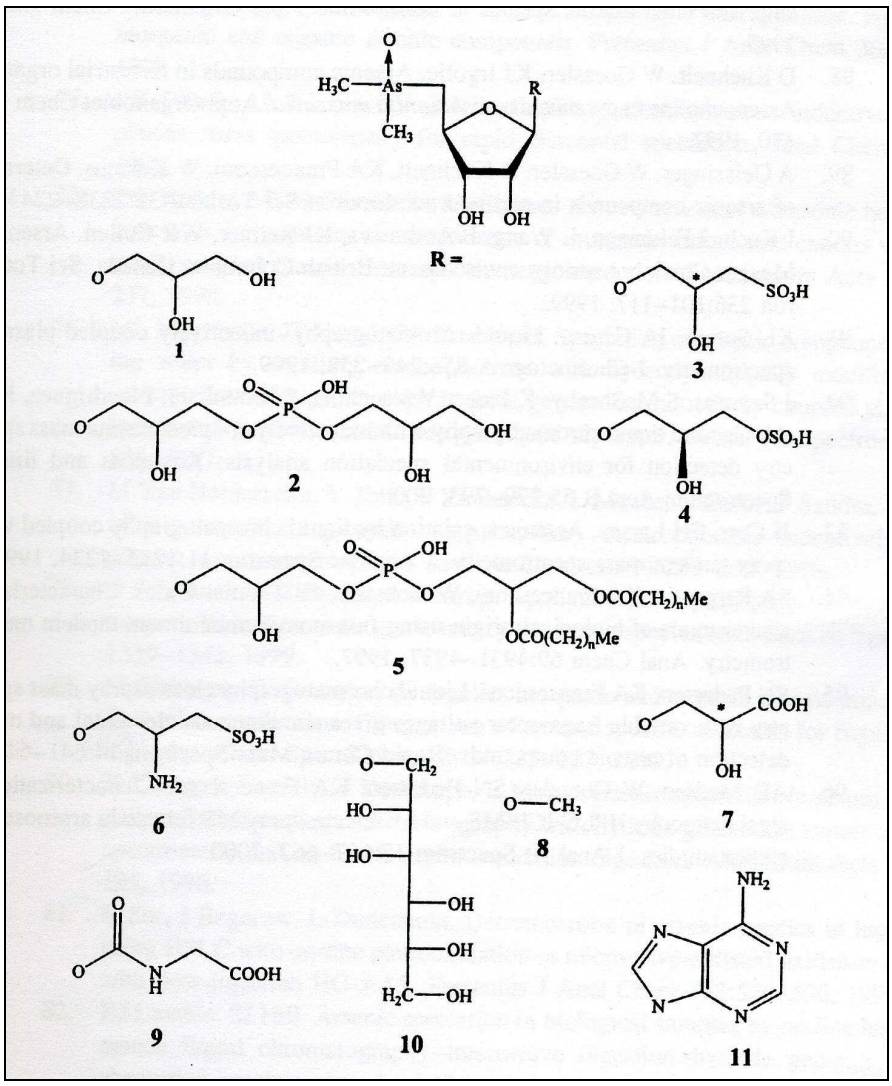


Fig. 4: structure développée des sucres arséniés rencontrés dans l'environnement d'après Francesconi et al. (2002). R : radical ramifié ; Les chiffres de 1 à 11 représentent la structure moléculaire des ramifications.

ANNEXE IV. Rappels sur les différents mécanismes de fixation des oxyanions dans les sols

Plusieurs mécanismes interviennent dans les processus de rétention ou d'adsorption de l'As dans les sols: l'adsorption non spécifique et spécifique, la substitution isomorphique, la précipitation et la coprécipitation. Les différents mécanismes de rétention peuvent intervenir simultanément avec une plus ou moins grande importance relative (Hettiarachchi et al., 2001). Selon les conditions physico-chimiques du milieu, un mécanisme peut être prédominant, mais la nature complexe des sols fait qu'il est généralement difficile de distinguer les mécanismes mis en jeu. La figure 5 illustre les principales interactions entre un élément et un solide à l'interface solide/liquide.

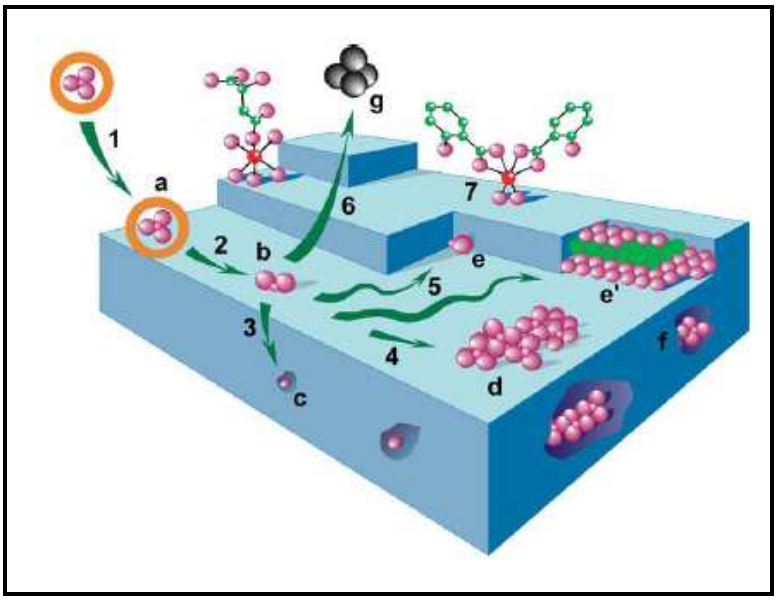


Fig. 5: Les différents mécanismes de fixations d'après Deschamps et al. (2006)

Adsorption (1) sous forme de complexe de sphère externe (a) ; perte de la sphère d'hydratation (2) et formation d'un complexe de sphère interne (b) ; diffusion dans le réseau cristallin (3) et substitution isomorphique (c) ; diffusion latérale rapide (4,5) et formation d'un polymère de surface (d) ; adsorption sur un front de croissance du minéral (e et e') ; formation de polymère de surface et incorporation dans la matrice hôte après croissance cristalline (f). L'ion adsorbé peut éventuellement repasser en solution, suite par exemple à des réactions redox de surface ou d'un équilibre dynamique (g). (7) Complexation organo-minérale.

1.Les mécanismes d'adsorption

Les processus d'adsorption impliquent des interactions entre les oxyanions et l'adsorbant à l'interface eau /sol. L'intensité de l'adsorption de l'As dépend des propriétés

physico-chimiques du sol (pH, capacité d'échange cationique et anionique…), de la concentration en oxyanions d'As, de leur spéciation dans la solution du sol et de la compétition entre les différentes espèces chimiques présentes (Inskeep, 2002).

1.1. Adsorption non spécifique (physisorption)

Dans le cas de l'adsorption non spécifique, les ions sont solvatés et maintenus à la surface de la phase solide avec leur sphère de solvatation par des forces électrostatiques (interactions coulombiennes, forces de Van Der Waals), on parle alors de complexe de sphère externe (CSE) (Fig. 6) (Sposito, 1989). La force de rétention est donc relativement faible et les ions adsorbés sont facilement échangeables.

1.2. Adsorption spécifique (chimisorption)

Les ions peuvent perdre une ou plusieurs molécules d'eau de leur sphère d'hydratation et être directement complexés par un atome du substrat. On parle de formation de complexe de sphère interne (CSI) ou d'adsorption spécifique (Fig.6) (Sposito, 1989). Le terme spécifique se réfère au caractère partiellement covalent de la liaison chimique. Le recouvrement partiel des orbitales atomiques de l'ion d'As et des ligands définit une géométrie précise du complexe de coordination, ce qui n'est pas le cas lors de l'adsorption non spécifique. Toutefois, le caractère partiellement covalent de la liaison chimique n'est pas une condition indispensable à la formation de CSI, puisque dans certains CSI la liaison chimique est de nature purement électrostatique (Sposito, 1989). La rétention des ions sur la surface adsorbante par ce mécanisme est plus forte et donc moins réversible que la physisorption.

La figure 15 montre une représentation schématique des complexes de sphère externe et des complexes de sphère interne (Cotter-Howells et al, 2000).

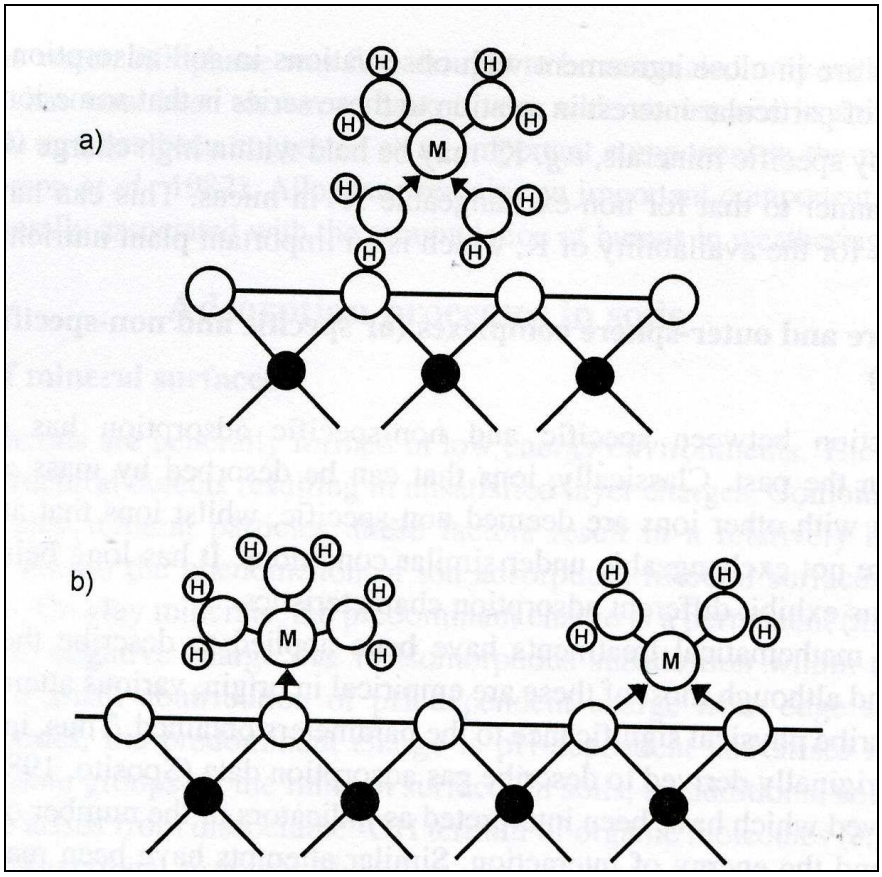


Fig.6 : a) complexe de sphère externe et b) complexe de sphère interne.

Le substrat solide est en dessous de la ligne horizontale et la solution est en dessus. Les cercles libellés par la lettre « M » représentent le métalloïde (ici l'As) sorbés ; les cercles libellés par la lettre « H » représentent les atomes d'hydrogène. Les cercles en noir et blanc correspondent aux ions métalliques dans le substrat d'après Cotter-Howells et al. (2000).

1.3. La substitution isomorphique

Lorsqu'un ion a été chimisorbé, il peut diffuser dans la structure cristalline et remplacer un ion du minéral ou combler une lacune cationique. Ce mécanisme dépend de la charge, du rayon ionique, et de l'électronégativité de l'élément incorporé. Généralement, la différence entre les rayons ioniques de l'élément substituant et substitué ne doit pas dépasser environ 15 % et la charge ne doit pas différer de plus d'une unité (Fig.14) (Alloway, 1995).

1.4. La précipitation homogène, hétérogène et la co-précipitation

Les phénomènes de précipitation peuvent se produire dans la phase liquide ou à la surface de la phase solide. La précipitation homogène, ou précipitation, est la formation en solution d'une phase solide (Sposito, 1989). Celle-ci s'effectue lorsque la concentration des espèces ioniques d'As excède le produit de solubilité de la phase solide. On parle de précipitation hétérogène, ou précipitation de surface, lorsque la précipitation se produit à l'interface liquide / solide. La précipitation a lieu lorsque les sites d'adsorption spécifique sont saturés. Sposito (1989) définit la co-précipitation comme la précipitation simultanée de plusieurs éléments. Cela se produit lorsqu'une phase minérale précipite et incorpore un élément exogène dans sa structure cristalline, en remplacement d'un atome constitutif du minéral. La co-précipitation peut conduire à la formation d'un solide homogène (ou solution solide homogène) si la taille et la valence de l'élément substituant sont comparables à ceux de l'élément remplacé. Dans le cas contraire, un solide mixte constitué de plusieurs phases se forme.

ANNEXE V. Tableaux et figures correspondant au chapitre de synthèse bibliographique « Mobilisation de l'As dans la rhizosphère »

Tableau 4 le pourcentage du carbone photosynthétique net alloué, et perdu par les racines des espèces végétales annuelles

Pourcentage du carbone alloué aux racines	Pourcentage du carbone perdu par les racines		
	Respiration (A)	Rhizodéposition (B)	Total (A + B)
28-59	16-76	4-70	42-90

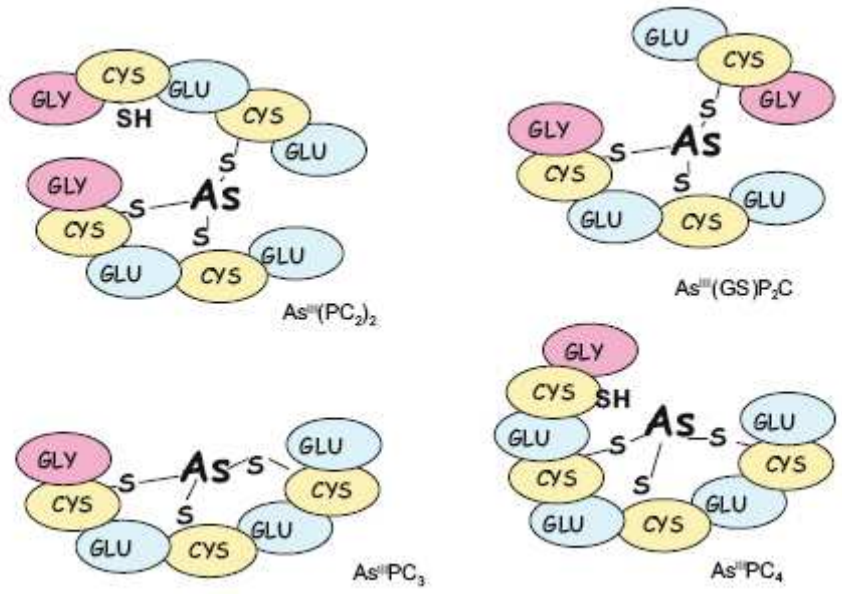


Fig. 7 Structures des complexes arsénites-phytochélatines. Il existe deux isoformes pour $As^{III}(PC_2)_2$ par contre il existe quatre pour $As^{III}PC_4$. GLU, (glutamic acid); CYS, (cysteine); GLY, (glycine)

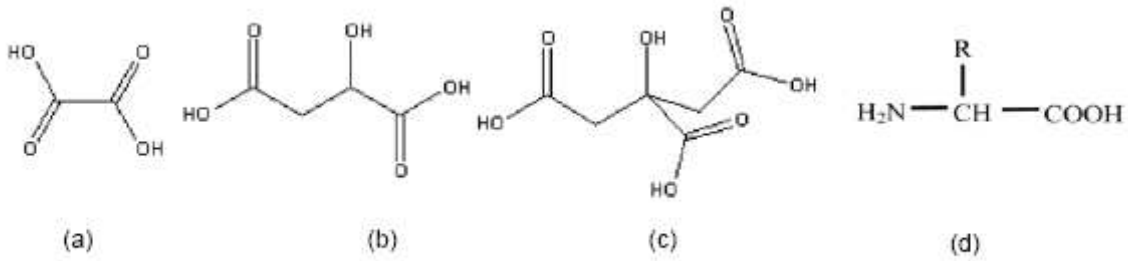


Fig. 8 quelques acides organiques et structure d'un acide aminé ; (a) oxalate, (b) malate, (c) citrate, (d) acide aminé (R = H glycine ; R = CH2SH cystéine ; R =CH2CH2COOH glutamate).

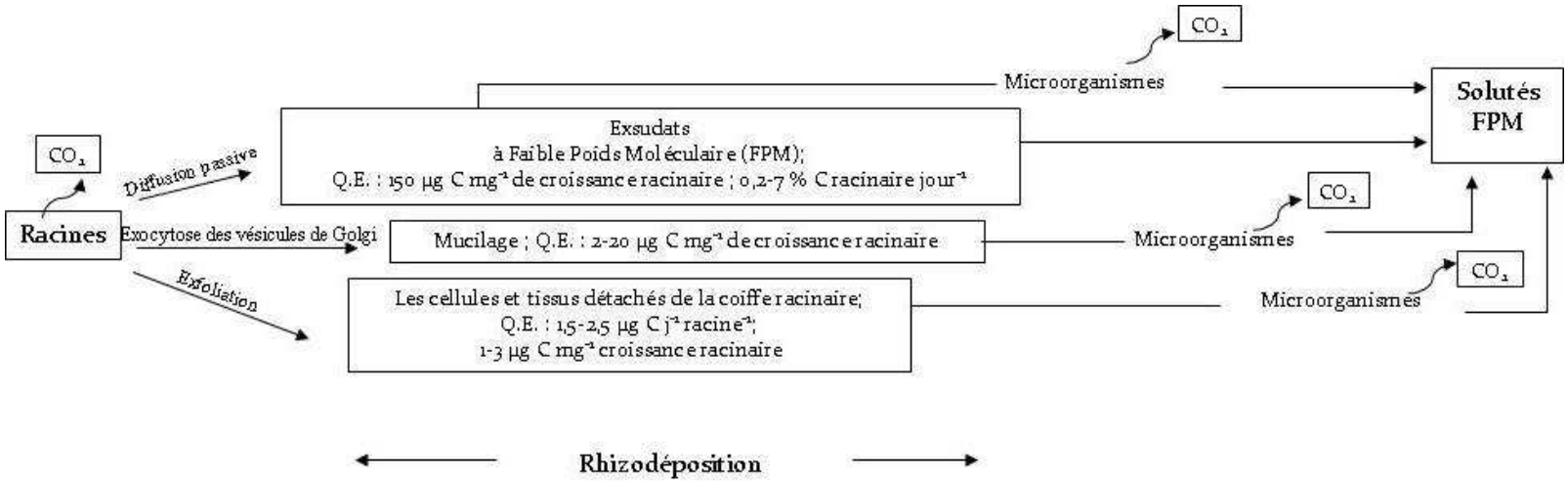


Figure : model du flux de carbone dans la rhizosphère (**Barlow**, 1975 ; **Warembourg et Billes**, 1979; **Rovira et al.**, 1979 ; **Rougier**, 1982 ; **Marschner**, 1995 ; **Nguyen**, 2003); Q.E : Quantité Estimée.

ANNEXE VI : quelques données des expérimentations

Chapitre I : bioaccumulation

icpnum	who	sampl	taux	Al396,152	As189,042	Ca317,933	Fe259,940	Mn257,610	P214,914
icpnum	who	sampl	taux	Al(ppm)	As(ppm)	Ca(ppm)	Fe(ppm)	Mn(ppm)	P(ppm)
5001	OBEIDY	Blanc	1	1,71	0,0831	5,35	0,534	0,0133	0,0249
5002	OBEIDY	NCS DC 73319	31,86	56484,59	33,77	9913,24	9901,77	1309,13	543,85
5003	OBEIDY	NCS DC 73323	26,93	84145,48	349,55	257,72	8316,52	1039,5	214,63
5004	OBEIDY	H20-1	90,7	146,03	1,22	6547,63	122,45	88,89	1389,52
5005	OBEIDY	H20-2	130,57	194,55	1,65	7727,13	103,8	212,83	1299,17
CTRL	_	_	_	5,22	5,21	5,05	5,19	5,25	5,18
5006	OBEIDY	H20-3	100,17	672,14	2,46	13463,85	501,85	210,36	1850,14
5007	OBEIDY	H20-4	76,06	482,98	0,73	11953,59	352,92	242,63	1944,09
5008	OBEIDY	H20-5	60,47	1024,97	2,16	8106,61	879,23	177,78	1306,15
5009	OBEIDY	H40-1	147,84	1074,8	3,67	8833,44	632,76	189,24	1614,41
5010	OBEIDY	H40-2	97,56	249,75	2,26	8053,58	135,61	162,93	1548,28
CTRL	_	_	_	5,16	5,63	5,01	5,08	5,16	5,13
5011	OBEIDY	H40-3	104,66	634,24	2,91	7110,6	456,32	254,32	1444,31
5012	OBEIDY	H40-4	106,26	1072,16	2,74	7113,04	697,07	143,45	1549,27
5013	OBEIDY	H40-5	112,29	248,16	2,74	7931,04	126,89	195,38	1173,43
5014	OBEIDY	H60-1	181,55	370,36	2,76	8302,28	192,44	187	1181,89
5015	OBEIDY	H60-2	75,12	332,78	1,78	7782,43	232,12	195,31	1122,29
CTRL	_	_	_	5,15	5,59	4,92	5,32	5,33	5,15
5016	OBEIDY	H60-3	94,85	92,67	1,61	6198,45	75,5	119,51	1029,12
5017	OBEIDY	H60-4	411,49	613,12	7,53	10558,83	551,4	185,17	975,23
5018	OBEIDY	H60-5	366,67	770,01	5,65	10160,43	246,77	242,74	1019,34
5019	OBEIDY	H80-1	612,77	1011,07	8,27	12151,23	303,32	373,79	1164,26
5020	OBEIDY	H80-2	970	1629,6	10,28	12910,7	512,16	346,29	815,77
CTRL	_	_	_	5,16	5,42	4,96	5,28	5,29	5,11
5021	OBEIDY	H80-3	387,92	632,31	6,01	12529,82	500,42	320,81	1024,11
5022	OBEIDY	H80-4	352,73	606,7	6,67	9297,96	241,62	220,1	1276,88
5023	OBEIDY	H80-5	255,75	442,45	6,24	8380,93	322,25	281,33	1094,61
5024	OBEIDY	H100-1	194,26	343,84	7,91	7923,87	106,65	229,23	1050,95
5025	OBEIDY	H100-2	276,81	656,04	5,34	11484,85	252,73	442,9	1323,15
CTRL	_	_	_	5,15	5,51	5,06	5,27	5,2	5,24
5026	OBEIDY	H100-3	583	1783,98	5,61	19705,4	1055,23	317,15	1731,51
5027	OBEIDY	H100-4	104,64	568,2	7,3	9910,45	385,08	297,18	1176,15
5028	OBEIDY	I20-1	31,45	527,1	1,34	17646,28	372,68	93,72	1188,81
5029	OBEIDY	I20-2	27,61	96,64	0,48	13776,56	80,62	67,09	1109,09
5030	OBEIDY	I20-3	43,55	639,75	1,62	24379,29	439,42	92,76	1037,36
CTRL	_	_	_	5,12	5,63	5,06	5,19	5,26	5,28
5031	OBEIDY	I20-4	31,01	204,36	0,75	15774,79	157,53	89	1383,67
5032	OBEIDY	I20-5	30,38	297,42	1,06	14555,36	227,85	89,92	1273,83
5033	OBEIDY	I40-1	90,23	1439,17	4,29	16858,57	1113,44	129,93	1143,21
5034	OBEIDY	I40-2	42,46	201,69	1,01	12377,09	128,23	68,79	833,91
5035	OBEIDY	I40-3	35,45	101,39	0,93	12771,57	93,23	75,86	1022,73
CTRL	_	_	_	5,15	5,79	5,03	5,31	5,25	5,31
5036	OBEIDY	I40-4	48,81	291,4	1,24	13720	184,99	80,54	1060,15
5037	OBEIDY	I40-5	41,05	272,16	0,82	13858,89	185,96	80,46	1079,62
5038	OBEIDY	I60-1	30,09	92,98	0,61	10364,5	83,65	60,48	891,87
5039	OBEIDY	I60-2	37,53	343,02	1,08	15042,4	237,19	80,31	1207,34
5040	OBEIDY	I60-3	34,5	153,87	1,12	13255,59	193,89	94,19	993,26
CTRL	_	_	_	5,17	5,51	4,91	5,15	5,15	5,13
5041	OBEIDY	I60-4	27,81	72,03	0,73	13460,87	125,15	66,74	1277,59
5042	OBEIDY	I60-5	31,55	182,67	0,88	12982,83	315,82	63,73	931,99
5043	OBEIDY	I80-1	84,09	423,81	3,13	13303,04	296,84	84,93	867,81
5044	OBEIDY	I80-2	36,88	314,59	1,73	12005,18	251,89	87,41	936,01
5045	OBEIDY	I80-3	81,3	313,82	2,79	11073,06	213,01	86,18	803,24
CTRL	_	_	_	5,21	5,69	4,95	5,39	5,44	5,24
5046	OBEIDY	I80-5	129,55	529,86	6,21	14649,51	334,24	98,59	1048,06
5047	OBEIDY	I100-1	48,76	344,25	2,08	14091,64	136,04	96,06	978,13
5048	OBEIDY	I100-2	84,77	871,44	4,65	24557,02	481,49	93,25	1265,62
5049	OBEIDY	I100-3	217,18	1192,32	4,82	21364	694,98	134,22	1711,38
5050	OBEIDY	I100-4	197,99	4286,48	12,95	25384,3	2876,79	231,65	1308,71
CTRL	_	_	_	5,22	5,67	5,09	5,36	5,31	5,25
5201	OBEIDY	I100-5	86,066	435,49	2,81	16700,25	230,66	104,14	1363,29
5202	OBEIDY	L20-1	41,325	109,92	0,94	17416,01	111,16	57,86	1145,53
5203	OBEIDY	L20-2	36,076	115,08	1,36	15959,66	80,09	74,32	1305,59
5204	OBEIDY	L20-3	38,852	101,79	0,65	17949,24	78,48	63,33	1460,45
5205	OBEIDY	L20-4	37,002	95,1	0,58	16818,15	72,15	61,79	1029,03
CTRL	_	_	_	5,3	5,74	5,16	5,43	5,4	5,36
5206	OBEIDY	L20-5	33,591	92,04	0,97	18758,89	64,49	69,87	1094,39
5207	OBEIDY	L40-1	64,257	172,21	1,01	19780,23	70,04	56,61	1042,25
5208	OBEIDY	L40-2	93,658	232,27	1,4	17433,5	97,4	68,46	1038,67
5209	OBEIDY	L40-3	164,096	300,3	0,15	14581,57	71,38	42,01	745
5210	OBEIDY	L40-4	81,806	230,69	1,13	20197,08	93,26	85,9	926,86
CTRL	_	_	_	5,08	5,53	5,06	5,26	5,25	5,22

icpnum	who	sampl	taux	Al396,152	As189,042	Ca317,933	Fe259,940	Mn257,610	P214,914
icpnum	who	sampl	taux	Al(ppm)	As(ppm)	Ca(ppm)	Fe(ppm)	Mn(ppm)	P(ppm)
5287	OBEIDY	Blanc	1	3,19	-0,00739	8,49	0,332	0,0126	0,152
5288	OBEIDY	CTA-VTL-2	13,419	2069,612	1,012	28414,733	869,685	58,641	2390,729
5289	OBEIDY	I100-1R	277,34	2465,553	13,035	5649,416	1852,631	116,205	984,557
5290	OBEIDY	I100-2R	621	2819,34	5,875	8961,03	1757,43	209,277	1347,57
5291	OBEIDY	I100-5R	442,55	2557,956	7,346	4350,296	1792,34	167,728	1022,297
CTRL	_	_	_	4,85	5,24	4,69	5,1	4,85	4,89
5292	OBEIDY	L20-1R	160,33	2074,618	3,479	6148,502	1579,211	176,359	1382,01
5293	OBEIDY	L20-2R	224	2280,32	3,539	5996,48	1740,48	197,344	1498,56
5294	OBEIDY	L20-3R	147,7	1979,18	4,815	5482,624	1549,373	220,073	1355,886
5295	OBEIDY	L20-4R	112,94	1770,962	3,038	5946,502	1353,069	171,675	910,329
5296	OBEIDY	L20-5R	116,81	1808,25	3,329	7896,491	1363,196	107,233	1121,395
CTRL	_	_	_	4,81	5,19	4,66	5,1	4,87	4,83
5297	OBEIDY	L40-1R	104,32	1792,2	6,155	5508,043	1340,499	107,449	1044,233
5298	OBEIDY	L40-2R	481,89	5406,806	15,228	9849,832	4110,522	360,454	1628,788
5299	OBEIDY	L40-3R	398,07	4239,392	9,275	9004,23	3136,752	272,675	1349,44
5300	OBEIDY	L40-4R	364,5	2278,106	3,506	5489,325	1366,864	151,266	1111,716
5501	OBEIDY	L60-1R	174,59	3938,683	15,224	6634,306	3437,618	226,963	1326,861
CTRL	_	_	_	4,85	5,17	4,71	5,05	4,78	4,84
5502	OBEIDY	L60-2R	246,94	3597,901	17,138	6269,781	3904,106	251,878	1296,43
5503	OBEIDY	L60-3R	343,09	3362,321	11,288	6120,797	2689,857	237,078	1629,697
5504	OBEIDY	L60-4R	99,044	1840,238	9,082	5076,005	1453,966	166,394	1252,907
5505	OBEIDY	L60-5R	247,77	3585,275	19,45	8104,655	2737,892	267,595	1471,772
5506	OBEIDY	L80-1R	579,25	4060,507	24,27	8538,071	2786,168	225,326	909,415
CTRL	_	_	_	4,85	5,19	4,6	5,12	4,87	4,81
5507	OBEIDY	L80-2R	564,82	5693,335	28,862	6636,576	4140,094	351,88	1395,093
5508	OBEIDY	L80-3R	380,86	7091,688	47,227	11734,42	5396,843	396,099	2707,943
5509	OBEIDY	L80-4R	409,22	11073,49	19,274	16990,814	8401,287	495,156	3654,335
5510	OBEIDY	L80-5R	190,37	2215,849	4,664	4505,94	1686,634	119,549	839,51
5511	OBEIDY	L100-3R	339,33	4964,339	10,689	14309,377	3885,283	326,432	3009,822
CTRL	_	_	_	4,83	5,15	4,7	5,08	4,82	4,79
5512	OBEIDY	L100-4R	621	3527,28	23,288	8420,76	2639,25	293,112	1664,28
5513	OBEIDY	L100-5R	222,3	1982,934	12,093	4154,824	1478,308	132,937	818,071
5514	OBEIDY	P20-1R	183,63	1470,884	15,664	3577,132	1129,331	78,41	655,563
5515	OBEIDY	P20-2R	305	3525,8	30,47	9445,85	2662,65	341,6	2128,9
5516	OBEIDY	P20-3R	140	1400	13,664	3021,2	1044,4	104,86	539
CTRL	_	_	_	4,89	5,08	4,61	4,96	4,68	4,78
5517	OBEIDY	P20-4R	140,14	3343,645	7,862	6959,154	2637,36	177,973	1341,102
5518	OBEIDY	P20-5R	151,78	2581,795	5,13	5354,834	2093,06	143,281	1083,716
5519	OBEIDY	P40-1R	201,85	3796,704	10,173	6479,225	2914,642	187,514	956,745
5520	OBEIDY	P40-2R	159,03	5831,483	13,326	5998,461	4403,43	216,275	1103,64
5521	OBEIDY	P40-5R	195,38	3575,454	9,046	7436,163	2748,997	207,103	1201,587
CTRL	_	_	_	4,87	5,13	4,58	5,07	4,79	4,81
5522	OBEIDY	P60-1R	272,81	3797,473	15,495	6239,096	2981,781	185,509	963,009
5523	OBEIDY	P60-2R	179,88	3353	15,434	5704,058	2694,632	167,47	976,759
5524	OBEIDY	P60-4R	523,73	4441,222	9,532	7269,359	3666,103	178,068	958,424
5525	OBEIDY	P80-4R	525,21	2363,445	12,132	6060,923	2347,689	106,618	1045,168
5526	OBEIDY	P100-4R	289,25	4558,612	40,206	5333,807	3615,65	208,261	1165,686
5527	OBEIDY	P100-5R	211,4	4339,98	30,864	6111,487	3485,937	255,79	1365,625
CTRL	_	_	_	4,91	5,14	4,74	5,11	4,89	4,84

VMT

Bootstrap calculation of toxicity parameters									
############	Inula								
Data sheet :	data								
Concentration	**Average effect**	**Standard deviation**	**Nb replicates**						
0	0	0	3	0	0	0			
25,64102564	2,525801664	1,07093047	3	1,351351351	2,777777778	3,448275862			
48,07692308	15,63464276	4,118962719	3	12,67605634	20,33898305	13,88888889			
64,1025641	25,23078634	7,921523269	3	28,39506173	31,08108108	16,21621622			
144,2307692	55,37843015	17,06700711	3	70,96774194	58,02469136	37,14285714			
192,3076923	67,85455487	22,03339046	3	86,95652174	72,85714286	43,75			
240,3846154	72,62828365	10,09577346	3	80,64516129	75,94936709	61,29032258			
320,5128205	83,81916016	9,346058699	3	73,03370787	89,53488372	88,88888889			
480,7692308	90,64721287	9,102217775	3	100	90,12345679	81,81818182			
961,5384615	100	0	3	100	100	100			

Bootstrap calculation of toxicity parameters						
############	holcus					
Data sheet :	data					
Concentration	**Average effect**	**Standard deviation**	**Nb replicates**			
0	0	0	3	0	0	0
0,066737854	1,110509209	0,99555666	3	1,923076923	1,408450704	0
0,133475707	4,914990421	3,310465207	3	1,724137931	4,6875	8,333333333
0,333689269	31,98193931	19,87538059	3	53,7037037	27,53623188	14,70588235
0,667378537	57,40740741	9,259259259	3	57,40740741	48,14814815	66,66666667
1,067805659	58,76969591	7,827207203	3	67,69230769	53,06122449	55,55555556
1,334757074	66,70138889	10,17230746	3	71,66666667	73,4375	55
2,002135611	74,22222222	12,27614368	3	66	88,33333333	68,33333333
4,004271223	90,16528511	4,749293929	3	94,91525424	90,16393443	85,41666667
10,01067806	98,58156028	2,456809656	3	100	100	95,74468085
20,02135611	100	0	3	100	100	100

Rhizopot-rhizons : accumulation dans les plantes

icpnum	who	sampl	taux	Al2O3(%)	As(ppm)	CaO(%)	Cd	Cu(ppm)	Fe2O3(5%)	MgO(%)	MnO(%)	P2O5(%)	P2O5(%)	Pb(ppm)	Sb(ppm)	Se(ppm)	Zn(ppm)
icpnum	who	sampl	taux	Al396.152	As189.042	Ca317.933	Cd226.502	Cu324.754	Fe259.940	Mg279.806	Mn257.610	P213.618	P214.914	Pb220.353	Sb217.581	Se196.026	Zn213.856
4251	OBEDY	B1	19.66	12.503	1892.7	1.8288	16.632	261.48	1.2627	1.0666	0.25341	0.057582	0.071674	529.64	45.021	13.762	538.68
4252	OBEDY	B2	23.29	9.2813	1339.2	1.5758	17.84	213.34	1.497	1.1434	0.30044	0.049014	0.065014	524.96	40.059	15.767	476.51
4253	OBEDY	B3	25.38	8.6968	1118.5	1.7307	17.715	213.45	1.631	1.2261	0.32753	0.051204	0.065269	674.85	46.953	16.142	604.81
4254	OBEDY	B4	23.52	0.059122	1581.7	1.5916	0.084907	9.0082	1.1711	1.2563	0.22995	0.056608	0.065084	12.207	41.63	13.03	483.34
4255	OBEDY	B5	24.65	8.8397	1402.8	1.2252	14.445	200.9	1.2265	1.1614	0.2411	0.052892	0.062319	698.58	51.518	16.959	480.67
CTRL	_	_	_	0.00023436	1.09	0.0002044	1.09	1.07	0.00032461	0.00016932	0.00029025	0.00021778	0.00020198	1.03	1.01	1.05	1.17
4256	OBEDY	B6	25.28	8.6869	1489.2	1.6472	12.286	220.44	1.2592	1.273	0.24732	0.057023	0.065475	646.41	40.195	13.247	487.65
4257	OBEDY	B7	25.25	8.8258	1662.5	1.5405	15.099	227	1.2558	1.2868	0.24683	0.059962	0.069503	800.42	49.49	15.908	536.56
4258	OBEDY	B8	26.02	9.0151	1493	1.3958	16.289	221.43	1.2934	1.2476	0.25433	0.058334	0.069239	861.26	50.739	16.289	527.43
4259	OBEDY	B9	25.15	9.2607	1415.7	1.2938	14.235	198.43	1.2511	1.2701	0.24589	0.055693	0.06652	884.27	42.503	15.266	497.22
4260	OBEDY	B10	26.4	8.8933	1504	1.549	14.942	228.62	1.3137	1.3174	0.25818	0.059489	0.06759	1122.8	46.464	16.157	548.86
CTRL	_	_	_	0.00023436	1.16	0.000217	1.21	1.05	0.00034177	0.00017264	0.00030831	0.00023358	0.00021343	1.08	1.04	1.11	1.2
4261	OBEDY	H1	23.97	8.7051	739.71	1.4628	11.865	164.91	1.1933	1.3479	0.23441	0.05072	0.057965	784.54	38.592	13.495	475.8
4262	OBEDY	H2	25.34	14.616	538.73	1.5298	12.239	189.04	1.2612	1.3322	0.24775	0.060698	0.067197	664.16	40.797	12.391	496.16
4263	OBEDY	H3	25.47	8.6955	1333.6	1.5023	13.372	194.85	1.2674	1.3465	0.24902	0.062701	0.068242	716.47	43.044	14.11	504.82
4264	OBEDY	H4	24.56	14.165	1548.5	1.661	13.876	197.71	1.2216	1.3908	0.24009	0.057199	0.065691	816.13	43.717	15.031	541.3
4265	OBEDY	H5	24.42	14.09	1305	1.1964	14.066	167.52	1.2142	1.2844	0.23872	0.055898	0.064198	818.07	40.537	15.653	506.96
CTRL	_	_	_	0.00024381	1.21	0.0002282	1.28	1.07	0.00036322	0.00018758	0.00033024	0.0002519	0.00024045	1.15	1.07	1.19	1.22
4266	OBEDY	H6	24.91	9.1732	1471.9	1.6411	14.871	278.24	1.2389	1.49	0.24351	0.057215	0.065943	820.54	45.087	15.021	546.77
4267	OBEDY	H7	25.84	9.4566	927.66	1.3815	13.204	192.51	1.2859	1.345	0.25264	0.062665	0.068937	1059.2	52.714	14.264	543.42
4268	OBEDY	H8	25.65	8.891	1861.7	1.7205	14.826	210.59	1.2758	1.413	0.25081	0.065082	0.073306	739.49	45.401	15.185	513
4269	OBEDY	H9	24.84	8.6479	1067.6	1.3605	13.165	171.4	1.2356	1.3188	0.24283	0.059216	0.065587	774.26	41.731	14.382	497.3
4270	OBEDY	H10	24.94	8.9658	1702.2	1.841	13.767	209.25	1.241	1.3231	0.24384	0.064594	0.071162	748.2	47.885	14.715	532.47
CTRL	_	_	_	0.00023814	1.25	0.0002268	1.32	1.03	0.00036322	0.00017928	0.00032379	0.00024503	0.00024045	1.17	1.05	1.18	1.21
4271	OBEDY	I1	26.01	9.6377	1584.5	1.5776	13.317	190.13	1.2945	1.3545	0.25426	0.064507	0.071535	714.23	38.755	14.279	512.14
4272	OBEDY	I2	25.16	8.5949	1651.5	1.7805	13.36	203.29	1.2523	1.4762	0.24602	0.065107	0.073288	735.93	41.262	14.266	506.97
4273	OBEDY	I3	25.51	14.713	1426.5	1.7572	12.781	172.96	1.2702	1.4284	0.24934	0.061164	0.067823	726.27	41.836	12.5	504.59
4274	OBEDY	I4	25.45	9.207	1716.1	1.6713	14.099	211.49	1.2863	1.3533	0.24896	0.062593	0.072443	1052.9	42.247	14.227	517.91
4275	OBEDY	I5	25.06	14.454	1803.6	1.5791	15.186	216.52	1.2462	1.3044	0.24498	0.065823	0.074087	929.22	49.869	16.038	619.98
CTRL	_	_	_	0.00025704	1.25	0.0002282	1.29	1.08	0.00037752	0.0001826	0.00031863	0.00024961	0.00024045	1.17	1.08	1.24	1.23
4276	OBEDY	I6	24.39	14.066	1894.6	1.8781	14.536	223.9	1.2128	1.368	0.2383	0.066912	0.074731	833.41	45.609	13.975	557.8
4277	OBEDY	I7	25.23	8.8644	1959.4	1.8384	14.659	227.32	1.2551	1.3776	0.24657	0.066443	0.073434	845.21	44.909	14.104	558.09
4278	OBEDY	I8	25.38	8.6859	2155.5	2.3371	14.111	243.39	1.2633	1.3717	0.24817	0.072185	0.079218	787.29	44.923	14.949	562.17
4279	OBEDY	I9	25.41	9.2728	1901.9	1.6905	14.509	224.37	1.264	1.3817	0.2483	0.068139	0.075005	874.87	50.312	14.839	572.49
4280	OBEDY	I10	24.54	8.7494	2010.3	1.8004	14.945	227	1.2202	1.3938	0.23986	0.072887	0.082272	819.64	45.644	17.129	567.86
CTRL	_	_	_	0.00027972	1.29	0.0002324	1.31	1.08	0.00039754	0.00018592	0.00032121	0.00025877	0.0002519	1.17	1.08	1.24	1.23
4281	OBEDY	L1	23.93	8.8206	1570.8	1.3595	16.344	197.42	1.1887	1.2356	0.23368	0.061704	0.070856	951.7	62.218	18.522	573.36
4282	OBEDY	L2	26.07	15.038	1923.7	1.6136	16.32	229.42	1.2962	1.3855	0.25482	0.067581	0.076058	905.41	57.093	18.145	605.35
4283	OBEDY	L3	25.74	9.2926	1768.6	2.0258	15.032	224.71	1.2803	1.4436	0.25159	0.072089	0.080224	950.58	50.708	16.808	596.14
4284	OBEDY	L4	24.07	8.5334	2054.6	1.9108	14.346	244.79	1.1976	1.2521	0.23533	0.070499	0.075901	816.45	47.418	15.14	551.44
4285	OBEDY	L5	25.24	8.7161	2267.6	2.0027	14.059	254.17	1.2562	1.3345	0.24677	0.074504	0.082711	747.36	41.646	12.847	554.52
CTRL	_	_	_	0.00025515	1.29	0.000231	1.3	1.06	0.00037895	0.00018094	0.00032766	0.00025648	0.00024961	1.19	1.07	1.23	1.25
4286	OBEDY	L6	24.25	8.8858	2269.3	2.0023	15.302	251.96	1.2058	1.3863	0.237	0.072525	0.080522	774.79	48.985	16.102	551.93
4287	OBEDY	L7	23.91	8.8529	1700.2	1.5739	14.681	199.17	1.1883	1.3382	0.23358	0.065157	0.070578	903.56	43.755	16.594	575.51
4288	OBEDY	L8	25.04	9.0809	1384.2	1.8515	15.55	290.21	1.245	1.3244	0.24472	0.07248	0.080106	961.79	50.581	17.929	596.95
4289	OBEDY	L9	25.01	14.424	1722.9	1.6555	17.582	218.09	1.2418	1.4116	0.24442	0.067124	0.077948	900.86	73.279	19.858	577.23
4290	OBEDY	L10	23.59	13.605	1592.8	1.6524	14.461	197.45	1.1722	1.4782	0.23045	0.062627	0.071578	980.64	45.293	17.291	566.63
CTRL	_	_	_	0.00027972	1.31	0.0002422	1.34	1.05	0.00039754	0.00018924	0.00034056	0.00027022	0.00026564	1.23	1.1	1.28	1.28
4299	OBEDY	Blanc	1	0.00020034	0.0307	0.0003696	0.00236	0.0262	7.007E-5	1.5089E-5	1.7286E-6	-1.8709E-5	-2.0381E-5	0.0267	-0.00312	0.00188	0.0395
4300	OBEDY	NCSDC73323	27.67	16.001	469.28	0.04176	14.416	151.35	1.374	0.44743	0.1582	0.055	0.065075	625.62	45.932	21.057	495.02
4291	OBEDY	P1	25.05	14.449	1577.4	1.4844	14.88	192.38	1.2453	1.3978	0.24469	0.068034	0.074861	918.83	49.349	15.681	582.41
4292	OBEDY	P2	25.6	9.2277	1859.8	1.7213	14.669	215.55	1.2731	1.3909	0.25016	0.067711	0.076211	878.34	49.92	17.92	577.02
4293	OBEDY	P3	24.47	14.116	1477.7	1.5134	13.972	168.84	1.2173	1.4872	0.23908	0.068981	0.076434	848.86	44.78	16.003	561.59
CTRL	_	_	_	0.00026271	1.33	0.0002422	1.39	1.08	0.00039754	0.00018592	0.00032895	0.0002748	0.00026106	1.26	1.17	1.33	1.32
4294	OBEDY	P4	24.3	8.8631	1785.8	1.7181	14.167	204.12	1.2085	1.4268	0.23736	0.068613	0.074678	828.39	48.357	13.219	554.77
4295	OBEDY	P5	25.31	9.3087	1774	2.1596	13.895	195.14	1.2591	1.3903	0.24732	0.06706	0.072798	814.98	48.595	13.693	576.06
4296	OBEDY	P6	25.07	14.46	1217.4	1.5963	14.591	181.76	1.2463	1.4611	0.24491	0.06694	0.073715	945.39	51.895	16.872	589.14
4297	OBEDY	P7	23.82	13.737	2084.7	1.9877	14.459	215.09	1.1844	1.5117	0.23276	0.073749	0.080349	866.57	49.307	16.579	588.12
4298	OBEDY	P8	25.01	8.7071	1620.5	1.7949	17.432	230.05	1.2427	1.4549	0.24446	0.067467	0.076068	949.04	192.33	19.057	569.96
CTRL	_	_	_	0.00026649	1.37	0.0002422	1.41	1.09	0.00041184	0.00019256	0.0003354	0.00028167	0.00027251	1.27	1.17	1.38	1.32
4301	OBEDY	P9	25.29	14.584	2506.5	1.9447	15.662	268.07	1.2573	1.3566	0.247	0.07691	0.084844	966.84	49.063	14.466	633.77
4302	OBEDY	P10	25.71	14.825	1940.8	1.9127	14.86	227.79	1.2788	1.6134	0.2512	0.072535	0.080601	1199.1	59.647	17.509	650.98
4303	OBEDY	H1p	18.67	0.011045	21.844	1.2232	0.23151	4.7235	0.0055265	0.54968	0.012427	0.15537	0.15712	0.60491	0.15552	1.2509	24.084
4304	OBEDY	H2p	18.09	0.0073167	43.778	1.8245	0.18633	3.6904	0.0043718	0.62993	0.014958	0.14777	0.14773	0.45949	0.069285	1.402	22.613
4305	OBEDY	H3p	18.83	0.0093954	37.095	1.5821	0.22031	3.6718	0.0063817	0.56267	0.013651	0.16576	0.16692	0.63834	-0.00026362	1.1675	19.395
CTRL	_	_	_	0.00026271	1.35	0.0002394	1.33	1.1	0.00038038	0.0001909	0.00032379	0.0002748	0.00026564	1.22	1.14	1.37	1.3
4306	OBEDY	H4p	18.93	0.0065831	32.749	1.2908	0.22337	4.2214	0.0044124	0.57232	0.0096702	0.18896	0.18783	0.27449	0.12626	1.4576	31.234
4307	OBEDY	H5p	20.32	0.0074121	29.464	1.4811	0.18471	4.0843	0.0044168	0.56756	0.011534	0.17166	0.17422	0.20726	0.06604	1.5281	21.539
4308	OBEDY	H6p	23.36	0.0080795	33.405	1.4463	0.21211	3.9478	0.0045096	0.57387	0.014223	0.17343	0.17584	0.54195	0.06167	1.5091	25.229
4309	OBEDY	H7p	19.86	0.0067939	29.393	1.3342	0.2264	3.3961	0.0041748	0.57575	0.014475	0.17073	0.17319	0.52829	0.034556	1.565	23.038
4310	OBEDY	H8p	18.74	0.0066587	18.534	1.1835	0.18234	4.0291	0.0048773	0.54409	0.014505	0.18346	0.182	0.29797	0.020239	1.3849	27.36
CTRL	_	_	_	0.00026649	1.37	0.0002324	1.33	1.13	0.00038753	0.0001909	0.00032895	0.00028396	0.00026564	1.18	1.18	1.39	1.31
4311	OBEDY	H9p	20.74	0.0071733	24.058	1.3117	0.24058	3.7747	0.0044784	0.52634	0.011076	0.1876	0.19045	0.40858	0.072175	1.4559	24.473
4312	OBEDY	H10p	19.19	0.0065284	25.907	1.3248	0.20533	4.4713	0.0048023	0.60251	0.014333	0.2366	0.237	0.60065	-0.010881	1.2358	22.452
4313	OBEDY	I1p	19.02	0.0070098	8.3688	2.1622	3.5377	17.708	0.0049229	0.4276	0.0069682	0.19522	0.19613	0.17346	0.067141	1.4474	85.21
4314	OBEDY	I2p	18.79	0.0085942	7.0462	2.3223	3.2695	14.919	0.00618	0.38462	0.0072233	0.18447	0.18434	0.19542	0.065577	1.5164	70.838
4315	OBEDY	I3p	22.5	0.0084625	7.7625	2.0769	3.2625	16.425	0.0056306	0.39217	0.0063275	0.17086	0.1723	0.15413	0.08145	1.8157	70.65
CTRL	_	_	_	0.00023247	1.36	0.0002338	1.34	1.11	0.00036179	0.00018426	0.00032637	0.00027709	0.0002748	1.21	1.23	1.41	1.3
4316	OBEDY	I4p	21.88	0.0071955	6.3452	2.322	3.4352	16.126	0.004662	0.42601	0.0071974	0.17101	0.17497	0.14091	0.1129	1.9079	79.206
4317	OBEDY	I5p	19.12	0.0074803	8.5466	2.2301	3.499	15.698	0.0062339	0.40813	0.0070788	0.16428	0.16678	0.24282	0.10554	1.5067	72.656
4318	OBEDY	I6p	21.54	0.00745	8.6375	2.1121	2.8433	14.906	0.0045587	0.40308	0.0068633	0.1722	0.17447	0.11718	0.11244	1.6478	63.758
4319	OBEDY	I7p	22.14	0.0085781	7.3062	2.3502	3.6088	17.313	0.0053822	0.42346	0.0072544	0.19327	0.19657	0.11535	-0.015387	1.6428	85.682
4320	OBEDY	I8p	18.27	0.0081492	8.8609	2.1277	3.1242	14.762	0.0046504	0.41547	0.006222	0.16911	0.17204	0.087696	0.14013	1.5347	67.964
CTRL	_	_	_	0.00023625	1.34	0.0002324	1.28	1.11	0.00034034	0.00018426	0.00031347	0.00027709	0.00026793	1.14	1.2	1.41	1.26
4321	OBEDY	I9p	17.73	0.0064339	7.1275	2.1755	3.0673	17.73	0.004944	0.39848	0.0058323	0.16212	0.16419	0.13085	0.10532	1.6117	81.026
4322	OBEDY	I10p	19.41	0.0084375	7.0458	2.0641	3.2609	14.849	0.007855	0.3591	0.005784	0.15624	0.15477	0.13082	0.055318	1.3936	73.758
4323	OBEDY	L1p	18.72	0.0065808	8.7235	2.3488	0.70013	9.6221	0.008834	0.79198	0.010625	0.16102	0.16629	0.75067	0.02939	2.0218	81.058
4324	OBEDY	L2p	18.45	0.0056142	6.7158	2.5042	0.58117	8.7084	0.0067857	0.8604	0.011281	0.15971	0.16321	1.2694	0.10129	2.0848	79.888
4325	OBEDY	L3p	18.02	0.0052108	12.668	2.773	0.85054	9.01	0.0091994	0.95205	0.011623	0.14773	0.15021	1.1317	0.098569	1.8741	96.587
CTRL	_	_	_	0.00023436	1.36	0.000231	1.25	1.12	0.00033748	0.00018924	0.00032121	0.0002748	0.00027022	1.15	1.2	1.44	1.27
4326	OBEDY	L4p	19.04	0.0060096	11.786	2.2223	0.61309	7.9778	0.0084132	0.79528	0.0098738	0.13883	0.14127	1.0758	0.050266	1.685	75.779
4327	OBEDY	L5p	20.7	0.0064944	14.324	2.4516	0.73278	9.108	0.0085251	0.87486	0.011162	0.15212	0.15462	1.184	0.14573	1.7098	79.902
4328	OBEDY	L6p	21.58	0.007056	9.4736	2.2644	0.61719	9.0852	0.0081469	0.78584	0.0097155	0.16125	0.15927	1.379	0.057619	1.5387	73.804
4329	OBEDY	L7p	19.06	0.0078891	8.0052	2.039	0.52606	7.9861	0.009267	0.74518	0.009417	0.13727	0.1381	1.3838	0.029924	1.4047	70.713
4330	OBEDY	L8p	18.15	0.0061746	7.4233	2.6707	0.6044	8.8753	0.0076047	0.88606	0.011145	0.14352	0.14406	0.93472	0.11689	1.5228	73.507
CTRL	_	_	_	0.00023247	1.37	0.0002338	1.3	1.11	0.00035035	0.00018758	0.00031863	0.00028167	0.00026793	1.15	1.24	1.44	1.29
4331	OBEDY	L9p	20.6	0.026047	17.263	2.4312	0.39964	11.371	0.017734	1.1716	0.0065372	0.161	0.16601	1.2751	0.0081782	2.5544	44.29
4332	OBEDY	L10p	17.6	0.072848	9.944	1.7907	0.41712	10.648	0.055017	0.9125	0.0044954	0.13236	0.13405	3.256	0.22176	1.5787	48.048
4333	OBEDY	P1p	23.87	0.049716	21.197	2.4158	0.4965	11.386	0.03352	1.1581	0.0052963	0.17131	0.17333	2.4109	0.079487	1.9931	50.366
4334	OBEDY	P2p	20.89	0.013542	28.41	2.6616	0.31753	11.928	0.0083644	1.1389	0.0064675	0.13294	0.13576	0.46376	0.10424	1.5876	45.122
4335	OBEDY	P3p	18.8	0.046298	27.636	2.2494	0.39668	11.017	0.031831	1.0181	0.0050687	0.1388	0.14001	2.1056	0.10378	1.4025	53.392
CTRL	_	_	_	0.00023436	1.4	0.0002282	1.31	1.12	0.00035893	0.00018592	0.00032508	0.00027938	0.00027251	1.16	1.22	1.42	1.28
4336	OBEDY	P4p	19.38	0.016483	25.194	2.1522	0.28682	10.62	0.0068406	1.1691	0.00605	0.1335	0.13261	0.55814	0.10388	1.4535	36.434
4337	OBEDY	P5p	18.81	0.014896	19.186	1.919	0.28403	8.8031	0.0091992	0.95507	0.0043192	0.11568	0.11548	0.68092	0.034987	1.2283	35.175
4338	OBEDY	P6p	18.45	0.013111	18.45	1.7679	0.28413	8.6715	0.0079678	0.86953	0.0038319	0.099922	0.10132	0.48155	0.069926	1.1476	35.055
4339	OBEDY	P7p	17.89	0.0068639	7.5854	2.2748	0.59037	7.478	0.0089284	0.71333	0.010524	0.15658	0.16203	0.71918	0.12308	2.0574	73.17
4340	OBEDY	P8p	18.35	0.0085663	8.2208	2.1247	0.48261	6.6244	0.0077147	0.75025	0.0087585	0.12955	0.13052	0.67345	0.087897	1.5157	58.17
CTRL	_	_	_	0.00023247	1.36	0.0002268	1.3	1.11	0.00034463	0.00018094	0.00031089	0.00028167	0.00027022	1.16	1.21	1.41	1.3
4341	OBEDY	P9p	19.38	0.031207	21.512	2.346	0.42055	10.426	0.020757	1.0785	0.00615	0.12995	0.1327	1.7209	0.078683	1.6105	56.59
4342	OBEDY	P10p	17.92	0.039389	18.099	1.8264	0.36198	11.092	0.026317	0.8804	0.0047389	0.14063	0.14141	1.6164	0.15841	2.24	41.216
4343	OBEDY	VM0	21.23	12.244	65.388	1.5573	7.8126	43.734	1.0575	1.2807	0.20729	0.23389	0.24274	117.61	13.842	13.439	273.87
4344	OBEDY	VM20	20.97	12.091	94.575	1.8858	7.3814	44.876	1.0447	1.4545	0.20472	0.22565	0.24121	124.77	11.911	11.869	276.59
4345	OBEDY	VM40	23.23	13.394	119.87	1.9077	7.5265	44.602	1.1577	1.3787	0.22697	0.23279	0.23944	116.61	13.334	12.149	281.08
CTRL	_	_	_	0.00024003	1.44	0.000231	1.36	1.12	0.00036322	0.0001909	0.00032121	0.00028625	0.00028167	1.2	1.2	1.5	1.31
4346	OBEDY	VM60	22.6	13.028	129.72	2.2505	7.6614	45.426	1.1281	1.5723	0.22072	0.2273	0.23879	118.42	12.498	12.181	275.27
4347	OBEDY	VM80	23.51	13.561	156.34	1.5059	7.6408	47.255	1.1716	1.2733	0.22964	0.23904	0.25202	173.27	13.095	12.178	291.52
4348	OBEDY	VM100	23.91	13.788	181.24	1.7459	8.512	44.473	1.1912	1.3834	0.23361	0.25472	0.26375	127.68	13.055	12.601	301.03
4349	OBEDY	CTA-OTL-1	22.58	0.38511	0.98675	4.3489	1.2374	13.254	0.14772	0.65119	0.050101	0.82464	0.84967	3.4999	0.11719	1.9916	46.966
CTRL	_	_	_	0.00024381	1.41	0.0002394	1.33	1.1	0.00037037	0.00018592	0.00033024	0.00028625	0.00027938	1.21	1.22	1.46	1.31

Rhizopot-rhizons : analyse solution du sol

.inum	.who	.sampl	.taux	Al396,152	As189,042	Ca317,933	Cd226,502	Cu324,754	Fe259,94	Mg279.806	Mn257,61	Pb220,353	Sb217,581	Se196,026	Zn213,856
.inum	.who	.sampl	.taux	Al	As	Ca	Cd	Cu	Fe	Mg	Mn	Pb	Sb	Se	Zn
	OBEIDY	Eau Pure	1	0,00322	0,00396	0,00155	0,00417	0,00445	0,000627	0,00315	0,000753	0,0103	0,00461	0,0213	0,00441
1151	OBEIDY	T0-B1	1	-0,00257	0,386	185	0,0028	0,0625	0,0177	65,9	0,00103	0,0089	0,0207	0,0137	0,0136
1152	OBEIDY	T0-B2	1	-0,00244	0,405	185	0,00235	0,0655	0,017	64,8	0,00087	0,0062	0,0169	0,0171	0,0136
1153	OBEIDY	T0-B3	1	-0,00366	0,365	219	0,00213	0,0568	0,0166	80,3	0,000737	0,00583	0,0132	0,0193	0,0147
1154	OBEIDY	T0-B4	1	-0,00239	0,326	208	0,00228	0,0518	0,0157	75,9	0,00156	0,00469	0,0156	0,0249	0,0146
1155	OBEIDY	T0-B5	1	-0,000982	0,373	141	0,00191	0,0543	0,0146	52,7	0,00122	0,00565	0,0136	0,0144	0,0133
1156	OBEIDY	T0-B6	1	-0,00283	0,388	166	0,00209	0,0866	0,0166	61,1	0,000861	0,00604	0,0205	0,0173	0,0167
1157	OBEIDY	T0-B7	1	-0,00487	0,394	157	0,00167	0,0589	0,0142	57,1	0,000692	0,00252	0,0146	0,014	0,0131
1158	OBEIDY	T0-B8	1	-0,00196	0,324	123	0,00157	0,0422	0,0104	45,1	0,00115	0,00743	0,0102	0,013	0,0112
1159	OBEIDY	T0-B9	1	-0,00347	0,339	190	0,00151	0,0485	0,015	71,5	0,000769	0,00383	0,0121	0,0155	0,0126
1160	OBEIDY	T0-B10	1	-0,00414	0,324	227	0,00161	0,0559	0,0138	82,6	0,000756	0,00458	0,02	0,0151	0,0145
		CTRL	1	5,26	4,95	4,68	4,82	4,81	9,58	5,03	10,1	9,71	5,11	4,9	4,65
1161	OBEIDY	T0-H1	1	-0,000761	0,274	114	0,00195	0,0377	0,00983	43,9	0,00151	0,00565	0,00974	0,0184	0,00708
1162	OBEIDY	T0-H2	1	-0,00237	0,341	141	0,00167	0,056	0,0147	53,4	0,00124	0,00639	0,0204	0,0184	0,0103
1163	OBEIDY	T0-H3	1	-0,00242	0,387	161	0,00162	0,0647	0,0175	61,5	0,000915	0,00387	0,0224	0,0221	0,0112
1164	OBEIDY	T0-H4	1	-0,00357	0,4	192	0,00156	0,0637	0,0157	70,3	0,000889	0,00341	0,0181	0,0166	0,0132
1165	OBEIDY	T0-H5	1	-0,00246	0,356	166	0,00158	0,0579	0,0146	60,9	0,00145	0,00602	0,0199	0,0203	0,0128
1166	OBEIDY	T0-H6	1	-0,00514	0,339	186	0,00149	0,0541	0,0141	68,9	0,0012	0,00421	0,0123	0,0188	0,0133
1167	OBEIDY	T0-H7	1	-0,00625	0,368	183	0,00146	0,0583	0,0144	69,9	0,00105	0,00556	0,0192	0,0108	0,013
1168	OBEIDY	T0-H8	1	-0,00627	0,375	295	0,00159	0,0754	0,0191	109	0,000962	0,00475	0,019	0,0167	0,0205
1169	OBEIDY	T0-H9	1	-0,00594	0,39	176	0,00122	0,0637	0,0165	65,7	0,00091	0,0027	0,022	0,0163	0,0158
1170	OBEIDY	T0-H10	1	-0,00716	0,443	203	0,00117	0,0696	0,0172	76,3	0,0012	0,00345	0,0233	0,0206	0,0158
		CTRL	1	5,11	4,45	4,62	4,69	4,88	9,6	4,95	9,89	9,49	4,76	4,41	4,67
1171	OBEIDY	T0-I1	1	-0,00381	0,315	165	0,00208	0,0544	0,0131	60,6	0,000733	0,00747	0,0226	0,022	0,0106
1172	OBEIDY	T0-I2	1	-0,00309	0,354	259	0,00192	0,0779	0,0193	95,1	0,00398	0,00854	0,0221	0,0231	0,0155
1173	OBEIDY	T0-I3	1	-0,00692	0,442	238	0,00182	0,0918	0,0219	87,2	0,00134	0,0032	0,02	0,0218	0,0167
1174	OBEIDY	T0-I4	1	-0,00496	0,411	252	0,00173	0,0952	0,0229	90,5	0,00291	0,00364	0,0233	0,0257	0,0191
1175	OBEIDY	T0-I5	1	-0,00329	0,338	168	0,00127	0,0586	0,0134	62,7	0,00092	0,00417	0,0162	0,0205	0,0127
1176	OBEIDY	T0-I6	1	-0,00476	0,374	208	0,00152	0,0713	0,0175	76,6	0,00927	0,00619	0,0212	0,0191	0,0151
1177	OBEIDY	T0-I7	1	-0,00814	0,295	248	0,0014	0,0603	0,0156	92,3	0,0011	0,00531	0,0171	0,0706	0,0182
1178	OBEIDY	T0-I8	1	-0,00531	0,36	259	0,00141	0,0793	0,0187	95,7	0,00112	0,00479	0,0197	0,00957	0,0182
1179	OBEIDY	T0-I9	1	-0,00471	0,325	220	0,00104	0,0558	0,0149	81,7	0,00102	0,00253	0,0151	0,00687	0,017
1180	OBEIDY	T0-I10	1	-0,0066	0,322	212	0,00127	0,0584	0,0176	78,2	0,00118	0,00276	0,015	0,0179	0,0164
		CTRL	1	5,17	4,57	4,58	4,67	4,98	9,52	4,87	9,69	9,58	4,61	4,63	4,83
1181	OBEIDY	T0-L1	1	-0,00214	0,325	114	0,00222	0,046	0,0119	42,5	0,00133	0,0066	0,0151	0,02	0,00841
1182	OBEIDY	T0-L2	1	-0,0026	0,338	136	0,00158	0,0476	0,0128	50,6	0,0013	0,00635	0,0174	0,00995	0,0106
1183	OBEIDY	T0-L3	1	-0,00301	0,441	132	0,00166	0,0651	0,0163	47,2	0,000657	0,00425	0,0228	0,0112	0,0123
1184	OBEIDY	T0-L4	1	-0,00413	0,326	150	0,0013	0,046	0,0114	55,1	0,00093	0,00404	0,0184	0,0194	0,0123
1185	OBEIDY	T0-L5	1	-0,00338	0,392	219	0,0013	0,0608	0,0149	82,4	0,00218	0,0014	0,0194	0,00756	0,016
1186	OBEIDY	T0-L6	1	-0,00461	0,407	200	0,0015	0,0679	0,0167	73,4	0,00154	0,00244	0,0185	0,0237	0,0171
1187	OBEIDY	T0-L7	1	-0,00659	0,356	206	0,00128	0,0614	0,0147	73,9	0,00104	0,00521	0,019	0,00887	0,0156
1188	OBEIDY	T0-L8	1	-0,00405	0,421	233	0,00118	0,0746	0,0172	83,3	0,00139	0,00533	0,0201	0,0208	0,0169
1189	OBEIDY	T0-L9	1	-0,00709	0,451	206	0,00122	0,0834	0,0199	72,7	0,0014	0,006	0,0278	0,0162	0,0153
1190	OBEIDY	T0-L10	1	-0,0051	0,349	252	0,00125	0,0674	0,018	91,4	0,00155	0,00332	0,0185	0,0136	0,0213
		CTRL	1	5,22	4,82	4,62	4,52	5,12	9,61	4,79	9,6	9,6	4,84	4,82	4,97
1191	OBEIDY	T0-P1	1	-0,00153	0,403	112	0,0014	0,0513	0,0134	43,2	0,00124	0,00535	0,0185	0,0131	0,00954
1192	OBEIDY	T0-P2	1	-0,00269	0,476	118	0,00121	0,059	0,0148	44,1	0,000696	0,00653	0,0196	0,0156	0,0092
1193	OBEIDY	T0-P3	1	-0,00316	0,337	153	0,00118	0,0499	0,0115	58,4	0,000667	0,00334	0,0146	0,0144	0,0129
1194	OBEIDY	T0-P4	1	-0,00707	0,335	205	0,00119	0,0601	0,0151	76,8	0,00106	0,00531	0,016	0,018	0,0147
1195	OBEIDY	T0-P5	1	-0,00292	0,405	137	0,00112	0,0589	0,014	52,4	0,000812	0,00558	0,0202	0,0146	0,015
1196	OBEIDY	T0-P6	1	-0,00856	0,309	220	0,00112	0,0452	0,0118	82,3	0,000939	0,00487	0,0153	0,0229	0,0167
1197	OBEIDY	T0-P7	1	-0,00262	0,453	146	0,001	0,0652	0,0162	52,9	0,00063	0,00398	0,0238	0,0134	0,0113
1198	OBEIDY	T0-P8	1	-0,00577	0,385	217	0,00114	0,0613	0,0154	78,9	0,00159	0,00342	0,021	0,0122	0,0153
1199	OBEIDY	T0-P9	1	-0,00758	0,372	207	0,00112	0,065	0,0168	74,8	0,000653	0,00104	0,0202	0,0177	0,018
1200	OBEIDY	T0-P10	1	-0,00683	0,419	246	0,00124	0,0842	0,0196	90,4	0,00132	0,0063	0,0186	0,0202	0,0219

Rhizopot-rhizons : analyse du sol après trois mois de croissance

.inum	.who	.sampl	.taux	Al396.152	As189.042	Ca317.933	Cd226.502	Cu324.754	Fe259.940	Mg279.806	Mn257.610	Pb220.353	Sb217.581	Se196.026	Zn213.856
.inum	.who	.sampl	.taux	Al	As	Ca	Cd	Cu	Fe	Mg	Mn	Pb	Sb	Se	Zn
eau pure	_	_	_	0.00358	-0.00253	0.00292	0.00375	0.00464	0.000962	0.00331	0.0012	0.0103	0.00471	0.0158	0.0128
701	OBEIDY	B1	1.00	0.0043	0.465	168.25	0.00271	0.0515	0.0183	59.09	0.000899	0.00479	0.0172	0.023	0.0156
702	OBEIDY	B2	1.00	0.00384	0.398	245.2	0.00259	0.0472	0.016	86.29	0.000668	0.0076	0.012	0.0391	0.0179
703	OBEIDY	B3	1.00	0.00548	0.357	237.03	0.00264	0.0495	0.0276	84.98	0.00142	0.00599	0.0158	0.0104	0.0301
704	OBEIDY	B5	1.00	0.00226	0.373	184.87	0.00255	0.0459	0.0169	66.97	0.00071	0.00998	0.0119	0.0184	0.0173
705	OBEIDY	B6	1.00	0.00421	0.357	204.84	0.00253	0.0474	0.0157	71.86	0.000748	0.00829	0.0115	0.0287	0.0322
706	OBEIDY	B7	1.00	0.00295	0.369	227.81	0.00236	0.0495	0.0166	81.07	0.000798	0.00674	0.0124	0.0341	0.0183
707	OBEIDY	B8	1.00	0.00293	0.285	168.63	0.00224	0.0588	0.0119	61.34	0.000625	0.0058	0.00774	0.0276	0.0152
708	OBEIDY	B9	1.00	0.00294	0.342	203.57	0.00191	0.0437	0.0143	73.82	0.000583	0.00632	0.0113	0.0211	0.0169
709	OBEIDY	B10	1.00	-0.000167	0.42	175.51	0.00214	0.0463	0.0165	62.64	0.00118	0.00231	0.0114	0.0132	0.0499
CTRL	_	_	_	4.97	4.83	4.84	4.92	4.96	9.67	5.05	9.82	9.84	4.95	4.9	5.11
710	OBEIDY	H1	1.00	0.00501	0.325	111.07	0.00283	0.0339	0.0118	41.62	0.000934	0.00426	0.00906	0.0255	0.0145
711	OBEIDY	H2	1.00	0.00315	0.376	109.34	0.00239	0.0406	0.014	39.99	0.000835	0.00906	0.00977	0.0092	0.0147
712	OBEIDY	H3	1.00	0.00185	0.391	99.09	0.00222	0.0412	0.0133	35.35	0.000562	0.00505	0.0115	0.0196	0.0134
713	OBEIDY	H4	1.00	0.00215	0.341	149.07	0.00207	0.0418	0.0136	52.64	0.000551	0.00451	0.0129	0.0117	0.0149
714	OBEIDY	H5	1.00	0.00178	0.377	107.53	0.00217	0.0456	0.0149	38.25	0.000595	0.00571	0.0155	0.022	0.0147
715	OBEIDY	H6	1.00	0.00124	0.351	133.84	0.00191	0.0398	0.0194	46.79	0.000674	0.00735	0.00863	0.0195	0.0139
716	OBEIDY	H7	1.00	0.00119	0.321	121.36	0.00181	0.036	0.024	44.47	0.000719	0.00545	0.00727	0.0168	0.0132
717	OBEIDY	H8	1.00	-0.00127	0.39	189.92	0.00218	0.054	0.0185	68.66	0.000709	0.00456	0.0159	0.0248	0.0168
718	OBEIDY	H9	1.00	0.00219	0.4	113.39	0.00179	0.0447	0.015	40.97	0.000595	0.00797	0.0091	0.0151	0.0165
719	OBEIDY	H10	1.00	0.00169	0.381	132.63	0.00174	0.0567	0.0151	48.36	0.000719	0.00326	0.0143	0.017	0.0163
CTRL	_	_	_	5.01	4.83	4.81	4.8	5.08	9.75	5.08	9.99	9.71	5.09	4.91	4.93
720	OBEIDY	I1	1.00	0.00133	0.358	165.33	0.00256	0.0468	0.0231	62.51	0.000705	0.00949	0.0141	0.0294	0.0113
721	OBEIDY	I2	1.00	0.000597	0.31	201.8	0.00236	0.042	0.0149	73.53	0.000707	0.00212	0.00997	0.0297	0.0161
722	OBEIDY	I3	1.00	-0.000342	0.381	225.52	0.00211	0.0574	0.0209	81.89	0.00056	0.00414	0.0097	0.0195	0.0162
723	OBEIDY	I4	1.00	0.000687	0.404	182.73	0.00197	0.063	0.0214	65.35	0.000793	0.00652	0.0137	-0.00563	0.0207
724	OBEIDY	I5	1.00	0.00239	0.372	118.84	0.002	0.0386	0.0157	42.22	0.000708	0.00856	0.00767	0.0185	0.0156
725	OBEIDY	I6	1.00	0.00171	0.363	132.64	0.00194	0.0412	0.0137	46.46	0.000708	0.00724	0.0112	0.0229	0.0261
726	OBEIDY	I7	1.00	0.0012	0.345	188.92	0.00198	0.0481	0.0164	68.72	0.00063	0.00701	0.017	0.0244	0.0178
727	OBEIDY	I8	1.00	0.000679	0.376	195.86	0.00193	0.0512	0.0167	68.54	0.000481	0.00549	0.0123	0.0207	0.0181
728	OBEIDY	I9	1.00	0.00112	0.348	145.54	0.00187	0.0455	0.0159	52.7	0.000551	0.00304	0.00495	0.0173	0.0153
729	OBEIDY	I10	1.00	-0.00101	0.378	134.24	0.00174	0.0462	0.0178	48.38	0.000579	0.00522	0.0118	0.0235	0.0133
CTRL	_	_	_	5.1	4.65	4.91	4.72	5.21	9.97	5.01	10.13	9.65	4.91	4.76	4.89
730	OBEIDY	L1	1.00	0.0012	0.365	96.77	0.0024	0.0407	0.0219	35.38	0.00109	0.00932	0.00928	0.0222	0.00953
731	OBEIDY	L2	1.00	0.00283	0.359	99.2	0.00201	0.0359	0.0115	35.38	0.000491	0.00684	0.00943	0.0156	0.0104
732	OBEIDY	L3	1.00	0.00368	0.397	138.69	0.00174	0.0445	0.0162	49.74	0.000907	0.00584	0.012	0.0133	0.0128
733	OBEIDY	L4	1.00	0.00206	0.377	100.13	0.00176	0.0397	0.0176	36.4	0.000708	0.00856	0.0155	0.0196	0.0127
734	OBEIDY	L5	1.00	0.00244	0.371	112.46	0.00173	0.0382	0.0115	40.36	0.000663	0.00655	0.0106	0.0238	0.0127
735	OBEIDY	L6	1.00	0.00084	0.374	142.24	0.00177	0.0458	0.0139	51.53	0.000573	0.00379	0.0112	0.0224	0.0135
736	OBEIDY	L7	1.00	0.00254	0.373	95.83	0.00166	0.041	0.0127	34.19	0.000488	0.00205	0.0132	0.013	0.0125
737	OBEIDY	L8	1.00	0.00369	0.38	185.55	0.00167	0.0495	0.0155	64.37	0.000626	0.00568	0.0118	0.0212	0.0173
738	OBEIDY	L9	1.00	0.00202	0.389	198.11	0.00244	0.0542	0.017	69.82	0.00125	0.00687	0.0144	0.0205	0.025
739	OBEIDY	L10	1.00	0.00029	0.38	165.14	0.00166	0.0468	0.0197	58.03	0.000662	0.00613	0.00671	0.0162	0.0169
CTRL	_	_	_	4.96	4.86	4.8	4.77	5.01	9.67	4.95	9.91	9.66	4.95	4.92	4.93
740	OBEIDY	P1	1.00	0.0033	0.403	94.93	0.002	0.045	0.0317	33.31	0.00135	0.00598	0.0118	0.00768	0.0148
741	OBEIDY	P2	1.00	0.00256	0.513	91.06	0.00165	0.057	0.0187	31.91	0.000775	0.00732	0.0183	0.0211	0.0166
742	OBEIDY	P3	1.00	0.00155	0.353	93.89	0.00183	0.0333	0.0105	34.06	0.000568	0.00814	0.00812	0.0103	0.0116
743	OBEIDY	P4	1.00	0.00207	0.377	108.74	0.00166	0.0412	0.0221	38.31	0.000825	0.00642	0.0139	0.0223	0.0146
744	OBEIDY	P5	1.00	0.00146	0.451	138.84	0.00163	0.0544	0.0177	49.26	0.000853	0.00794	0.0161	0.0174	0.0155
745	OBEIDY	P6	1.00	0.00195	0.325	108.94	0.00166	0.0324	0.0147	38.87	0.000627	0.00768	0.00959	0.0146	0.013
746	OBEIDY	P7	1.00	0.00284	0.409	106.11	0.00144	0.0454	0.0267	36.76	0.000908	0.00662	0.0186	0.015	0.0129
747	OBEIDY	P8	1.00	0.00437	0.351	138.76	0.00163	0.0451	0.0142	50.69	0.000872	0.00363	0.0113	0.0127	0.0143
748	OBEIDY	P9	1.00	-3.9E-5	0.376	195.39	0.00148	0.0659	0.0188	64.9	0.000576	0.00741	0.0179	0.0105	0.0143
749	OBEIDY	P10	1.00	0.00165	0.38	180.27	0.00157	0.0527	0.0176	63.54	0.000729	0.00495	0.0119	0.0175	0.0235

Rhizopot-rhizons : mesures pH

Echantillons	pH/T0	pH/T1	pH/T2	pH/T3	pH/T4	pH/T5
B1	7,64	7,64	7,61	7,08	7,11	7,37
B2	7,48	7,62	7,61	7,54	7,52	7,52
B3	7,54	7,81	7,68	7,28	7,43	7,42
B4	7,53	n.d.	7,63	7,17	7,25	7,26
B5	7,57	7,61	7,58	7,32	7,36	7,61
B6	7,41	7,91	7,56	7,26	7,13	7,3
B7	7,47	7,91	7,64	7,46	7,04	7,5
B8	7,56	7,5	7,58	7,38	7,53	7,38
B9	7,56	7,68	7,63	7,11	7,35	7,44
B10	7,4	7,72	7,6	7,51	7,39	7,42
H1	7,64	7,73	7,93	8	8,17	8,24
H2	7,94	7,73	7,88	7,92	8,04	8,04
H3	7,89	7,98	7,85	7,86	8,05	8,14
H4	8,18	7,97	8,1	7,71	8,09	8,16
H5	8,22	7,8	8,06	7,65	8,16	8,23
H6	8,17	7,77	7,84	7,65	8,03	8,09
H7	8,57	7,76	7,9	7,82	8,05	8,24
H8	8,02	7,75	7,92	7,65	8,03	8,16
H9	8,34	7,77	7,8	7,84	7,96	8,24
H10	7,95	7,83	7,83	7,82	7,99	n.d.
I1	7,57	8,38	7,73	7,88	8,04	8,19
I2	8,42	8,24	7,8	7,82	n.d.	8,04
I3	8,06	7,83	7,81	7,82	7,94	8,06
I4	7,98	7,43	7,82	7,81	8,06	8,2
I5	8,31	7,49	7,77	7,87	8	8,05
I6	8,07	7,47	7,75	7,89	8,1	8,16
I7	7,66	8,03	7,86	7,79	8,17	8,14
I8	7,87	7,65	7,71	7,84	8,08	8,15
I9	7,66	7,68	7,96	7,86	8,11	8,17
I10	7,74	7,72	7,83	7,76	8,13	8,12
L1	7,71	7,86	8,01	7,89	8,08	8,03
L2	7,7	7,81	7,9	7,8	n.d.	7,98
L3	8,07	7,65	8,03	7,9	8,07	8,21
L4	7,9	7,68	8,05	7,92	n.d.	8,16
L5	8,68	7,7	7,78	7,8	8,11	8,17
L6	8,1	7,58	7,76	7,9	8,08	8,22
L7	8,24	7,67	7,84	7,8	n.d.	8,21
L8	8,14	8,07	7,71	7,96	8,17	8,23
L9	7,95	8,21	7,8	7,87	8,17	8,21
L10	7,74	7,49	7,79	7,95	n.d.	8,16
P1	7,86	7,83	8,06	7,78	8,17	8
P2	7,96	7,94	7,93	7,79	8,02	8,11
P3	7,75	7,82	8,03	7,74	8,08	8,08
P4	7,86	7,79	7,9	7,8	8,16	8,14
P5	8,01	7,85	8,05	7,69	8,14	8,12
P6	7,88	7,57	7,79	7,66	8,09	8,09
P7	7,92	7,88	7,93	7,61	8,11	8,13
P8	8,26	7,77	7,86	7,9	8,06	8,14
P9	7,76	7,86	8,02	7,94	8,14	8,05
P10	8,18	7,89	7,85	7,86	8,11	8,46

Rhizopot-rhizons : extraction séquentielle

sampl	Al2O3(%)	As(ppm)	CaO(%)	Cd(ppm)	Cu(ppm)	Fe2O3(%)	MgO(%)	MnO(%)	Pb(ppm)	Sb(ppm)	Se(ppm)	Zn(ppm)
sampl	Al396,152	As189,042	Ca317,933	Cd226,502	Cu324,754	Fe259,837	Mg279,806	Mn257,610	Pb220,353	Sb217,581	Se196,026	Zn213,856
H1F1	-0,00272	0,237	100,99	0,00192	0,024	0,00569	24,43	0,013	0,00622	0,0118	0,0152	0,0106
H2F1	-0,00087	0,28	118,6	0,00164	0,0303	0,00617	24,79	0,0202	0,00102	0,00733	0,0133	0,0149
H3F1	-0,00318	0,369	138,4	0,00174	0,0399	0,00764	26,78	0,0149	0,00395	0,0137	0,0215	0,00951
H4F1	0,000442	0,297	114,75	0,00151	0,0297	0,00885	24,11	0,00273	0,00209	0,00833	0,0169	0,0149
H5F1	-0,000508	0,254	109,91	0,00171	0,0266	0,00735	25,76	0,0204	0,00238	0,00836	0,0106	0,018
H6F1	-0,0019	0,369	138	0,00184	0,0332	0,0078	25,54	0,0137	0,00422	0,0064	0,0187	0,00912
H7F1	-0,00133	0,245	107,3	0,00206	0,0279	0,00705	25,88	0,0293	0,00345	0,0141	0,0182	0,0162
H8F1	-0,0034	0,336	128,99	0,00177	0,0383	0,00695	24,63	0,0308	0,00217	0,0114	0,0185	0,00697
H9F1	-0,00131	0,26	111,95	0,00186	0,0288	0,00904	25,32	0,0528	0,00281	0,00825	0,0181	0,0303
H10F1	0,000594	0,265	109,95	0,00173	0,0307	0,0101	24,81	0,0791	0,00232	0,0138	0,0142	0,0183
H1F2	0.38	7.18	30.35	0.005	0.115	0.378	6.95	0.418	0.0179	0.0363	0.0248	0.0769
H2F2	0.332	7.57	36.39	0.00615	0.102	0.301	7.19	0.514	0.01	0.0396	0.0164	0.0629
H3F2	0.584	8.04	42.27	0.00522	0.112	0.498	7.54	0.468	0.0116	0.0342	0.0184	0.0681
H4F2	0.421	8.01	33.47	0.00504	0.116	0.465	7.12	0.447	0.0103	0.0353	0.0167	0.069
H5F2	0.391	7.7	32.5	0.00466	0.112	0.403	7.61	0.552	0.0111	0.0397	0.0184	0.0704
H6F2	0.296	7.99	43.11	0.00489	0.104	0.263	7.65	0.478	0.013	0.0373	0.00637	0.0615
H7F2	0.508	7.56	31.22	0.00486	0.108	0.452	7.38	0.567	0.0108	0.038	0.0184	0.0643
H8F2	0.306	7.79	40.98	0.00476	0.107	0.249	7.23	0.627	0.00841	0.0359	0.0137	0.0698
H9F2	0.451	7.57	32.54	0.00474	0.11	0.389	7.35	0.801	0.0115	0.0361	0.0183	0.0622
H10F2	0.41	7.49	32.67	0.00482	0.105	0.341	7.12	0.876	0.00939	0.0355	0.0174	0.0666
H1F3	50.82	18.97	0.501	0.044	4.32	151.95	32.47	86.81	2.59	0.218	0.0434	4.6
H2F3	50.17	21.17	0.501	0.039	5.07	166.39	49.02	86.8	1.97	0.226	0.047	4.65
H3F3	51.17	23.08	0.508	0.0509	5.52	182.65	35.95	86.8	2.27	0.248	0.0513	5.53
H4F3	52.22	22.09	0.609	0.0533	5.19	175.41	30.92	86.8	2.82	0.24	0.0511	5.38
H5F3	55.86	20.55	0.532	0.0403	4.73	179.35	48.65	86.8	1.56	0.217	0.0581	4.93
H6F3	56.87	24.96	0.565	0.0564	5.55	210.81	34.02	86.8	2.25	0.255	0.0501	5.71
H7F3	52.32	19.54	0.564	0.0488	4.47	157.97	28.04	86.81	3.1	0.195	0.0423	4.48
H8F3	49.76	22.15	0.485	0.0407	4.96	185.97	48.47	86.8	1.7	0.242	0.0472	5.29
H9F3	52.3	18.46	0.584	0.0537	4.48	155.15	30.14	86.79	10.17	0.249	0.0383	4.85
H10F3	50.28	19.24	0.485	0.0392	4.44	162.76	41.87	86.81	2.67	0.212	0.0414	4.72
H1F4	65,56	6,52	0,424	0,108	0,277	527,16	9,96	3,09	2,48	-0,0533	0,128	2,33
H2F4	66,28	7,18	0,401	0,0931	0,272	510,65	10,25	2,7	2,26	-0,0415	0,134	2,29
H3F4	69,65	8,35	0,372	0,0978	0,289	506,95	10,19	2,9	2,1	-0,0208	0,119	2,33
H4F4	64,96	7,75	0,626	0,0958	0,25	456,48	9,49	2,58	2,21	-0,0435	0,133	2,25
H5F4	63,24	6,42	0,379	0,0962	0,247	479,26	10,17	2,89	2,38	-0,0527	0,165	2,2
H6F4	66,94	7,65	0,529	0,0991	0,283	498,03	9,92	2,83	2,15	-0,029	0,207	2,23
H7F4	67,01	6,96	0,636	0,0975	0,299	504,43	9,36	2,99	2,32	-0,00921	0,189	2,15
H8F4	60,59	8,17	0,376	0,093	0,283	498,32	10,6	3	2,1	-0,0301	0,188	2,16
H9F4	66,25	6,14	0,392	0,106	0,256	499,66	10,3	3,4	3,65	-0,0384	0,177	2,25
H10F4	56,1	5,39	0,368	0,0719	0,203	372,46	8,66	2,04	1,99	-0,0285	0,096	1,8
H1F5	36.11	8.45	30.52	0.0469	1.1	105.78	25.23	2.91	5.07	-0.0326	0.0483	1.69
H2F5	38.45	11.25	30.1	0.0455	1.29	126.7	27.03	3.15	4.1	-0.037	0.0416	1.9
H3F5	40.74	11.96	37.04	0.0483	1.57	129.06	27.06	3.07	6.73	-0.0457	0.0445	2.05
H4F5	39.64	11.02	34.19	0.0519	1.49	125.19	26.48	3.06	6.21	-0.0458	0.0484	2
H5F5	39.33	10.39	37.81	0.051	1.32	127.71	28.14	3.07	6.39	-0.05	0.0417	2.03
H6F5	41.77	12	42.03	0.0512	1.75	140.27	27.83	3.21	7.48	-0.0606	0.0509	2.22
H7F5	43.05	10.32	29.34	0.0561	1.38	144.59	28.42	3.43	6.52	-0.0586	0.0571	1.99
H8F5	37.85	13.95	63.61	0.0581	1.59	117.94	28.49	3.38	5.35	-0.023	0.053	1.99
H9F5	39.13	10.67	28.6	0.0513	1.38	136.32	26.76	12.69	18.1	-0.045	0.0451	2.04
H10F5	38.59	12.25	39.47	0.0597	1.28	123.43	30.17	3.83	5.12	-0.0354	0.0529	1.88
H1	10,91396	466,56	0,97575	10,98	52,37	6,19114	1,45968	0,03460	504,26	34,32	18,05	390,44
H2	11,67664	549,40	1,41036	9,54	43,38	5,02964	1,60152	0,03479	578,11	22,75	17,07	390,43
H3	13,11368	691,26	1,47439	10,12	43,54	5,28899	1,81308	0,03953	493,84	22,97	16,17	363,69
H4	11,96736	617,10	1,29775	8,20	48,51	4,67489	1,67916	0,02919	442,37	25,46	15,76	335,28
H5	11,53772	522,45	1,26169	9,85	43,68	5,32744	1,70916	0,03756	549,02	21,71	18,28	380,67
H6	12,53684	758,40	1,66621	9,05	51,02	4,78280	1,78932	0,03412	502,72	23,88	15,35	361,40
H7	11,52208	470,70	0,89971	9,50	45,39	5,82305	1,57560	0,03329	496,08	42,45	16,18	411,01
H8	11,95356	791,43	1,66308	10,44	44,95	5,49341	1,73916	0,04556	598,54	19,91	17,89	365,13
H9	12,06488	405,98	0,89568	11,88	46,58	10,81828	1,72656	0,13632	1335,60	32,27	22,45	389,02
H10	12,11456	529,00	1,48506	8,89	43,61	4,84196	1,84764	0,03342	481,82	20,52	15,82	353,57

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abedin M. J., Feldman J., Meharg A.A. Uptake kinetics of Arsenic Species in Rice Plants. Plant Physiology, 2002, vol. 128, pp. 1120-1128.

Adriano D.C. Trace Elements in Terrestrial Environments Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, second edition. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, 2001, 867p.

Alam M., Tokunaga S., Maekawa T. Extraction of arsenic in a synthetic arsenic contaminated soil using phosphate. Chemosphere, 2001, vol. 43, pp. 1035-1041.

Alloway B.J. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In : Alloway B.J. (Ed.), Heavy Metals in soils. New York, NY. : Blackie Academic And Professional Publication, 1995, 268p.

Antosiewicz D.M., Escude-Duran C., Wierzbowska E., Sklodowska A. Indigenous Plant Species with the potential for the Phytoremediation of Arsenic and Metals Contaminated Soil. Water Air Soil Pollut., 2008, vol. 193, pp. 197-210.

B

Baker A.J.M. Accumulators and excluders-Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of plant nutrition, 1981, vol. 3, pp. 643-654.

Baldwin P.R., Butcher D.J. Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. Microchemical Journal, 2001, vol. 85, pp. 297-300.

Bauer M., Fulda B., Blodau C. Groundwater derived arsenic in high carbonate wetland soils: Sources, sinks, and mobility. Science of The Total Environment, 2008, vol. 401, pp. 109-120.

Bhattacharya P., Welch H. A., Stollenwer K. G., et al. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. Science of the Total Environment, 2007, vol. 379, pp. 109–120.

Bissen M., Frimmel F.H., Arsenic – a review. Part I : Occurrence, toxicity, Speciation, Mobility. Acta Hydrochim Hydrobiol, 2003, vol. 31, pp. 9-18.

Bhumba D.K., Keefer R.F. arsenic Mobilization and Bioavailability in Soils. In J. O. Nriagu (Ed.), Arsenic in the Environment-Part I: Cycling and Characterization. New York, NY : Jhon Willey & Sons, Inc., 1994, pp. 9-18.

Bluemlein K., Raab A., Meharg A. et al. Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC–ICP–MS and LC–ES-MS/ICP–MS with XANES/EXAFS in analysis of Thunbergia alata. Original paper. Anal Bioanal Chem, Springer -Verlag 2007.

Bowell R.J. Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. Applied Geochemistry, 1994, vol. 9, pp. 279-286.

Bravin M., Travassac F., Le Floch M., Hinsinger P., Garnier J. Oxygen input controls the spatial and temporal dynamics of arsenic at the surface of a flooded paddy soil and in the rhizosphere of lowland rice (*Oryza sativa* L.) : a microcosm study. Plant and Soil, 2008, vol. 312, pp. 207-218.

Bravin M.N., Marti A.L., Clairotte M., Hinsinger P. Rhizosphere alkalization- a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. Plant and Soil, 2009, vol. 318, pp. 257-268.

Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffre´T. Detection of nickeliferous rocks by herbarium species of indicator plants. J. Geochem. Explor., 1977, vol. 7, pp. 49- 57.

Bundschuh J., Litter M., Ciminelli V.S.T., Morgada M.E., Cornejo L., Hoyos S.G., Hoinkis J., Alarcón-Herrera M.T., Armienta M.A. Emerging mitigation needs and sustainable options for solving the arsenic problems of rural and isolated urban areas in Latin America – A critical analysis. Water research, 2010, vol. 44, pp. 5828-5845.

Burlo F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A.A., Valero D., Martinez-Sanchez F. Arsenic Species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants.

C

Callier L., Gérard J.P. Inventaires des sites industriels : pour mieux gérer le présent et anticiper l'avenir. Les Enjeux des Géosciences, Fiche de synthèse scientifique brgm, 2005, n°12.

Carbonell-Barachina A.A., Aarabi M.A., DeLaune R.D., Gambrell R.P., Patrick W.H., Jr. The influence of arsenic chemical forms and concentrations on Spartina patens and Spartina alternifolia growth and tissue arsenic concentration. Plant Soil, 1998, vol. 198, pp. 33-43.

Chaignon V., Hinsinger P. Heavy Metals in the Environment A Biotest for Evaluating Copper Bioavailability to Plants in a Contaminated Soil. J. Environ. Qual., 2003, vol. 32, pp. 824-833.

Chaignon V., Quesnoit M., Hinsinger P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. Environmental Pollution, 2009, vol. 157, pp. 3363-3369.

Chenu C., Bruand A. Constituants et Organisation du sol. In Sols : interface fragile. INRA éditions, 1997, pp. 3-17

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie, 2006, vol. 88, pp. 1707-1719.

Clozel B., Battaglia F., Conil P. Et al. Traitabilité par des méthodes physiques, chimiques et biologiques de sols contaminés-Rapport final. Rapport BRGM/RP-52065-FR, Orléans, France : BRGM Editions, 2002, 357p.

Cornu L., Gillet C. Arsenic et ses dérivés inorganiques. INERIS – DRC-01-25590-00DF258.doc., 2006, 78p.

Cotter-Howells J.D., Paterson E. Minerals and soil development. In Vaughan D.J., Wogelius R.A. Environmental Mineralogy. Eötvös University Press, 2000, pp. 91-124.

Creger, T.L., Peryea, F.J. Phosphate fertilizer enhances arsenic uptake by apricot liners grown in lead _ arsenate enriched soil. Hort. Sci., 1994, vol. 29, pp. 88-92.

Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. Phytoremediation of contaminated soil. Trends Biotechnol., 1995, vol., 13 pp. 393–397

D

Decarreau A. Partitioning of divalent transition elements between octahedral sheets of trioctahedral smectites and water. Geochim.Cosmochem. Acta., 1985, vol. 49, pp. 1537-1544

Deschamps T., Banzaazoua M., Bussière B. et al. Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels. VertigO-La revue en sciences de l'environnement, 2006, vol. 7, N°2.

Dessureault-rompré J., Nowack B., Schulin R., Luster J. Spatial and temporal variation in organic anion exudation and nutrient anion uptake in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. Plant Soil, 2007, vol. 301, pp. 123-134.

Devau N., Le Cadre E., Hinsinger P., Jaillard B., Gérard F. Soil pH controls the environmental availability of phosphors : Experimental and mechanistic modelling approaches. Applied Geochemistry, 2009, vol. 24, pp. 2163-2174.

Dinkelaker B., Römheld V. & Marschner H. Citrate acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (Lupinus albus L.). Plant, Cell and Environment, 1989, vol. 12, pp. 285-292.

Dolique R. L'arsenic et ses composés. Presses universitaires de France, 1968, 126p.

Dondon M-G., de Vathaire F., Quénel P., Fréry N. Cancer mortality during the 1968-1994 period in a mining area in France. European Journal of Cancer Prevention, 2005, vol. 14, pp. 297-301

Doušová B., Martaus A., Filippi M., Koloušek D. Stability of Arsenic Species in Soils Contaminated Naturally and in an Anthropogenic Manner. Water Air Soil Pollut., 2008, vol. 187, pp. 233–241.

Doyle M.O., Otte M.L., Organism-induced accumulation of iron, zinc and arsenic in wetland soils. Environmental Pollution, 1997, vol. 96, pp. 1-11.

Goldberg S., Glaubig R.A. anion sorption on a calcareous, montmorillonitic soil-arsenic. Soil Sci. Soc. Am. J., 1988, vol. 52, pp. 1297-1300.

F

Fitz W.J., Wenzel W.W. Arsenic transformations in the soil_ rhizosphere_ plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. Journal of Biotechnology, 2002, vol. 99, pp. 259-278.

Flessa, H., Fischer, W.R.. Plant-induced changes in the redox potential of rice rhizospheres. Plant Soil, 1992, vol. 143, pp. 55_ 60.

Fltecher. J. Introduction. In Mackova M., Dowling D. Phytoremdiation Rhizoremediation. Springer, 2006, pp. 1-3

Francesconi K.A., Kuehnelt D. Arsenic compounds in the environment. In: W.T. Frankenberger (Eds.), Environmental chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, Inc., 2002, 181p.

Francesconi K. Visoottiviseth P., Sridokchan W., Goessler W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. The Science of the Total Environment, 2002, vol. 284, pp. 27-35.

Frost R.R., Griffin R.A. Effect of pH on adsorption of arsenic and selenium from letfill leachate by clay minerals. Soil Sci. Soc. Am. J., 1977, vol. 41, pp. 53-57.

Fu Y., Chen M., Bi X., He Y., Ren L. , Xiang Y., Qiao S., Yan S., Li Z. Occurrence of arsenic in brown rice and its relationship to soil properties from Hainan Island, China. Environmental pollution, 2011, vol. 159, pp. 1757-1762.

G

Gardner W.K., Barber D.A., Parbery D.G. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. Plant and Soil, 1983, vol. 70, pp. 107-124.

Gao S., Goldberg S., Herbel M.J., Chalmers A.T., Fujii R. Sorption processes affecting arsenic solubility in oxidized surface sediments from Tulare Lake Bed, California. Chemical Geology, 2006, vol. 228, pp. 33-43.

Geng C.N., Zhu Y.G., Tong Y.P., Smith S.E., Smith F.A. Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat.Chemosphere, 2006, vol. 62, pp. 608-615.

Ghosh M., Singh S.P. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. Applied Ecology and environmental Research, 2005, vol. 3, pp. 1-18.

Greenwood N., Earnshaw A. Chemistry of the elements. Pergamon, Oxford, 1990, 1542p.

Gulen J., Champ D.R., Jackson R.E. influence of redox environments on the mobility of arsenic in ground water. Amer. Chem.. Soc. Symp. Ser., 1979, pp. 81-95.

Gupta K., Maity A., Ghosh U.C. Manganese associated nanoparticles agglomerate of iron(III) oxide: Synthesis, characterization and arsenic(III) sorption behavior with mechanism. Journal of Hazardous Materials, 2010, vol. 184, pp. 832-842.

H

Hartley W., Dickinson N., Riby P., Leese L., Morton J. Arsenic mobility and speciation in a contaminated urban soil are affected by different methods of green waste compost application. Environmental pollution, 2010, vol. 158, pp. 3560-3570.

Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Voojis, R., Bookum, W.T., Schat, H., Meharg, A.A. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in Holcus lanatus . Plant Physiol., 2001, vol. 126, pp. 299-306.

Huang J.H., Matzner E. Mobile arsenic species in unpolluted and polluted soils. Science of the Total Environment, 2007, vol. 377, pp. 308–318

Hettiarachichi G.M., Pirzynski G.M., Ransom M.D. In Situ Stabilization of Soil Lead Using Phosphorus. J. Environ.Qual., 2001, vol. 30, pp. 1214-1221.

Hinsinger P. How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the Rhizosphere. Advances in Agronomy, 1998, vol. 64, pp. 225-265.

Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant and soil, 2001, vol. 23, pp. 173-195.

Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. Origins of root mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. Plant and Soil, 2003, vol. 248, pp. 43-59.

Hudson-Edwards K.A., Houghton S.L., Osborn A. Extraction and analysis of arsenic in soils and sediments. Trends in Analytical Chemistry, 2004, vol. 23, pp. 10–11.

Hoffland, E. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilisation of rock phosphate by rape. Plant Soil, 1992, vol. 140, pp. 279-289.

Hossain M.B., Jahiruddin M., Loeppert R.H., Panaullah G.M., Islam M.R., Duxbury J.M. the effects of iron plaque and phosphorus on yield and arsenic accumulation in rice. Plant Soil, 2009, vol. 317, pp. 167-176.

I

Inskeep W.P., McDermott T.R. Arsenic (V)/(III) Cycling in soils and Natural Waters : Chemical and Microbiological Processes. In : W.T._Frankenberger (Eds.), Environmental chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, Inc., 2002, 181p.

Irtelli B., Navari-Izzo F., Uptake kinetics of different arsenic species by Brassica carinata. Plant Soil, 2008, vol. 303, pp. 105-113.

J

Jacobs, L.W., Keeney, D.R. Arsenic_ phosphorus interactions on corn. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1970, vol. 1, pp. 85-93.

Johnson S.E., Loeppert R.H. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. Soil Sci. Soc. Am. J., 2006, vol. 70, pp. 222-234.

Jones D.L., Darrah P.R. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and soil, 1994, vol. 166, pp. 247-257.

Jones D.L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil,* 1998, vol. 205, pp. 25–44

Jones D.L. Encyclopedia of ferns. British Musum (Natural History), London. In : Fitz. W.J., Wenzel W.W. Arsenic transformations in the soil –rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. Journal of biotechnology, 2002, vol. 99, pp. 259-278.

Jones D.L., Hinsinger P. The rhizosphere : complex by design. Plant soil Springer Science + Business Media B.V. 2008.

K

Kabata-Pendias A., Pendias H., Trace Elements in soils and Plants. CRC Press LLC, 2001, 403p.

Kihara T., Wada T., Suzuki Y., Hara T., Koyama H. Alteration of Citrate Metabolism in Cluster Roots of White Lupin. Plant Cell Physiol., 2003, vol. 44, pp. 901-908.

Kirk, G.J.D., Santos, E.E., Findenegg, G.R. Phosphate solubilisation by organic anion excretion from rice (Oryza sativa L.) growing in aerobic soil. Plant Soil, 1999, vol. 211, pp. 11-18.

Ko I., Kim J.Y., Kim, K.Y. Arsenic speciation and sorption kinetics in the As-hematite-humic acid system. Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engineering Aspects, 2004, vol. 234, pp. 43-50.

Kuzyakov Y. Review : Factors affecting rhizosphere priming effects. J. Plant Nutr. Soil Sci., 2002, vol. 165, pp. 382-396.

L

Laperche V., Bodénan F., Dictor M.C. et al. Guide méthodologique de l'arsenic appliqué à la gestion des sites et sols pollués. Rapport BRGM/RP-520066-FR, Orléans, France : BRGM Editions, 2003, 91p.

Lee K.Y., Kim K.W., Kim S.O. Geochemical and microbial effects on the mobilization of arsenic in mine tailing soils. Environ. Geochem. Health, 2010, vol. 32, pp. 31-44.

Le Hécho I. Bio-géochimie de l'arsenic. In : Journée technique : Arsenic. Pau, France : APESA, 2002, pp. 1-6.

Linehan D.J., Sinclair A.H., Mitchell M.C. Mobilisation of Cu, Mn and Zn in the soil solutions of barley rhizospheres. Plant and Soil, 1985, vol. 86, pp. 147-149.

Li X.F., Zuo F.H., Ling G.Z., Li Y.Y., Yu Y.X. et al. Secretion of citrate in response to aluminum and low phosphorus stresses in *Stylosanthes*. Plant and soil, 2009, vol. 325, pp. 219-229.

Lindsay W.L., Vlek P. L.G., Chien S.H. Phosphate minerals. In J.B. Dixon, S.B. Weed. Minerals in soil environment. Soil Sci. Soc. Am., Madison, 1989, pp. 1089-1130.

Lombi, E., Wenzel, W.W., Sletten, R., 1999. Arsenic adsorption by soil and iron-coated sand: kinetics and reversibility. J. Plant Nutr. Soil Sci. 162, 451-456.

Loosemore N., Straczek A., Hinsinger P. & Jaillard B. Zinc mobilization from a contaminated soil by three genotypes of tobacco as affected by soil and rhizosphere pH. Plant and Soil, 2004, vol. 260, pp. 19-32.

Lu Y., Dong F., Deacon C., Chen H., Raab A., Meharg A.A. Arsenic accumulation and phosphorus status in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars surveyed from fields in South China. Environmental pollution, 2010, vol. 58, pp. 1536-1541.

Luo Y.M., Christie P., Baker A.J.M. Soil solution Zn and pH dynamics in non-rhizosphere soil and in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* grown in a zn/Cd-contaminated soil. Chemosphere, 2000, vol. 41, pp. 164-164.

Luongo T., Ma L.Q. Characteristics of arsenic accumulation by *Pteris* and *non-Pteris* ferns. Plant and soil, 2005, vol. 277, pp. 117-126.

Lyubun Y.V., Fritzsche A., Chernyshova M.P., Dudel E.G., Fedorov E.E. Arsenic transformation by Azospirillum brasilense Sp245 in association with wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. Plant Soil, 2006, vol. 286, pp. 219-227.

M

Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature, 2001, vol. 409, pp. 579.

Manceau A., Drits V.A. Local structure of ferrihydrite and feroxyhite by EXAFS spectroscopy. Clay minerals, 1993, vol. 28, pp. 165-184.

Manning B.A., Goldberg S. Adsorption and stability of arsenic (III) at the clay mineral-water interface. Environ. Sci. Technol., 1997, vol. 31, pp.2005-2011.

Maria I. Silva Gonzaga, Jorge A.G. Santos, Lena Q. Ma. Arsenic chemistry in the rhizosphere of Pteris vittata L.and Nephrolepis exaltata L. Environmental Pollution, 2006, vol. 143, pp. 254-260.

Marin, A.R., Masschenlyn, P.H., Patrick Jr.W.H. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. Plant and soil, 1992, vol. 139, pp. 175-183.

Marin, A.R., Masschenlyn, P.H., Patrick Jr.W.H. Soil redox_ pH stability of arsenic species and its influence on arsenic uptake by rice. Plant Soil, 1993, vol. 152, pp. 245-253.

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. Academic Press, London, UK., 1995, 889p.

Marschner, H., Römheld, V. Strategies of plants for acquisition of iron. Plant Soil, 1994, vol. 165, pp. 261-274

Marseille F., Tiffreau C., Laboudigue A., Lecomte P. Impact of vegetation on the mobility and bioavailability of trace elements in a dredged sediment deposit; a greenhouse study. Agronomy, 2000, vol. 20, pp. 547-556.

Masschelyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick, W.H., Jr. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. Environ. Sci. Technol., 1991, vol. 25, pp. 1414-1418.

McCutcheon S.C., Schnoor J.L.Phytoremdiation Transformation and Control of Contaminants. Wiley-Interscience, 2003, pp. 3-25.

McIntyre T. Phytoremdiation of Heavy Metals from Soils. In Tasao D.T. (Eds.) Phytoremdediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003, pp. 98-123.

Meharg A.A., Macnair M.R. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. New Phytol., 1990, vol. 116, pp. 29-35.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis capillaris* L. New Phytologist, 1991, vol. 119, pp. 291-297.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in Holcus lanatus L. J. Exp. Bot., 1992a, vol. 43, pp. 519-534.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Polymorphism and physiology of arsenate tolerance in Holcus lanatus L. from an uncontaminated site. Plant and soil, 1992b, vol. 146, pp. 219-225.

Meharg, A.A., Macnair, M.R. Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of Deschampsia cespitosa L. Beauv. that differ in their tolerance to arsenate. Plant Soil, 1994, vol. 162, pp. 99-106.

Meharg A.A. Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in ferns and their allies. New Phytologist, 2003, vol. 157, pp. 25-31.

Mench M., Bussière S., Boisson J., Castaing E., Vangrosveld J., Ruttens A. et al. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after *in situ* treatments. Plant and soil, 2003, vol., 187, pp. 187-202.

Mench, M., Vangronsveld J. Lepp N. Phytostabilisation of metal-contaminated sites. In: In :J.-L. Morel et al. (Eds.) Phytoremediation of metal contaminated soils. Springer, 2006, pp.109-190.

Mucha A.P., Almeida C.M.R., Bordalo A.A., Vasconcelos M.T.S.D. Exudation of organic acids by a marsh plant and implications on trace metal availability in the rhizosphere of estuarine sediments. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2005, vol. 65, pp. 191-198.

Murphy A., Taiz L., A New Vertical Mesh Transfer Technique for Metal-Tolerance Studies in Arabidopsis. Plant Physiol., 1995, vol. 108, pp. 29-38.

N

Nguyen C. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des minéraux pour les plantes, Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches, Institut Polytechnique de Lorraine, 2007 136 p.

Nriagu J.O. Arsenic poisoning through ages. In : W.T. Frankenberger (Eds.), Environmental chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, Inc., 2002, 181p.

Neumann, G., Römheld, V. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorous-deficient plants. Plant Soil, 1999, vol. 211, pp. 121-130.

O

Oburger E., Kirk G.J.D., Wenzel W.W., Puschenreiter M., Jones D.L. Interactive effects of organic acids in the rhizosphere. Soil Biology & Biochemistry, 2009, vol. 41, pp. 449-457.

Ohwaki Y., Hirata H. Differences in Carboxylic Acid Exudation among P-Starved Leguminous Crops in Relation to Carboxylic Acid Contents in Plant Tissues and Phospholipid level in roots. Soil Sci. Plant Nutr., 1992, vol. 38, pp. 235-243.

O'Neill P. Arsenic. In : B.J. Alloway (Ed.), Heavy metals in soils. London, UK: Blackie Academic and Professionnal, 1995, pp. 105-121.

Oscarson D.W., huang P.M., Defosse C. et al. Oxidative power of Mn (IV) and Fe (II) oxides with respect to As (III) in terrestrial and aquatic environment.Nature, 1981, vol.191, pp.50-51.
Othmer K. Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Inc, 2001, 2240p.

P

Parsons R. Jordan J. Standard Potentials in Aqueous Solution. Marcel Dekker, Inc., 1985, pp. 162-172.

Pellet D.M., Grunes D. L., Kochian L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (Zea mays L.). Planta, 1995, vol. 196, pp. 788-795.

Pérez-López R., Asta M.P., Román-Ross G., Nieto J.M., Ayora C., Tucoulou R. Synchrotron-based X-ray study of iron oxide transformations in terraces from the Tinto-Odiel river system: Influence on arsenic mobility. Chemical Geology, 2011, vol. 280, pp. 336-343.

Peryea, F.J., Kammereck, R. Phosphate-enhanced movement of arsenic out of lead arsenate-contaminated topsoil and through uncontaminated subsoil. Water Air Soil Pollut., 1995, vol. 93, pp. 243-254.

Pickering I.J., Prince R.C., George M.J., Smith R.D., George G.N., Salt D.E. Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard. Plant Physiology, 2000, vol. 122, pp. 1171-1177.

Pierce M. L., Moore C.B. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. Water Res., 1982, vol. 16, pp. 1247-1253.

Porter, E.K., Peterson, P.J. Arsenic accumulation by plants on mine waste (United Kingdom). Sci. Total Environ, 1975, vol. 4, pp. 365-371.

Porter, E.K., Peterson, P.J. Arsenic tolerance in grasses growing on mine waste. Environ. Pollut., 1977, vol. 14, pp. 255-265.

Post J.E. Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmentam significance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, vol. 96. pp. 3447-3454.

Prohaska T., Stingeder G., Speciation of arsenic. In :Cornelis R., Crews H., et al. Handbook of Elemental Speciation II-Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health. John Wiley & Sons, Ltd., 2005, pp. 71-93.

Puschenreiter M., Schnepf A., Millan I.M., Fitz W.J., Horak O., Klepp J., et al. Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Plant and Soil, 2005, vol. 271, pp. 205-218.

Q

Quaghebeur, M., Rengel, Z. The Presence of Phosphate in the Rhizosphere of Holcus lanatus L. Stimulates the Uptake of Arsenate from Kaolinite. Arsenic in the Asia Pacific Region Workshop (Book of Abstracts), 20-23 November 2001, Adelaide, SA, pp. 143-145.

Quaghebeur M., Rengel Z. The distribution of Arsenate and Arsenite in Shoots and Roots of Holcus lanatus is influenced by Arsenic Tolerance and Arsenate and Phosphate Supply. Plant Physiology, 2003, vol. 132, pp. 1600-1609.

Quaghebeur M., Rengel Z..Arsenic Speciation Governs Arsenic Uptake and Transport in Terrestrial Plants. Microchim Acta, 2005, vol. 151, pp. 141–152.

R

Raab A., Feldmann J., Meharg A.A.The nature of arsenic-phytochelatin complexes in Holcus lanatus and Pteris cretica. Plant Physiology, 2004, vol. 134, pp. 1113-1122.

Raab A., Wright S., Jaspars M. , Meharg A. Pentavalent Arsenic Can Bind to Biomolecules. Angew. Chem. Int. Ed., 2007, vol. 46, pp. 2594 –2597.

Rahman M.A., Hasegawa H., Ueda K., Maki T., Mahfuzur Rahman M. Chemical Engineering Journal, 2008, vol. 145, pp. 179-184.

Redman A.D., Macalady D.L., Ahmann D. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. Environ. Sci. Technol, 2002, vol. 36, pp. 2889-2896.

Reeves, R.D. Hyperaccumulation of trace elements by plants In :J.-L. Morel et al. (Eds.) Phytoremediation of metal contaminated soils. Springer, 2006, pp. 25-52.

Remon E., Bouchardon J.-L., Faure O. Multi-tolerance to heavy metals in Plantago arenaria Waldst. & Kit. : Adaptative characters. Chemosphere, 2007, vol. 69, pp. 41-47.

Rovira A.D. Plant root exudates. The Botanical Review, 1969, vol.35, pp.35-59.

Ryan P.R., Jones D.L. Function and mechanism of organic anions exudation from plant roots. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.2001, vol.52, pp.527-560.

S

Sadiq M. Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and field observations. Water, Air, and Soil Pollution, 1997, vol. 93, pp. 117-136.

Schwertmann U., Carlson L. Aluminium influence on iron oxides: XVII. Unit-cell parameters and aluminium substitution of natural goethites. Soil Sci.Soc.Am.J., 1994, vol. 58, pp. 256-261.

Shen J., Li H., Neumann G., Zhang F. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in Lupinus albus as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. Plant Science, 2005, vol. 168, pp. 837-845.

Seyler, P., Martin, J.M. Biogeochemical processes affecting arsenic species distribution in a permanently stratified lake. Env. Sci. Technol., 1989, vol. 23, pp. 1258-1263.

Silva Gonzaga M., Santos A.G., Ma L.Q. Arsenic chemistry in the rhizosphere of Pteris vittata L. and Nephrolepis exaltata L. Environmental pollution, 2006, vol. 143, pp. 254-260.

Smedley P.L., Kinniburgh D.G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry, 2002, vol.17, pp. 517–568.

Smith K.S., Huyck H.L.O. An Overview of the Abundance, Relative Mobility, Bioavailability, and Human Toxicity of Metals. In: Geoffrey S. Plumlee, M.J. Logsdon, The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits. Reviews in Economic Geology, 1999, pp.29-70.

Smith, E., Naidu, R., Alston, A.M., 2002. Chemistry of arsenic in soils: II. Effect of phosphorous, sodium and calcium on arsenic sorption. J. Environ. Qual. 31, 557-563.

Sposito G. The chemistry of soils. Oxford, UK : Oxford University Press, 1989, 277p.

Srivastava M., Ma L.Q., Santos J.A.G. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. Sci Total Environ., 2006, vol. 364, pp. 24-31.

Ström L. Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuges and calcicole behaviour of plants. OIKOS, 1997, vol. 80, pp. 459-466.

Stroud J., Norton G., Islam M., Dasgupta T., White R., Price A., Meharg A.A., McGrath S.P., Zhao F. The dynamics of arsenic in four paddy fields in the Bengal delta. Environmental pollution, 2011, vol. 158, pp. 947-953.

Szegedi K., Vetterlin D., Jahn R. Modelling rhizosphere transport in the presence of goethite, including competitive uptake of phosphate and arsenate. Plant Soil, 2010, vol. 330, pp. 481-501.

Szegedi K., Vetterlin D., Nietfeld H., Jahn R. New Tool rhizomath for Modeling Coupled Transport and Speciation in the Rhizosphere. Soil Science Society of America, 2008, vol. 7, pp. 712-720.

T

Takematsu T., Kawashima M., Koyama M. The role of Mn^{2+}-rich hydrous managanese oxide in the accumulation of arsenic in lake sediments. Water Res., 1985, vol. 19, pp. 1029-1032.

Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). Pure Appl. Chem., 2000, vol. 72, pp. 1453-1470.

Takahashi Y., Minamikawa R., Hattori K.H., Kurishima K., Kihou N., Yuita K. Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded and non-flooded periods. Environmental Science & Technology, 2004, vol. 38, pp. 1038-1044

Thanabalasingam P., Pickering W.F. Arsenic sorption by humic acids. Envion. Pollut., 1986, vol. 12, pp. 233-246.

Tlustos P., Goessler W., Szakova J., Balık J. Arsenic compounds in leaves and roots of radish grown in soil treated by arsenite, arsenate and dimethylarsinic acid. Appl.Organometal. Chem., 2002, vol. 16, pp. 216-220.

Tlustos P., Pavilikova D. et al. Plant accumulation capacity for potential toxic elements. In :J.-L. Morel et al. (Eds.) Phytoremediation of metal contaminated soils. Springer, 2006, pp.53-84.

Tripathi R.D., Srivastava S., Mishra S., Singh N., Tuli R. et al. Arsenic hazards : strategies for tolerance and remediation by plants. Trends in Biotechnology, 2007, vol. 25, pp. 158-165.

Tu, C., Ma L.Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. J. Environ. Qual., 2002, vol. 31, pp. 641- 647.

Tu C., Ma L.Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator Pteris vittata L. under hydroponic conditions. Environmental and Experimental Botany, 2003, vol. 50, pp. 243-251.

Tu C., Ma L.Q., Luongo T. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. Plant and Soil, 2004, vol. 258, pp. 9-19.

Turpeinen, R., Pantsar-Kallio, M., Ha¨ggblom, M., Kairesalo, T., 1999. Influence of microbes on the mobilisation, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. Sci. Total Environ.236, 173-180.

U

Ultra Jr V.U., Sanaka S., Sakurai K., Iwasaki K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. Plant Soil, 2007, vol. 290, pp. 29-41.

V

Van Der Lelie D., Schwitzguebel J. P., Glass D. J., Vangronsveld J. and Baker A. Assessing Phytoremediation's Progress in the United States and Europe. Environ. Sci. Technol., 2001, vol.35, pp. 446 -452.

Vetterlein D., Szegedi K., Ackermann J. Competitive Mobilization of Phosphate and Arsenate Associated with Goethite by root Activity. J. Environ. Qual., 2007, vol. 36, pp. 1811-1820.

Vindimian E., Garric J., Flammarion P., Thybaud E., Babut M. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, vol. 18., pp. 2386-2391.

W

Wang J., Zhao F.-J., Meharg A.A., Raab A., Feldmann J., McGrath S.P., Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in Pteris vittata. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. Plant Physiology, 2002, vol. 130, pp. 1552-1561.

Wang W.J., Dalal R.C., Moody P.W., Smith C.J. Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. Soil Biology & Biochemistry, 2003, vol. 35, pp. 273-284.

Wang S., Mulligan C.N. Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, behaviour and distribution. Science of the Total Environment, 2006, vol. 366, pp. 701– 721.

Wang B.L., Shen J.B., Zhang W.H., Zhang F.S., Neumann G. Citrate exudation from white lupin induced by phosphorus deficiency differs from that induced by aluminum. New Phytologist, 2007, vol. 176, pp. 581-589.

Waychunas, G.A., Rea, B.A., Fuller, C.C., Davis, J.A. Surface chemistry of ferrihydrite: 1. EXAFS studies of thegeometry of coprecipitated and adsorbed arsenate. Geochim. Cosmochim. Acta, 1993, vol. 57, pp. 2251-2269.

Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., Adriano, D.C.. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure.Anal. Chim. Acta, 2001, vol. 436, pp. 309- 323.

Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Fitz W.J. & Puschenreiter M. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. Plant and Soil, 2001, vol. 237, pp. 37-45.

Y

Yamaguchi N., Nakamura T., Dong D., Takahashi Y., Amachi S., Makino T. Arsenic release from flooded paddy soils is influenced by speciation, Eh, pH, and iron dissolution. Chemosphere, 2011, vol. 83, pp. 925-932.

Yamauchi H., Yamamura Y. Concentration and chemical-species of arsenic in human-tissue. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1983, vol.31, pp.267-270.

Z

Zarcinas B.A., Cartwright B., Spouncer L.R. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. Commun. In Sci. Plant Anal., 1987, vol. 18, pp. 131-146.

Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. New Phytologist, 2002, vol. 156, pp. 27-31.

Sites internet:

Basol : http://basol.ecologie.gouv.fr

Basias : http://basias.brgm.fr

Organisation Mondiale pour la Santé : http://www.who.int/fr/

Portail 'Sites pollués' du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du développement durable, et de l'aménagement du territoire : http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr

Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

N°d'ordre : *2011 EMSE 0608*

Carole OBEIDY

The effect of vegetation on Arsenic mobilization in the rhizosphere.

Speciality: Environmental Engineering

Keywords: Arsenic, rhizosphere, phytoremediation, geochemical contamination, tolerance

Abstract:

The pollution of soils with Arsenic (As) is an increasing environmental concerns in several countries in the world: USA, Canada, Mexico, China, Vietnam and France. Recently, the emergence of green technologies sush as "phytoremediation" is considered an attractive soil remediation strategy due to its low cost and soil preservation. For this reason, the understanding of interactions between plants and As at the soil-root interface is necessary in order to accelerate phytoremediation implementation and to test its effectiveness. Hence the aim of this work was to study the effect of four plant species *Holcus lanatus*, *Dittrichia viscosa*, *Plantago lanceolata* and *Lotus corniculatus* on As mobility in a natural As contaminated soil (up to 2000 mg kg-1). First, we compared and characterized the tolerance behaviour of the four selected species to As and their accumulation capacity in hydroponic and in natural soil conditions. Then, the study of As mobilization in the rhizosphere was conducted by using two approaches "rhizopot-rhizons" and "root mat". We identified by the "rhizopot-rhizons" approach, some interesting correlations between As and the monitored parameters (NO_3^-, SO_4^{2-}, Ca, Mg, P, pH, COD) over the vegetative growing period. We observed several processes affecting As mobilization in the rhizosphere (alkalization / acidification, anionic competition ...). The advantage of this approach is that the plants have grown normally without growth substrate pretreatment (artificial contamination, addition of nutrient solutions ...).
Whereas, the "root mat" approach allowed the identification of some organic anions in the root system of *P. lanceolata* and highlighted the role of phosphorus on As mobilization due mainly toto the easy roots collection at the end of experiment.

Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

N°de l'ordre : *2011 EMSE 0608*

Carole OBEIDY

Effet de la végétation sur la mobilité de l'arsenic (As) dans la rhizosphère

Spécialité : Génie des Procédés

Mots clefs : Arsenic, rhizosphère, phytoremédiation, contamination géochimique, tolérance

Résumé :

La pollution des sols par l'Arsenic (As) est une préoccupation environnementale grandissante dans plusieurs pays du monde : États-Unis, Canada, Mexique, Chine, Vietnam et France. L'émergence des techniques écologiques dites « phytoremédiation » constitue à l'heure actuelle une des solutions aux problématiques de décontamination des sols pollués par l'As. Aussi, elle permet de rallier le respect de l'état écologique des sites d'une part et le coût financier de traitement d'autre part. Pour cela, l'appréhension des interactions entre le végétal et l'As à l'interface racine-sol est nécessaire afin d'accélerer la mise en place de la phytoremédiation et de tester son efficacité. D'où l'objectif général de ce travail est d'étudier l'effet de quatres espèces végétales *Holcus lanatus*, *Dittrichia viscosa*, *Lotus corniculatus* et *Plantago lanceolata* sur la mobilité de l'As dans un sol à contamination géochimique en As (2000 mg kg^{-1}). Notre étude a permis au départ de comparer et de caractériser la tolérance et la capacité accumulatrice des espèces séléctionnées à l'égard de l'As en milieu de culture et en sol contaminé chimiquement par l'As. Ensuite, l'étude de la mobilisation de l'As dans la rhizosphère a été réalisée par deux approches d'étude complémentaires : l'approche « rhizopot-rhizons » et l'approche « tapis racinaire ». L'approche « rhizopot-rhizons » nous a permis d'identifier d'intéressantes corrélations entre l'As et les paramètres suivis (NO_3^-, SO_4^{2-} , Ca, Mg, P, pH, COD) tout au long de la période de croissance. Nous avons identifié et caractérisé plusieurs processus ifluençant la mobilisation de l'As dans la rhizosphère (alcalinisation/acidification, compétition anionique…). L'avantage de l'approche « rhizopot-rhizons » réside dans le fait que les plantes se sont développées sans prétraitement du substrat de croissance (contamination artificielle, ajout de solutions nutritives…). Par ailleurs, l'approche « tapis racinaire » a permis d'identifier quelques anions organiques dans les racines de *P. lanceolata* et de mettre en évidence le rôle du Phosphore dans la mobilisation de l'As dans la rhizosphère. Elle permet d'amplifier l'effet du système racinaire sur la mobilité de l'As dans le sol d'une part, et de récupérer entièrement le système racinaire tout en limitant les artefacts liés à la contamination des racines par le sol d'autre part.