



HAL
open science

Hyperaccumulation du nickel sur des substrats élaborés pour l'agromine

Marie Rue

► **To cite this version:**

Marie Rue. Hyperaccumulation du nickel sur des substrats élaborés pour l'agromine. Sciences agricoles. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0124 . tel-01745865

HAL Id: tel-01745865

<https://theses.hal.science/tel-01745865>

Submitted on 28 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Université de Lorraine

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries alimentaires
Laboratoire Sols et Environnement
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
École doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lorraine Spécialité **Sciences Agronomiques**

Hyperaccumulation du nickel sur des substrats élaborés pour l'agromine

par

Marie Rue

Soutenue publiquement le 1^{er} juin 2017

Devant le jury composé de :

M^{me} Isabelle Laffont-Schwob , Maître de Conférences, Université Aix Marseille (IMBE)	Rapporteuse
M^{me} Laure Vidal-Beudet , Maître de Conférences, Agrocampus Ouest (EPHor)	Rapporteuse
M. Alan J M Baker , Professeur, Université de Melbourne (School of BioSciences)	Examinateur
M^{me} Marie-Noëlle Pons , Directrice de Recherche, Université de Lorraine (LRGP)	Examinatrice
M. Alexandre Chagnes , Professeur, Université de Lorraine (GéoRessources)	Invité
M. Christophe Chêne , Directeur technique SOLEO Services	Invité
M. Jean Louis Morel , Professeur, Université de Lorraine (LSE)	Directeur de thèse
M^{me} Marie-Odile Simonnot , Professeur, Université de Lorraine (LRGP)	Co-directrice de thèse

*Laboratoire Sols et Environnement (LSE)
Université de Lorraine, INRA (UMR 1120)
2, avenue de la forêt de Haye- BP 20163
F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy*

*Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)
Université de Lorraine, CNRS (UMR 7274)
1, rue Grandville- BP 20451
F-54001 Nancy Cedex*

Version corrigée
Août 2017

REMERCIEMENTS

Si la thèse est un travail personnel, elle n'en est pas moins collective. Ce travail s'inscrit dans la continuité de plusieurs années de recherche dans le monde et à Nancy. Il s'est basé sur les travaux concernant la phytoextraction des métaux au Laboratoire Sols et Environnement (LSE) et leur extraction par hydrométallurgie à partir des plantes dans l'équipe Sols et Eaux au Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP), sans oublier les travaux de l'équipe Technosol au LSE ! Il va être difficile de dresser une liste exhaustive des personnes qui ont participé de près ou de loin à l'existence et l'émergence de cette thèse. Cependant, il y a des personnes que j'ai longuement cotoyé au cours de ces années et qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail. Ainsi je leur dédie ces premières pages.

Cette thèse s'est déroulée dans le cadre du projet LORVER, dont je remercie les financeurs : le FEDER et la région Grand Est et les coordinateurs du projet : Sophie Guimont, Marie-Odile Simonnot et Lucas Gossiaux pour leur suivi. Cette thèse s'est déroulée au sein du LSE et du LRGP dont je remercie les directeurs Christophe Schwartz et Laurent Falk pour leur accueil et la mise à disposition du matériel pour le bon déroulement de ces années.

Merci à Jean Louis Morel et à Marie-Odile Simonnot pour leur direction, leurs conseils et pour la confiance qu'ils m'ont accordée. Merci de m'avoir fait progresser, de m'avoir endurci et de m'avoir laissée concrétiser ce sujet par de multiples expérimentations. Merci pour les opportunités de congrès et les déplacements en Grèce et en Espagne. Merci à Jean Louis de m'avoir donné la liberté d'entreprendre, de chercher et d'expérimenter, merci pour l'enseignement des processus pédogénétiques. Merci à Marie-Odile pour ses leçons de chimie, sa disponibilité et sa présence pour canaliser ce travail quand cela était nécessaire.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci pour leurs relectures éclairées, leurs propositions d'améliorations de ce manuscrit. Merci pour les riches échanges lors de la soutenance et les pistes de réflexion proposées sur ce travail.

Merci à toutes les personnes qui ont aidé à la préparation de la journée du 1^{er} juin 2017, aux relecteurs du manuscrit, aux 10 oreilles attentives qui ont écouté les répétitions et aux confecteurs du pot, aux coursiers et à celles et ceux qui ont participé à l'installation et au rangement dans cette journée bien remplie.

Merci à Stéphane Désobry pour sa volonté de toujours améliorer le doctorat à RP2E et de laisser la parole à tous lors des conseils de l'école doctorale. Merci à Christine Fivet pour son dévouement pour les doctorants, sa disponibilité et pour les nombreux services rendus.

Si la thèse repose sur une école doctorale et des laboratoires, elle se vit au quotidien avec les membres des laboratoires. Pour les bons moments et les services rendus, je remercie toutes les petites mains qui ont un jour apporté de l'eau à mes centaines de plantes qui ont pendant plus de 3 ans poussé dans les phytotrons et les serres, à Brabois et Homécourt !

Merci à tous les techniciens pour leur aide, leurs conseils et leur assistance. Merci à eux d'avoir donné de leur temps et de leur patience, et pour les petits dépannages de dernière minute. Merci à Adeline Bouchard, Romain Goudon et Alain Rakoto d'améliorer nos conditions de travail, au bureau et au labo. Merci à Stéphane Colin d'avoir fabriqué des dispositifs sur mesure. Merci à Jean-Claude Bégin pour les broyages et le travail réalisé sur les lames à partir de substrats bien friables ! Merci à Alain pour les dépannages informatiques 7/7J ! Merci à Lucas Charrois pour les arrosages et les broyages!

Merci à toutes les personnes qui m'ont formé à l'utilisation des appareils. Merci à Romain pour la formation à l'ICP. Merci à Steve Pontvianne et Stéphanie Ouvrard pour le COT et la chromatographie. Merci à Frédéric Diot pour le Niton et à Isabelle Bihannic pour la DRX. Merci à Jean-François Remy pour le MEB. Merci au LAE, à Frédéric Bourgaud, Alexandre Olry, Romain

Larbat pour leur expertise sur les coumarines et particulièrement à Jérémy Grosjean pour les analyses. Merci au LIEC, à Charlotte Berthelot et Damien Blaudez pour leur intérêt pour les racines de *Berkheya* et les analyses réalisées.

Merci à Malik Boulefrakh, Laetitia Despouy, Sylvia L'Huillier, Marie Bourre, Sylvie Vaultrin, Anne-Gaëlle Villatte, d'avoir facilité mes démarches administratives et les commandes de matériel.

Merci à tous les participants du 22 août 2016 : Adeline Combat, Baptiste Laubie, Émile Benizri, Gaylord Machinet, Jean Louis Morel, Marie-Odile Simonnot, Maxime Maire, Stéphane Colin sous un soleil brûlant, d'avoir préparé les mélanges et rempli les bacs. Et merci à tous ceux qui continuent de faire tourner cette expérience : Adeline, Yannick, Steve, Romain, Lucas et les achemineurs d'échantillons.

La thèse, c'est aussi des jeunes collègues, des chercheurs en herbe. Merci à Luciana Frota-Madeira d'avoir travaillé à mes côtés durant son stage de 6 mois et ma première année de thèse. Merci à Monique Goderniaux, Yannick Cazes et Benjamin Magnus, nous étions 4 apprentis chercheurs à atterir ensemble à Brabois. Merci à Hermine Huot, Audrey Pernot, Sarah Rokia, Cédric Gonneau, Joan Dupuy, Frédéric Rees, Tenghaobo Deng, Sophie Joimel, Ryad Bouzoudja, Robin Dagois, Ivan Zelko, Ali Kanso, Khaled Brimo, Amina Ameer, Quentin Vincent, Ramez Saad, Celestino Quintela, Clémentine Lapie, Séverine Lopez, Anne Blanchart, Dulce Montserrat, Mohammad Wazne, Xuan Nguyen, Charline Ridard, Jérémie Bel et aussi Xin Zhang, Jérémy Rodrigues, Julien Mocellin, Bérénice Ranc, Vivian Houzelot, Florent Ferrari, Claire Hazotte, Lucie Barbier, Mathilde Guilpain, Zeinab Chour, Charlotte Berthelot, Dimitri Ubersfeld pour les badmintons, les repas au RU, les WEED, les burgers, les apéros, les tarots et les déménagements ! Enfin, nombreux sont les stagiaires, doctorants ou postdoctorants qui ont foulé les couloirs du LSE ou du LRGP pendant mes années à Nancy et qui ont un jour, autour d'un gâteau, d'un verre, d'une balance ou d'une sorbonne eu une phrase drôle ou une attention sympathique qui font jour après jour de bons souvenirs, merci à eux.

Une pensée particulière pour Jérémy, Bérénice, Khaled, Ali et Amina avec qui nous avons démarré conjointement l'aventure au LSE ou au LRGP. Merci à Ali pour sa disponibilité et son infinie générosité. Merci à Bérénice pour son énergie et sa vitalité débordante.

Merci au GISFI, à Noële Enjelvin, Rémi Baldo, Mélanie Malacarne, Adeline Combat et Yannick Cazes pour votre implication dans les expérimentations, pour le suivi de la superbe expérience « Bacs » et pour le travail à venir.

Merci à Emmanuelle Montarges, Antony Van der Ent et Isabella Zelano pour le très intéressant séjour passé au synchrotron DESY, la visite express de Hambourg, les cours de nuit sur la fluorescence et les pauses café -chocolat entre deux scans.

Merci à Émile, Stéphanie, Pierre et Xin pour avoir été présents lors de ma première comm' orale à 9h du matin et à Alan Baker d'avoir été un chairman soutenant.

Que de bons souvenirs en Grèce et en Espagne, merci à Guillaume Echevarria pour la botanique, à Jean Louis pour la pédologie et les cubes de pastèque, à Tino pour la présentation floristique et à Petra et son équipe pour l'accueil à Saint Jacques.

Merci à Noële Enjelvin pour sa présence féminine dans les pauses, nos discussions météorologiques et agricoles, et celles sur les goûts et les couleurs ! Merci à Baptiste Laubie pour les enseignements de chimie, les modélisations et les conseils pour l'oral. Merci à Geoffroy Séré, Sophie Leguedois, Apolline Auclerc pour les discussions imprévues mais bienvenues au détour d'un couloir ou d'un bureau, autant scientifiques que personnelles, ces conversations auront permis de me faire relativiser et avancer d'un pas de plus.

Merci à Françoise Watteau pour sa gentillesse et sa modestie. Merci à Stéphanie Ouvrard pour l'organisation des séminaires, les discussions chimistiques et les heures de chants. Merci à Thibault Sterckeman pour ses connaissances et son exigence. Merci à Guillaume Echevarria pour sa connaissance des hyperaccumulateurs et du terrain. Merci à Catherine Sirguy pour les discussions sur la fertilisation, l'usage des filtres et la journée de semis à Jeandelaincourt. Merci à

Christophe Schwartz pour son oreille attentive aux suggestions des doctorants. Il me reste tant de choses à apprendre de vous tous.

Merci à Émile Benizri qui m'a donné ma chance en Master 2. Merci pour son accompagnement, son aide, son infailible soutien pendant plus de 4 ans. Merci de m'avoir formé à la recherche, à l'expérimentation, à la rédaction, à la présentation et à la microbiologie. Merci pour son exigence et sa rigueur. Merci pour ses exemples à la paillasse et pour avoir partagé les dures fins de semaine lorsque les expériences et les aléas génèrent stress et découragement. Merci pour sa présence dans les moments qui semblaient des impasses. Merci pour les cours d'anglais, pour ses encouragements, sa générosité, sa disponibilité et pour sa gentillesse.

Merci à Sarah pour nos échappées dans Nancy. Merci à Robin pour les voyages en twingo, les soirées tarots et le dépotage.

Merci à Joan pour sa générosité, le goût des bons plats, de la charcuterie, du piment d'espelette, des boîtes de cerf. Merci de m'avoir fait participer aux moments importants de sa vie et à la quête de ballerines bleue nuit ! Merci pour les soirées rue Jeanne d'Arc, la visite du Sud Ouest, et... de Montréal !

Merci à Cédric pour nos innombrables phrases échangées sur les expérimentations passées, pour tous les protocoles enseignés, pour les pauses entre 2 séries de DTPA, pour les stats sous R, pour ses connaissances scientifiques et sa vivacité d'esprit. Merci pour son sens de la fête, du rhum arrangé et pour le Ti'jacque du départ.

Merci à Frédéric pour l'enseignement des traditions très alsaciennes et éloignées des foréziennes ! Pour avoir tranché sur la consommation de clémentine (pas avant le 6 décembre), pour les tartes aux pommes (avec cannelle), les vins alsaciens (...) et les cures de cinéma (ça ce n'est pas typiquement de l'Est). Merci pour son soutien, sa présence, ses paroles rassurantes, ses relectures scientifiques, tellement justes et formatrices. À bientôt, en salle, pour son film.

Parce que rien n'est écrit d'avance et que l'improvisation est source de création, merci à la chorale Jean Lamour, pour l'escapade musicale du mercredi soir. Quelle chance j'ai eu de pouvoir faire de la musique pendant ma thèse. Merci donc à Marie-Odile, qui par l'intermédiaire de Jean-Pierre m'a présenté Corinne. Merci à tous les choristes pour toutes ces notes gaiement partagées, le concert à Batigny, le Stabat Mater d'Astorga et toutes ces répétitions tant appréciées.

Merci à Émilie et Nastasia pour toutes ces histoires que nous avons échangées et les souvenirs que nous nous sommes créés, de la tortue au fond du jardin à l'ancrage provisoire de Désiré sur le canal de la Marne au Rhin.

Merci à Camille et Martin, fidèles voisins, volontaires quelque soit la météo, pour dévaler les quelques marches qui nous séparaient et se réchauffer autour d'une... ou plusieurs poires. Ces magnifiques soirées pour discuter de nos thèses, de politiques, d'ICN, d'agriculture, de projets et de projet agricole.

Merci à l'ISARA de m'avoir fait rencontrer de super nanas. Merci à la fac de musicologie de Saint- Etienne de transmettre les pages de la musique grâce à des enseignants formidables et d'avoir placé sur ma route Juliette.

Merci à une poignée d'auvergnat pour les bals, les bœufs, la coloco et les vogues.

Merci à Jacques Berthelon et Jean-Louis Berthon d'avoir un jour évoqué la possibilité de faire une thèse et avoir ces jours là semé une idée qui a fini par germer.

Merci à mes fidèles amies, Aurélia et Pascale, qui même si la distance entre Lyon et Nancy ne se parcourt pas en moins de 4h, continuent de partager les moments importants et de prêter leur présence et leur gentillesse dans tous les instants essentiels.

Merci à Nicole, Héloïse, Christiane, Francis et Hervé pour les étés, les classes et les fêtes passées à Salvizinet depuis 18 ans !

Merci à Rozier, aux occupants du chalet, de l'atelier, de Mussy et de la rue du Grenouiller pour l'accueil, les cafés, les repas aux balcons ...Eugénie, Marcel, Monique, Daniel, Raph, Fred, Louise, Félix et Oscar. Même si les discussions sont parfois animées, les après-midi y sont chaleureux.

Merci à mes cousins, oncles et tantes pour les rendez-vous annuels auxquels nous aimons participer, merci pour votre venue à la soutenance. Merci à Daniel et Virginie pour leur bienveillance.

Merci à mes frères et sœurs : Mathilde, Magali, Lisa, Édouard, Armand et Valentine, pour nos points communs et nos différences, pour supporter mes excès et mes impatiences. Vivement toutes ces belles années qui arrivent à la ferme et ailleurs.

Je fais partie de ces enfants, très chanceux, car ils ont une grand-mère extraordinaire. Merci à elle pour cet espace de liberté et d'apprentissage qu'est son jardin, pour les étés à jardiner, les pôtées de rattes/pois gourmands, la cueillette des fruits, les confitures de ballons, les tartes aux myrtilles, les pâtés aux poires de rivière, les marchés à Feurs pour trouver des perles, les brocantes, les châtaignes cueillies à l'automne et pelées à Noël, la recette du gâteau de Savoie....

Merci à mes parents pour toutes ces années de transmission de savoir vivre et de savoir être et pour avoir propulsé leurs enfants dans le monde des grands avec la liberté de faire leurs choix et l'énergie pour y parvenir.

Merci Anthony

Merci aux botanistes pour leurs prospections et l'identification des hyperaccumulateurs.

Merci aux plantes de nous épater par leurs potentialités infinies et de nous inspirer des idées qui nourrissent notre créativité.

SOMMAIRE

Liste des figures	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations	12
Introduction générale.....	13
<i>PARTIE 1 Agromine du nickel, des sols naturels aux milieux extrêmes</i>	15
1. L'extraction du Ni du sol par les plantes	16
1.1. Le Ni dans les sols.....	16
1.2. Réponse des plantes à la présence de Ni.....	16
a) Le Ni, un oligo-élément.....	16
b) Les hyperaccumulateurs de Ni.....	17
c) Prospection pour la découverte et l'inventaire des HA.....	17
d) Pourquoi les plantes hyperaccumulent-elles ?	19
1.3. Adaptations de la flore des sols de serpentine	20
a) Flore des sols métallifères.....	20
b) Traits de la flore des sols métallifères	21
c) Rapport molaire Ca/Mg.....	21
2. Prélèvement du métal par la plante, transport et stockage	22
2.1. La phytodisponibilité.....	22
2.2. Un pH modérément acide est favorable à la phytoextraction.....	25
2.3. La microflore peut augmenter la phytoextraction	26
2.4. Les molécules impliquées dans le prélèvement, la translocation et la séquestration du Ni	26
2.5. Où est stocké le Ni dans les hyperaccumulateurs ?.....	27
2.6. Les métabolites secondaires ; des chélateurs de métaux ?	28
2.7. Conclusion.....	29
3. L'agronomie des hyperaccumulateurs au service de l'agromine.....	29
3.1. L'agromine	30
3.2. L'optimisation de la culture des hyperaccumulateurs pour l'agromine du Ni.....	31
a) Choix des sols et des hyperaccumulateurs	31
b) Compétition entre éléments pour l'accès à la plante	32
3.3. Itinéraires de culture	33
a) Installation du couvert : semis, repiquage, densité.....	33
b) Fertilisation et amendements.....	33
c) Co-culture d'espèces végétales	36
d) Inoculation de souches d'intérêt	37
e) Coupes successives au cours de l'année.....	37
3.4. Évolution et pérennité de l'agroécosystème	38
a) Multiplication des plantes	38
b) Suivi de la biodisponibilité.....	38

3.5. Exemples de cultures d'hyperaccumulateurs de Ni à l'échelle de la parcelle	38
a) Phytoextraction sur sites ultramafiques : sols délaissés (Balkans) ou post exploitation minière (tropiques).....	38
b) La réhabilitation de sites miniers	39
3.6. Conclusion.....	40
4. Le génie pédologique pour valoriser des déchets métalliques et créer des substrats	41
4.1. Utilisation des déchets métalliques.....	41
4.2. La construction de sol	42
4.3. La construction de sols pour l'agromine du Ni	45
5. Conclusion.....	47
<i>PARTIE 2 Matériels et méthodes</i>	<i>51</i>
1. Matériels	52
1.1. Espèces végétales	52
1.2. Matériaux	53
a) Boue industrielle métallique.....	53
b) Terres, stérile de carrière et vermiculite.....	57
c) Amendements.....	61
2. Modalités de culture des végétaux.....	64
2.1. Tests de germination	64
2.2. Test de croissance	65
3. Méthodes d'analyse.....	65
3.1. Analyse de la solution du sol	65
3.2. Analyse des solides	66
3.3. Analyse des végétaux	67
3.4. Analyses statistiques.....	68
<i>PARTIE 3 Potentiel des hyperaccumulateurs pour l'agromine de Ni et Co</i>	<i>71</i>
<i>Chapitre 1 : Potentiel d'espèces de Brassicacées pour l'agromine du Ni</i>	<i>74</i>
1. Accumulation du Ni par différentes espèces et populations de Brassicacées	74
1.1. Matériels et méthodes	74
1.2. Résultats	75
a) Biomasse des parties aériennes.....	75
b) Ni accumulé dans les parties aériennes	76
c) Composition des parties aériennes	77
d) Corrélations du Ni avec Ca, Co et, Zn	80
e) Variabilité de la composition	80
f) Individus avec des concentrations extrêmes.....	81
g) Individus les plus efficaces pour le Ni, le Co	81
1.3. Discussion	84

1.4. Conclusion.....	85
2. Production de composés organiques d'intérêt par les hyperaccumulateurs de Ni	85
2.1. Matériels et méthodes	85
2.2. Résultats	86
2.3. Conclusion.....	87
3. Effet de la co-culture sur l'accumulation du Ni	88
3.1. Matériels et méthodes	88
3.2. Résultats	88
a) Biomasse et extraction du Ni	88
b) Composition des parties aériennes et racinaires.....	90
c) Composition de la terre rhizosphérique.....	90
3.3. Discussion	94
4. Techniques de conservation des individus performants.....	94
4.1. Coupes successives	94
4.2. Multiplication par bouturage pour la conservation d'individus performants.....	95
4.3. Conclusion.....	97
5. Conclusion.....	99
Chapitre 2 : Potentiel d'Astéracées pour l'agromine du Ni et du Co	100
1. Matériels et méthodes.....	100
2. Résultats.....	103
2.1. Comparaison des biomasses et concentrations dans les organes de <i>B. coddii</i>	103
a) Biomasse de <i>B. coddii</i>	103
b) Transfert du Ni et du Co dans les plantes.....	105
c) Composition de <i>B. coddii</i>	110
2.2. Comparaison des biomasses et concentrations dans <i>B. coddii</i> et <i>C. thracica</i>	113
a) Concentration du Ni et du Co dans <i>B. coddii</i> et <i>C. thracica</i>	113
b) Comparaison des rendements de <i>B. coddii</i> lors de deux récoltes effectuées au cours d'une culture de 14 mois	115
2.3. Sols après culture	116
3. Discussion	117
PARTIE 4 Élaboration de substrats à partir de matériaux secondaires et réponse des hyperaccumulateurs :	
Cas du biochar	123
Chapitre 1 : Comportement des hyperaccumulateurs sur substrats phytotoxiques.....	124
1. Tests de germination.....	124
1.1. Matériels et méthodes	124
a) Matériels.....	124
b) Tests de germination	125

1.2. Résultats des tests de germination	126
a) Germination de <i>L. emarginata</i> sur la boue amendée avec différentes proportions de biochar et de terre de biopile	126
b) Germination d' <i>A. murale</i> et <i>L. emarginata</i> sur des substrats contenant une proportion variable de boue de phosphatation, avec ou sans une dose de 5% de biochar	127
c) Germination en fonction du mode de préparation du substrat	128
1.3. Discussion	129
2. Effet du biochar sur l'hyperaccumulation sur sol ultramafique	130
2.1. Matériels et méthodes	130
2.2. Résultats	131
2.3. Discussion	132
3. Croissance et développement d'hyperaccumulateurs de Ni sur les substrats élaborés à partir d'une boue industrielle amendée en biochar	133
3.1. Matériels et méthodes	133
a) Espèces végétales	133
b) Substrats	133
c) Plan d'expérience	134
3.2. Résultats	134
a) Développement des plantes et biomasse produite	134
b) Transfert du Ni dans les plantes	136
c) Propriétés physiques et chimiques des substrats	137
3.3. Discussion	139
3.4. Conclusion	140
Chapitre 2 : Croissance des plantes et accumulation du Ni en présence de biochar	141
1. Matériels et méthodes	141
1.1. Substrats	141
1.2. Plantes	142
1.3. Essais cultureux	142
2. Résultats	144
2.1. Biomasse produite	144
a) Biomasse aérienne et racinaire	144
b) Croissance et surface racinaires	146
2.2. Transfert du Ni dans la biomasse	146
2.3. Métaux, éléments majeurs et C, N dans les plantes	149
a) Concentration du Zn dans les parties végétales	149
b) Composition carbonée et azotée des parties végétales	150
2.4. Suivi de la solution du sol pendant la culture	151
a) pH et conductivité de la solution du sol	151
b) Éléments métalliques dans les solutions du sol	153
c) Les éléments majeurs dans la solution du sol	157
d) Composés azotés dans la solution du sol	160
e) Anions dans la solution du sol	161
f) Carbone dissous dans la solution du sol	161
g) Pré conclusion sur les analyses des solutions de sol	162
2.5. Caractérisation des substrats après culture	162
a) pH et conductivité des substrats après 120 jours d'expérience	162

b) Éléments disponibles (extraction au DTPA) après 120 jours de culture	163
2.6. Corrélations entre paramètres mesurés.....	165
a) Analyse multivariée des paramètres	165
b) Corrélations entre variables selon l'espèce et le substrat	166
3. Discussion	167
4. Conclusion.....	168
 <i>PARTIE 5 Mise en œuvre et optimisation de l'agromine sur des substrats élaborés avec une boue métallique industrielle</i>	
<i>169</i>	
<i>Chapitre 1 : Modalités d'application de la boue.....</i>	<i>171</i>
1. Objectifs.....	171
2. Matériels et méthodes.....	171
2.1. Matériaux	171
2.2. Espèce végétale	171
2.3. Essai en vases de végétation.....	172
2.4. Essai en rhizotrons.....	173
3. Résultats.....	174
3.1. Essai en vases de végétation.....	174
a) Survie des individus et biomasses.....	174
b) Concentration des métaux dans la biomasse.....	175
c) Propriétés des substrats après culture.....	177
3.2. Essai en rhizotron.....	178
4. Discussion	180
5. Conclusion.....	182
<i>Chapitre 2 : Mise en œuvre de l'agromine à l'échelle du pilote en conditions climatiques réelles.....</i>	
<i>184</i>	
1. Objectifs.....	184
2. Matériels et méthodes.....	184
2.1. Matériaux pour le remplissage des bacs.....	184
2.2. Espèces végétales	185
2.3. Mélanges et remplissage des bacs.....	185
3. Résultats.....	186
3.1. Développement des végétaux	186
3.2. Concentration dans les parties aériennes de <i>B. coddii</i>	186
3.3. Analyses des lixiviats	188
3.4. Flux d'éléments dans les eaux de percolation.....	190
3.5. Relations entre la composition des plantes et celle des eaux	191
3.6. Bilan de matière.....	192
4. Conclusion.....	193

Conclusion générale.....	195
1. Comportement des hyperaccumulateurs en culture sur des boues industrielles métalliques.....	196
2. Potentiel de l'agromine sur des boues industrielles métalliques.....	197
3. Applications de l'agromine sur des boues industrielles métalliques.....	199
4. Conclusions et recommandations	202
Références.....	204
ANNEXES.....	223

Liste des figures

Figure 1 _ Espèces hyperaccumulatrices de Ni a) herbacées de Méditerranée et d'Europe et b) ligneuses des régions tropicales (Asie Pacifique).....	19
Figure 2 _ Réponses conceptuelles des plantes en terme de concentrations de métal dans les feuilles lors d'une augmentation des concentrations dans le sol.....	20
Figure 3 _ Schéma de la disponibilité des éléments traces dans le sol.....	22
Figure 4 _ Diagramme potentiel pH du Ni.....	24
Figure 5 _ a) Voies de synthèses impliquées dans la synthèse des acides aminés et des métabolites azotés en lien avec les métaux lourds dans les plantes.....	27
Figure 6 _ Molécules de a) scopolétine et b) d'esculétine	29
Figure 7 _ Représentation de la filière agromine, depuis la culture de la plante <i>A. murale</i> jusqu'à la fabrication de composés commercialisables à base de Ni	30
Figure 8 _ Synthèse des étapes de sélection des matériaux dans le cadre du projet SITERRE.....	43
Figure 9 _ Schéma conceptuel du projet LORVER, de la construction de sol à la valorisation de la biomasse produite	43
Figure 10 _ Schéma conceptuel des objectifs de la construction de sol.....	44
Figure 11 _ Modèle pour un système économique viable de phytomining.....	46
Figure 12 _ Insertion des travaux de thèse dans la filière agromine : un système de production et de valorisation de la biomasse à faible intrant et faible coût	49
Figure 13 _ Photographie de la boue de phosphatation (Boue A)	54
Figure 14 _ Diffractogramme de a) la boue A (Lot 2) et b) la boue B	56
Figure 15 _ Images au MEB a) la boue A (Lot 2) et b) la boue B.....	57
Figure 16 _ Spectres EDX de a) la boue A (Lot 2) et b) la boue B	57
Figure 17 _ Biomasse aérienne des sept populations d'hyperaccumulateurs de Ni testées après 70 jours de culture sur sol ultramafique	76
Figure 18 _ Taille et nombre de ramifications des individus des populations d' <i>A. murale</i>	76
Figure 19 _ Concentration du Ni dans les parties aériennes des hyperaccumulateurs après 70 jours de culture sur sol ultramafique.....	77
Figure 20 _ Quantité de Ni extraite par population sur sol ultramafique.....	77
Figure 21 _ Concentrations des éléments en traces dans les parties aériennes d' <i>A. murale</i> après 70 jours de culture sur une terre ultramafique	80
Figure 22 _ a) Répartition des individus avec au moins une valeur extrême pour un des éléments suivants : B, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Zn et b) Nombre de valeurs aberrantes par élément	81
Figure 23 _ Relation entre Ni et Co dans les dix individus les plus concentrés en Ni pour chacune des quatre populations d' <i>A. murale</i>	82
Figure 24 _ Relation entre Ni et Co pour les dix individus offrant les concentrations les plus élevées en Co des quatre populations d' <i>A. murale</i>	83
Figure 25 _ Relation entre Ni et Co dans <i>L. emarginata</i>	83
Figure 26 _ Relations du Co avec le Ni et le Zn dans les parties aériennes des dix <i>L. emarginata</i> les plus concentrés en Co (graines calibrées)	84
Figure 27 _ Matrice des corrélations deux à deux des éléments dosés dans les parties aériennes de <i>B. tymphaea</i> et <i>L. emarginata</i> (les deux espèces confondues) après 70 jours de culture sur la terre ultramafique.....	87

Figure 28 _ a) Biomasse et b) Concentration du Ni des parties aériennes des quatre espèces hyperaccumulatrices selon le mode de culture.....	89
Figure 29 _ Facteur de a) translocation du Ni et de b) bioconcentration du Ni.....	89
Figure 30 _ Quantité de Ni extrait par individu selon l'espèce et le type de couvert (mono-spécifique ou en co-culture).....	90
Figure 31 _ Photographie de <i>L. emarginata</i> , a) Trois semaines après la coupe de trois individus sur quatre et b) Huit semaines après la coupe.....	95
Figure 32 _ Photographies d'une feuille et d'une demie feuille de <i>L. emarginata</i> après multiplication végétative.....	96
Figure 33 _ Photographies des boutures dans de la terre ultramafique.....	96
Figure 34 _ Photographies des boutures âgées de 15 semaines.....	97
Figure 35 _ Photographies de racines aériennes de a) <i>A. murale</i> et b) <i>N. tymphaea</i>	97
Figure 36 _ Répartition des échantillons de feuilles et de tiges par individu.....	101
Figure 37 _ Photographies des échantillons collectés lors de la récolte des pièces florales.....	101
Figure 38 _ Photographies des racines de a) <i>B. coddii</i> ; b) <i>C. thracica</i> et c) détails des racines de <i>B. coddii</i>	102
Figure 39 _ Photographies de feuilles chlorosées de <i>B. coddii</i> selon la modalité.....	103
Figure 40_ Biomasse de <i>B. coddii</i> selon l'organe végétal et les concentrations du Ni et du Co dans le substrat.....	104
Figure 41 _ Concentration du Ni dans les différents organes aériens de <i>B. coddii</i>	105
Figure 42 _ Concentration du Co dans les différents organes aériens de <i>B. coddii</i>	106
Figure 43 _ Rapport Ni/Co des concentrations massiques dans les organes aériens de <i>B. coddii</i>	106
Figure 44 _ Concentration du Co dans les feuilles basales (B) et apicales (H) de <i>B. coddii</i> selon le substrat.....	107
Figure 45 _ Rapport des concentrations massiques de Ni/Co dans les feuilles basales (B) et apicales (H) de <i>B. coddii</i> selon le substrat.....	107
Figure 46 _ Concentration du Ni dans les boutons floraux selon leur maturité et les concentrations du Ni et du Co dans le substrat.....	108
Figure 47 _ Concentration du Ni dans les pièces florales.....	109
Figure 48 _ Concentration du Co dans les pièces florales.....	110
Figure 49 _ Rapport des concentrations massiques de Ni/Co dans les différentes pièces florales de <i>B. coddii</i> selon la maturité du bouton sur FOR (100 mg kg ⁻¹ de Ni et de Co).....	110
Figure 50 _ Analyse en composantes principales de la composition des feuilles selon leur localisation sur la tige pour les quatre modalités confondues dans le plan 1-2.....	111
Figure 51 _ Analyse en composantes principales de la composition de la tige selon son éloignement de la graine pour les quatre modalités confondues dans le plan 1-3.....	111
Figure 52 _ Analyse en composantes principales sur les concentrations totales des <i>B.coddii</i> selon la modalité dans le plan 1-4.....	112
Figure 53 _ Concentration du Ni en fonction du Co dans les feuilles de <i>B. coddii</i>	113
Figure 54 _ Concentrations du Ni et du Co dans les parties aériennes de a) <i>B. coddii</i> et b) <i>C. thracica</i> selon les concentrations du Ni et Co dans le substrat.....	114
Figure 55 _ Concentration du Ni et du Co dans les parties racinaires de <i>B. coddii</i> selon les concentrations de Ni et Co dans le substrat et selon la taille de la racine.....	114
Figure 56 _ Concentration du Ni et du Co dans les parties racinaires de <i>C. thracica</i> selon les concentrations de Ni et Co dans le substrat et selon la taille des racines.....	115
Figure 57 _ Ni et Co extractible au DTPA après culture de <i>B. coddii</i>	117

Figure 58 _ Taux de germination de <i>L. emarginata</i> en fonction de la fraction massique de boue dans le substrat après 13 jours d'incubation	127
Figure 59 _ Taux de germination d' <i>A. murale</i> et <i>L. emarginata</i> neuf jours après le semis selon le substrat	127
Figure 60 _ Photographies des radicules et poils absorbants sur les graines.....	128
Figure 61 _ Gain de taux de germination de <i>Z. mays</i> avec le mélange préparé en suspension en comparaison avec le mélange préparé à sec.....	129
Figure 62 _ Biomasse de <i>L. emarginata</i> a) par vase de végétation et b) par individu selon l'amendement en biochar (m)	131
Figure 63 _ a) Concentration en Ni dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> et b) quantité de Ni extraite par vase de végétation, selon l'amendement en biochar (m)	131
Figure 64 _ a) pH et b) conductivité de la terre ultramafique avant et après culture	132
Figure 65 _ Concentration en Ni _{DTPA} de la terre ultramafique avant et après culture	132
Figure 66 _ Vases de végétation végétalisés après 90 jours de culture selon l'amendement en biochar.....	135
Figure 67 _ Biomasse aérienne moyenne par individu	135
Figure 68 _ Concentration du Ni dans les parties aériennes et racinaires d' <i>A. murale</i> et <i>L. emarginata</i>	137
Figure 69 _ Quantité de Ni extrait dans les parties aériennes de <i>A. murale</i> (en rouge, A) et <i>L. emarginata</i> (en bleu, L) par vase de végétation selon une dose croissante de boue dans le substrat et en absence de biochar (SBc) ou avec 5% de biochar (Bc).	137
Figure 70 _ pH et conductivité des substrats non plantés à t0 et après incubation de 90 jours. 138	
Figure 71 _ Concentration du Ni disponible dans les substrats selon une dose croissante de boue, avec et sans amendement en biochar	139
Figure 72 _ Photographie du ray-grass après a) 4 semaines de croissance sur U amendé en biochar (%) et b) 6 semaines sur M et U avec 3% de biochar.....	144
Figure 73 _ Photographie d' <i>A. murale</i> âgée de 2,5 semaines sur U amendé en biochar	144
Figure 74 _ Photographie d' <i>A. murale</i> âgée de 7 semaines sur U amendé en biochar.....	145
Figure 75 _ Biomasses aériennes et racinaires d' <i>A. murale</i> après 12 semaines de culture sur U et M selon une dose croissance de biochar (0, 1, 3 et 5%)	145
Figure 76 _ Biomasses aériennes (coupe 1 + coupe 2) et racinaires du ray-grass	146
Figure 77 _ Concentration en Ni dans les parties aériennes et racinaires d' <i>A. murale</i> sur le substrat élaboré avec une dose croissante de biochar	147
Figure 78 _ Concentration du Ni dans le ray-grass sur le sol U et le substrat M dans la première coupe et la seconde coupe et dans les parties racinaires	148
Figure 79 _ Quantité de Ni extrait par <i>A. murale</i> et par le ray-grass.....	149
Figure 80 _ Rapport des concentrations Ni/Zn des parties aériennes d' <i>A. murale</i> et du ray-grass sur U et M.....	150
Figure 81 _ Rapport des concentrations Ni/Zn des parties racinaires d' <i>A. murale</i> et du ray-grass sur U et M.....	150
Figure 82 _ pH de la solution du sol.....	152
Figure 83 _ Concentration du Ni dans la solution du sol	155
Figure 84 _ Concentration du Zn dans la solution du sol.....	156
Figure 85 _ Concentration du Ca dans la solution du sol.....	158
Figure 86 _ Concentration des nitrates dans la solution du substrat M selon quatre doses de biochar (0, 1, 3 et 5%) et trois couverts (Aly : <i>A. murale</i> , RG : ray-grass, SN : sol nu) lors de trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun (S1, S2 et S3)	160

Figure 87 _ Conductivité des substrats après 120 jours d'expérimentation sur le substrat M et le sol U	163
Figure 88 _ Concentration en Ni et Zn extractible au DTPA dans le substrat M	164
Figure 89 _ Concentration en Ni et Zn extractible au DTPA dans le sol U après 120 jours d'expérimentation sur le sol U selon trois couverts (Aly : <i>A. murale</i> , RG : ray-grass, SN : sol nu) et quatre doses de biochar (0, 1, 3 et 5%)	164
Figure 90 _ Analyse en composantes principales des paramètres mesurés sur les sols et les plantes à l'issue de l'expérience.	165
Figure 91 _ Dispositif en vases de végétation.....	172
Figure 92 _ Dispositif en « rhizotron »	174
Figure 93 _ Biomasse de <i>L. emarginata</i> par vase de végétation	175
Figure 94 _ Biomasse racinaire de <i>L. emarginata</i> en fonction de la profondeur	175
Figure 95 _ Concentration du Ni et du Zn dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> après 3 mois de culture en conditions contrôlées sur les substrats élaborés.....	176
Figure 96 _ Rapport Ni/Zn des concentrations dans les racines de <i>L. emarginata</i>	176
Figure 97 _ Rapport Ni/Zn des concentrations massiques phytodisponibles	177
Figure 98 _ pH des substrats après culture selon la profondeur dans le vase de végétation.....	178
Figure 99 _ Conductivité des substrats après culture selon les substrats et la profondeur	178
Figure 100 _ a) Biomasse racinaire par individu ; b) concentration du Ni dans les parties racinaires pour la modalité avec 6% de boue pure et la modalité avec 6% de boue chaulée, selon la profondeur.....	179
Figure 101 _ Concentration du Ni et du Zn extractible au DTPA pour la modalité avec 6% de boue pure (BP) et la modalité avec 6% de boue chaulée (BCh), selon la profondeur	180
Figure 102 _ Photographies des étapes de remplissage des bacs lysimétriques.....	185
Figure 103 _ Survie de <i>L. emarginata</i> et <i>B. coddii</i> sur les substrats élaborés.....	186
Figure 104 _ Concentration en Zn et Ni dans les parties aériennes de <i>B. coddii</i> après trois mois de culture sur les substrats élaborés	187
Figure 105 _ Composition des parties aériennes de <i>B. coddii</i> selon le substrat de culture.....	187
Figure 106 _ pH des lixiviats des trois substrats au cours des trois premiers mois	188
Figure 107 _ Évolution de la conductivité électrique des lixiviats des trois substrats au cours des trois premiers mois.....	188
Figure 108 _ Concentration du Ni dans les lixiviats sur les trois substrats au cours des trois premiers mois.....	189
Figure 109 _ Concentration du Zn dans les lixiviats sur les trois substrats au cours des trois premiers mois.....	189
Figure 110 _ Analyse en composantes principales des paramètres mesurés dans les lixiviats sur les trois substrats dans le plan 2-3	190
Figure 111 _ Masse cumulée d'éléments dans les lixiviats à l'issue des trois premiers mois de culture sur les trois substrats	190
Figure 112 _ Masse cumulée du Ni, Zn, Mn et P dans les lixiviats à l'issue des trois premiers mois de culture sur les trois substrats	191
Figure 113 _ Analyse en composantes principales à partir des quantités d'éléments cumulées dans les lixiviats.....	191
Figure 114 _ Ni et Zn a) extraits par <i>B. coddii</i> et b) cumulés dans les lixiviats après trois mois de culture.....	192
Figure 115 _ Démarche de l'élaboration d'un substrat pour l'agromine	200

Liste des tableaux

Tableau 1 _ Concentrations élémentaires dans les plantes et seuils d'hyperaccumulation	17
Tableau 2 _ Concentrations maximales mesurées dans les hyperaccumulateurs de Ni et Co	18
Tableau 3 _ Travaux présentant une meilleure capacité de phytoextraction du Ni par la plante lors d'une augmentation du pH.....	25
Tableau 4 _ Principaux sites de localisation du Ni dans les feuilles des hyperaccumulateurs	28
Tableau 5 _ Matériaux délaissés en lorraine.....	45
Tableau 6 _ Description des sites de récoltes des graines d'hyperaccumulateurs de Ni.....	53
Tableau 7 _ Caractéristiques physico-chimiques des boues métalliques	55
Tableau 8 _ Propriétés des différents lots de terre	59
Tableau 9 _ Caractérisation des trois biochars	62
Tableau 10 _ Propriétés des composts et du marc de café	63
Tableau 11 _ Liste des espèces utilisées, de leur abréviation et taux de germination et nombre de graines semées par alvéole	75
Tableau 12 _ Concentration dans les parties aériennes.....	79
Tableau 13 _ Concentration des coumarines dans les parties aériennes de <i>B. tymphaea</i> et <i>L. emarginata</i>	86
Tableau 14 _ Biomasse individuelle et composition des parties aériennes (PA) et racinaires (PR) selon l'espèce et le couvert	92
Tableau 15 _ Caractérisation des substrats après culture	93
Tableau 16 _ Survie des individus après la première coupe selon la population.....	95
Tableau 17 _ Schéma temporel de la culture de <i>B. coddii</i> et <i>C. thracica</i>	102
Tableau 18 _ Paramètres mesurés sur <i>B. coddii</i> selon la modalité	104
Tableau 19 _ Concentration du Ni et du Co dans <i>B. coddii</i>	105
Tableau 20 _ Comparaison des rendements entre la première et la seconde coupe de <i>B. coddii</i>	116
Tableau 21 _ Rendement potentiel de biomasse et de métaux extrait par <i>B. coddii</i> pendant un an sur les quatre modalités, à l'issue de deux récoltes.....	116
Tableau 22 _ Composition des substrats utilisés pour le premier test de germination	125
Tableau 23 _ Composition des substrats du deuxième test de germination	126
Tableau 24 _ Composition et codage des substrats du troisième test de germination	126
Tableau 25 _ Composition des six différents substrats	134
Tableau 26 _ Caractérisation des substrats.....	142
Tableau 27 _ Âge des plantes au moment des prélèvements de solution de sol.....	143
Tableau 28 _ Éléments corrélés avec la biomasse des PA ou la concentration en Ni des PA, selon l'espèce et le substrat	166
Tableau 29 _ Répartition des échantillons collectés à la récolte	173

Liste des abréviations

Anova	Analyse de la variance
C _{org}	Carbone organique
CEC	Capacité d'échange cationique
DRX	Diffraction des rayons X
DTPA	Acide diéthylène tri-amine penta-acétique
HA	Hyperaccumulateur(s)
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma –Optical Emission Spectrometry
LAS	Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras
LSE	Laboratoire Sols et Environnement
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
MEB	Microscopie électronique à balayage
MO	Matière organique
MS	Matière sèche
OAD	Outil d'aide à la décision
PA	Partie(s) aérienne(s)
PR	Partie(s) racinaire(s)
STEP	Station d'épuration
XRF	Spectromètre de fluorescence X (portable)

Abréviations fréquemment utilisées dans le codage des échantillons

Partie 3 _ Chapitre 1

LEPT	<i>Leptoplax emarginata</i>
NOC	<i>Noccaea tymphaea</i>
ALY	<i>Alyssum murale</i>
BORN	<i>Bornmuellera tymphaea</i>

Partie 3 _ Chapitre 2

FOR	Concentrations élevées (100mg kg ⁻¹)
NIC	Concentration élevée en Ni (100 mg kg ⁻¹)
COB	Concentration élevée en Co (100 mg kg ⁻¹)
FAI	Concentrations faibles (10 mg kg ⁻¹)

Partie 4 _ Chapitre 1 et 2

U	Sol ultramafique
M	Substrat élaboré (mélange de matériaux)
RG	Ray-grass
Aly	<i>Alyssum murale</i>
SN	Sol nu

Partie 5 _ Chapitre 1 et 2

MBP	Mélange avec boue pure
MBCh	Mélange avec boue chaulée
CBP	Couche de boue pure

Introduction générale

Dans un contexte de raréfaction des ressources primaires, l'agromine pourrait représenter une voie de récupération des métaux contenus dans une gamme large de matériaux ou substrats délaissés. L'agromine consiste à cultiver, sur des substrats trop faiblement concentrés pour l'exploitation minière conventionnelle, des plantes (*e.g.* hyperaccumulateurs) qui peuvent concentrer dans leurs parties récoltables des métaux en vue de leur récupération par des procédés pyro/hydrométallurgiques (Van der Ent *et al.* 2015a). L'agromine est donc une filière de production de métaux qui repose sur l'assemblage de procédés agricoles et de procédés hydrométallurgiques (Morel 2013). Si la filière valorise d'abord des sols peu fertiles comme les sols ultramafiques (Bani *et al.* 2015a), elle pourrait aussi s'appliquer à des matériaux secondaires dans une logique d'économie circulaire. Sur 355 millions de tonnes de déchets produits en France (2010), seuls 45 millions de tonnes sont recyclés, soit 12,7% (« Ressources secondaires | Minéralinfo »). Cela concerne 12,5 t de métaux ferreux et 1,3 t de métaux non ferreux recyclés, qui représentent ainsi un gisement conséquent de matériaux disponibles pour le recyclage. De plus, certains procédés industriels et miniers sont à l'origine de nombreux sous-produits métalliques non valorisés qui pourraient aussi constituer une ressource secondaire de métaux. De surcroît, il est nécessaire aussi de mettre en place des voies de valorisation des ressources secondaires qui s'appuient sur des procédés en accord avec les critères du développement durable et qui contribuent à maintenir voire amplifier la capacité des écosystèmes à rendre une large gamme de services. Cette « mine verte » permettrait alors la récupération des métaux à partir d'une très large gamme de ressources, allant des sites ultramafiques jusqu'à des substrats issus des activités industrielles.

Si un fond géochimique élevé en éléments traces peut induire un stress chez les végétaux, il a aussi, au cours de l'évolution, conduit à l'apparition de certaines espèces adaptées aux milieux métallifères (Baker 1981). Parmi ces espèces tolérantes, il existe un ensemble de plantes, dites hyperaccumulatrices qui peuvent extraire du sol et stocker de grandes quantités de métaux dans leurs tissus aériens (Brooks *et al.* 1977). Ces plantes sont la base de l'agromine, filière désormais démontrée pour le Ni extrait de sols ultramafiques et transformé ensuite par hydrométallurgie en produits d'intérêt industriel (Li *et al.* 2003b; Barbaroux *et al.* 2011). Cependant, le comportement des plantes hyperaccumulatrices de Ni en dehors des conditions de leur milieu naturel n'est pas établi. Les déchets qui contiennent des métaux présentent des propriétés qui peuvent être très défavorables à l'installation, la croissance et les performances des plantes hyperaccumulatrices. Toutefois, la toxicité directe des métaux sur les plantes, le déséquilibre en éléments nutritifs et en métaux peut être aussi largement préjudiciable à la phytoextraction.

La possibilité de récupérer les métaux par la culture de plantes hyperaccumulatrices est l'enjeu de cette thèse qui se propose de relever plusieurs défis. Il s'agit notamment d'étudier le comportement d'hyperaccumulateurs mis en germination et croissance sur des substrats d'origine industrielle, dont le potentiel en tant que ressources secondaires est important. Puis, en vue du développement de l'agromine sur des déchets industriels métalliques, il est nécessaire de créer les conditions de substrat qui permettent les meilleures performances d'extraction des métaux d'intérêt par des hyperaccumulateurs, notamment par l'ajout d'amendements appropriés, afin de lever la toxicité.

Dans cette optique, la thèse a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à quatre questions : i) les plantes hyperaccumulatrices peuvent-elles récupérer les métaux contenus dans des sous-produits métalliques industriels ? ii) Quels sous-produits choisir et dans quelle proportion pour élaborer un substrat pour la culture d'hyperaccumulateurs ? iii) Comment est modifiée l'hyperaccumulation du Ni en présence d'amendements de type biochar et quels en sont les mécanismes ? iv) Quelle(s) stratégie(s) faut-il mettre en place pour limiter la compétition d'autres éléments métalliques avec le Ni ?

La thèse a été menée en trois étapes. La première a consisté à sélectionner parmi plusieurs populations d'hyperaccumulateurs celles qui présentent le meilleur potentiel à extraire le Ni et à produire de la biomasse. La deuxième étape était consacrée à l'étude du comportement d'hyperaccumulateurs sur des matériaux secondaires d'origine industrielle contenant du Ni. Dans un troisième temps, il s'agissait de formuler un substrat à partir d'un matériau industriel particulièrement défavorable aux végétaux en s'appuyant sur l'apport d'amendements et l'arrangement des matériaux. Les travaux ont été conduits en conditions contrôlées et en pilote de terrain pour confirmer les résultats de croissance des plantes et d'hyperaccumulation du Ni. Ainsi, l'objectif global de cette nouvelle démarche, basée sur le concept de l'agromine, est de valoriser des matériaux délaissés. La thèse est l'un des volets du projet LORVER (2012-2018) qui a pour objectif de produire de la biomasse à usage non alimentaire sur des territoires délaissés à partir de sols construits avec des matériaux secondaires¹.

Après une première partie consacrée à l'état de l'art, sont présentées les méthodes communes utilisées dans les différentes expériences. Ensuite, dans une première partie de résultats, le potentiel de différentes populations d'hyperaccumulateurs de Ni appartenant aux Brassicacées et Astéracées est étudié pour évaluer leur variation individuelle tant au niveau de leur biomasse, que de la concentration en Ni et leur composition générale. L'hyperaccumulation du Co par les hyperaccumulateurs de Ni ainsi que la production de molécules d'intérêt par les hyperaccumulateurs, telles que les coumarines, sont également étudiées. Enfin, en vue d'assurer la propagation des plantes sélectionnées, des essais de multiplication végétative des hyperaccumulateurs ainsi que la possibilité d'effectuer plusieurs récoltes sur les individus des deux familles sont menés. La deuxième partie des résultats rapporte l'élaboration d'un substrat à partir d'une boue métallique de phosphatation en vue de l'installation d'hyperaccumulateurs et la récupération du Ni contenu dans la boue. Divers matériaux sont testés au cours d'expériences de germination et de croissance dans différentes proportions. À l'issue de ces essais, le substrat le plus performant est conservé et il est amélioré par l'apport de biochar dans différentes proportions en fonction de son aptitude à réduire la mobilité des métaux, stimuler la production de biomasse et l'extraction du Ni. Deux espèces ont été testées, *A. murale* et une espèce témoin, le ray-grass. Enfin, dans la dernière partie des résultats, il s'agissait de modifier les propriétés du substrat, notamment la phytotoxicité i) par l'ajout de Ca(OH)_2 afin de diminuer la toxicité métallique et ii) par l'arrangement des matériaux verticalement afin de disposer la boue métallique en surface du substrat, éloignée des racines, pour limiter sa toxicité et les pertes de métaux dans les lixiviats. Des essais sont menés avec *L. emarginata* en vases de végétation puis les expériences sont transposées à l'échelle du pilote afin de confirmer et compléter les résultats par le suivi des lixiviats.

¹ Dans ce cadre, selon l'espèce, la biomasse produite peut intégrer les filières du textile, de la construction, de la pyrolyse ou de l'hydrométallurgie. Le projet LORVER est soutenu par la Région Grand Est et le Feder (UE).

PARTIE 1

Agromine du nickel, des sols naturels aux milieux extrêmes

L'objectif de cette partie est de présenter brièvement l'état de l'art, pour donner les fondements des différentes parties de la thèse. En premier lieu, elle décrit les sols ultramafiques, riches en Ni, sur lesquels se sont développées des plantes capables d'hyperaccumuler ce métal. Ces plantes seront présentées, de même que les mécanismes qui gouvernent la phytoextraction. Intégrant le prélèvement par les racines avec les phénomènes agissant dans la rhizosphère, puis le transport et enfin le stockage des métaux dans la plante.

Le concept d'agromine sera ensuite détaillé, ainsi que les stratégies qui permettent de cultiver ces plantes à grandes échelles, en vue de produire des composés commercialisables à base de nickel (métal, sels, oxyde). Les différents leviers pour optimiser l'agromine en terme d'itinéraires agronomiques seront présentés.

Enfin, dans la philosophie du projet LORVER qui vise à valoriser les ressources délaissées, sera présentée la construction de sols pour à partir de ces délaissés, élaborer un substrat pour produire de la biomasse. Avec l'objectif d'appliquer la phytoextraction à la récupération de nickel présents dans des déchets industriels ou urbains.

Autrement dit, comment construire une filière d'agromine sur ces milieux extrêmes ?

1. L'extraction du Ni du sol par les plantes

1.1. Le Ni dans les sols

Dans de nombreuses régions du monde, existent différents sols métallifères: les **sols ultramafiques** (Fe, Mg, Ni, Cr, Co), les sols sélénifères (Se), les sols calaminaires (Zn, Cd et Pb) et des sols riches en Co et Cu (Afrique). Les sols ultramafiques contiennent des concentrations de plusieurs centaines à plusieurs milliers de mg kg^{-1} de Ni total et de quelques dizaines à quelques centaines de mg kg^{-1} de Co dans l'horizon supérieur (Proctor et Woodell 1975). Les sols ultramafiques sont aussi caractérisés par des concentrations élevées en fer (Fe), magnésium (Mg) et chrome (Cr) ; une déficience en calcium (Ca) ; une faible capacité de rétention d'eau et de faibles teneurs en nutriments azote (N), phosphore (P) et potassium (K) (Proctor *et al.* 1981).

Les roches ultramafiques ont de hautes concentrations en Mg et Fe. Au sens strict, la serpentine est un minéral de formule $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. Péridotites et serpentines sont les principales roches ultramafiques et sont issues du manteau supérieur (Coleman et Jove 1992). Les roches de serpentine ont une composition proche de celle du manteau (Mg, Fe, Si et O) et non pas de la croûte (Al, Ca, Na, K et P). L'affleurement de ces roches est dû à la subduction des plaques océaniques, suivie de l'orogénèse ou élévation des montagnes. Les roches volcaniques ultramafiques sont rares (Alexander *et al.* 2006). Les sols de serpentine sont formés par l'altération des roches ultramafiques. En fonction du degré d'altération des péridotites, la serpentinitisation, l'altération de la roche conduit à deux types de sol : i) les sols latéritiques nickélifères si les péridotites sont faiblement serpentinisées ou ii) les sols de serpentine si le degré de serpentinitisation est élevé (serpentinite) (Coleman et Jove 1992).

Par comparaison avec les sols ultramafiques, en France², la teneur moyenne en Ni dans les sols est de $30,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ($n=1110$ horizons de surface, valeurs min/max : 60 à 2076 mg kg^{-1}) (Programme ASPITET, Baize 2000).

L'exploitation minière entraîne de fortes perturbations des sols et l'accumulation en surface de concentrations métalliques élevées (*e.g.* Brésil (Raous *et al.* 2010)). Les activités industrielles peuvent aussi provoquer une contamination métallique des sols, en raison de retombées atmosphériques, de l'accumulation et du stockage en extérieur de résidus contaminés en métaux à proximité des activités (Huot *et al.* 2013). Par ailleurs, les intrants agricoles peuvent entraîner une accumulation de métaux dans les sols, issus de la roche employée dans la fabrication de l'engrais (Taylor 1997) ou de l'épandage de boues de stations d'épuration (Morel *et al.* 1984).

1.2. Réponse des plantes à la présence de Ni

a) Le Ni, un oligo-élément

Le Ni est un oligo-élément nécessaire au métabolisme de la plante en petite quantité : $0,01$ à 5 mg kg^{-1} (Brown *et al.* 1987). L'hydrolyse de l'urée en NH_3 par action de l'uréase, nécessite la présence de Ni et permet de fournir de l'azote (N) à la plante (Welch 1981). En l'absence de Ni,

² Dans la législation française, le seuil de Ni dans les sols est défini par la norme AFNOR U 44-041 (1985), qui régit les concentrations des ETM des boues et des sols agricoles dans le cadre de l'épandage des boues de station d'épuration, et détermine les teneurs maximales à respecter dans les horizons de surface. Les seuils sont de 2, 150, 100, 1, 50, 100, 10, 300 mg kg^{-1} pour le Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se et Zn respectivement. Le seuil pour le Co est défini à 30 mg kg^{-1} (Godin 1983).

l'activité de l'uréase diminue et l'urée s'accumule à des teneurs toxiques (Eskew *et al.* 1983). Par ailleurs, le Ni peut augmenter la masse des nodules et la production de graines de soja en absence d'azote (Bertrand et DeWolff 1973). Il pourrait être nécessaire à la translocation de quantité élevée de N des racines vers les parties aériennes par les composés uréides chez les légumineuses. Le Ni permet d'augmenter le taux de germination de certaines graines (Mishra et Kar 1974). Les mécanismes d'action ne sont pas très bien connus mais le Ni aurait un rôle de fongicide qui pourrait expliquer l'augmentation du taux de germination. Par ailleurs, il permet d'augmenter la croissance de certaines plantes lorsque de faibles concentrations de sels de Ni sont apportées, se substituant à d'autres métaux dans l'activation d'enzymes. Le Ni dans les plantes est peu absorbé et transféré dans la plante. Cependant, plus de 70% du Ni des parties aériennes sont remobilisés dans les graines, principalement dans les cotylédons (Cataldo *et al.* 1978b).

b) Les hyperaccumulateurs de Ni

À des doses plus élevées, le Ni est toxique pour les plantes, comme la plupart des métaux. Toutefois, certaines espèces ont développé des aptitudes à accumuler les métaux dans leurs parties aériennes à des concentrations 10 à 1 000 fois supérieures aux autres plantes et ont révélé une exceptionnellement haute tolérance aux métaux lourds : elles sont appelées « hyperaccumulateurs » (Brooks *et al.* 1977). Les seuils d'hyperaccumulation varient selon l'élément considéré, et ont été réévalués récemment pour certains éléments comme le Zn et le Co. Il est communément admis aujourd'hui que le seuil est de 100 mg kg⁻¹ pour le Cd, 300 mg kg⁻¹ pour le Co, 1 000 mg kg⁻¹ pour Ni et Pb, 3 000 mg kg⁻¹ pour Zn et 10 000 mg kg⁻¹ pour Mn (Tableau 1). Dans le cas du Ni, certaines espèces, capables d'extraire au moins 1% de Ni dans leur parties aériennes, soit 10 fois plus que le seuil, sont dites hypernickelophores (Jaffré 1980). Ces seuils sont établis à partir de la concentration mesurée dans les parties aériennes sèches d'au moins un individu dans son habitat naturel (Reeves 1992).

Tableau 1 _ Concentrations élémentaires dans les plantes et seuils d'hyperaccumulation

Éléments	Concentration normale (mg kg ⁻¹)	Seuil d'hyperaccumulation (mg kg ⁻¹)	Références
Ni	1,5	1 000	Brooks <i>et al.</i> (1977)
Zn	50	3 000	Broadley <i>et al.</i> (2007); Krämer (2010)
Cd	0,05	100	Baker <i>et al.</i> 1994
Cu	10	300	Krämer (2010); Van der Ent <i>et al.</i> (2012)
Co	0,2	300	Krämer (2010); Van der Ent <i>et al.</i> (2012)
Mn	200	10 000	Baker et Brooks (1989)
Se	0,02	100	Van der Ent <i>et al.</i> (2012)

c) Prospection pour la découverte et l'inventaire des HA

Dans le cas du Ni, les plantes ordinaires ont des concentrations de 0,1 à 10 mg kg⁻¹ (Brooks 1987). Il devient phytotoxique entre 10 et 100 mg kg⁻¹ selon l'espèce (Welch 1981; McIlveen et Negusanti 1994). Minguzzi et Vergnano (1948) ont mesuré plus de 1% de Ni dans les feuilles d'*Alyssum bertolonii* en Italie et ainsi identifié le premier hyperaccumulateur de Ni. En 1961, la même concentration a été rapportée dans les feuilles d'*Alyssum murale* (Doksopulo 1961). Depuis ces premières découvertes, des prélèvements de plantes *in situ* sur des sols métallifères (pourtour Méditerranéen, Nord du Caucase ou Asie du Sud Est) permettent de quantifier le potentiel d'extraction de métaux : Ni, Cd, Zn par des espèces et des populations d'hyperaccumulateurs (HA)

et de leur composition en Ca, Mg, Co, Fe, Mn (Brooks *et al.* 1977; Bani *et al.* 2009, 2013; Alekseeva-Popova *et al.* 2015; Van der Ent *et al.* 2015b).

Par ailleurs, des analyses d'herbiers permettent d'identifier de nouveaux hyperaccumulateurs (Brooks *et al.* 1977; Van der Ent *et al.* 2013, 2016). Les principaux genres auxquels appartiennent les espèces hyperaccumulatrices sont des Brassicacées, comme *Noccaea* (anciennement *Thlaspi*), hyperaccumulateurs de Cd, Zn, Pb et Ni et *Alyssum* (Baker et Brooks 1989) avec des concentrations pouvant atteindre 3% de Ni (MS) (Tableau 2). D'autres familles botaniques telles que les Astéracées sont aussi représentées. Alors qu'en 1989, 145 hyperaccumulateurs de Ni répartis dans 22 familles et 26 hyperaccumulateurs de Co (Baker et Brooks 1989) étaient recensés, aujourd'hui, plus de 500 espèces ont été découvertes, dont 450 hyperaccumulatrices de Ni et 30 de Co (Figure 1). Les autres éléments hyperaccumulés sont As, Cu, Cd, Mn, Pb, Se, Tl, Zn. La concentration de Ni la plus élevée a été mesurée dans le latex de *Sebertia acuminata*, un arbre de 10 m de hauteur de la famille des Sapotacées appartenant à la flore de Nouvelle Calédonie. La concentration de Ni est de 26 % (MS) dans son latex (Jaffré *et al.* 1976).

Tableau 2 _ Concentrations maximales mesurées dans les hyperaccumulateurs de Ni et Co. D'après (Brooks *et al.* 1998; Nkrumah *et al.* 2016)

Métal	Espèces	Origine (distribution native)	Concentration feuille (mg kg ⁻¹)	Concentration biomasse (mg kg ⁻¹)	Rendement (biomasse sec, t ha ⁻¹)	Références
Co	<i>Anisopappus davyi</i> S. Moore	Zaire	2 650			Malaisse <i>et al.</i> (1979)
Co	<i>Haumanniastrum robertii</i>	Zaire	10 200			Brooks (1977)
Ni	<i>Alyssum</i> ssp	Sud et SE de l'Europe, Turquie, Arménie, Iraq, Syrie	15 000 à 20 000	10 000 à 25 000	10	Brooks (1998); Harris <i>et al.</i> (2009); Bani <i>et al.</i> (2010); Zhang <i>et al.</i> (2014)
Ni	<i>Berkheya coddii</i>	Afrique du Sud, Zimbabwe	11 600	17 000	22	Morrey <i>et al.</i> (1989)
Ni	<i>Bornmuellera</i> spp	Grèce, Albanie, Turquie	22 000	10 000 à 30 000		Reeves <i>et al.</i> (1983); Zhang <i>et al.</i> (2014)
Ni	<i>Leptoplax</i> spp	Grèce	34 500	10 000 à 35 000		Reeves <i>et al.</i> (1980); Zhang <i>et al.</i> (2014)
Ni	<i>Psychotria costivenia</i>	Cuba	38 520			Reeves <i>et al.</i> (1999)
Ni	<i>Thlaspi goesingense</i>	Europe	12 400			Reeves et Baker (1984)

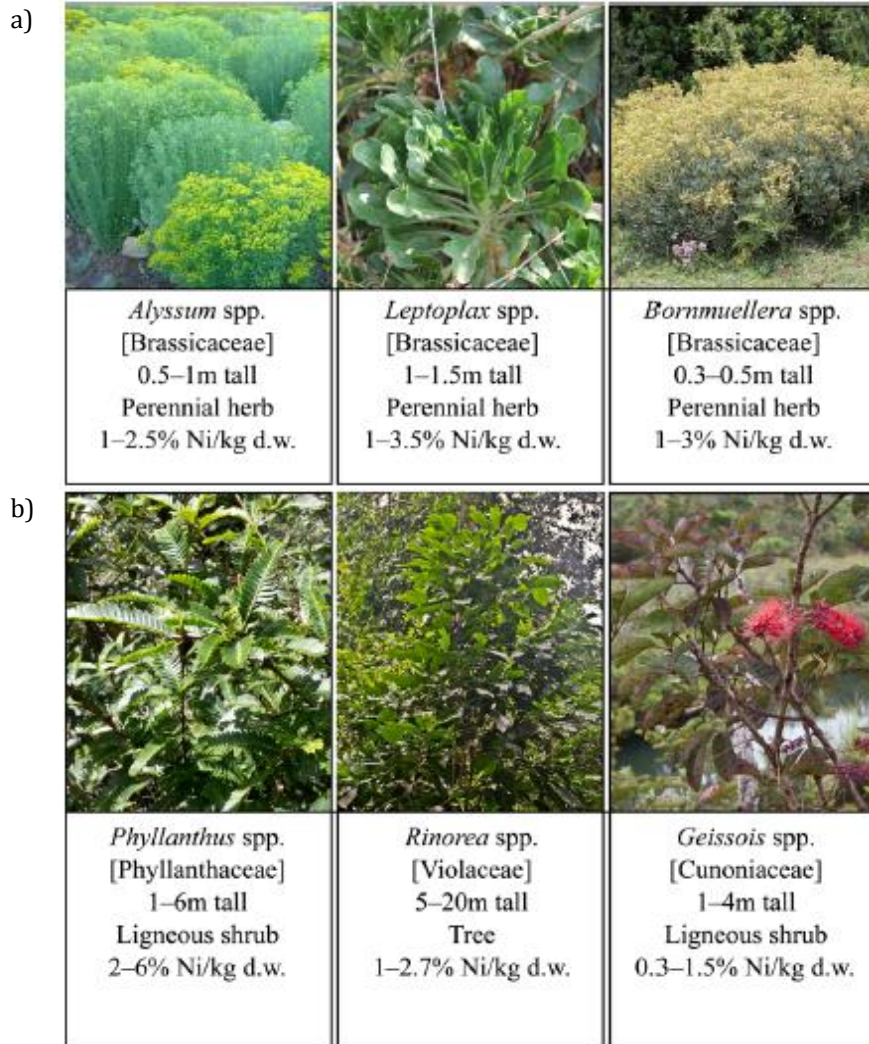


Figure 1 _ Espèces hyperaccumulatrices de Ni a) herbacées de Méditerranée et d'Europe et b) ligneuses des régions tropicales (Asie Pacifique) Van der Ent et al. (2015a)

d) Pourquoi les plantes hyperaccumulent-elles ?

Le phénomène d'hyperaccumulation est apparu plusieurs fois chez les Angiospermes au cours de l'évolution. L'apparition de ce trait conférant une innovation évolutive clé aurait entraîné une expansion et une diversification rapide des espèces du genre *Alyssum* (Krämer 2010; Flynn 2013). Ainsi, l'hyperaccumulation des métaux représente un coût énergétique pour la plante (transport, stockage, détoxification). Ces adaptations doivent donc conférer un avantage à ces espèces pour que ce caractère ait été conservé. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer l'apparition de la faculté de certaines espèces à hyperaccumuler les métaux (Boyd et Martens 1990; Cappa et Pilon-Smits 2014). Ces hypothèses peuvent être classées en deux catégories de types d'adaptation :

- adaptation de la plante à la tolérance au métal : la plante aurait développé la capacité d'hyperaccumulation pour tolérer les métaux par leur transfert vers des compartiments cellulaires d'activité physiologique faibles et dans les organes caduques (Brooks *et al.* 1998) ou bien les transférer pour les éliminer par lessivage ou par les feuilles sénescentes,

- adaptation de la plante à son environnement biotique et abiotique avec trois hypothèses :
 - l'hyperaccumulation comme mécanisme de défense (hypothèse la plus largement soutenue) selon laquelle l'accumulation de Ni peut conférer une défense à la plante contre les herbivores (Jhee *et al.* 2006; Boyd 2007; Boyd et Jaffré 2009; Rascio et Navari-Izzo 2011) ;
 - l'hyperaccumulation pour résister aux milieux secs : l'accumulation de Ni réduirait la transpiration cuticulaire (Boyd et Martens 1998; Brooks *et al.* 1998) et le métal pourrait jouer un rôle dans l'ajustement osmotique (Bhatia *et al.* 2005) ;
 - l'allélopathie élémentaire : les plantes hyperaccumulatrices enrichissent la surface du sol en métaux, *via* les feuilles caduques, et ainsi favorisent leur propre développement au détriment d'autres espèces, non tolérantes aux métaux (Zhang *et al.* 2007; Barillot 2012).

1.3. Adaptations de la flore des sols de serpentine

a) Flore des sols métallifères

Sur les sols métallifères, les plantes présentent trois stratégies en réponse à la présence de métaux i) elles prélèvent le métal non restrictivement et sont donc indicatrices, ii) elles excluent le métal ou iii) elles l'hyperaccumulent (Baker 1981) (Figure 2).

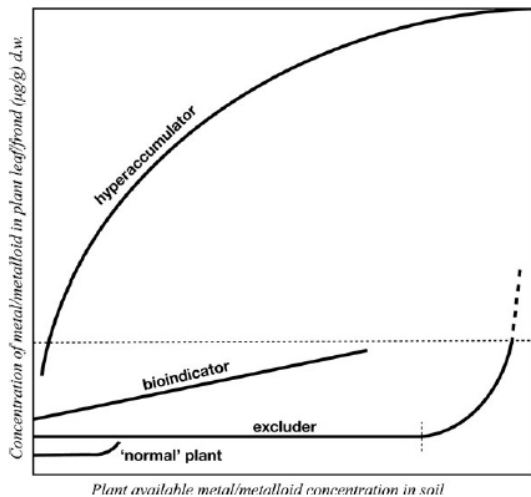


Figure 2 _ Réponses conceptuelles des plantes en terme de concentrations de métal dans les feuilles lors d'une augmentation des concentrations dans le sol. D'après Baker 1981

Les sols ultramafiques présentent une flore endémique à laquelle appartiennent les espèces hyperaccumulatrices qui ont évolué sur ces milieux et se sont adaptées aux hautes teneurs métalliques (Proctor 1999). L'aire d'affleurement totale de ces sols dans le monde est supérieure aux aires concernées par la présence d'autres éléments (Van der Ent *et al.* 2012), ce qui explique en majeure partie la prépondérance d'espèces hyperaccumulatrices de Ni. Les hyperaccumulateurs de Ni se répartissent sur sept zones ultramafiques principales représentant 1% de la surface des sols : la Nouvelle-Calédonie, l'ouest de l'Australie, le Sud de l'Europe et l'Asie mineure, l'Asie du Sud-Est, Cuba, la Nouvelle-Californie et la région du Zimbabwe, Zambie et Zaïre en Afrique (Baker et Brooks 1989).

La flore de serpentine s'est adaptée à cet environnement particulier et supporte les concentrations métalliques toxiques et les carences induites par ce milieu (Proctor *et al.* 1981).

b) Traits de la flore des sols métallifères

Tyndall et Hull (1999) résumant plusieurs traits de la flore des sols de serpentine. Les plantes en présentent au moins un: une grande tolérance à des niveaux élevés de Mg et faibles de Ca, une forte nécessité de Mg pour un maximum de croissance, une faible absorption du Mg, une forte absorption du Ca et une exclusion du Mg des feuilles. Il existe des variations génétiques entre les différentes populations d'une même espèce. Par exemple, certaines populations sont issues de sols ultramafiques et d'autres non (dans deux espèces d'Astéracées du Nord-ouest des États-Unis, *Achillea lanulosa* et *Senecio pauperculus*). Les différentes populations d'une même espèce ne réagissent pas de la même manière : les trois populations de *Senecio* s'adaptent lorsqu'elles sont cultivées sur un sol différent de leur sol d'origine ; pas celles d'*Achillea*, indiquant une nette différence de génotype entre les populations (Cooke 1994). Ces expériences de transplantation réciproque font ressortir cinq traits importants pour survivre sur les sols ultramafiques: i) adaptation à des potentiels d'eau inférieurs aux autres sols, ii) contrôle stomatique des pertes d'eau (maintien des stomates partiellement ou totalement fermés), iii) taux de croissance ralenti et plus faible production de biomasse, iv) modification de la morphologie des feuilles (feuilles plus courtes et étroites), v) tolérance de hautes concentrations de Ni et Mg, et de faibles concentrations de Ca (Cooke 1994).

Aussi, sur ces sols, les plantes ont des concentrations supérieures dans leur racines que dans les parties aériennes (Wiltshire 1972). Par ailleurs, les plantes ont développé des mécanismes de tolérance aux métaux lourds sur les sols de serpentine : elles rendent le métal dans les racines insolubles, le transfèrent rapidement ou concentrent ces métaux dans leur feuille et les isolent (Ernst 1972).

c) Rapport molaire Ca/Mg

La flore de serpentine peut supporter des rapports Ca/Mg très inférieurs à 1. Cependant, les plantes peuvent se développer sur des sols avec un rapport Ca/Mg plus élevé que sur leur habitat naturel sans diminution de la biomasse, alors que les espèces non issues de sol ultramafique voient leur biomasse diminuer avec la diminution du rapport Ca/Mg (Walker *et al.* 1955; Ghasemi et Ghaderian 2009; Pakdaman *et al.* 2013). En culture hydroponique, l'augmentation de la concentration de Mg est tolérée par les plantes adaptées aux sols de serpentine jusqu'à un certain seuil. La biomasse de *Cleome heratensis* et d'*A. murale* n'est pas différente lors d'une augmentation du Mg en solution de 0,5 à 4 mM (avec Ca constant) mais diminue avec une exposition à 10 mM (Asemaneh *et al.* 2007). Cette dernière concentration est élevée par rapport aux sols ultramafiques, dans lesquels les concentrations sont comprises entre 0,4 et 7,4 mM de Mg, et 0,01 et 0,57 mM de Ca, sur une gamme de sept sols dont les eaux ont été extraites à la capacité au champ (Proctor *et al.* 1981). Le Mg pourrait avoir un effet antagoniste sur la prise de Ca par les plantes (Pakdaman *et al.* 2013) mais ces résultats ne rejoignent pas ceux d'une autre étude (Asemaneh *et al.* 2007). Cependant, l'identification de canaux non sélectifs (NSCC) pourrait constituer une voie primaire pour la prise du Ca et du Mg par les plantes. Des mutants d'*Arabidopsis thaliana* sans la fonction CAX1 tolèrent de faibles niveaux de Ca²⁺ et de fortes concentrations de Mg²⁺ comme la flore serpentinophyte (Cheng *et al.* 2003; Shabala et Hariadi 2005). Par ailleurs, l'augmentation du Ca²⁺ et Mg²⁺ dans la solution de culture diminue la prise de Ni par les racines de *A. bertolonii* (Gabbrielli et Pandolfini 1984). Cette même étude a montré que la biomasse racinaire la plus élevée était obtenue avec un rapport molaire Ca/Mg de 0,067. Le rapport n'est pas suffisant pour déterminer l'optimum pour le développement des plantes. Cela dépend aussi de la concentration du Ca et du Mg.

2. Prélèvement du métal par la plante, transport et stockage

L'optimisation de la phytoextraction implique la compréhension des mécanismes. Pour être prélevé par la plante, le métal doit être présent dans le sol et phytodisponible. Les concepts de mobilité, bio et phytodisponibilité sont définis dans la première partie. À partir de là, les influences de certains paramètres abiotiques ou biotiques sur le prélèvement du métal par la plante seront décrites. On s'intéressera ensuite à la translocation du métal vers les parties aériennes, aux formes chimiques du métal transporté et à sa localisation dans les tissus. Enfin, les plantes hyperaccumulatrices produisent des métabolites secondaires, pouvant jouer un rôle sur la spéciation du métal et susceptibles d'avoir un intérêt appliqué.

2.1. La phytodisponibilité

Les plantes n'ont pas accès à la totalité du métal présent dans un sol. La connaissance de la concentration totale d'un métal ne permet pas de prévoir la concentration disponible pour la plante. Même si une relation positive est observée entre les concentrations pseudo totales de Ni et Co dans le sol et celles dans la plante (Galardi *et al.* 2007b), la toxicité ou l'hyperaccumulation ne peuvent être déduites directement de la concentration totale. Les notions de mobilité et de biodisponibilité sont fondamentales.

La **mobilité** d'un métal peut se définir comme sa capacité à être transféré de la phase solide du sol à la solution. Il pourra alors être transporté par l'eau et, dans certains cas, passer dans les organismes vivants. La mobilité du Ni et des ETM en général dépend de la spéciation, gouvernée par les interactions bio-physico-chimiques en phases hétérogènes (*e.g.* précipitation/dissolution, sorption/désorption) et en phase aqueuse (dissociation, complexation, oxydo-réduction). La **biodisponibilité** d'un élément correspond à sa disponibilité pour les organismes vivants, c'est-à-dire qu'il peut être transféré dans cet organisme (Bourrelier et Berthelin 1998). La **phytodisponibilité** d'un élément, c'est-à-dire sa capacité à être transféré du sol vers la plante correspond aux métaux en solution et à la fraction des métaux légèrement adsorbés et désorbables pendant la croissance des plantes (Figure 3).

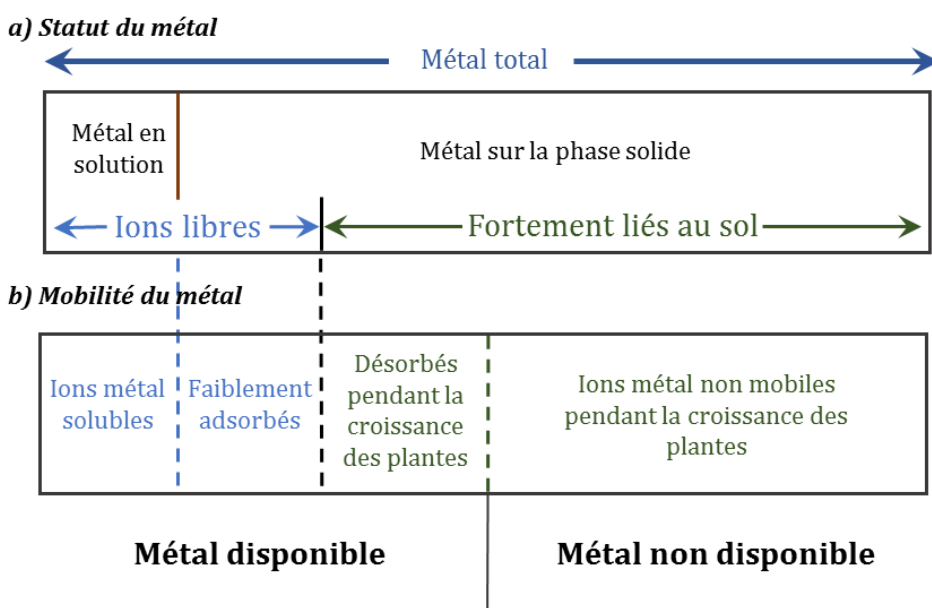


Figure 3 _ Schéma de la disponibilité des éléments traces dans le sol (d'après Morel 1996)

Ainsi la phytodisponibilité dépend de trois processus successifs (Bourrelrier et Berthelin 1998). Le premier est l'offre du sol en l'élément vers la solution du sol, gouvernée par les interactions biophysico-chimiques citées plus haut. Le second concerne le transport de l'élément vers les surfaces racinaires par diffusion ou advection. Le troisième est le prélèvement de l'élément par les cellules racinaires suivi du transport et de la distribution dans la plante.

La mobilité et la biodisponibilité d'un métal donné dépendent du sol et des processus induits par les conditions climatiques, la faune et la flore et les pratiques agricoles (Morel 1996). On peut classer les paramètres d'influence en deux catégories : abiotique et biotique, même si les deux sont interdépendants.

Les **paramètres abiotiques majeurs** sont :

- le pH et le potentiel redox (Eh) (Brown *et al.* 1994; Chardot 2007; Jean 2007): leur rôle combiné sur la spéciation d'un élément donné peut être visualisé par un diagramme potentiel-pH, comme par exemple celui relatif au Ni (Figure 4). Dans l'ensemble, un pH faible favorise la forme Ni^{2+} . Toutefois, le pH et le potentiel redox gouvernent aussi la spéciation des autres métaux. Ainsi, de faibles valeurs d'Eh favorisent la solubilisation des minéraux porteur de Ni (hydroxydes de Fe et de Mn). En conditions d'aération limitante (inondation, battement de nappe), les (oxy)hydroxydes de Fe et Mn sont réduits et solubilisés, et libèrent les éléments métalliques qui leur sont associés (Davranche et Bollinger 2000; Jean 2007). Les variations de pH entraînent une modification de la spéciation des éléments métalliques. Sur des sols très acides, l'augmentation de pH provoque une diminution de la solubilité des cations métalliques (Mellis *et al.*, 2004 ; Jean, 2007). Le pH du sol est optimum pour la mobilité et donc la disponibilité du Ni lorsqu'il est modérément acide, entre 6 et 7. Cependant, en culture hydroponique, le pH des solutions est souvent ajusté à des pH plus acides, entre 5,5 et 6 (Hu *et al.* 2013; Deng *et al.* 2014). Bien qu'il soit conseillé de maintenir le pH entre 4,5 et 6,2 (Chaney *et al.* 1998), un pH en dessous de 4,6 peut entraîner une diminution de la biomasse produite (Robinson *et al.* 1999). Par ailleurs, la modification du pH, selon le réactif employé, peut être défavorable au transfert du métal, même dans une gamme de pH modérément acide (Robinson *et al.* 1999). Le potentiel redox intervient dans la mise en solution du Ni. De faibles valeurs d'Eh favorisent la solubilisation des minéraux porteur de Ni (hydroxydes de Fe et de Mn) et contribuent donc à l'augmentation de la concentration en solution de Ni.

- La capacité d'échange cationique (CEC) caractérise la capacité d'un sol à stocker et restituer les éléments minéraux sur le complexe argilo-humique. Lorsque les particules fines d'argile sont chargées négativement et que la CEC est élevée, elles adsorbent les particules de charges opposées. De ce fait, les cations métalliques peuvent se fixer à la surface des particules d'argile, entraînant une baisse de leur disponibilité (Barillot 2012). La disponibilité dépend aussi des minéraux auxquels est lié le Ni, particulièrement dans les contaminations d'origine anthropique (Massoura *et al.* 2006). Les oxydes, hydroxydes et (oxy)hydroxydes de fer, sont présents en abondance dans les sols. Ils interviennent dans les réactions d'oxydo-réduction et dans les réactions d'échange cationique. Ils possèdent une forte capacité d'adsorption et jouent alors un rôle prépondérant dans la sorption des ions métalliques.

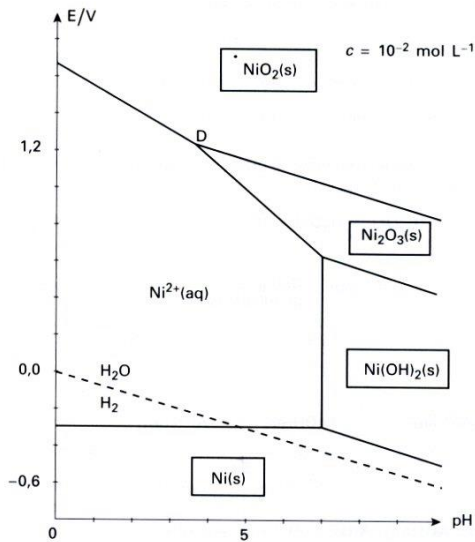


Figure 4 _ Diagramme potentiel pH du Ni pour $c=10^{-2}$ mol L⁻¹ (d'après <http://lycees.ac-rouen.fr/galilee/images/nickelpotentielpH.jpg>)

Ces paramètres donnent des tendances mais ne suffisent pas à prédire la spéciation des métaux ni leur répartition entre les phases aqueuse, solide et colloïdale. Dans les cas les plus simples, la spéciation peut être calculée à l'aide d'un code géochimique comme CHESS (développé par l'École des Mines de Paris, J. van der Lee et L. De Windt, 2002, <http://chess.geosciences.mines-paristech.fr/>) ou PHREEQC (développé par l'United States Geological Survey).

Les paramètres biotiques peuvent aussi moduler la disponibilité des polluants.

- Les **rhizodépôts** peuvent jouer un rôle important dans la solubilisation des métaux : les acides organiques de faible masse molaire influencent l'acquisition du métal, en formant des complexes avec le métal et en diminuant le pH à proximité des racines (Nascimento et Xing 2006). Ainsi, les rhizodépôts ont une action directe sur la phytoextraction en augmentant la biodisponibilité du métal, et un effet indirect en agissant sur les bactéries qui vont augmenter la biodisponibilité du métal.

- Les **microorganismes** du sol produisent des métabolites tels que des biosurfactants, des acides organiques ou des sidérophores, qui facilitent la biodisponibilité du métal dans le sol en libérant le Ni des phases non solubles (Rajkumar et Freitas 2008; Ma *et al.* 2009). Ainsi, les microorganismes du sol augmentent la biodisponibilité en agissant i) directement sur les complexes du sol, et ii) sur les plantes, et donc indirectement sur les métaux. Par ailleurs, les bactéries interagissent avec les plantes en diminuant le stress de la plante lié au métal et/ou en stimulant sa croissance. L'action des racines peut dissoudre certaines phases porteuses de métaux dans le sol (Fellet *et al.* 2009).

La disponibilité dépend d'un grand nombre de processus couplés et ne peut être prédite simplement. En revanche, elle peut être mesurée par extraction avec certains complexants. Pour le Ni, trois extractants sont majoritairement utilisés en raison de la forte corrélation entre le Ni en solution extrait de la matrice sol par l'extractant, et celle dans les parties aériennes : l'**acétate d'ammonium** (Proctor et Woodell 1975; Robinson *et al.* 1997b), l'**acide diéthylène tri-amine penta-acétique ou DTPA** (Lindsay et Norvell 1978; Echevarria *et al.* 1998) et le **nitrate de strontium** (Madden 1988; Siebielec et Chaney 2006). Ces extractions donnent une bonne tendance, mais il ne faut pas négliger la possibilité d'un transfert du Ni par contact de la racine

avec les particules du sol sans passage par la solution (Proctor et Woodell 1975 ; Proctor *et al.* 1981). La disponibilité peut aussi être évaluée par dosage des concentrations dans la solution du sol, mais cette estimation est souvent insuffisante. Le pool d'ions Ni assimilable par la plante peut aussi être prédit par les cinétiques d'échange isotopique qui reposent sur la mesure des ions Ni²⁺ du sol qui sont isotopiquement échangeables et qui sont ceux assimilables par la plante (Echevarria *et al.* 1997; Gérard *et al.* 2000; Estrade *et al.* 2015).

2.2. Un pH modérément acide est favorable à la phytoextraction

La diminution du pH entraîne une augmentation des formes solubles du métal dans le sol et une augmentation du prélèvement par la plante (Wang *et al.* 2006). Les plantes induisent des changements de pH en libérant des H⁺ ou des OH⁻ (Bernal *et al.* 1994b; Hinsinger *et al.* 2003; Philippot *et al.* 2013). Cette libération entraîne des réactions d'oxydo-réduction modifiant la disponibilité des éléments dans le sol, comme c'est le cas du Fe³⁺ réduit en Fe²⁺ sous l'action des exsudats. L'absorption des nutriments par la plante modifie le pH du sol. Dans le cas de la nutrition azotée, les plantes peuvent prélever l'azote sous forme d'ammonium (NH₄⁺) ou de nitrate (NO₃⁻). Lors du prélèvement de NH₄⁺, des protons sont libérés dans la rhizosphère ce qui entraîne une diminution du pH. Inversement, quand la plante absorbe NO₃⁻, il y a une prise simultanée de H⁺, et une libération d'OH⁻ et de HCO₃⁻ par la plante, donc une augmentation du pH rhizosphérique (Marschner 1995). Généralement, la nutrition en NO₃⁻ diminue le Ni dans les parties aériennes alors qu'avec le NH₄⁺, elle augmente. Mais lors de l'exposition de Graminées à de faibles concentrations de Ni, la nutrition NO₃⁻ entraîne une augmentation du Ni prélevé (Wiltshire 1972). De plus, dans *Arabidopsis*, la concentration du Ni dans les parties aériennes augmente davantage en présence de NO₃⁻ que de NH₄⁺. Cependant, la biomasse avec NO₃⁻ est inférieure (Hu *et al.* 2013). D'autres études présentent des résultats similaires où, lors de l'augmentation du pH, la solubilité du métal diminue mais le prélèvement par les plantes augmente (Tableau 3). Le choix de la fertilisation azotée a donc une incidence sur l'acidification de la rhizosphère et le prélèvement des métaux (Puschenreiter *et al.* 2001; Zaccheo *et al.* 2006; Hu *et al.* 2013).

Tableau 3 _ Travaux présentant une meilleure capacité de phytoextraction du Ni par la plante lors d'une augmentation du pH

Etude	Type de sol (pH avant culture)	Amendement(s) utilisé(s) pour augmenter pH	Espèces	pH (après culture)	Métaux extraits
Li <i>et al.</i> (2003)	Limoneux (5 à 5,8) et organique (5,2 à 6,2)	1,6 M HNO ₃ ou CaCO ₃ .	<i>A. murale</i> <i>A. corsicum</i>	4,97 à 6,32	Ni Co
Everhart <i>et al.</i> (2006)	5,1 à 7,5 Limoneux (6 à 7,5) (Welland loam) et organique (5,1 à 6,9) (Quarry muck)	Chaux (comparaison sol chaulé/non-chaulé)	<i>A. murale</i> <i>Avena sativa</i>	5,1 à 7,5	Ni
Kukier <i>et al.</i> (2004)	Quarry muck (pH 5,66), Welland (pH 5,24), Brockman (serpentine) (pH 6,30)	CaCO ₃ et MgCO ₃	<i>A. murale</i> <i>A. corsicum</i>	Quarry muck (pH 7,3), Welland (pH 7,6), Brockman (pH 5,8 et 7,8)	Ni Co
Hu <i>et al.</i> (2013)	Hydroponie (pH 5,5 ajusté avec NaOH)	Fertilisation avec NO ₃ ⁻ (agit sur IRT1)	<i>A. thaliana</i>		Ni

Ainsi, le Ni peut être extrait dans une gamme assez large de pH. L'augmentation du pH vers la neutralité peut conduire à une augmentation de la concentration du Ni dans la plante malgré une disponibilité moindre. Par ailleurs, le développement des plantes et de leur système racinaire interagit avec le sol et modifie le pH.

2.3. La microflore peut augmenter la phytoextraction

Les plantes rhizodéposent en moyenne 17% du carbone net fixé lors de la photosynthèse. Ce C participe à l'alimentation de la microflore du sol (Nguyen 2003). Les microorganismes du sol vont se développer favorablement à proximité des racines. Ils sont donc plus importants en terme de quantité et de diversité que dans un sol non planté (Gao *et al.* 2012). Les microorganismes du sol peuvent avoir des propriétés améliorant le développement des plantes : ils sont dits PGPR pour « plant growth promoting rhizobacteria ». Ils ont alors des aptitudes à produire des hormones de croissance (auxines), des enzymes diminuant le stress dans la plante (ACC déaminase) ou encore à améliorer la solubilisation du phosphore et produire des sidérophores. Outre l'amélioration du développement de la plante et la lutte contre les pathogènes, la microflore peut modifier la relation plante-métaux. La production d'acides organiques par les bactéries diminue la toxicité du métal en liant les ions métalliques (Rajkumar *et al.* 2012), ce qui minimise et inactive les impacts cytologiques des ions métal libres (Gao *et al.* 2010a) car le complexe métal-acide organique est moins phytotoxique que la forme libre du métal.

La disponibilité et la mobilité du métal peuvent être influencées par les exsudats racinaires (phytosidérophores, acides organiques, protons) et par les microorganismes (Whiting *et al.* 2001b; Zhao *et al.* 2001; Wenzel *et al.* 2003). Ceux-ci peuvent contribuer à diminuer le stress de la plante, augmenter la longueur et la surface racinaire permettant une plus grande surface d'absorption, ou augmenter la disponibilité des éléments traces dans la rhizosphère et donc potentiellement influencer leur transfert vers la plante (Glick et Stearns 2011; Sessitsch *et al.* 2013). Des souches bactériennes isolées de la rhizosphère d'*A. murale* et inoculées lors de la culture peuvent augmenter jusqu'à 40% l'extraction du Ni par rapport au témoin non inoculé (Abou-Shanab *et al.* 2006). Lors de la co-culture d'hyperaccumulateurs, et en inoculant une souche PGPR, la quantité de Ni extraite peut augmenter de 40 à 80% en comparaison à la co-culture non inoculée (Durand *et al.* 2016).

2.4. Les molécules impliquées dans le prélèvement, la translocation et la séquestration du Ni

Dans la rhizosphère, le Ni peut être sous différentes formes chimiques. Il a été mis en évidence dans les hyperaccumulateurs une surexpression de certains gènes encodant pour des transporteurs transmembranaires de la famille des ZIP et HMA, ceux-ci interviennent certainement dans le prélèvement par les racines, la translocation et la séquestration du métal (Rascio et Navari-Izzo 2011). L'entrée du Ni²⁺ et son transport à travers la membrane racinaire sont réalisés par des transporteurs à faible affinité (Deng *et al.* 2014) et peuvent se faire par le transporteur du Fe²⁺ : AtIRT1 (Nishida *et al.* 2011; Hu *et al.* 2013). Malgré des transporteurs communs pour l'entrée dans la plantes, les mécanismes de translocation vers les parties aériennes sont différents pour le Fe et le Ni.

Dans la plante, le Ni peut être libre ou chélaté. La chélation permet de lier le métal pour diminuer sa toxicité (action antioxydante), le transporter et le stocker. Elle peut se faire par complexation avec différents ligands : acides aminés, acides organiques, protéines et peptides. Ainsi, certaines

molécules ont été détectées en grande quantité dans les plantes exposées au métal. C'est le cas des acides aminés, comme la proline pour différentes espèces (Sharma et Dietz 2006) et l'histidine pour *A. lesbiacum*, *A. montanum* et *N. caerulea* (Krämer *et al.* 1996; Kerkeb et Krämer 2003; Kozhevnikova *et al.* 2014). D'autres molécules, telles que l'acide malique et l'acide citrique (Lee *et al.* 1978; Montargès-Pelletier *et al.* 2008; Mnasri *et al.* 2015; Deng *et al.* 2016), le glutathion, les phytochélatines, les métallothionéines ou les phytosidérophores ont aussi été identifiées (Cobbett et Goldsbrough 2002; Callahan *et al.* 2005; Haydon et Cobbett 2007; Verbruggen *et al.* 2009) (Figure 5). Centofanti *et al.* (2013) analysent la composition de la sève du xylème dans différents génotypes d'*Alyssum* et montrent que les concentrations des différents ligands varient selon l'espèce. De plus, la concentration du Ni est 100 à 1 000 fois supérieure à celle des principaux ligands (histidine, malate, citrate et nicotianamine). Ces concentrations en ligands sont donc trop faibles pour complexer l'ensemble du Ni présent. Ainsi, la majeure partie du Ni pourrait être sous forme de cation hydraté ou chélaté à des ligands non identifiés jusqu'à présent.

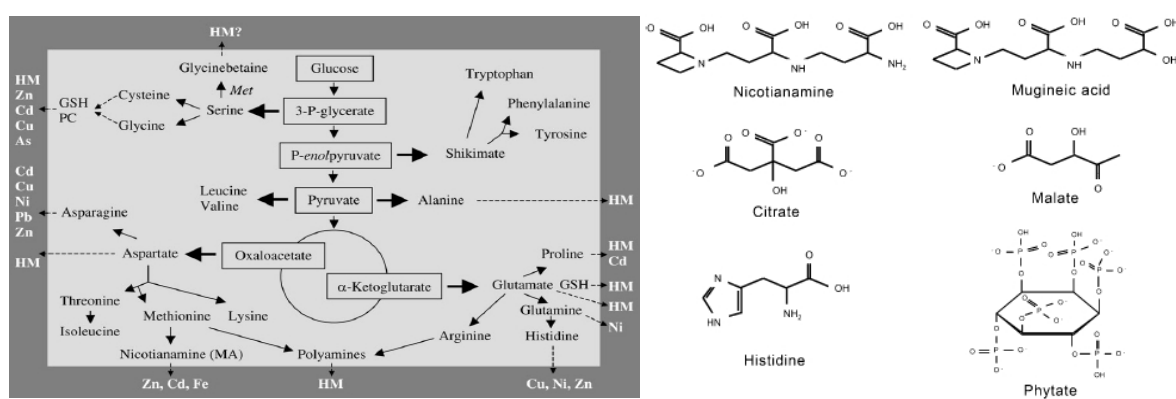


Figure 5 _ a) Voies de synthèses impliquées dans la synthèse des acides aminés et des métabolites azotés en lien avec les métaux lourds dans les plantes (Sharma et Dietz 2006) et b) Ligands du Fe, Zn, Cu, Mn et Ni dans les plantes (Haydon et Cobbett 2007)

La difficulté d'extraction et d'analyse des complexes organométalliques limite l'identification des complexes impliqués dans le transport, l'immobilisation et la tolérance aux métaux dans les hyperaccumulateurs. En effet, l'identification de hautes concentrations d'une molécule présente dans les hyperaccumulateurs et absentes d'autres espèces ne permet pas de quantifier les molécules complexées au Ni, ni la fraction du métal total complexé avec telle ou telle molécule. Cependant, les techniques d'absorption aux rayons X permettent d'observer la spéciation des métaux dans les tissus non détruits mais sont limitantes pour observer la localisation à l'échelle de la cellule (Montargès-Pelletier *et al.* 2008; Van der Ent *et al.* 2017). L'utilisation de mutants a permis des avancées sur le rôle des ligands dans l'homéostasie des métaux spécialement dans le transport entre les tissus. De nombreux ligands sont certainement encore inconnus dans la mesure où ils peuvent être libres lors de leur transport (Haydon et Cobbett 2007). Récemment, une nouvelle molécule intervenant dans l'accumulation du césium dans *A. thaliana* a été identifiée : la cystéinate méthylée (C₄H₉NO₂S) (Adams *et al.* 2017).

2.5. Où est stocké le Ni dans les hyperaccumulateurs ?

Les concentrations observées dans les hyperaccumulateurs de Ni nécessitent la mise en place de mécanismes de tolérance et de détoxification des métaux dans la plante. Les feuilles sont les organes de stockages principaux. Elles détiennent des concentrations de Ni de plusieurs pourcents. Le métal est localisé dans les zones n'interférant pas avec le métabolisme de la plante :

principalement dans les vacuoles et les parois cellulaires des cellules épidermiques (Broadhurst *et al.* 2004; Leitenmaier et Küpper 2013)(Tableau 4). Par ailleurs, la complexation du métal dans la plante avec des chélatants et des composés antioxydants produits par la plante favorise l'inertie des métaux (Clemens 2001; Hall 2002).

Tableau 4 _ Principaux sites de localisation du Ni dans les feuilles des hyperaccumulateurs

Espèce	Localisation	Étude
<i>A. murale</i> <i>A. lesbiacum</i> <i>A. bertolonii</i>	Cellules épidermiques, trichomes	Küpper <i>et al.</i> (2001); Smart <i>et al.</i> (2007); Tappero <i>et al.</i> (2007)
<i>Berkheya coddii</i>	Mésophylle et épiderme des feuilles Cuticule	Mesjasz-Przybyłowicz <i>et al.</i> (2001a); Robinson <i>et al.</i> (2003)
<i>Hybanthus floribundus</i>	Vacuole des cellules épidermiques Cellules palissadiques Cellules du mésophylle	Bidwell (2000)
<i>Phyllanthus bagooyi</i>	Phloème et épiderme supérieur	Van der Ent <i>et al.</i> (2017)
<i>Phyllanthus securinegioides</i>	Épiderme supérieur et inférieur	Van der Ent <i>et al.</i> (2017)
<i>Rinorea bengalensis</i>	Épiderme supérieur et inférieur et mésophylle spongieux	Van der Ent <i>et al.</i> (2017)
<i>Senecio coronatus</i>	Epiderme des feuilles	Mesjasz-Przybyłowicz <i>et al.</i> (1994)
<i>Senecio anomalochrous</i>	Epiderme des feuilles	Mesjasz-Przybyłowicz <i>et al.</i> (2001b)
<i>Stackhousia tryonii</i>	Cuticule des feuilles	Bidwell (2000)
<i>Thlaspi goesingense</i>	Cellules épidermiques	Küpper <i>et al.</i> (2001)
Huit hyperaccumulateurs de Ni	Cellules épidermiques (éloignées des stomates) + cellules subsidiaires	Psaras (2000)

2.6. Les métabolites secondaires ; des chélateurs de métaux ?

En réaction à son environnement, une plante produit dans ses tissus une centaine de métabolites secondaires. Ces molécules peuvent être exsudées au niveau des racines (Guillon *et al.* 2006). Parmi elles, les phytoalexines sont des molécules de faible masse molaire, antibactériennes, synthétisées et accumulées dans la plante après une infection (Paxton 1981). Certaines molécules ont des propriétés appliquées en médecine, cosmétique ou lutte biologique.

Les coumarines sont des composés phénoliques présents dans de nombreux végétaux et appartenant aux phytoalexines. Leur présence dans la nature et leur extraction à partir des végétaux sont connues depuis plusieurs décennies (Murray *et al.* 1982; Bourgaud *et al.* 1994). Des coumarines ont été identifiées dans les Brassicacées, le tabac (Baumert *et al.* 2001) et *A. thaliana* (Rohde 2004). Depuis, d'autres études ont été menées sur la production de ces composés dans ces espèces (Kai *et al.* 2006, 2008; Ahn *et al.* 2010; Didierlaurent 2012; Siwinska *et al.* 2014) dont les voies de synthèse ont été détaillées (Bourgaud *et al.* 2006).

Les coumarines peuvent être des composés phénoliques simples qui apparaissent après l'agression de la plante (*e.g.* platane) ou des phénols constitutifs, tels que dans le genre *Citrus* où plusieurs coumarines et furocoumarines sont présentes (Macheix *et al.* 2005; Dugrand *et al.* 2013). La scopolétine a été mise en évidence lors de l'attaque de pathogène dans *A. thaliana* (Bednarek *et al.* 2005) et *Nicotiana tabacum* (Chong *et al.* 2002). De même, pour *Hevea brasiliensis*, la teneur en scopolétine est plus élevée dans des feuilles infectées que dans les feuilles de la même plante non infectées (Silva *et al.* 2002). De plus, il existerait des interactions entre l'AIA (auxine) et les composés phénoliques. *In vitro*, la scopolétine agit comme un activateur de l'activité AIA-oxydase et diminue la teneur en auxine, pouvant conduire à un ralentissement de la croissance.

La phytoalexine produite est généralement caractéristique de l'espèce végétale. Ainsi, chez le genre *Citrus*, on rencontre la scopolétine et l'esculétine (C₆-C₃). Ces molécules présentent un cycle aromatique et une ou plusieurs fonctions -OH susceptibles d'être substituées par d'autres groupements (Figure 6). Elles peuvent se trouver sous formes libres ou complexées. La forme glycosylée de la scopolétine est la scopoline, dans laquelle un glucose est substitué au groupement H₃COH. Récemment, l'implication de cette molécule dans l'acquisition du Fe a été mise en évidence pour *Arabidopsis* (Kai *et al.* 2008; Schmid *et al.* 2014). Cette molécule peut présenter des applications en médecine (propriétés cicatrisantes) ou dans la conservation des récoltes de par ses propriétés fongistatiques, fongicides et anti bactériennes (Garabeth *et al.* 2007; Gnonlonfin *et al.* 2012; Ba *et al.* 2017). Les concentrations mesurées dans les plantes sont de l'ordre de quelques dizaines de mg kg⁻¹ : 0,58 mg kg⁻¹ dans les racines de manioc, 6,34 mg kg⁻¹ dans les fleurs et 2,51 mg kg⁻¹ dans les fruits de *Prangos asperula* Boissier (Garabeth *et al.* 2007).

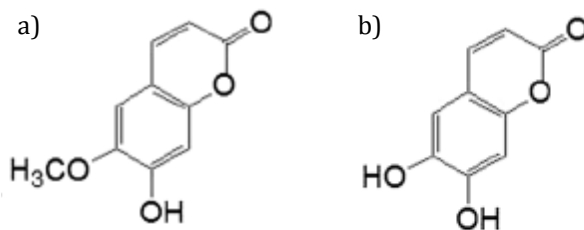


Figure 6 _ Molécules de a) scopolétine et b) d'esculétine Yang *et al.* (2015)

2.7. Conclusion

Les mécanismes de prélèvement du Ni par les racines et la translocation dans la plante jusque dans les parties aériennes ainsi que les ligands impliqués à différents niveaux (séquestration, transport et stockage) permettent d'appréhender l'homéostasie des métaux dans les plantes. Leur compréhension est nécessaire pour augmenter l'efficacité d'extraction du métal et donc la phytoextraction. Le prélèvement nécessite que le Ni soit accessible aux racines dans la rhizosphère, *i.e.* phytodisponible, sinon l'extraction n'aura pas lieu. Des chélateurs encore non identifiés et produits par la plante pourraient permettre de comprendre le transport et le stockage des métaux et avoir des applications dans des domaines tels que la pharmacologie. Il est nécessaire de rechercher et quantifier les molécules présentes dans les plantes hyperaccumulatrices et leur interaction avec les métaux.

3. L'agronomie des hyperaccumulateurs au service de l'agromine

L'étude des sols, l'identification des hyperaccumulateurs et la compréhension des mécanismes de phytoextraction donnent les bases fondamentales permettant d'envisager la culture de ces plantes à grande échelle. Le premier objectif de cette culture était la décontamination de sols pollués en métaux, mais aujourd'hui, on s'intéresse de plus en plus à « l'agromine » dont l'objectif est de cultiver des plantes pour produire des métaux, autrement dit « cultiver des métaux ».

Cette partie commence par la définition du concept d'agromine, puis décrit l'agronomie des hyperaccumulateurs. Elle se termine par des exemples de cultures sur sols ultramafiques et sols miniers et les leviers qui peuvent être mis en place pour optimiser l'agromine.

3.1. L'agromine

La dépollution de sols contaminés par des métaux a été la première application envisagée pour les technologies basées sur des plantes hyperaccumulatrices (Robinson *et al.* 1997b; a). Ce sujet a été largement étudié pour de nombreux métaux. Toutefois, la question du devenir de la biomasse contaminée a été très peu abordée. Elle est pourtant extrêmement importante pour la mise en œuvre à grande échelle. Au départ, il était question de l'incinérer ou de la stocker en centre spécialisé (Sas-Nowosielska *et al.* 2004; Keller *et al.* 2005). R.L. Chaney a été le premier à montrer que le Ni pouvait être valorisé à partir d'*A. murale*: le procédé consistait à brûler la biomasse sèche et à la traiter comme un minerai, par pyrométallurgie, pour produire du Ni métal (Chaney *et al.* 1998; Angle *et al.* 2001; Li *et al.* 2003b).

Ainsi a été introduit le concept de "phytomining", récemment élargi à "agromining" ou "agromine" (Morel 2013; Van der Ent *et al.* 2015a). En effet, la production de composés à base de Ni extrait de plantes repose sur la possibilité de pouvoir cultiver ces plantes à grande échelle, ce qui implique la mise en œuvre des procédés agronomiques. La biomasse peut aussi être employée comme un fertilisant si le métal qu'elle contient est un oligo-élément (Ni, Se, etc.) et que la biomasse n'est pas chargée en métaux toxiques mais cet usage reste anecdotique (Wood *et al.* 2006; Bañuelos *et al.* 2015).

L'agromine est une filière (Figure 7) qui va de l'extraction du métal par les plantes jusqu'à la production de composés de valeur, commercialisables.



Figure 7 _ Représentation de la filière agromine, depuis la culture de la plante *A. murale* jusqu'à la fabrication de composés commercialisables à base de Ni (B. Laubie et M.O. Simonnot)

Après la transformation par voie pyrométallurgique pour produire du Ni métal, d'autres recherches ont démontré l'intérêt du traitement par voie hydrométallurgique (Van der Ent *et al.* 2015a; Simonnot *et al.* Sous presse). Une série de travaux porte sur la production de nickel métal (Barbaroux *et al.* 2011) et d'un sel de nickel « ANSH » (sulfate de Ni et d'ammonium hexahydraté) à partir de la biomasse d'*A. murale*, de l'échelle du laboratoire à celle du pilote (Barbaroux *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014, 2016; Houzelot *et al.* 2017). D'autres concernent la production de catalyseurs à base de Ni pour la chimie organique (Losfeld *et al.* 2012b; a; Grison *et al.* 2013), ou encore de production d'oxyde de Ni à partir d'hyperaccumulateurs tropicaux (Vaughan *et al.* 2017).

Outre la production de composés commercialisables, l'agromine présente de nombreux intérêts, car elle permet :

- la récupération de métaux disséminés dans des ressources secondaires inexploitées par d'autres techniques ;
- la détoxification des sols ou stériles miniers, par un abaissement progressif de la teneur en métal, et donc l'augmentation de leur fertilité et une amélioration de la qualité du sol ;

- la production d'énergie lors de l'incinération de la plante sèche et la réutilisation des sous-produits en tant que fertilisants (solution de lavage).

Une analyse du cycle de vie de la filière a montré que les impacts sur l'environnement étaient faibles (Rodrigues *et al.* 2016; Pons *et al.* Sous presse). En termes de services écosystémiques, les services fournis relèvent de l'approvisionnement (*e.g.* produits à base de métaux, énergie) et de la régulation (*e.g.* détoxification).

Enfin, l'agromine répond parfaitement au concept de développement durable, sur le plan environnemental, économique et sociologique, puisqu'elle permet d'apporter des revenus à des agriculteurs de régions défavorisées aux sols peu fertiles.

3.2. L'optimisation de la culture des hyperaccumulateurs pour l'agromine du Ni

Pour obtenir des rendements élevés en Ni, il faut cultiver des plantes non seulement à fort potentiel d'extraction du Ni mais aussi à forte production de biomasse (Chaney *et al.* 2007; Van der Ent *et al.* 2015a; Nkrumah *et al.* 2016). Dans cette partie, vont être présentés les différents aspects à prendre en considération pour les procédés agronomiques, ainsi que des exemples de réalisation à l'échelle de la parcelle. En effet, pour démontrer la faisabilité de l'agromine, il est indispensable de travailler à grande échelle.

a) Choix des sols et des hyperaccumulateurs

Les parcelles seront installées dans des **zones ultramafiques**, où des hyperaccumulateurs préexistent. Le choix des zones prend en compte l'accessibilité du site, l'exposition du terrain (pente, disponibilité de l'irrigation), la localisation en dehors d'une zone protégée, etc. (Van der Ent *et al.* 2016). Les zones ultramafiques offrant les meilleurs potentiels se situent en Asie Pacifique, dans les Balkans, en Espagne et au Brésil, où des surfaces de plusieurs centaines de km² pourraient être exploitées.

Les espèces les plus pertinentes sont des **espèces locales, tolérantes et hypernickelophores**. Parmi les hyperaccumulateurs, les variations entre espèces se situent au niveau de la production de biomasse, de la capacité à extraire et transférer le métal et du développement phénologique. En effet, certaines espèces sont plus précoces que d'autres pour atteindre la floraison, stade phénologique auquel la plante contient la concentration en métal la plus élevée de son stade de développement (Salt *et al.* 1998).

En dehors de ces critères, la sélection peut s'orienter vers des plantes avec de faibles teneurs en d'autres éléments (Ca, Mg, K) pour faciliter les étapes de récupération et purification de sels de métaux. Par exemple, les *Alyssum* sont caractérisées par des teneurs élevées en Ca, de 1 à 3 % (Pancaró *et al.* 1988). La diversité génétique des populations est liée à la variabilité du métal dans le sol. Les populations les plus efficaces sont généralement issues de sites avec des teneurs métalliques élevées dans le sol (Galardi *et al.* 2007b). Pour choisir les meilleures populations et s'abstraire des concentrations dans le sol, les plantes doivent être cultivées dans les mêmes conditions. Afin de pouvoir comparer le potentiel des populations, elles doivent être exposées à des concentrations identiques en métaux. Ces expériences sont possibles sur sols contaminés (Peer *et al.* 2003, 2006; Schwartz *et al.* 2006) ou en hydroponie (Adamidis *et al.* 2014; Gonneau *et al.* 2014). Elles montrent que pour certaines populations, des individus peuvent être performants pour différents éléments. Par ailleurs, la production de biomasse et la concentration élevée en métal sont deux variables antagonistes et donc difficiles à rassembler dans le même individu.

Cependant, en raisonnant en terme de quantité extraite, les populations les plus efficaces peuvent être identifiées.

Différents indicateurs permettent d'évaluer l'efficacité de la phytoextraction d'une espèce ou d'un individu :

- Le facteur de bioconcentration (FBC ou BCF) (McGrath et Zhao 2003; Ghosh et Singh 2005; Liu *et al.* 2011), rapport de la concentration en métal dans les parties aériennes et de sa concentration dans le sol, mesure l'aptitude d'une plante à extraire et transporter les métaux vers ses parties aériennes. Les plantes hyperaccumulatrices ont un facteur de bioconcentration au moins égale à 1.
- Le facteur de translocation (TF), rapport entre les concentrations de métal dans les parties aériennes et dans les racines (Yoon *et al.* 2006; Lebeau *et al.* 2008), doit être supérieur à 1.

b) Compétition entre éléments pour l'accès à la plante

La phytoremédiation regroupe un ensemble de méthodes basées sur l'utilisation de plantes permettant la remédiation des sites et sols contaminés. Deux voies sont possibles pour les sites contaminés en métaux : la phytoextraction, extraction des métaux et la phytostabilisation, stabilisation de la pollution métallique. La phytoextraction consiste en l'extraction des métaux par les plantes et leur accumulation dans les parties aériennes. BCF et TF doivent être supérieurs à 1 (Baker *et al.* 1988).

L'étude de sites multi-contaminés soulève plusieurs problèmes quant à l'efficacité de la phytoextraction. Les deux raisons principales sont : i) la toxicité de certains métaux pour le développement de la plante et ii) la compétition entre éléments pour l'accès à la plante et la translocation. La toxicité de certains métaux peut inhiber la capacité de la plante à extraire le métal visé. Ainsi, la co-contamination au Cu peut être une limite sérieuse au potentiel de phytoextraction de Zn et de Cd par *N. caerulescens*, sensible au Cu (Lombi *et al.* 2001). La compétition entre éléments entraîne la diminution de la prise des deux éléments comparés à lorsqu'ils sont seuls dans le milieu de culture : c'est le cas du Ni et Cd (Mnasri *et al.* 2015). La présence de Cu, Zn, Fe ou Co inhibe l'absorption et la translocation du Ni dans la plante (Cataldo *et al.* 1978a).

La compétition peut être due à l'utilisation des mêmes transporteurs pour les oligo-éléments et les métaux (Assunção *et al.* 2003, 2008; Escarré *et al.* 2013). Par ailleurs, les plantes sont susceptibles de prélever d'autres éléments que ceux pour lesquels elles sont reconnues hyperaccumulatrices, lorsque l'élément hyperaccumulé (*e.g.* le Ni) est en plus faible concentration qu'un autre. Ainsi, le Cd est préférentiellement prélevé lorsqu'il est présent dans la même concentration que le Ni (1 mg l⁻¹ en hydroponie) et le Co est hyperaccumulé par *A. murale* en l'absence de Ni (Bernal et McGrath 1994a). Cette compétition pour l'entrée du Ni est aussi observée avec le Zn (Deng *et al.* 2014) ou le Mn (Broadhurst *et al.* 2009; Ghaderian *et al.* 2015).

3.3. Itinéraires de culture

La mise en place de culture sur des matrices potentiellement toxiques implique, en plus du choix de l'espèce, de s'assurer de l'installation des végétaux et de la disponibilité du métal. Pour y parvenir, différents leviers peuvent être mis en place :

- le choix de la méthode d'implantation ; semis ou repiquage, et densité des plantes ;
- les amendements : fertilisation chimique, organique, inoculation de souches d'intérêts (PGPR) ;
- le suivi des cultures : désherbage (manuel, mécanique, chimique), des récoltes (une ou plusieurs).

En complément, il s'agit de choisir pour chacune de ces actions le moment et la fréquence d'intervention en fonction du cycle de développement des plantes sur le sol et du climat.

a) Installation du couvert : semis, repiquage, densité

Pour la mise en place de la culture, différentes stratégies peuvent être appliquées selon le climat. Elles nécessiteront un suivi différent des parcelles (entretien, interventions, récoltes). En milieu tropical, des espèces ligneuses (*e.g. Phyllanthus spp., R. bengalensis*) peuvent être cultivées en taillis à courte rotation (Van der Ent *et al.* 2015a; Nkrumah *et al.* 2016). Dans le cas d'herbes pérennes (*e.g. B. coddii*), une coupe pourrait être réalisée une ou deux fois par an (Robinson *et al.* 1997a). En milieu tempéré (*e.g. Balkans*), les espèces sont majoritairement des herbacées annuelles ou bisannuelles, et sont réinstallées chaque année. Deux modes d'installation sont possibles : semis direct ou installation de plants. Ce dernier est plus chronophage mais garantit une survie et une production de biomasse supérieure (Kanso 2016). Toutefois, la concentration en métaux peut être inférieure dans les individus transplantés par rapport aux semés (McGrath *et al.* 2006). Cependant, sur un sol acide, la transplantation garantit une augmentation de métal extrait à l'issue de la culture (Hammer et Keller 2003).

Les arbres (2 à 10 m de haut selon l'espèce à l'âge adulte) sont plantés en avril, cinq à six mois avant la saison sèche, après avoir été semés et élevés en serre pendant 1 an (Losfeld *et al.* 2015). La densité de plante varie selon l'espèce. Bani *et al.* (2015b) recommandent de conserver quatre individus au m² lors de l'utilisation d'*A. murale* native sur des sols ultramafiques en Albanie. Dans le cas d'espèce ligneuse, 3,8 arbres sont installés dans 10 m² (Losfeld *et al.* 2015).

b) Fertilisation et amendements

La fertilisation permet de compenser en partie la faible teneur en nutriments et la toxicité métallique (Wiszniewska *et al.* 2016). Elle est effectuée par application de fertilisants chimiques, directement prélevables par la plante, et/ou l'apport d'amendements, dégradés progressivement, et diffusant lentement des nutriments. S'ils modifient le pH du sol ou contiennent de la matière organique (MO), ils jouent un rôle sur la mobilité et la disponibilité des métaux. Si l'ajout d'amendements peut diminuer la mobilité des métaux et ainsi être plus favorable à la phytostabilisation qu'à la phytoextraction, il peut néanmoins hautement favoriser le développement de la biomasse, nécessaire au succès de la phytoextraction. Les amendements peuvent modifier les propriétés chimiques (pH, CEC, etc.), physiques (texture, porosité, capacité de rétention en eau, etc.) et biologiques (biomasse microbienne, etc.) du sol.

Sur les sols ultramafiques, l'apport de Ca(OH)_2 augmente le pH et le rapport Ca/Mg. Ainsi, la mobilité du Ni dans le sol et vers la plante diminue, ce qui améliore le développement de celle-ci (Halstead 1968; Halstead *et al.* 1969). De même, l'apport de MO provoque la complexation du Ni et le rend moins disponible pour la plante. Les boues de station d'épuration sont classiquement utilisés pour les terres (Frossard *et al.* 1996). On utilise aussi des composts de déchets verts, des déchets municipaux, des résidus d'industries alimentaires etc. Le choix des amendements dépend souvent de leur disponibilité à proximité du site, surtout si de grandes quantités sont requises (Yang *et al.* 2016a).

Il faut donc choisir le type d'amendement et la quantité à apporter selon le sol initial et l'objectif de remédiation. La quantité apportée doit être suffisante sans être excessive (Alvarenga *et al.* 2009). Les amendements peuvent aussi apporter des quantités significatives de métaux dont il faut tenir compte, comme Zn, Cd et Cu, provenant des boues de station d'épuration (Samake *et al.* 2003) et des composts de déchets verts municipaux. Ces concentrations peuvent s'avérer néfastes pour l'installation des plantes, malgré l'amélioration d'autres paramètres telles que les activités enzymatiques du sol (Alvarenga *et al.* 2009; Yang *et al.* 2013). Sur des sols très acides, pH 4, un amendement devra permettre de corriger suffisamment le pH pour permettre l'installation des plantes (Alvarenga *et al.* 2009).

En premier lieu, les amendements permettent d'augmenter le taux de germination des graines (Beesley *et al.* 2010). Trois principaux types d'amendements sont présentés ci-dessous : les amendements calciques ou calco-magnésiens (chaulage), les composts et le biochar.

L'utilisation de CaCO_3 , MgCO_3 , Ca(OH)_2 a pour objectif d'augmenter le pH du sol et diminuer la mobilité des métaux (Robinson *et al.* 1999; Kukier et Chaney 2001). Par exemple, l'application de CaCO_3 sur sol acide diminue le transfert du Ni vers des plantes de cultures (Graminées et Brassicacées) (Crooke et Inkson 1955 ; Siebielec et Chaney 2006 ; Karer *et al.* 2015). Dans certains cas, le pH est peu modifié, mais le Ni et Co extraits diminuent. Cela pourrait être dû à une compétition avec le Ca (Robinson *et al.* 1999). Dans d'autres cas, malgré l'augmentation du pH après chaulage, le transfert du Ni augmente dans *A. murale* (Tableau 3), de même lors de l'ajout de MgCO_3 sur une culture d'*Alyssum* (Chaney *et al.* 1998). Donc, l'ajout de Ca ou Mg sous forme de carbonate peut augmenter la phytoextraction du Ni.

Sur un sol ultramafique, l'apport de N augmente la concentration du Ni dans *B. coddii* alors que P n'a pas d'effet (Robinson *et al.* 1997a). Une **fertilisation minérale** (NPK+S) double la production de biomasse d'*A. murale* (Bani *et al.* 2007) et améliore le rendement de Ni. L'apport de 2,5 ou 5% (m/m) de **compost** permet d'obtenir les meilleurs rendements avec trois espèces d'*Alyssum* et *Noccaea goesingense* malgré une diminution du Ni extractible (Álvarez-López *et al.* 2016). La biomasse produite et le contenu en chlorophylle des laitues augmentent avec un amendement de 2,5 à 10 % (v/v) de **marc de café** (Cruz *et al.* 2012, 2015).

L'application de **biochar** sur des sols contaminés entraîne une diminution de la mobilité des métaux, expliquée par la précipitation et l'adsorption des métaux sur les phases minérales du biochar (Rees *et al.* 2014), ainsi que l'adsorption des sels (Na^+) dans les sols à forte salinité (Akhtar *et al.* 2015b). L'effet du biochar dépend de la quantité amendée, du type de matière première, de la taille des particules et des conditions de pyrolyse, qui jouent sur la surface spécifique, le pH, le contenu en cendres et en carbone (Streubel *et al.* 2011; Paz-Ferreiro *et al.* 2014; Chintala *et al.* 2014). L'augmentation de la température de pyrolyse augmente le contenu en cendres et le pH

(Wu *et al.* 2012; Cantrell *et al.* 2012). Le biochar a un effet bénéfique plus marqué sur les sols acides qu'alcalins (Zwieten *et al.* 2010). Par ailleurs, bien que le biochar diminue la mobilité des métaux, il semble augmenter la surface racinaire et donc la surface d'échange avec le sol (Rees *et al.* 2016). Différents types de résultats ont été rapportés :

- l'application de 5% (m) de biochar de bois sur un sol de serpentine (pH 5,5) diminue la disponibilité du Cr, Ni et Mn de 99, 66 et 42%, respectivement et diminue la concentration de ces éléments de plus de 90% dans des plants de tomate et augmente de 40% la biomasse produite (Herath *et al.* 2015) ;
- Des résultats similaires sont obtenus sur la croissance de l'épinard sur un sol à pH de 7,9 amendé en Ni et en présence de 3 et 5% (m) d'un biochar de tiges de coton. La biomasse et le taux de chlorophylle augmentent tandis que la concentration du Ni dans la biomasse diminue (Younis *et al.* 2015) ;
- Sur un sol (pH 7,6) avec une forte salinité (25 ou 50 mM de NaCl), l'application de 5% (m) de biochar augmente la biomasse du blé et ses propriétés physiologiques (densité stomatique, contenu en chlorophylles, activité photosynthétique). Les teneurs en N et K dans les feuilles augmentent alors que celle en Na diminue. Sur le même sol, des essais en colonne montrent que l'application de biochar augmente Ca^{2+} , K^+ et Mg^{2+} dans la solution de sol et diminue Na^+ (Akhtar *et al.* 2015a). L'application de biochar diminue le stress induit par la salinité aussi par augmentation de la capacité de rétention en eau et a donc un effet de dilution.

L'augmentation de la biomasse est attribuée à l'augmentation de la capacité de rétention de l'eau et des nutriments, de la CEC et l'amélioration des propriétés biologiques des sols amendés en biochar (Liang *et al.* 2006; Streubel *et al.* 2011; Paz-Ferreiro *et al.* 2014).

Malgré l'abondance des recherches sur l'effet du biochar sur les plantes, peu d'auteurs se sont intéressés aux plantes hyperaccumulatrices. Des exemples de travaux sont présentés ci-dessous :

- Un sol minier contaminé en Cd et Zn et de pH alcalin (7,7) a été amendé avec 1,5 et 3% (m) de trois biochars différents. Le biochar issu de granulés de sapin permet d'augmenter les concentrations de Zn et Pb dans *Noccaea rotundifolia* et *Anthyllis vulneraria*, atteignant les seuils d'hyperaccumulation non atteints sans biochar. Le biochar issu de résidus de vergers n'a pas d'effet. Le 3^{ème} biochar, préparé dans les mêmes conditions que le premier, mais avec 30% de granulés de sapins et 70% de fumier, diminue les concentrations de Zn et Pb dans les plantes. Les mêmes essais réalisés avec *Poa alpina*, une Graminée, indiquent la diminution du transfert du Zn et Pb vers la plante quels que soient le type et la dose de biochar (Fellet *et al.* 2014) ;
- Rees *et al.* (2016) observent une augmentation de la concentration de Cd et Zn dans les parties aériennes de *N. caerulea* lors d'un amendement de 5% (m) de biochar de bois sur un sol alcalin (pH 8), mais une diminution de la teneur en Cd dans *L. perenne* ;
- Lu *et al.* (2014) observent une diminution du transfert de Cd vers *Amaranthus tricolor* lors de l'apport sur un sol acide (pH 6) de biochar ou de CaO, conduisant à des pH de 6,8 à 7,6. Le biochar de litière de volaille permet d'obtenir une biomasse significativement plus élevée que tous les traitements. Un biochar d'*Eucalyptus* n'a pas un facteur de translocation différent de celui du témoin non amendé. La quantité de Cd extraite est significativement inférieure au témoin non amendé sur toutes les modalités. L'amendement en CaO et en biochar ont le même effet ;
- Les plantules de *Brassica juncea* meurent en une semaine sur un sol minier, acide (pH 2,8) contaminé en métaux. En mélangeant 20% et 40% d'amendement (constitué de 95% de compost et 5% de biochar) à 80 et 60% de terre (m/m), le pH augmente et les concentrations totales et

extractibles de Co, Cu, Pb et Ni diminuent, celle du Zn augmente. Avec ces traitements, on n'observe pas de différence significative de biomasse produite mais une augmentation de l'extraction du Ni. La concentration est multipliée par 2 entre les traitements avec 20% et 40% d'amendement et, alors que le pH augmente avec 80% d'amendement et que le Ni extractible est très faible (0,2 mg kg⁻¹), le facteur de bioconcentration (Ni dans les parties aériennes/ Ni disponible dans le substrat) est supérieur à 200 (Rodríguez-Vila *et al.* 2014).

Ainsi, l'effet du biochar est difficile à prévoir, selon le matériau d'origine et les conditions de pyrolyse. Dans un certain nombre de cas, il montre un effet bénéfique sur l'hyperaccumulation.

Il est aussi possible d'associer plusieurs amendements sur un même sol (Córdova *et al.* 2011; Rodríguez-Vila *et al.* 2015; Yang *et al.* 2016b). L'utilisation simultanée du compost et du biochar a pour objectif de bénéficier d'une synergie des deux amendements (Beesley *et al.* 2010; Karami *et al.* 2011; Rodríguez-Vila *et al.* 2014). Mais là encore, les résultats sont controversés (Beesley *et al.* 2010; Karami *et al.* 2011; Kanso 2016).

c) Co-culture d'espèces végétales

Une diversité de plantes induit une diversité de rhizodépôts (Zak *et al.* 2003), et donc sélectionne une communauté microbienne complexe et des groupes fonctionnels microbiens plus diversifiés (Lavelle *et al.* 1995). D'après Gao *et al.* (2012), la taille de la population bactérienne du sol diminue selon les critères suivants : sol non pollué végétalisé > co-culture (deux espèces) sur sol pollué en métaux lourds > monoculture sur sol pollué en métaux lourds > sol pollué nu. Les activités enzymatiques microbiennes (phosphatases, déshydrogénase et uréase) sont plus importantes dans un sol planté non-pollué que dans un sol planté pollué et encore plus faibles dans un sol nu pollué. Ainsi, la coexistence de différentes espèces végétales permet l'augmentation de la taille de la communauté microbienne de 15-20 % par rapport à la monoculture et corrélativement l'augmentation des activités enzymatiques de ces microbes (Gao *et al.* 2010b, 2012).

La co-culture sur sol contaminé peut avoir plusieurs objectifs :

- augmenter le développement des plantes par la diversité des fonctions bactériennes présentes et, par conséquent, la biomasse et les métaux extraits par l'hyperaccumulateur ;
- augmenter la disponibilité des polluants et la prospection du volume de sol avec des systèmes racinaires propre à l'espèce (Keller *et al.* 2003) ;
- favoriser le développement d'une espèce moins tolérante par le prélèvement du métal présent par une co-culture avec un hyperaccumulateur (Whiting *et al.* 2001a) ;
- séparer deux éléments qui se trouvent dans le substrat en utilisant deux plantes capables chacune de concentrer un élément différent (Wu *et al.* 2007).

Ainsi, peuvent être envisagées :

- la co-culture d'un arbre avec une herbacée : sur des sols contaminés en Zn et Cd, une co-culture de *Salix caprea* et *Arabidopsis halleri* n'augmente pas la quantité de métaux extraits. Cependant, sur le sol acide, la concentration de Zn est supérieure dans les parties aériennes de *A. halleri* lors de la co-culture (Wieshammer *et al.* 2007). La concentration du Zn dans les parties aériennes de *N. caerulea* augmente aussi lorsqu'elle est cultivée avec *Salix dasyclados* (Fuksová *et al.* 2009) ;

- la co-culture d'un hyperaccumulateur et d'un accumulateur augmente la quantité de métal extrait et augmente la biomasse microbienne carbonée dans la rhizosphère. Cela suggère que l'association d'espèces augmente l'exploration du sol et peut être une voie d'amélioration prometteuse pour la phytoextraction (Epelde et al. 2012) ;
- la co-culture d'un hyperaccumulateur et d'une Graminées : une co-culture d'*A. murale* et de ray-grass n'a ni d'effet sur la biomasse, ni sur la concentration en Ni dans *A. murale* (Broadhurst et Chaney 2016) ;
- des co-cultures sans hyperaccumulateur dans lesquelles une espèce à forte production de biomasse, le maïs, est cultivée avec différentes espèces. Lorsqu'elle est cultivée avec une Fabacées, la concentration de Cd augmente significativement dans le maïs comparé au maïs seul. Cependant, la co-culture du maïs avec une autre espèce d'une autre famille, telles que Brassicacées, Graminées ou Amaranthacées, ne modifie pas la concentration du Cd par rapport au témoin (Li et al. 2008).

Ceci montre que de multiples possibilités de co-cultures sont envisageables, mais il est difficile de prévoir les effets.

d) Inoculation de souches d'intérêt

Des essais d'inoculation de souches bactériennes PGPR isolées de la rhizosphère d'*A. murale* peuvent augmenter jusqu'à 40% l'extraction du Ni de cette même espèce par rapport au contrôle non inoculé (Abou-Shanab et al. 2006). De même, chez *A. pintodasilvae* une souche rhizobactérienne, capable de produire des auxines, des sidérophores et de solubiliser le phosphore, améliore la phytoextraction du Ni (Cabello-Conejo et al. 2014). Des champignons mycorhiziens arbusculaires testés sur *B. coddii* permettent d'augmenter la quantité de Ni extrait de 20 fois (Orłowska et al. 2011).

Une méta-analyse réalisée sur 73 publications et présentée par Sessitsch et al. (2013) révèle que dans 60,3% des cas, une augmentation de la biomasse produite est observée suite à l'inoculation de bactéries. Par ailleurs, dans 30,5% des cas il y a une augmentation significative de la concentration de métal dans les parties aériennes, alors que dans 16,3% une diminution significative de la concentration est observée. Dans le cas du Ni, une augmentation de la biomasse et de la concentration a lieu dans 20,3% des cas, alors qu'une diminution seule de la biomasse a lieu que dans moins de 2% des cas. Donc, même si la concentration extraite de Ni n'est pas toujours augmentée sous l'effet de l'inoculum, les bactéries permettent d'augmenter tout de même l'extraction du métal, étant donné l'augmentation de la biomasse produite.

e) Coupes successives au cours de l'année

Une gestion prévoyant deux coupes peut être envisagée sur des hyperaccumulateurs si les espèces sont pérennes. Ces techniques sont utilisées en agriculture sur des ligneux (taillis à courte rotation) ou des herbacées (Graminées pour le fourrage). Deux études ont testé la coupe des hyperaccumulateurs et ont analysé les individus lors de chacune des coupes (Varenes et al. 1996; Robinson et al. 1997a). Pour *Alyssum pintodasilvae* et *B. coddii*, la repousse est rapide et les plantes de la seconde récolte plus concentrées en Ni que la première. Cependant pour *A. pintodasilvae* les coupes sont difficilement comparables car réalisées à un mois puis deux mois après la première coupe (Varenes et al. 1996). Aucune étude ne montre la possibilité de réaliser une coupe à deux moments différents de l'année après un stade avancé du développement des plantes pour évaluer le rendement annuel. Dans le cas de *B. coddii*, cette espèce est pérenne et dispose d'un tubercule. La gestion en plusieurs récoltes annuelles doit donc ainsi être possible mais cette espèce,

endémique d'Afrique du Sud, nécessite des températures clémentes et ne peut donc être implantée partout.

3.4. Évolution et pérennité de l'agroécosystème

a) Multiplication des plantes

Une voie d'amélioration des rendements de culture de plantes hyperaccumulatrices est la sélection et la conservation d'individus performants, c'est-à-dire d'individus avec un potentiel pour l'extraction du Ni supérieur au potentiel moyen de la population. Cela implique la production de semences à partir d'individus sélectionnés. À l'issue de la première culture, les semences des individus en place devraient être récoltées pour établir un germoplasme constitué de semences tolérantes à la matrice. D'autres voies de multiplication peuvent être envisagées telles que la multiplication végétative par bouturage ou marcottage. Il est possible de bouturer une hyperaccumulatrice de Ni (*Stackhousia tryonii*) à partir de parties herbacées sur des milieux enrichis en hormones de croissance (Bhatia *et al.* 2002c). Peu d'essais ont été menés. Néanmoins, des équipes ont mené des essais concluants de micropropagation *in vitro* sur des hyperaccumulateurs à partir d'explants de parties aériennes ou racinaires (Bhatia *et al.* 2002a; b; Corso *et al.* 2005) et d'épicotyles sur des *Alyssum* (Vinterhalter et Vinterhalter 2005; Vinterhalter *et al.* 2008).

b) Suivi de la biodisponibilité

Pour l'agromine, il faut veiller à ce que le métal disponible dans le substrat soit suffisant pour permettre un rendement en métal élevé. Au fur et à mesure du prélèvement par la plante, le métal en solution est épuisé. Pour assurer la disponibilité pour la plante, le pool disponible doit donc être réalimenté. Le métal est libéré par diffusion et libération depuis la phase solide (Lehto *et al.* 2006), mais le stock mobilisable finit par s'épuiser. On estime que sur un sol ultramafique avec une teneur totale de 2 000 mg kg⁻¹ et sur 1 m de profondeur, l'exploitation par phytoextraction peut être effectuée pendant 30 à 60 ans, considérant 10 à 20% du métal total comme disponible pour les plantes (Van der Ent *et al.* 2015a). Ces estimations dépendent de la concentration totale de métal, des phases porteuses, de l'espèce végétale, et du volume de sol exploré par le système racinaire. Sur des sols miniers ou construits amendés, l'évolution de la biodisponibilité des nutriments et des métaux dépend de la décomposition des amendements organiques (Vidal-Beaudet *et al.* 2016) et de la fréquence et durée des apports.

3.5. Exemples de cultures d'hyperaccumulateurs de Ni à l'échelle de la parcelle

a) Phytoextraction sur sites ultramafiques : sols délaissés (Balkans) ou post exploitation minière (tropiques)

En région tempérée, les essais sur parcelles menés en Albanie avec *A. murale* ont conduit à de faibles rendements de Ni dans les premières années (25 kg Ni ha⁻¹ an⁻¹) (Bani *et al.* 2007). Ces rendements ont pu être augmentés jusqu'à 112 kg Ni ha⁻¹ an⁻¹ (Bani *et al.* 2015b). Un cultivar obtenu à partir d'*A. murale* et *A. corsicum* peut concentrer 2% de Ni et produire 20 t ha⁻¹, et ainsi atteindre un rendement de 400 kg Ni ha⁻¹ (Li *et al.* 2003b). Le développement de tel cultivar pourrait permettre d'après Chaney *et al.* (2005) d'atteindre des concentrations de Ni de 3% et extraire ainsi 600 kg ha⁻¹ par culture.

En milieu tropical, des essais de phytoextraction sur site minier contenant du Mn et du Ni en Nouvelle Calédonie ont été conduits en utilisant deux espèces locales. Vingt mois après la plantation, des individus prélevés de *Geissois pruinosa* contenait 1 500 mg kg⁻¹ de Ni et de *Grevillea exul* 2 000 mg kg⁻¹ de Mn (Losfeld *et al.* 2015). D'autres essais sont en cours en Malaisie, à l'échelle de l'hectare, avec *Phyllanthus securinegoides* et *Rinorea bengalensis* pour mettre en évidence la faisabilité de l'agromine. Des paramètres tels que le taux de croissance, la production de biomasse par unité de surface et les concentrations du Ni seront mesurés (Van der Ent *et al.* 2016; Nkrumah *et al.* 2016).

b) La réhabilitation de sites miniers

La construction de sol à partir de matériaux délaissés et contaminés peut conduire à des substrats aux propriétés particulières : pH extrêmes, concentrations de plusieurs centaines de mg kg⁻¹ en métaux, etc. Finalement, les propriétés envisagées peuvent être similaires à celles rencontrées sur des sites miniers ou industriels dont l'exploitation a conduit au dépôt en surface de matériaux libérant des concentrations toxiques d'éléments métalliques, souvent aux pH très acides.

La réhabilitation de sites dégradés et contaminés nécessite une étape de végétalisation car l'installation d'un couvert végétal permet d'une part d'éviter l'érosion et d'autre part, la présence de systèmes racinaires stabilise les polluants et ainsi évite leur lixiviation vers la nappe. L'utilisation d'espèces locales ou à proximité du site à végétaliser ou à traiter assure la conservation de la biodiversité et permet d'augmenter la réussite de l'installation du couvert en favorisant des espèces qui sont de surcroît adaptées au climat et à la pollution (Boukhris *et al.* 2015; Guittonny-Philippe *et al.* 2015; Heckenroth *et al.* 2016). Cependant, dans un objectif de phytoextraction, les espèces présentes localement ne permettent pas toujours d'atteindre des concentrations en métaux extraits suffisamment élevées (Testiati *et al.* 2013). Il s'agit alors de sélectionner des espèces hyperaccumulatrices originaires d'autres sites.

En parallèle du choix des espèces végétales, la réhabilitation nécessite parfois d'améliorer la composition du sol pour permettre le développement des plantes. Plusieurs travaux se sont intéressés à la réhabilitation de sites miniers présentant des caractéristiques extrêmes et des conditions toxiques pour les végétaux, de par leur pH très acide, leur faible CEC et leur faible contenu en matière organique et des concentrations métalliques très élevées (Vega *et al.* 2005). Tordoff *et al.* (2000) proposent différentes solutions de réhabilitation des déchets miniers selon leur contenu en métaux et leur salinité. Pour les sols avec une haute toxicité (concentration en métaux > 0,1% et salinité élevée), deux approches sont envisagées : la première est de semer un cultivar tolérant aux hautes concentrations métalliques et/ou à la salinité ; la seconde consiste à améliorer le substrat en diminuant la toxicité par l'apport d'une couverture et à semer ensuite. Dans les deux cas, il est conseillé de chauler et fertiliser. L'utilisation d'une couverture a été largement développée par Palmer (1990) qui décrit deux matériaux de recouvrement possible, utilisés séparément ou en complémentarité : les améliorants et les amendements inertes. Palmer proposait cinq types de traitement à appliquer sur les sites miniers : i) couvrir *in situ* avec un matériau non contaminé, ii) regrouper dans un endroit les matériaux très contaminés, iii) végétaliser les matériaux avec des plantes tolérantes aux métaux, iv) excaver et enlever du site les matériaux, v) enlever sur site les métaux pour les commercialiser en incorporant la restauration du site.

L'utilisation d'une couverture, se traduisant souvent par l'apport d'amendements, améliore la capacité de rétention de l'eau et des nutriments dans le milieu, et induit un apport d'éléments nutritifs diffusés lentement dans le substrat. Par ailleurs, la biodisponibilité des contaminants est diminuée et donc leur phytotoxicité aussi. De plus, l'utilisation de ces sous-produits organiques évite leur stockage en installation de déchets et permet la revalorisation des déchets industriels (Yang et al, 2013).

Sur un résidu minier riche en Zn et Pb, co-contaminé en Mn, Cr, Cu, Cd, à pH 7,8, avec peu de nutriments et une concentration de Zn de 2 650 mg kg⁻¹, trois sous-produits industriels organiques sont testés à hauteur de 30 t ha⁻¹ (compost de champignons, résidus d'herbes médicinales et vinasse de sorgho doux). Le substrat amendé par rapport au témoin (non amendé) présente : une diminution du Cd, Cu, Pb, et Zn extractibles au DTPA de 10 à 50% selon l'élément, une élévation de l'état nutritionnel du sol (C organique, NH₄⁺ et P disponible), une augmentation de la biomasse microbienne et de la respiration du sol. Les activités enzymatiques sont multipliées par 1,5 à 2 en présence d'amendement. Enfin, la biomasse de *L. perenne* augmente en présence des amendements (couvert végétal et biomasse). Cette étude montre aussi que les amendements organiques ont un effet positif supérieur à celui généré par l'apport de terre avoisinant et utilisé jusqu'alors pour couvrir les résidus miniers et qui avait des résultats similaires à ceux du témoin. Les amendements diminuent aussi significativement la concentration des métaux dans les parties aériennes des plantes testées (deux Graminées, une Astéracées et une Fabacées) (Yang *et al.* 2013, 2016a). D'autres essais sur des sols miniers acides (pH 3 à 4) ont montré l'immobilisation des métaux et une augmentation de la biomasse produite après apport d'amendements organiques (Alvarenga *et al.* 2009).

L'apport de Ca(OH)₂ et de compost permet de végétaliser des sols acides métalliques. L'installation des plantes est rendue possible par l'apport de matière organique plutôt que par la modification du pH (Córdova *et al.* 2011). L'association de biochar et de « technosol » sur des résidus miniers à pH 3 permet d'obtenir un pH de 5 et de cultiver des plantes qui, à leur tour, augmentent davantage le pH (Rodríguez-Vila *et al.* 2015). L'utilisation de chaux et de fumier de poule *in situ*, sur sol très acide (pH 2,6) contaminé aux métaux, permettent d'obtenir l'installation d'un couvert d'espèces non hyperaccumulatrices en six mois (Yang *et al.* 2016b).

Ainsi, la réhabilitation de sites miniers ou industriels très dégradés s'oriente principalement vers de la phytostabilisation, permettant l'immobilisation de la pollution par l'installation d'un système racinaire permanent (plantes pérennes) et par l'augmentation du pH. Cette augmentation est due à l'apport initial d'amendements, et progressivement à l'action des plantes (exsudation et dégradation de la matière organique). Cependant, la phytoextraction est rarement envisagée sur de tels sites du fait de la co-contamination, des rendements faibles, particulièrement les premières années. Il est nécessaire de développer les connaissances sur le comportement et le potentiel des hyperaccumulateurs sur ces milieux particuliers.

3.6. Conclusion

Pour assurer une filière de production de métaux à partir de biomasse végétale, il est nécessaire de choisir :

- des espèces végétales et/ou des individus performants et adaptés ;
- des modes de culture (pratiques culturales/itinéraires techniques et amendements(s)).

Il faut choisir des espèces végétales aptes à l'extraction de grande quantité de métaux, *i.e.* produisant une biomasse élevée avec une concentration élevée en métaux. Ce choix peut

nécessiter des étapes de sélection pour identifier et conserver au sein d'une population les meilleurs individus. Cependant, les recherches en sélection d'hyperaccumulateurs sont encore au balbutiement, les espèces identifiées en milieu naturel étant peu domestiquées. La sélection peut aussi s'appuyer sur d'autres critères tels que la capacité des individus à extraire plusieurs éléments présents dans le sol ou alors exclusivement un en particulier. En effet, les éléments présents dans la solution du sol peuvent entraîner une compétition pour l'accès à la plante et réduire les rendements attendus ou observés dans d'autres conditions.

4. Le génie pédologique pour valoriser des déchets métalliques et créer des substrats

Les sites et sols contaminés en métaux peuvent ainsi assurer un approvisionnement en métal. Ce service peut s'inscrire comme un service écosystémique d'approvisionnement rendu par ces écosystèmes particuliers (Morel *et al.* 2014). Aussi, l'agromine participe à la diminution du contenu métallique de ces sols, et donc atténue la pollution, rendant un service de régulation de ces milieux.

Certains résidus d'origine urbaine, minière ou industrielle, qualifiés de « déchets toxiques » contiennent des métaux, à des concentrations plus ou moins élevées, seuls ou en mélange. Par exemple, les bains de cataphorèse mis en œuvre pour le traitement de surface dans l'industrie automobile ou aéronautique donnent lieu à des boues riches en Ni. De même, des résidus d'incinération d'ordures ménagères contiennent différents métaux. Pour l'instant, ces résidus ne sont généralement pas valorisés, mais stockés en centre de stockage de déchets dangereux. Or, dans le cadre de l'économie circulaire et de la diminution des ressources en matières premières, leur recyclage peut être extrêmement pertinent.

Plusieurs voies peuvent être envisagées pour traiter et valoriser ces matériaux. Si les teneurs en métaux sont élevées, il est préférable de traiter directement par mise en solution pour séparer et récupérer les métaux par hydrométallurgie ou électrolyse. La pyrométallurgie, par traitement thermique, peut aussi permettre d'extraire les métaux des matériaux. En revanche, si les teneurs sont faibles, la récupération des métaux par la culture de plantes, l'agromine, peut être envisagée. Pour l'instant, le seuil de concentration déterminant le choix de la technique appropriée reste à déterminer (Simonnot *et al.* 2017).

Les matrices contenant des métaux peuvent ne pas être fertiles. Aussi, la mise en œuvre de l'agromine sur ces milieux extrêmes peut requérir la construction d'agrosystèmes dont les propriétés permettront l'installation de plantes.

Dans cette partie, seront abordés la mise en évidence de déchets métalliques, puis l'état de l'art sur, dans un premier temps la construction de sol par le génie pédologique pour formuler des substrats fertiles et, dans un second temps pour formuler des substrats pour l'agromine.

4.1. Utilisation des déchets métalliques

L'exploitation des ressources produit des matériaux secondaires qui pourraient faire l'objet d'un traitement par phytoextraction. Ces matériaux entreraient alors dans la composition de substrat pour la culture de plante. En effet, les industries minières et industrielles génèrent des matériaux secondaires qui peuvent contenir des concentrations élevées en métaux à des niveaux

extrêmement toxiques pour les organismes. Le recyclage des métaux issus de ces déchets peut être une nouvelle voie d'approvisionnement en métaux et les plantes pourraient être les acteurs de ce recyclage. La récupération par voie biologique nécessite de trouver une issue pour cultiver les plantes sur ces déchets. La mise au point de substrat à partir de ces déchets est une solution. Même si la réhabilitation *in situ* de site miniers ou la végétalisation de site industriels ont déjà été testées, la formulation de sols à partir de déchets confinés n'a pas été expérimentée. C'est une des pistes de recherche développée dans le projet LORVER. L'élaboration d'un substrat pour l'agromine requiert différentes caractéristiques : des propriétés chimiques et physiques permettant le développement des plantes, soit une fertilité chimique, physique et la présence de métaux disponibles. La première piste à envisager est la culture des plantes sur le matériau seul. Par ailleurs, il faut sélectionner des plantes aptes à se développer sur ces matrices originales et capables de récupérer et concentrer les métaux d'intérêts. Les connaissances de la végétalisation de sites fortement contaminés et de la construction de sol appuient le développement de ces nouveaux substrats aux propriétés extraordinaires.

4.2. La construction de sol

L'élaboration de substrats fait appel à l'**ingénierie pédologique** et, en particulier, à la construction de sol. Cette ingénierie a été développée récemment, s'appuyant sur l'utilisation de terres et déchets industriels (Séré 2007) et de déchets urbains (Rokia 2014). Le sol construit est formulé en fonction des usages auxquels il est destiné et donc des services attendus. Un **service d'approvisionnement** en biomasse, dans le cadre de l'agromine, nécessite un substrat fertile, *i.e.* avec des propriétés agronomiques favorables au développement des végétaux, telles que le contenu en matières organiques et le pH, d'autres paramètres tels que le C total, P disponible et la CEC peuvent être mesurés (Rokia 2014; Yilmaz *et al.* 2016).

Trois projets de recherche ont successivement permis de développer des connaissances et des expériences sur la construction de sol : BIOTECHNOSOL, SITERRE et LORVER. Le projet **BIOTECHNOSOL** (BIODiversité et fonctionnement d'un TECHNOSOL construit utilisé dans la restauration de friches industrielles), financé par Gessol, a étudié la dynamique de colonisation d'un technosol par les organismes vivants et leurs effets sur la pédogénèse de celui-ci. Une parcelle d'1 ha a été construite en 2007 sur la plateforme expérimentale du GISFI suite à un procédé développé dans le cadre d'un partenariat entre le Laboratoire Sols et Environnement et le Groupe TVD (Séré 2007). Le Technosol a été élaboré à partir de sous-produits papetiers, de terre industrielle traitée et de compost (Séré *et al.* 2008) Le programme de recherche **SITERRE** (Procédé de construction de Sols à partir de matériaux Innovants en substitution à la TERRE végétale et aux granulats de carrière), porté par Plante & Cité et financé par l'ADEME, s'est déroulé de 2011 à 2015 et a donné lieu à un ouvrage (Damas et Coulon 2016). Ce projet a développé une démarche de génie pédologique pour parvenir à la construction de sols avec deux objectifs recherchés: fertilité et portance du substrat. À partir du Catalogue Européen des Déchets, les matériaux sont sélectionnés en fonction de leurs propriétés et selon différents critères (Figure 8). Au final, onze matériaux sont retenus : compost, déchets verts, boue de station d'épuration, sous-produits papetiers, déchets de balayage de rue, deux terres excavées (acide et basique), béton, briques, déchets de bâtiments et ballasts. Ils sont agencés par deux ou trois afin de proposer des formulations adaptées aux usages en milieux urbains, squares et parcs urbains d'une part, et fosses de plantation d'arbre d'alignement d'autre part.

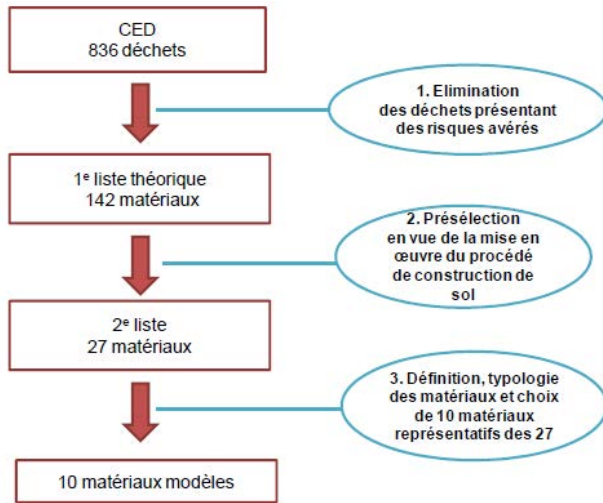


Figure 8 _ Synthèse des étapes de sélection des matériaux dans le cadre du projet SITERRE (Rokia 2014) CED : Catalogue Européen des Déchets

Dans le cadre du projet **LORVER**, l'objectif est de valoriser les sous-produits par la construction de sol afin de produire de la biomasse pour différents usages (cf. Introduction générale et Figure 9). Des sols ont été construits d'abord à l'échelle de petites parcelles (15*15 m) puis d'autres parcelles à l'échelle supérieure (plus de 1 ha), en vue de produire de la biomasse à vocation industrielle (peuplier, chanvre, ortie). Les petites parcelles sont contaminées en métaux lourds et ont pour objectif d'observer le transfert ou non des contaminants dans la biomasse et si les propriétés des végétaux sont modifiées du fait de la présence de métaux (Kanso 2016). Les plus grandes parcelles sont exemptes de contaminants et vont permettre de produire de la biomasse à usage non alimentaire et démontrer la faisabilité d'un approvisionnement en biomasse produite sur des sols construits. L'ensemble des formulations s'appuie sur la volonté d'employer des sous-produits délaissés et de créer des sols durables pour les décennies à venir.

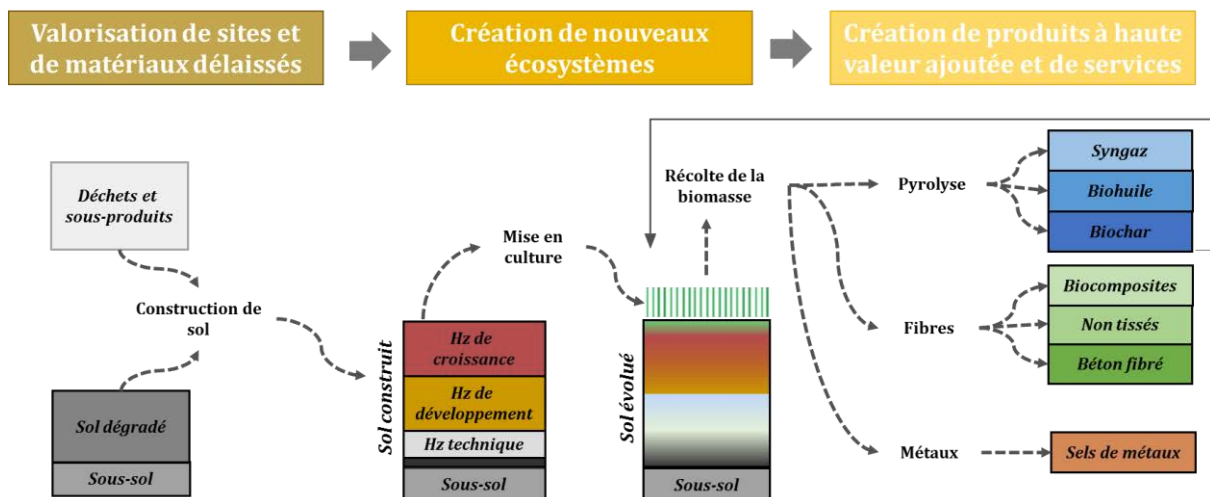


Figure 9 _ Schéma conceptuel du projet LORVER, de la construction de sol à la valorisation de la biomasse produite

Dans le cadre de cette thèse et comme évoqué ci-avant, le travail aura pour objectif de répondre à cette dernière production (hydrométallurgique). Le substrat élaboré contiendra donc des métaux et sa durée de vie sera celle de l'exploitation de son contenu en métal. Ainsi, un seul horizon est

élaboré pour permettre la croissance et le développement des plantes. Le choix des matériaux et la formulation du substrat sont donc effectués en fonction des services attendus (Figure 10).

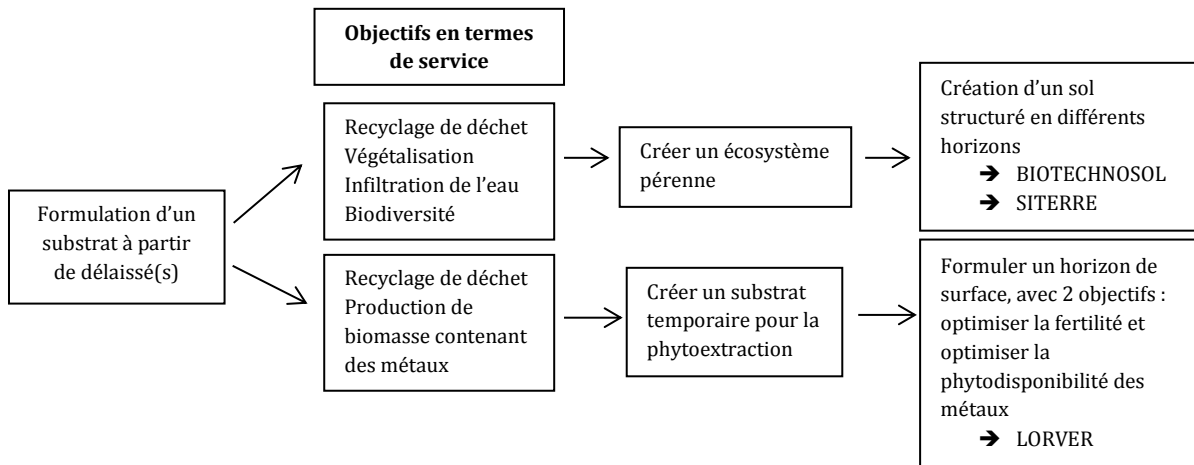


Figure 10 _ Schéma conceptuel des objectifs de la construction de sol

Les sols ainsi créés dans ces projets, étant donné la présence importante de matériaux technogéniques, sont classés parmi les **Technosols** selon la classification *World Reference Base for Soil Resources* (WRB). Si les processus pédogénétiques peuvent être comparés entre ces sols et les sols naturels (Huot *et al.* 2013), l'association de ces processus au sein du même Technosol peut s'avérer originale du fait de l'assemblage de matériaux aux propriétés physico-chimiques particulières, ainsi qu'à la forte hétérogénéité présente (Séré *et al.* 2010; Huot *et al.* 2015b). L'altération des matériaux technogéniques, tels que les déchets industriels, est rapide et intense (Zevenbergen *et al.* 1999) et entraîne une évolution plus rapide et intense des Technosols dans les premiers temps après leur mise en place que dans les sols naturels (Séré 2007). Les propriétés des Technosols sont fortement liées à celles des matériaux parents (Zikeli *et al.* 2004; Huot *et al.* 2014; Rokia *et al.* 2014). Dans le cadre de production de biomasse, le type de matière organique peut ainsi jouer un rôle essentiel (Vidal-Beaudet *et al.* 2016). Ainsi, lors de la construction de sol, le choix des constituants initiaux est primordial.

Cette démarche s'applique à sélectionner des matériaux délaissés, sous-produits ou matériaux secondaires non valorisés ou bien des déchets non ré-employés. Elle constitue ainsi une alternative à l'utilisation des ressources non renouvelables (terre agricole, tourbe). La combinaison de matériaux complémentaires permet d'améliorer le potentiel de fertilité du substrat. Ainsi, sur une terre traitée le développement racinaire est meilleur en présence d'un amendement (Séré *et al.* 2008). Les déchets utilisés peuvent être classés en différentes catégories selon leurs propriétés et leurs avantages d'utilisation :

- les matériaux grossiers participent à l'aération du substrat (déblais, gravats, briques, granulats...);
- les matériaux avec une importante capacité de rétention en eau constituent une réserve d'eau dans le substrat améliorant le développement des plantes (boues de papeterie, compost);
- les composés organiques augmentent les capacités de rétention des éléments et diffusent des nutriments pour le développement des plantes (biochar, compost...).

Les matériaux délaissés représentent un gisement non négligeable de ressources non valorisées. Par exemple, à l'échelle de la Lorraine, plusieurs dizaines de milliers de tonnes de matériaux sont

produits chaque année (Tableau 5). Ces matériaux peuvent être de composition très variée, depuis des matières minérales à organiques ainsi que des matériaux de composition intermédiaire.

Tableau 5 _ Matériaux délaissés en Lorraine (Colin et Guimont 2013; De Rauglaudre et Louchez 2013)

Flux annuels de matériaux délaissés (t an⁻¹)	
Terre traitées	85 000
Cendres volantes	70 000
Sédiments de dragage	50 000
Boues industrielles	52 000
Sables de fonderie	15 000
Boues de l'industrie agro-alimentaire	27 000
Déchets verts	7 500
Déchets de démolition	7 000

Au-delà de la reconstitution de sol, nécessaire à la réhabilitation des sites dégradés (miniers, industriels, etc.), la construction de sol met en avant une démarche environnementale respectueuse et s'attache à valoriser et recycler les matières délaissées (Damas *et al.* 2016). Pour les parcelles LORVER, une analyse du cycle de vie a montré l'intérêt et les limites de la démarche (Rodrigues 2016). L'objectif est de créer des sols durables, ce qui est différent dans le cadre de l'agromine où l'objectif est d'obtenir un substrat fertile et contenant des métaux. Le développement de végétaux est possible sur des Technosols contenant des concentrations métalliques très élevées (Huot *et al.* 2015a). La composition de substrats pour l'agromine peut s'apparenter à la composition des sols miniers, industriels, dégradés qui sont réhabilités ou « reconstruits » pour permettre le développement de végétaux (phyto-stabilisation ou -extraction).

4.3. La construction de sols pour l'agromine du Ni

Il s'agit, à partir de matériaux délaissés, de créer les conditions de croissance des plantes et du transfert des métaux, c'est-à-dire la partie agronomique de la filière agromine. Celle-ci est en amont de la filière de production de produits à base de métaux et nécessite de rassembler des propriétés nécessaires pour le développement de végétaux dans un substrat élaboré à partir de déchets. Ainsi, cette démarche s'inscrit comme une toute première étape de l'agromine et constitue une recherche en amont des schémas déjà établis (Figure 11). Ceux-ci consistent à commencer « l'exploitation minière », donc l'extraction de métaux, à partir d'un sol ultramafique, c'est-à-dire avec un substrat déjà en place. Dans le cas de ces travaux, la première étape consiste donc, en amont de la culture de plantes, à sélectionner et agencer des matériaux.

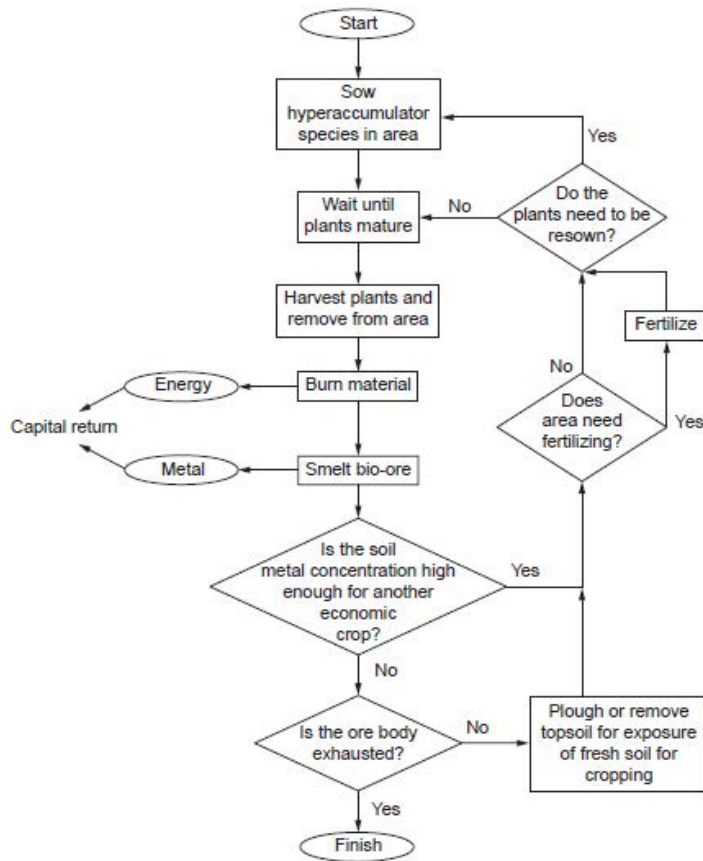


Figure 11 _ Modèle pour un système économique viable de phytomining (Brooks *et al.* 1998)

Pour la mise en œuvre de l'agromine, l'objectif est de construire un substrat contenant des métaux et, fertile, pour permettre la culture des plantes, afin de i) récupérer les métaux et ii) détoxifier le milieu.

La première étape consiste à identifier des déchets riches en Ni et quantifier les gisements. Il s'agit ensuite de caractériser ces déchets et de formuler un substrat fertile à l'aide d'amendements appropriés. Les paramètres déterminants seront : la teneur en métaux, le pH, les concentrations en nutriments et en matière organique et la capacité de rétention en eau.

La seconde étape vise à sélectionner les plantes et étudier leur installation sur ces substrats en menant des expériences de germination et croissance.

Enfin, la troisième étape est de passer à l'échelle de la parcelle pour étudier le développement des plantes en conditions réelles, établir des bilans de matières sur les différents éléments et surveiller la composition des lixiviats.

À l'heure actuelle, à notre connaissance, deux expérimentations de ce type ont été menées. Une première dans le cadre du projet LORVER où des substrats ont été formulés avec de la terre traitée par biopile mélangée avec des boues métalliques (contaminées en Pb, Zn, Cu et Cd) en présence ou non de biochar sur lesquels était cultivé l'hyperaccumulateur *N. caerulea* (ainsi que peuplier, chanvre et ortie pour produire de la biomasse). Les essais en parcelle ont été conduits en Lorraine (France) (Kanso 2016). D'autres études ont été menées à Vienne (Autriche) afin de récupérer les métaux de déchets urbains incinérés (Rosenkranz *et al.* 2017). Des substrats ont été

élaborés avec des cendres et des résidus de traitement biologique de déchets municipaux amendés avec du biochar de bois. Sur ce substrat, ont été cultivées cinq espèces différentes dont deux hyperaccumulateurs en vase de végétation, mais la production de biomasse s'avère difficile du fait des propriétés physico-chimiques du substrat dont des concentrations métalliques élevées.

Les données acquises en parcelle devront permettre de dimensionner l'expérience en grandeur réelle et de répondre à des questions fondamentales pour évaluer la pertinence de l'approche :

- Les plantes peuvent-elles se développer sur ces agrosystèmes en conditions climatiques réelles ?
- Quelles quantités de métaux peuvent-elles prélever, ou autrement dit, quel est le nombre de récoltes nécessaires pour détoxifier le milieu ?

5. Conclusion

L'exploration botanique permet aujourd'hui de disposer d'une large palette d'hyperaccumulateurs pour l'extraction de différents éléments, tels que le Ni, Zn, Co etc. (Brooks *et al.* 1977; Baker et Brooks 1989; Van der Ent *et al.* 2013, 2016). Cette haute diversité permet d'adapter le choix de l'espèce pour la phytoextraction selon le type de contaminant et le climat. Cependant, leur domestication et la maîtrise de leur culture restent partielles et il est nécessaire de sélectionner des individus tolérants la toxicité métallique, produisant une forte biomasse et performant pour l'extraction du métal sélectionné. Cette sélection doit s'accompagner par la mise au point de méthodes de multiplication et de conservation des individus (multiplication sexuée et asexuée), la multiplication végétative étant peu explorée pour les hyperaccumulateurs.

Si le développement de l'agromine sur des sols ultramafiques permet aujourd'hui d'obtenir des rendements de Ni de $112 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, la transposition de ce procédé à des matrices anthropiques multicontaminées, telles que les sites miniers ou des déchets métalliques, s'avère complexe et nécessite de plus amples recherches. La phytoextraction sur ces matrices implique d'améliorer le substrat pour créer les conditions d'installation et de croissance des plantes : apport de matériaux organiques suivi du choix d'itinéraires de culture (fertilisation, inoculation, densité de semis, etc.) pour garantir les meilleurs résultats. Ainsi, les essais effectués sur ces matrices peuvent aider à la compréhension des mécanismes de compétition entre éléments et, face à la mise en évidence des facteurs limitants, proposer des solutions concrètes validées *in situ*. L'utilisation de biochar n'a pas été testée dans le cadre de la culture d'hyperaccumulateurs de Ni. Cependant, elle permet d'améliorer l'installation et le développement des plantes, et dans certains cas l'extraction de métaux. Il est donc nécessaire d'explorer cet amendement dans un contexte d'agromine du Ni.

Récemment, des travaux ont été menés sur la construction de sol à destination principalement des milieux urbains, dans lesquels les sols souvent perturbés par les activités anthropiques sont fortement dégradés voir absents. Cette technique s'appuie sur la volonté d'utiliser des ressources non valorisées, préservant les matières non renouvelables telles que la terre végétale. Dans le cadre de l'agromine, l'utilisation de matériaux délaissés dans l'élaboration d'un substrat n'a que très récemment été explorée pour le cas du Cd et Zn, mais pas pour le Ni. Ainsi, de nouveaux champs de recherche s'ouvrent d'une part pour l'identification de matériaux potentiellement utilisables et par ailleurs sur la connaissance de leurs propriétés seuls, assemblés et de leur vieillissement en tant que substrat.

L'enjeu de cette thèse est donc de démontrer la faisabilité de l'élaboration de substrats pour l'agromine, particulièrement du Ni, et ainsi de proposer une nouvelle voie de l'agromine, non plus à partir de sites ultramafiques ou dégradés, mais par la mise en place d'agroécosystèmes construits à partir de matériaux délaissés métalliques, en alliant génie végétal et génie pédologique (Figure 12).

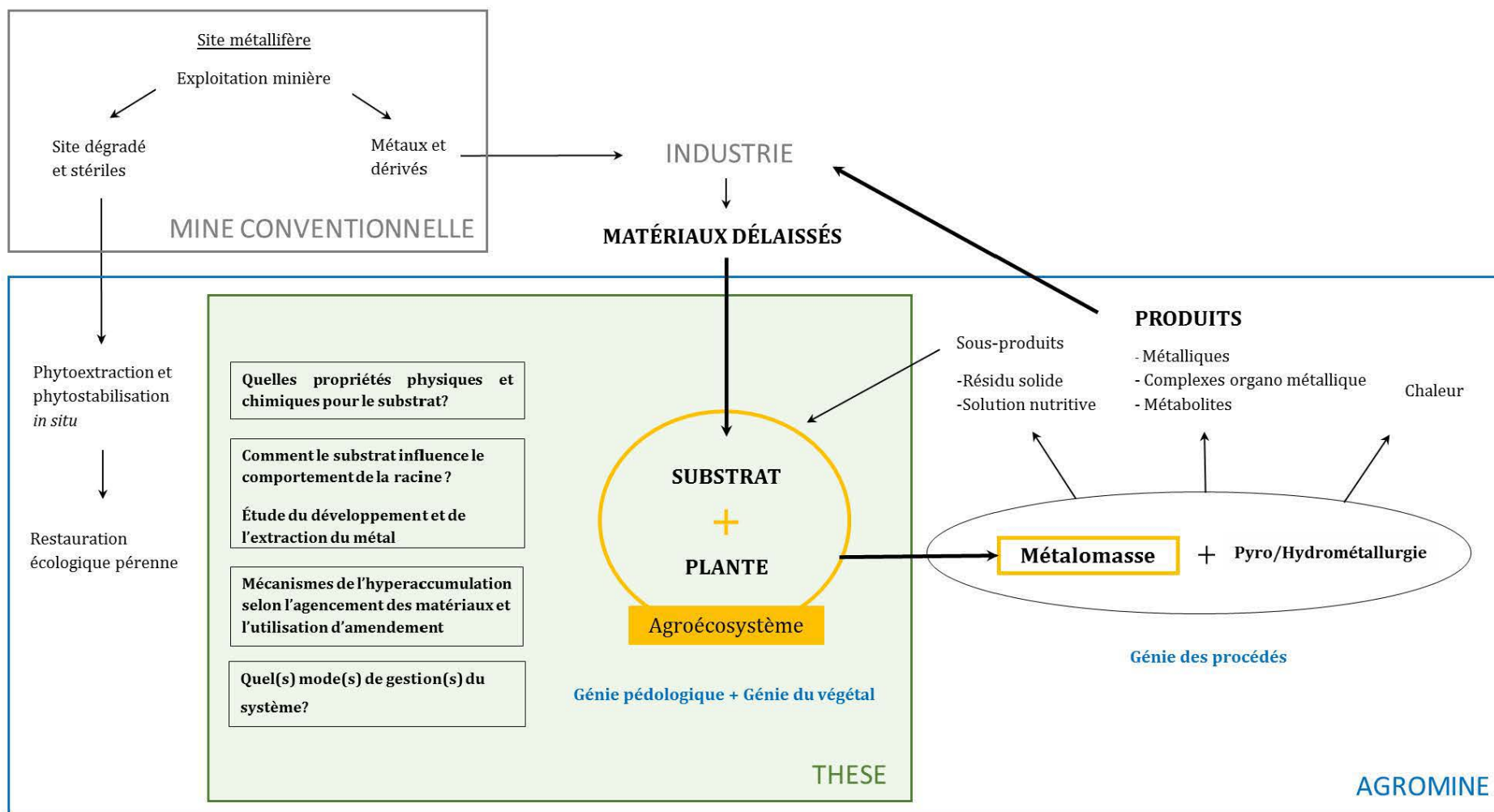


Figure 12 _ Insertion des travaux de thèse dans la filière agromine : un système de production et de valorisation de la biomasse à faible intrant et faible coût

PARTIE 2

Matériels et méthodes

Cette partie présente les espèces végétales, leur provenance et les matériaux utilisés pour constituer les substrats pour l'agromine. Certains résultats seront présentés en annexes, cependant, l'ensemble des matériaux est présenté dans cette partie pour permettre de comparer les provenances et les compositions. Les tests mis en œuvre et les méthodes d'analyses des échantillons liquides et solides sont également décrits. Les dispositifs propres à chaque expérimentation seront ensuite détaillés dans les chapitres qui rapportent les résultats des expériences.

1. Matériels

1.1. Espèces végétales

Les espèces hyperaccumulatrices de métaux utilisées dans les expérimentations appartiennent à la famille des Brassicacées ou des Astéracées. Des espèces non hyperaccumulatrices sont utilisées comme témoin.

Hyperaccumulateurs de Ni de la famille des *Brassicacées* : quatre espèces de Brassicacées bisannuelles hyperaccumulatrices de Ni ont été choisies : *Alyssum murale* (Waldst & Kit), *Noccaea tymphaea*, *Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz (anciennement appelée *Ptilotrichum emarginata*), *Bornmuellera tymphaea* (Hauskn) (décrite en 1886 sous le nom de *Vesicaria tymphaea*). Les graines ont été prélevées lors de quatre campagnes réparties entre juillet 2011 et août 2014 sur huit sites ultramafiques de Grèce (sites I à VIII) et un site en Albanie (Tableau 6). Considérant qu'une même espèce trouvée sur deux sites différents donne lieu à deux populations distinctes de cette espèce, plusieurs populations des quatre espèces ont été utilisées : huit populations d'*A. murale*, cinq populations de *L. emarginata*, trois populations de *B. tymphaea* et une population de *N. tymphaea*.

Hyperaccumulateurs de Ni de la famille des *Astéracées* : deux espèces ont été sélectionnées : *Centaurea thracica* et *Berkheya coddii*. Les graines de la première ont été prélevées en Grèce (site II), en août 2014 (Tableau 6). Les graines de *B. coddii* proviennent d'Afrique du Sud : sites d'Agnes Mine et de Queens River et ont été prélevées en février 2015. Sur le site d'Agnes Mine, quatre lots de graines sont constitués et deux sur le site de Queens river.

Espèces non hyperaccumulatrices : deux Graminées ont été retenues : i) le maïs, *Zea mays* L., hybride expérimental MB862, créé par l'INRA en 2004 (à partir des lignées F356 (femelle) et D171(mâle)), enrobé avec un fongicide Syngenta® (2,40%p/p Fludioxonil et 0,93%p/p Metaxyl-M) et ii) le ray-grass italien, *Lolium multiflorum* Lam. Cv. Lema.

Tableau 6 _ Description des sites de récoltes des graines d'hyperaccumulateurs de Ni

N° site	Nom du site et altitude	Année de récolte	Espèce (s)	Concentration Ni total / Ni _{DTPA} (mg kg ⁻¹) dans le sol
S I	Grèce, 814 m	2011	<i>A. murale</i>	n.a. / n.a.
S II	Trigona-Metsovo (Grèce), 830 m	2011 et 2013	<i>A. murale</i> , <i>L. emarginata</i> , <i>B. tymphaea</i>	2 660 / 130
S III	Col de Katara (Grèce), alt 1690-1705m	2011	<i>Noccaea tymphaea</i>	1 160/ 150
		2014	<i>A. murale</i> , <i>L. emarginata</i> , <i>B. tymphaea</i>	
S IV	Kteni (Grèce), 750 m	2013	<i>A. murale</i>	n.a. / 10
S V	Prokopi (Grèce), 55 m	2013	<i>A. murale</i>	n.a. / 200
S VI	Près de Katara (Grèce), 1600 m	2014	<i>L. emarginata</i> et <i>B. tymphaea</i>	n.a. / n.a.
S VII	Route de Ziakas à Greneva (Grèce), 902 m	2014	<i>A. murale</i>	n.a. / n.a.
S VIII	Valia Kalda (Grèce), 1 800 m	2014	<i>A. murale</i> et <i>L. emarginata</i>	n.a. / 450
Albanie S IX	Prenjas près de Domosdova (Albanie), 600 m	2012	<i>A. murale</i>	2 930 / n.a.

1.2. Matériaux

Trois types de matériaux ont été utilisés pour la construction des substrats de culture : i) des boues industrielles métalliques contenant des éléments stratégiques, tels que Ni et Co ; ii) des terres excavées ou traitées qui ne sont pas considérées comme « agricoles ou végétales », et iii) des amendements pour améliorer la fertilité du substrat. Ces matériaux proviennent de diverses sources et la multiplicité des lots pour certains matériaux s'explique par l'usage répété mais étalé sur la durée de la thèse de ces matériaux. Les différents lots avaient la même provenance. Même si la composition peut varier pour certains éléments entre les différents lots, la multiplicité des lots permet de rendre robustes les résultats obtenus successivement avec les différents lots.

a) Boue industrielle métallique

Boue de phosphatation : boue A - Le procédé de cataphorèse est un traitement anticorrosion appliqué à des pièces métalliques dans l'industrie, notamment automobile. Ce procédé consiste en une succession d'étapes au cours desquelles les pièces métalliques sont plongées dans différents bains liquides. Parmi ceux-ci, un bain acide composé de phosphate de Ni et Zn est déposé par électrophorèse sur les pièces métalliques. La filtration par filtre-pressé génère un résidu solide contenant 170% d'humidité appelé boue de phosphatation (Figure 13). Dans la suite, cette boue est appelée « boue A ». Trois lots ont été utilisés et dénommés Lot 1 (Partie 4), Lot 2 (Partie 5 Chapitre 1) et Lot 3 (Partie 5 Chapitre 2).



Figure 13 _ Photographie de la boue de phosphatation (Boue A)

Deux autres boues métalliques provenant de procédés industriels et contenant du Ni ont été étudiées (Annexe 1).

Les boues sont séchées à température ambiante, broyées dans un mortier en silice puis tamisées à 2 mm. Les 3 lots de boue A, de compositions assez proches, possèdent des concentrations élevées en Fe (>25%), P (21,5%), Zn (6,34 à 6,70%), Na (>2%), Mn (1%) et de 0,47 à 0,63% de Ni (pourcentages massiques) (Tableau 7). Le Fe présent dans la boue A est essentiellement sous forme amorphe (rapport $Fe_{\text{amorphe}} / Fe_{\text{cristallisé+amorphe}}$ proche de 1). Son pH est de 3,9. Elle présente des concentrations élevées en Ni, Zn et Mn extractibles au DTPA. La boue B est alcaline. Elle contient les mêmes éléments que la boue A mais avec des concentrations plus faibles en P (8,33%), Zn (1,30%), Fe (0,92%) et Mn (0,81%). Elle contient davantage de Ni (1,18%) et surtout 19% de Ca. Elle présente une concentration élevée en Ni DTPA. La boue C a plusieurs éléments extractibles au DTPA avec des concentrations élevées : Cu, Co et Ni. Son pH est de 9,87. Elle contient Fe (25,2%), Bi (18,1%), Ni (3,5%), Zn (3,4%), Na (2,84%), Co (2,8%), Cu (2,7%) et Sb (0,54%) et se caractérise par une forte teneur en Bi.

Tableau 7 _ Caractéristiques physico-chimiques des boues métalliques (Pourcentages massiques)

Paramètres	Boue A_ Lot 1	Boue A_ Lot 2	Boue A_ Lot 3	Boue B	Boue C	Unité
Paramètres agronomiques						
pH eau ¹	3,86 ± 0,03	4,03 ± 0,02	3,93 ± 0,01	8,48 ± 0,04	9,87 ± 0,01	-
Conductivité ²	2,08 ± 0,35	1,94 ± 0,09	1,89 ± 0,08	0,599 ± 0,021	11,1 ± 0,4	mS cm ⁻¹
C organique ³	2,11	-	3,43	-	-	g kg ⁻¹
N total ³	13,9	-	12,6*	-	-	g kg ⁻¹
C/N ³	0,15	-	0,27	-	-	-
Matière organique ³	3,64	-	5,92	-	-	g kg ⁻¹
P ₂ O ₅ Olsen ⁴	6,19					g kg ⁻¹
Oxydes amorphes et cristallins						
Al ⁵	27,7 ± 1,2	28,7 ± 1,2	18,9 ± 1,3	33 487 ± 214	4 150 ± 29	mg kg ⁻¹
Fe ⁵	18,6 ± 0,1	19,1 ± 0,257	19,7 ± 0,2	0,551 ± 0,007	7,89 ± 0,14	%
Mn ⁵	0,176 ± 0,001	0,192 ± 0,005	0,179 ± 0,004	0,343 ± 0,006	0,0787 ± 0,0022	%
Ni ⁵	0,0982 ± 0,0029	0,107 ± 0,008	0,0822 ± 0,0021	0,961 ± 0,017	1,69 ± 0,01	%
Al ⁶	63,2 ± 17,1	47,6 ± 16,0	93,6 ± 0	32 729 ± 610	6 023 ± 68	mg kg ⁻¹
Fe ⁶	18,7 ± 0,03	19,0 ± 0,1	19,0 ± 0,1	0,784 ± 0,006	20,9 ± 0,3	%
Mn ⁶	0,821 ± 0,007	0,895 ± 0,004	0,746 ± 0,003	0,785 ± 0,007	0,299 ± 0,004	%
Ni ⁶	0,489 ± 0,003	0,549 ± 0,001	0,395 ± 0,004	1,174 ± 0,011	2,58 ± 0,02	%
Éléments pseudo-totaux⁷						
Al	66,1 ± 8,8	41,4 ± 2,2	27,5 ± 0,4	32 417 ± 279	7 848 ± 78	mg kg ⁻¹
As	1,48 ± 0,09	1,84 ± 0,13	2,54 ± 0,02	9,04 ± 0,22	20,1 ± 0,1	mg kg ⁻¹
B	<LD	3,87 ± 0,11	<LD	9,41 ± 0,29	234 ± 3	mg kg ⁻¹
Bi	<LD	<LD	<LD	<LD	18,1 ± 2,9	%
Ca	0,144 ± 0,002	0,125 ± 0,002	0,129 ± 0,0003	18,8 ± 0,2	0,669 ± 0,053	%
Cd	0,533 ± 0,006	0,583 ± 0,001	0,653 ± 0,010	<LD	71,5 ± 3,3	mg kg ⁻¹
Co	5,56 ± 0,07	6,06 ± 0,04	5,21 ± 0,02	11,5 ± 0,2	28113 ± 132	mg kg ⁻¹
Cr	41,5 ± 0,3	51,3 ± 0,7	61,0 ± 0,3	<LD	512 ± 23	mg kg ⁻¹
Cu	12,1 ± 0,2	9,53 ± 0,16	13,9 ± 0,1	27,0 ± 0,6	27 014 ± 154	mg kg ⁻¹
Fe	24,9 ± 1,0	25,4 ± 0,3	26,2 ± 0,2	0,921 ± 0,009	25,2 ± 1,4	%
K	2 225 ± 23	2 657 ± 19	2 710 ± 11	1 753 ± 20	147 ± 2	mg kg ⁻¹
Mg	<LD	<LD	<LD	0,214 ± 0,003	0,784 ± 0,013	%
Mn	0,994 ± 0,017	1,08 ± 0,01	0,936 ± 0,009	0,813 ± 0,011	0,327 ± 0,002	%
Mo	<LD	<LD	<LD	<LD	0,689 ± 0,012	%
Na	2,70 ± 0,02	2,22 ± 0,01	2,05 ± 0,02	0,0402 ± 0,0003	2,84 ± 0,02	%
Ni	0,566 ± 0,009	0,627 ± 0,006	0,470 ± 0,001	1,18 ± 0,02	3,52 ± 0,01	%
P	21,4 ± 0,7	21,9 ± 0,3	21,6 ± 0,1	8,33 ± 0,16	0,837 ± 0,003	%
Pb	10,2 ± 0,1	9,81 ± 0,08	9,02 ± 0,11	4,18 ± 0,08	42,2 ± 3,4	mg kg ⁻¹
S	153 ± 0,5	175 ± 6	124 ± 2	6 668 ± 119	3 199 ± 87	mg kg ⁻¹
Sb	<LD	<LD	<LD	-	0,544 ± 0,036	%
Zn	6,70 ± 0,01	6,34 ± 0,32	6,35 ± 0,03	1,30 ± 0,02	3,44 ± 0,02	%

Paramètres	Boue A_ Lot 1	Boue A_ Lot 2	Boue A_ Lot 3	Boue B	Boue C	Unité
Éléments extractibles au DTPA⁸						
Bi	<LD	<LD	<LD	<LD	55,0 ± 0,6	mg kg ⁻¹
Co	0,340 ± 0,037	0,402 ± 0,029	0,387 ± 0,044	0,292 ± 0,025	199 ± 1	mg kg ⁻¹
Cu	0,557 ± 0,034	0,409 ± 0,040	0,581 ± 0,055	0,881 ± 0,039	290 ± 3	mg kg ⁻¹
Fe	4,97 ± 1,12	3,18 ± 0,31	4,95 ± 1,49	1,75 ± 0,23	10,0 ± 0,9	mg kg ⁻¹
Mn	179 ± 21	185 ± 12	181 ± 18	3,84 ± 0,24	<LD	mg kg ⁻¹
Ni	815 ± 77	919 ± 31	746 ± 60	306 ± 12	156 ± 2	mg kg ⁻¹
Zn	776 ± 79	693 ± 30	738 ± 94	13,7 ± 1,8	27,3 ± 0,5	mg kg ⁻¹

¹pH eau selon NF ISO 10390, ²Conductivité totale sur extrait filtré 1/5 (m/v) à 25 °C, ³C organique et N total, NF ISO 10694 et NF ISO 13878, ³N selon Kjeldahl, adaptée de NF EN 13342 (Eurofins), ⁴P disponible, méthode Olsen NF ISO 11263, ⁵Méthode Tamm en obscurité, méthode LSE ¹, ⁶Méthode Mehra-Jackson, méthode LSE ¹, ⁷Dosage des éléments après extraction à l'eau régale, NF EN ISO 11885 et NF EN 13346, ⁸Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique, NF X 31-121/NF ISO 22036.

Le diffractogramme de la boue A (Figure 14a) confirme la nature amorphe du matériau (Tableau 7). Dans le cas de la boue B, les pics correspondraient à de la nitratine (NaNO₃), de la lansfordite (MgCO₃·5(H₂O)) de la Fayalite (Mg 0,26 Fe 1,74 SiO₄) et de la pyrrhotite (Fe₇S₈) (Figure 14b). Les images (MEB) des boues A et B montrent l'absence de structure cristallisée et anguleuse. Les particules de boue sont de tailles diverses et de formes irrégulières plus ou moins ovoïdes, à la surface granulaire (Figure 15). Les spectres obtenus EDX couplés au MEB montrent des concentrations élevées en P, Fe et Mn dans la boue A et en Ca et P dans la boue B (Figure 16). Le Ni, en concentration faible n'apparaît pas sur ces spectres.

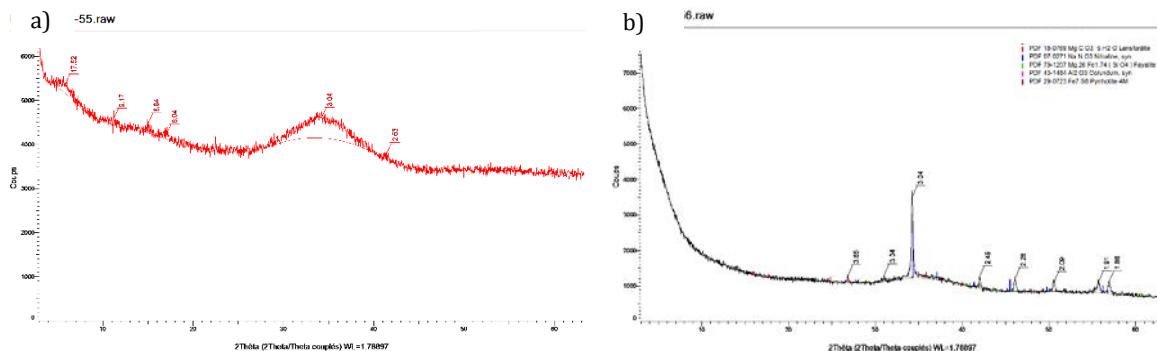


Figure 14 _ Diffractogramme de a) la boue A (Lot 2) et b) la boue B

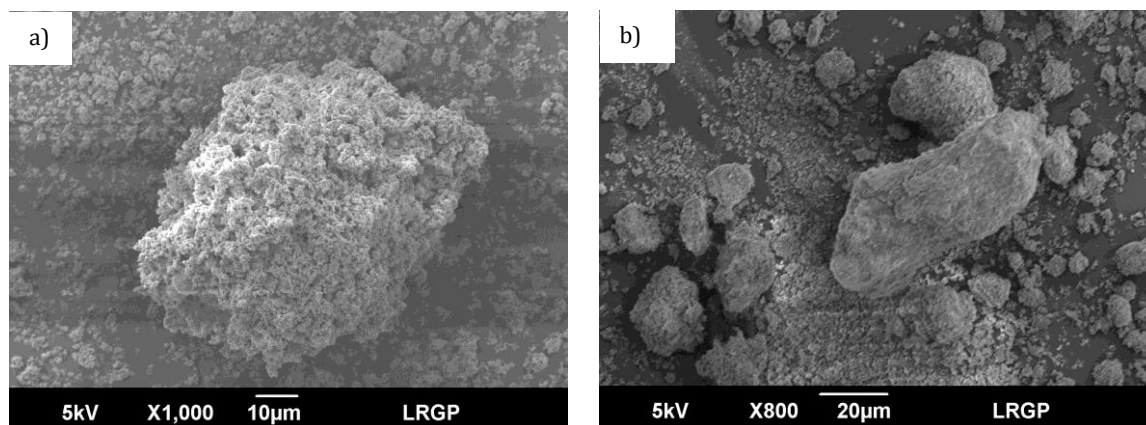


Figure 15 _ Images au MEB a) la boue A (Lot 2) et b) la boue B

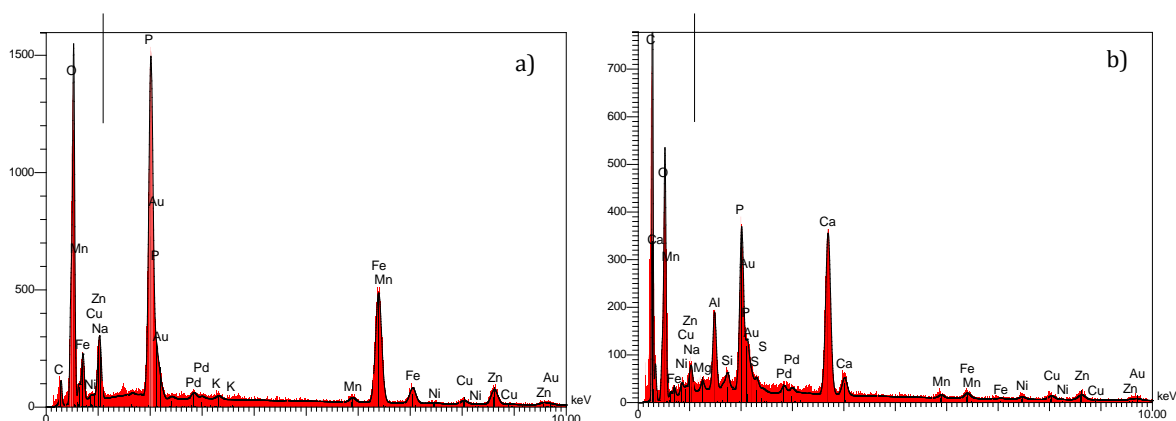


Figure 16 _ Spectres EDX de a) la boue A (Lot 2) et b) la boue B

b) Terres, stérile de carrière et vermiculite

La « **terre de biopile** » est une terre excavée et traitée par biopile. Elle contient des pollutions récalcitrantes en hydrocarbures dans certains lots. Cette terre a été prélevée à trois reprises par SITA France Déchets (Jeandelaincourt, 54) donnant lieu à quatre lots. Les deux premiers prélèvements ont été préparés au LSE (séchage, tamisage) et tamisés à 2 mm (TB_Lot 1, TB_Lot 2 et TB_Lot 3; Annexe 2). Le troisième prélèvement a été criblé à 2 cm (TB_Lot 4). Les quatre lots ont des compositions proches (Tableau 8). Ils contiennent entre 1,3 et 1,6% d'Al, environ 7% de Ca et de 1,8 à 7,7% de Fe. L'ensemble des lots a un pH alcalin compris entre 8 et 8,3. Leur texture est principalement sableuse. Les analyses ont été effectuées par le Laboratoire d'analyse des sols d'ARRAS pour le Lot 1, par le Laboratoire Sols et Environnement pour les Lots 2 et 3 et par Eurofins et Auréa AgroSciences pour le Lot 4.

La « **terre ultramafique** » a été prélevée d'un sol brun argilo-limoneux à proximité du col des Bagenelles (Vosges) (07°06'42,2"E, 48°11'03,7"N). Le premier prélèvement a donné lieu au **Lot 1 (TU_Lot 1)**. Le second prélèvement ajouté aux reliquats du premier a donné lieu au **Lot 2 (TU_Lot 2)**. Après prélèvement, les terres sont broyées en veillant à ce que la fraction fine initiale (sans broyage) soit présente au moins de moitié (en volume) dans le lot final. La terre a ensuite été tamisée à 2 mm puis quartée. Les deux lots (analysés par le LAS, Arras) présentent des caractéristiques très proches (Tableau 8). Les résultats sont caractéristiques des sols de serpentine ; riches en Ni et en Cr avec un rapport Ca/Mg<1. Le pH est acide. Le 2^{ème} lot a une concentration totale en Ni plus élevée mais une concentration en Ni_{DTPA} inférieure au premier lot.

La « **terre agricole** », choisie pour recevoir une contamination artificielle, a été prélevée à la ferme expérimentale de La Bouzule (54) sous une culture de céréales. C'est un sol brun lessivé, acide qui reçoit périodiquement des amendements organiques et des engrais minéraux. (Analyse par le LAS Arras) (Tableau 8).

Le **stérile de carrière** est un reliquat de l'exploitation des carrières en provenance de Montois la Montagne (sables Jaumont et polypiers). Ce matériau de texture sableuse permet d'améliorer les propriétés physiques en structurant et aérant le substrat. Le stérile a un refus de 58% de son poids brut lors d'un tamisage à 2 mm, effectué pour procéder à l'analyse. L'analyse de la fraction fine (par Eurofins et Auréa AgroSciences) présente ainsi un matériau sableux, calcaire et, de ce fait, à pH alcalin (Tableau 8).

La **vermiculite** a été fournie par Chimix® (Chassieu, 69), (sous l'appellation « absorbant pour produits chimiques répandus »).

Tableau 8 _ Propriétés des différents lots de terre. TB : terre traitée par biopile, TU : terre ultramafique

Paramètres	TB_Lot 1	TB_Lot 2	TB_Lot 3	TB_Lot 4	TU_Lot 1	TU_Lot 2	Sol agricole	Stérile de carrière	Unité
Texture¹									
Argile (< 2 µm)	117			160	382	290	276	89	g kg ⁻¹
Limons fins (2/20 µm)	92			131	262	243	329	121	g kg ⁻¹
Limons grossiers (20/50 µm)	53			98	108	124	211	56	g kg ⁻¹
Sables fins (50/200 µm)	69			129	67	105	46	175	g kg ⁻¹
Sables grossiers (200/2000 µm)	669			482	181	238	138	559	g kg ⁻¹
Paramètres agronomiques									
C Organique Total ^{2A}	24,2			15,9	58,9	28,7	16	15 000 ^{2B}	g kg ⁻¹
N total ^{2A}	4,05			0,73	4,25	2,14	1,59	0,32 ^{2B}	g kg ⁻¹
Rapport C/N ^{2A}	59,8			16,6	13,9	13,4	10,1	10,5 ^{2B}	-
Matières organiques ^{2A}	41,8			21	102	49,6	27,8	<6 ^{2B}	g kg ⁻¹
pH eau ³	8,28	8,07	8,28	8,3	6,22	6,58	6,03	9,1 ^{3B}	-
Conductivité ⁴	0,21	0,19	0,29	0,27			0,0917		mS cm ⁻¹
P ₂ O ₅ Olsen ⁵	0,292			0,205	0,011	0,007	0,089	<0,010	g kg ⁻¹
CEC Metson ⁶				8				2,3	cmol ⁺ kg ⁻¹
Cations échangeables⁷									
CEC cobaltihexamine	8,74				34	39,7	11,7		cmol ⁺ kg ⁻¹
Al	0,111				0,0299	<0,02	0,0866		cmol ⁺ kg ⁻¹
Ca	9,89				1,88	1,17	9,92		cmol ⁺ kg ⁻¹
Fe	0,0228				0,0057	<0,005	0,012		cmol ⁺ kg ⁻¹
K	0,396				0,182	0,132	0,871		cmol ⁺ kg ⁻¹
Mg	0,642				30,4	36,5	1,33		cmol ⁺ kg ⁻¹
Mn	<0,005				0,0319	0,0158	0,044		cmol ⁺ kg ⁻¹
Na	0,08				0,106	0,0983	0,0281		cmol ⁺ kg ⁻¹
Oxydes amorphes et cristallisés^{8,9}									
Al ⁸					0,396	0,354	0,177		%
Fe ⁸					2,23	1,86	0,826		%
Si ⁸					0,164	0,186	0,051		%
Al ⁹					0,409	0,322	0,316		%
Fe ⁹					5,25	4,65	4,17		%
Si ⁹					0,28	0,316	0,134		%

Paramètres	TB_Lot 1	TB_Lot 2	TB_Lot 3	TB_Lot 4	TU_Lot 1	TU_Lot 2	Sol agricole	Stérile de carrière	Unité
Éléments totaux¹⁰ / pseudo-totaux¹¹									
Al	1,58	1,62	1,64	1,28	3,51	3,34	2,26	0,385	%
As	11,7	12,7	14,1	12,6	-	-	24,4	24,8	mg kg ⁻¹
B	15,7	17,4	17,3	13,1	-	-	12,6	4,84	mg kg ⁻¹
Ca	7,38	6,87	5,01	5,26	0,517	0,504	0,249	33,2	%
Cd	1,28	1,47	4,67	2,48	-	-	0,318	0,505	mg kg ⁻¹
Co	7,07	7,67	8,56	7,09	166	158	25,1	2,69	mg kg ⁻¹
Cr	52,6	48,0	49	38,5	2170	2540	58,5	17,6	mg kg ⁻¹
Cu	27,1	31,6	31,8	49,8	14,7	10,6	23,1	0,832	mg kg ⁻¹
Fe	1,84	1,96	2,16	1,85	9,39	9,88	4,81	1,64	%
K	0,296	0,300	0,233	0,189	0,322	0,162	0,311	0,0635	%
Mg	0,554	0,581	0,557	0,458	9,58	12,9	0,317	0,250	%
Mn	615	608	497	495	1890	1830	1 421	779	mg kg ⁻¹
Na	0,0268	0,0240	0,0116	0,0154	0,192	0,102	0,0243	0,0128	%
Ni	38,2	37,8	32,8	23,9	1430	1780	44,2	4,77	mg kg ⁻¹
P	0,120	0,126	0,095	0,112	0,227	0,134	0,132	0,0196	%
Pb	37,3	42,1	46,6	69,2	68,9	32,9	31,5	7,32	mg kg ⁻¹
S	506	497	364	457	-	-	112	241	mg kg ⁻¹
Zn	164	169	165	223	192	177	96,9	24,8	mg kg ⁻¹
Éléments extractibles au DTPA¹²									
Cd	0,222	0,254	1,00	0,408	0,104	0,0578	0,0647	<LD	mg kg ⁻¹
Co	0,0426	0,0313	0,0953	0,0230	0,892	0,454	-	<LD	mg kg ⁻¹
Cu	6,21	5,84	5,14	8,50	1,04	0,839	2,48	<LD	mg kg ⁻¹
Fe	47,1	42,2	56,8	51,8	286	229	103	4,27	mg kg ⁻¹
Mn	11,6	8,57	12,6	4,98	10,7	8,11	31,1	2,69	mg kg ⁻¹
Ni	0,349	0,340	0,559	0,560	78	64,3	2,1	0,0248	mg kg ⁻¹
Pb	8,92	8,53	9,59	12,5	4,6	2,07	2,66	0,234	mg kg ⁻¹
Zn	16,1	16,3	18,1	21,5	2,49	1,17	2,58	0,334	mg kg ⁻¹

¹ Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation, NF X 31-107, ^{2A} C organique et N total, NF ISO 10694 et NF ISO 13878, ^{2B} C organique total par combustion, NF ISO 10694 (Eurofins), ^{3A} pH eau selon NF ISO 10390, ^{3B} pH eau, méthode Auréa, ⁴ Conductivité totale sur extrait filtré 1/5 (m/v) à 25 °C, ⁵ P disponible, méthode Olsen NF ISO 11263, ⁶ Capacité d'échange cationique, méthode Metson, NF 31-130, ⁷ Capacité d'échange cationique à la cobaltihexamine, NF 23470, ⁸ Méthode Tamm en obscurité, méthode INRA et NF ISO 22036, ⁹ Méthode Mehra-Jackson, méthode INRA et NF ISO 22036, ¹⁰ Dosage total : extraction à l'acide fluorhydrique, NF X 31-147 et NF ISO 22036, ¹¹ Dosage des éléments après extraction à l'eau régale, NF EN ISO 11885 et NF EN 13346, ¹² Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique, NF X 31-121/NF ISO 22036.

c) Amendements

Biochars : trois biochars ont été utilisés. Le biochar 1 est un biochar de bois (50 % résineux, 50 % feuillus), issu du procédé de pyrolyse Pyreg, (20 min de pyrolyse, dont 3 min à 650 °C). Il provient de Suisse (Edlibach, entreprise Maschinenring). Le biochar 2 est un biochar de bois (100% copeaux de résineux) issu d'une pyrolyse à 480 °C avec un réacteur Pyreg (Austrian Institute of Technology). Le biochar 3 provient d'une pyrolyse à 500-550°C de *Miscanthus x giganteus* produit par la ferme de l'Université de Udine (Italie). Il est utilisé dans l'ensemble de la Partie 4. Les biochars 2 et 3 seront employés dans l'expérimentation de la Partie 4 (Chapitre 2). Dans ce chapitre une expérimentation a été mise en place entre les membres de l'action européenne COST Biochar TD1107 <http://cost.european-biochar.org/en> (dont le laboratoire Sols et Environnement participe par l'intermédiaire de Frédéric Rees) dans laquelle les trois biochars ont été utilisés pour procéder à une expérience dans chacun des laboratoires membres. Les trois biochars ont un pH alcalin compris entre 8,9 et 10,1, et une CEC inférieure à 6 cmol⁺ kg⁻¹ (Tableau 9). Ils diffèrent de par leur teneur en CaCO₃ total, deux fois plus élevée dans le biochar 1 que dans les deux autres. En revanche, le biochar de *Miscanthus* a une concentration en P assimilable plus élevée que les biochars 1 et 2 ainsi qu'une conductivité plus haute. Le biochar de *Miscanthus* a des concentrations en Zn, K, P₂O₅ et S supérieures à celles des 2 biochars de bois. En revanche, il a des concentrations inférieures en Ni, Al, Fe et Na. L'extraction au DTPA indique une concentration de 145 mg kg⁻¹ de Zn dans le biochar de miscanthus. C'est 24 et 48 fois plus que dans les biochars 1 et 2, respectivement.

Tableau 9 _ Caractérisation des trois biochars. Analyses effectuées par le Laboratoire d'analyse de sols d'Arras

Paramètres	Biochar 1	Biochar 2	Biochar 3	Unité
Matière initiale	50 % feuillus/ 50% résineux	100% résineux	<i>Miscanthus x giganteus</i>	
pH eau ¹	9,62	8,9	10,1	-
CaCO ₃ total ²	61	28	29	g kg ⁻¹
P ₂ O ₅ Joret-Hébert ³	0,25	0,414	2,8	g kg ⁻¹
P ₂ O ₅ Olsen ⁴	0,0913	0,145	1,69	g kg ⁻¹
CEC Metson ⁵	3,2	5,24	3,63	cmol ⁺ kg ⁻¹
Conductivité ⁶	0,228	0,0825	0,793	mS cm ⁻¹
C organique ⁷	685	700	784	g kg ⁻¹
N total ⁷	5,25	4,44	2,77	g kg ⁻¹
C/N ⁷	131	158	283	-
Éléments totaux⁸				
Al	0,63	0,873	0,0587	%
Ca	3,4	1,8	1,16	%
Co	1,48	2,61	<1	mg kg ⁻¹
Cr	17,8	27,6	8,13	mg kg ⁻¹
Cu	15,8	13,5	10,5	mg kg ⁻¹
Fe	0,353	0,465	0,1	%
K	0,959	0,562	1,36	%
Mg	0,267	0,34	0,427	%
Mn	521	716	241	mg kg ⁻¹
Na	0,164	0,199	0,0258	%
Ni	13,2	20,4	2,49	mg kg ⁻¹
P ₂ O ₅	0,291	0,299	0,863	%
S	243	255	801	mg kg ⁻¹
Zn	94,4	73,1	259	mg kg ⁻¹
Éléments extractibles au DTPA⁹				
Cd	<0,005	<0,005	0,0076	mg kg ⁻¹
Cr	<0,2	<0,2	<0,2	mg kg ⁻¹
Cu	0,459	0,497	0,722	mg kg ⁻¹
Fe	16,2	7,71	5,6	mg kg ⁻¹
Mn	27,5	24,1	24,3	mg kg ⁻¹
Ni	0,154	0,122	0,0306	mg kg ⁻¹
Pb	0,249	0,278	0,876	mg kg ⁻¹
Zn	6,05	3,23	145	mg kg ⁻¹

¹pH eau, NF ISO 10390, ²CaCO₃ total, NF ISO 10693, ³P₂O₅ Joret-Hébert, NF X 31-161, ⁴Phosphore disponible, méthode Olsen NF ISO 11263, ⁵Capacité d'échange cationique, méthode Metson, NF 31-130, ⁶Conductivité totale sur extrait 1/25 (m/V) à 25°C, méthode INRA, ⁷C organique et N total, NF ISO 10694 et NF ISO 13878, ⁸Dosage total : extraction à l'acide fluorhydrique, NF X 31-147/NF ISO 22036, ⁹Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique NF X 31-121/NF ISO 22036.

Le **marc de café** est le résidu de préparation du café, matière fine correspondant à des grains de café broyés et rincés à l'eau chaude. Il provient de la consommation de café au laboratoire et a été séché à 50 °C, immédiatement après prélèvement, afin d'empêcher le développement de champignon. Il est employé dans l'expérience de la Partie 4, Chapitre 2. Le marc de café a un pH acide (Tableau 10).

Deux lots de **compost** sont utilisés. Tous les deux proviennent du pôle organique de SUEZ (TERRALYS). Le premier (Toul, 54) est issu de boues urbaines stabilisées, de boues papetières et de déchets végétaux compostés et non compostés. Le second (Metzervisse, 57) est issu de boues de station d'épuration, de déchets verts broyés, d'écorce, de palettes broyées non traitées et de

refus de compostage. Ces deux composts suivent la norme sur les amendements organiques NFU 44-095. Le premier lot a été broyé au broyeur à fléau et tamisé à 2 mm et sera employé dans l'expérimentation Partie 5, Chapitre 1. Le second lot a une granulométrie de 0-20 mm et est utilisé en l'état dans le Chapitre 2 de la même partie. Les 2 lots de compost ont un pH similaire de 7,5 (Tableau 10). Le deuxième lot de compost a une conductivité élevée et des fortes concentrations en certains éléments tels que le Fe et le Zn, ceux-ci se retrouvant dans des concentrations élevées lors de l'extraction au DTPA. Pour tous les éléments (mineurs et majeurs), les concentrations sont inférieures dans le marc de café par rapport aux composts.

Tableau 10 _ Propriétés des composts et du marc de café. Les analyses ont été effectuées au LSE (sauf C, N et matière organique : Auréa AgroSciences et SUEZ)

Paramètres	Marc de café	Compost Lot 1	Compost Lot 2	Unité
Paramètres agronomiques				
C organique ¹			217	g kg ⁻¹
N total ²		1,84	0,88	% Produit brut
C/N ²		7,67	19	-
Matière organique ²		28,1	33,6	% Produit brut
pH eau ³	5,39 ± 0,03	7,54 ± 0,02	7,18 ± 0,04	-
Conductivité ⁴	0,257 ± 0,003	1,57 ± 0,08	2,54 ± 0,15	mS cm ⁻¹
Éléments pseudo-totaux⁵				
Al	20,8 ± 1,6	12 415 ± 495	9 924 ± 110	mg kg ⁻¹
As	0,60 ± 0,07	12,6 ± 0,4	10,9 ± 0,02	mg kg ⁻¹
B	2,96 ± 0,08	34,3 ± 0,8	41,3 ± 0,4	mg kg ⁻¹
Ca	2148 ± 14	41 493 ± 652	54 545 ± 653	mg kg ⁻¹
Cd	0,0147 ± 0,0069	0,524 ± 0,010	1,42 ± 0,02	mg kg ⁻¹
Co	0,133 ± 0,007	7,98 ± 0,13	6,56 ± 0,12	mg kg ⁻¹
Cr	0,128 ± 0,013	44,3 ± 2,5	70,7 ± 1,4	mg kg ⁻¹
Cu	27,4 ± 0,2	74,7 ± 1,9	117 ± 3	mg kg ⁻¹
Fe	92,8 ± 49,6	17 007 ± 344	26 823 ± 79	mg kg ⁻¹
K	2770 ± 8	7 767 ± 184	8 214 ± 69	mg kg ⁻¹
Mg	957 ± 3	4346 ± 122	5 437 ± 29	mg kg ⁻¹
Mn	30,1 ± 0,4	682 ± 29	851 ± 43	mg kg ⁻¹
Na	85,0 ± 0,8	389 ± 81	820 ± 51	mg kg ⁻¹
Ni	0,492 ± 0,043	26,1 ± 0,7	22,6 ± 0,6	mg kg ⁻¹
P	934 ± 13	4 471 ± 102	12 697 ± 38	mg kg ⁻¹
Pb	0,0295 ± 0,0277	40,0 ± 3,5	44,8 ± 0,6	mg kg ⁻¹
S	1239 ± 9	2996 ± 91	4 360 ± 33	mg kg ⁻¹
Zn	6,78 ± 0,07	259 ± 7	635 ± 27	mg kg ⁻¹
Éléments extractibles au DTPA⁶				
Cd	0,0148 ± 0,0001	0,146 ± 0,005	0,518 ± 0,019	mg kg ⁻¹
Co	0,0825 ± 0,0028	0,165 ± 0,012	0,152 ± 0,003	mg kg ⁻¹
Cu	19,5 ± 0,2	3,00 ± 0,09	8,47 ± 0,27	mg kg ⁻¹
Fe	0,549 ± 0,042	45,8 ± 1,7	224 ± 4	mg kg ⁻¹
Mn	18,7 ± 0,2	122 ± 3	23,2 ± 0,3	mg kg ⁻¹
Ni	0,0808 ± 0,0029	0,534 ± 0,039	1,12 ± 0,02	mg kg ⁻¹
Pb	0,0462 ± 0,0056	5,87 ± 0,14	4,69 ± 0,03	mg kg ⁻¹
Zn	2,92 ± 0,04	51,4 ± 0,6	143 ± 4	mg kg ⁻¹

¹C organique total par combustion, NF ISO 10694 (Eurofins), ²Donné à titre indicatif (Suez Environnement), ³pH eau selon NF ISO 10390, ⁴Conductivité totale sur extrait filtré 1/5 (m/v) à 25 °C, ⁵Dosage des éléments après extraction à l'eau régale, NF EN ISO 11885 et NF EN 13346, ⁶Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique, NF X 31-121/NF ISO 22036.

Les matériaux sont séchés, tamisés (ou criblés) puis homogénéisés (ou quartés). Lorsque le taux d'humidité trop élevé ne permet pas le broyage, les terres sont étalées à l'air afin de favoriser l'évaporation de l'eau. Le broyage est effectué avec un broyeur à mâchoire (terre de biopile et terre ultramafique). Le tamisage à (2 mm ou 1 cm) est effectué à la main sur des tamis certifiés. Le criblage (stérile de carrière) est effectué avec une grille d'une maille de 2 cm à la pelle. Pour l'homogénéisation, les grandes quantités sont mélangées à la bétonnière. Les petites quantités sont quartées en divisant les lots par 2 puis en mélangeant les lots ainsi formés 2 à 2. Pour chaque lot, les méthodes utilisées sont précisées dans l'Annexe 2 (colonne « Traitement »). L'ensemble des matériaux a été caractérisé pour évaluer les paramètres agronomiques et les teneurs en éléments majeurs et traces. Les analyses ont été effectuées par des laboratoires externes (Laboratoire d'analyse des sols d'Arras (INRA), Eurofins ou Auréa AgroSciences) ou en interne au Laboratoire Sols et Environnement. Dans ce dernier cas, les protocoles d'analyses sont détaillés dans cette partie : paragraphe « Méthodes d'analyse ». Le laboratoire ayant effectué les analyses des lots est précisé pour chaque matériau. Ont été utilisés : Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation, NF X 31-107 ; C organique et N total, NF ISO 10694 et NF ISO 13878 ; pH eau selon NF ISO 1039 ; Conductivité totale sur extrait filtré 1/5 (m/v) à 25 °C ; P disponible, méthode Olsen NF ISO 11263 ; Capacité d'échange cationique à la cobalthexamine, NF 23470 ; Capacité d'échange cationique, méthode Metson, NF 31-130 ; Dosage des éléments après extraction à l'eau régale, NF EN ISO 11885 et NF EN 13346 ; Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique, NF X 31-121/NF ISO 22036.

2. Modalités de culture des végétaux

Les tests de germination et de croissance ont été conduits en atmosphère close (incubateur, chambre de culture) ou semi-ouverte (serre) voire ouverte (extérieur). Ainsi, pour l'ensemble des expérimentations, les paramètres, tels que la température, la luminosité et l'humidité, ont été plus ou moins contrôlés. Les plantes ont été arrosées avec de l'eau ultra pure ou avec l'eau du robinet. Les compositions des eaux sont données dans l'Annexe 3.

2.1. Tests de germination

Le pouvoir germinatif et la vitesse de germination d'un lot de graines et la phytotoxicité d'un substrat sont testés sur du papier filtre imbibé d'eau. Les tests de germination sont effectués en boîtes de Petri sur du papier filtre sur lequel est déposé le substrat à tester. Les graines sont installées à égale distance les unes des autres. Le nombre de graines par boîte varie de 10 à 20 selon l'espèce. Les boîtes sont placées à l'obscurité dans une enceinte close à 25 °C pendant la durée de l'expérience variant de 10 à 20 jours. Tous les jours, les graines sont soulevées une par une avec une pince souple afin de compter le nombre avec une radicule. Dès que la radicule a percé le tégument, la graine est considérée germée (Annexe 4).

Les substrats sont humidifiés si nécessaire, avec de l'eau ultra pure, en favorisant l'entrée de l'eau par le bord du substrat, qui diffuse vers le centre à travers le papier filtre et le substrat. Des témoins sont préparés avec du papier filtre pour tester le pouvoir germinatif des graines utilisées. Dans certaines expériences (Partie 3 Chapitre 1 et Partie 4) les graines ont été désinfectées. Pour cela, elles sont enfermées dans un papier filtre, qui est placé successivement dans les bains de TFD9 à 20% pendant 15 min, eau ultra pure (deux rinçages successifs), H₂O₂ à 10% pendant 2 min, eau ultra pure (deux rinçages successifs) et eau ultra pure pendant 1 h. Les papiers filtre sont ensuite égouttés et mis à +4°C pendant 12 h. Les graines sont retirées du filtre et mises en place

pour le test de germination. Les résultats des tests de germination permettent d'établir : la cinétique de germination par modalité, le pourcentage de germination final par mélange et le pourcentage des graines germées encore vivantes à la fin du test.

2.2. Test de croissance

Selon les expériences, trois modalités de culture ont été utilisées i) en **chambre de culture** : 16 h de jour / 8 h de nuit, 25 °C Jour / 18 °C Nuit (ou 22 °C Jour / 15 °C Nuit), hygrométrie à 70%, luminosité à 2000 Lux (soit 200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$), ii) en **serre non chauffée**, avec un système d'aération en été et iii) en culture **à l'extérieur sur le site expérimental** du GISFI (Homécourt, 54). Les détails des différentes expériences (dispositifs, volumes de terre, durée de culture) sont présentés dans les chapitres expérimentaux.

Au temps de récolte choisi pour l'expérience, les parties aériennes sont coupées au collet avant dépotage, puis lavées trois fois à l'eau ultra pure enfin séchées à 70°C pendant 48 h. Les parties racinaires sont prélevées pendant le dépotage par tamisage du sol avec une pince fine. Elles sont ensuite lavées plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit parfaitement claire. Pour les vases de végétation sans plante, la surface, pouvant présenter un développement d'algue ou de mousse, est raclée puis le vase est vidé et homogénéisé. Environ 150 g de terre sont placés à +4°C et 50 g à 40°C (pour mesures DTPA, pH et eau régale).

Après séchage, les échantillons sont conservés à température ambiante. Avant toute pesée, ils sont séchés de nouveau 12 h à 40°C puis mis au dessiccateur. Les échantillons non séchés sont conservés à +4°C.

Prélèvements des solutions de sol : dans la Partie 4 Chapitre 2, des bougies poreuses (rhizon, modèle 192122, *Rhizosphere Research Products*, 5 cm de long et 2,5 mm de diamètre) ont été installées en début de culture, par insertion dans le substrat avec une inclinaison de 45° en direction du centre du vase de végétation. Le jour du prélèvement, chaque mésocosme est arrosé à 100% de la capacité au champ du mélange, puis la solution du sol est prélevée 4h30 plus tard.

3. Méthodes d'analyse

Pour l'ensemble des analyses, l'eau ultra pure a une résistivité de 18 m Ω . Les réactifs employés sont l'acide nitrique HNO₃ ($\geq 65\%$) SIGMA-ALDRICH®, l'acide chlorhydrique HCl ($\geq 37\%$) SIGMA-ALDRICH® et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (30%) AnalaR NORMAPUR (VWR®). En absence de précision, les filtrations sont effectuées sur filtre de 0,45 μm (Filtre PALL, Acrodisc® et membrane Supor® en polyéthersulfone hydrophile et verre borosilicate).

3.1. Analyse de la solution du sol

Les solutions issues de bougies poreuses ne sont pas filtrées. Les eaux de percolation issues des dispositifs de terrain sont filtrées avant les mesures sur filtres en microfibre de verre (Whatman™ GF-F, seuil de coupure de 0,7 μm).

Le **pH** des solutions est mesuré selon la norme NF ISO 10390, dans un volume de 10 mL avec un appareil HQ440d Multi (Hach) et une sonde IntelliCAL™ pH PHC101. La sonde est calibrée avec 2 solutions tampon de pH 4 et 7 (Mettler Toledo, solutions étalons certifiées). La **conductivité** est

mesurée avec un conductimètre CyberScan CON 100 et une sonde V21 JJ0-043 (EUTECH INSTRUMENTS), étalonnée avec une solution standard de NaCl à 1 000 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (HACH).

Préalablement à l'**analyse élémentaire**, les échantillons sont acidifiés avec 0,2 mL de HNO_3 pour 10 mL d'échantillon et analysés par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma –Optical Emission Spectrometry). Pour chaque série d'analyse, l'appareil est étalonné avec une gamme obtenue à partir de solutions standard certifiées diluées pour atteindre des concentrations de 0,01 à 150 mg L^{-1} . La composition élémentaire des solutions est obtenue par ICP-OES avec un appareil Thermo Fischer iCAP 6300 Duo, étalonné avec des solutions certifiées (*PlasmaCAL*, SCP Science). Une solution standard est intégrée dans les séries d'échantillons afin de contrôler l'analyse au cours du temps. Il s'agit d'un étalon pour eau usée (EU-H-4 CRM *EnviroMAT*, SCP Science). Les éléments dosés sont Al, As, B, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb et Zn.

Le **C organique et le C inorganique dissous** sont mesurés avec un TOC V_{SCN} (Shimadzu). Le C total est obtenu par combustion de l'échantillon puis mesure du CO_2 dégagé. Le C inorganique est déterminé par attaque préalable à l'HCl puis combustion et mesure du CO_2 dégagé. Le C organique est déduit par soustraction du C inorganique au C total. Le N total est mesuré selon le principe de l'« *oxydative combustion-chemiluminescence* » avec un absorbeur de NO_x .

Les **anions et cations** sont dosés par chromatographie ionique (Dionex, chromatographe IC25 et générateur d'éluant EG40) avec les colonnes AS11-HC pour l'analyse des anions et CS12 A-5 μm pour l'analyse des cations. Les anions mesurés sont NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} et PO_4^{3-} , les cations sont Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} et NH_4^+ . L'étalonnage est effectué avec une gamme allant de 2 à 150 mg L^{-1} selon les éléments considérés. Elle préparée avec des solutions étalons mono élément pour chromatographie ionique de 1 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*AccuSPEC* SCP Science).

3.2. Analyse des solides

Les échantillons ont été préparés selon la norme NF ISO 11464.

L'**humidité** est mesurée selon la norme ISO 11 465, en plaçant une aliquote d'une masse connue pendant 48 h à 105 °C. Après séchage, elle est de nouveau pesée et l'humidité est calculée selon la formule suivante :
$$H (\%) = \frac{(\text{masse fraîche} - \text{masse sèche})}{\text{masse sèche}} \times 100$$

La **capacité de rétention en eau** et le point de flétrissement des substrats sont mesurés avec un extracteur à plaque (appareils Labotest 11500 et 11600) selon la NF ISO 11 274. Une plaque en céramique poreuse est saturée avec de l'eau ultra pure ainsi que les échantillons. Ensuite, la plaque est soumise à une pression de 0,1 bar (pF 2) pour la capacité de rétention (extracteur à plaque basse pression) ou de 15 bar (pF 4,2) pour le point de flétrissement permanent (extracteur à plaque haute pression). Après 24 h, l'échantillon est pesé, séché puis repesé. La valeur est ainsi obtenue en pourcentage d'humidité par échantillon. Un échantillon témoin est intégré à chaque série afin de vérifier le bon déroulement du protocole.

Le **pH** des matériaux solides est mesuré selon la norme NF ISO 10390. Après séchage à 40°C pendant 48 h, 5 mL de terre sont placés dans un pilulier et 25 mL d'eau ultra pure sont ajoutés. Par la suite, les échantillons sont mis dans un agitateur rotatif pendant 1 h 20 min et laissés au repos de 1 à 3 h. Le pH est mesuré sous agitation continue. La mesure est relevée après stabilisation du pH avec un temps maximal de mesure de 2 min 30 s. L'échantillon est ensuite centrifugé puis filtré à travers un filtre à 0,45 μm . La conductivité est alors mesurée.

Éléments extractibles au DTPA : une extraction avec une solution de DTPA (acide diéthylène tri-amine penta-acétique) tamponnée à pH 7,3 est effectuée sur les matériaux selon la norme NF X 31- 121, en utilisant un rapport solide/liquide (m/v) de 1/2. Le DTPA donne une indication du niveau de phytodisponibilité des métaux (Lindsay et Norvell 1978), pour le Ni (Echevarria *et al.* 1998), et peut donner des indications sur Fe, Cu, Mn, Zn, Cd et Co). Après extraction et filtration, les échantillons sont analysés à l'ICP-OES.

Éléments pseudo-totaux : les éléments présents dans les matériaux sont extraits à l'eau régale, en adaptant la NF ISO 11 466, avec un rapport v/v de 3/1 d'HCl/HNO₃. Ainsi, 6 mL d'HCl et 2 mL d'HNO₃ sont ajoutés à une prise d'essai de 0,500 ± 0,005 mg de terre broyée à une granulométrie inférieure à 200 µm. Après 16 h de contact, les échantillons sont placés dans un bloc chauffant (DigiPREP, SCP Science) programmé pour maintenir une température de 105°C pendant 120 min. Dans la série d'échantillons, sont insérés trois blancs contenant la même matrice que les échantillons et un échantillon certifié de sol contaminé SS-1 (*EnviroMAT* SCP Science) en 3 répétitions. Les blancs et les témoins sont analysés avec les échantillons. Après refroidissement, les échantillons sont filtrés à 0,45 µm et le volume est ajusté à 50 mL avec de l'eau ultra pure. La solution est analysée par spectrométrie ICP-OES.

Fe amorphe et oxydes de Fe et de Mn : les échantillons sont broyés, dans un mortier en agate, à 250 µm avant de procéder à trois extractions : i) oxydes de fer amorphes selon Tamm (1922) (extraction par 30 mL d'une solution composée d'acide oxalique (0,0866 M) et d'oxalate d'ammonium (0,1134 M) ajustée à pH 3 sur une prise d'essai de 500 mg et agitation pendant 2 h dans l'obscurité, puis filtration à 0,45 µm) ; ii) oxydes de fer amorphes et hautement cristallins d'après la méthode CBD (citrate-bicarbonate-dithionite); une prise d'essai de 100 mg est mise en contact avec 0,5 g de Na₂S₂O₄, 6g de Na₃C₆H₅O₇.2H₂O et 30 mL d'eau pendant une nuit, puis 5 mL de MgSO₄ à 0,050 M (floculant) sont ajoutés et l'échantillon est mis en agitation pendant 15 min) et iii) oxydes de manganèse, une prise d'essai de 500 mg est mise en contact avec 25 mL de chlorhydrate d'hydroxylamine (0,10 M) ajustée à pH 2 avec HNO₃ (0,010 M), puis agitation de 30 min. Ces trois extractions sont effectuées à 20°C. Après agitation, les solutions sont filtrées à 0,45µm puis Al, Si, Fe, Mn et Ni sont dosés par ICP-OES.

Diffraction des rayons X : L'identification des phases minérales cristallisées majeures nécessite un diffractomètre Bruker D8 Advance, équipé d'une source au cobalt (Co Kα1 λ= 1,789 Å). Les mesures sont effectuées entre 3 et 64° (2θ) avec un pas de 0,035° et un pas de temps de 540 à 570 sec avec une prise d'essai d'1 g de sol broyé à une granulométrie inférieure à 200 µm.

Microscope électronique à balayage couplé à un EDX : des observations sont effectuées sur des échantillons broyés à 200 µm. La poudre est déposée sur des plots métalliques. Elle est fixée par du scotch double face spécial MEB dépôt d'au/Pd (80/20 %), par pulvérisation ionique avec l'appareil FINE COAT Ion sputter JFC-1100 (JEOL). Les observations sont faites avec un MEB (JSM 6490LV, JEOL) couplé à un système EDX (microanalyse X). Les résultats sont analysés sur le logiciel IDFix (société SAMx).

3.3. Analyse des végétaux

Composition élémentaire : les biomasses séchées 48 h à 50°C sont placées au dessiccateur jusqu'à atteindre la température ambiante puis pesées pour mesurer la biomasse sèche. Les biomasses sont broyées avec un broyeur à billes (MM 400 Retsch), un mortier ou un broyeur à fléau selon la partie végétale considérée. Le mortier et le pilon ont la même composition (agate ou

silice). Le broyeur à fléau est constitué de lames en inox Les matériaux du broyeur à billes au contact des échantillons sont en tungstène. La fréquence est de 28 coups par s pendant environ 1 min. La minéralisation est ensuite effectuée par attaque acide des échantillons à HNO₃ suivie de l'ajout de H₂O₂. Le rapport des acides ajoutés est de 2/5 (v/v) avec 5 mL d'HNO₃ et 2 mL d'H₂O₂ lorsque la prise d'essai est comprise entre 50 et 500 mg et de 2 mL d'HNO₃ et 1 mL d'H₂O₂ lorsque celle-ci est inférieure à 50 mg. Après au moins 16 h, les échantillons sont chauffés dans un bloc en graphite thermostaté de 48 positions pendant 120 min à 95°C (DigiPREP (x>50mg) et DigiPROBE (x≤50mg) SCP Science). Dans chaque série, sont introduits 3 blancs (matrice sans prise d'essai) et 3 échantillons témoins internes (*Noccaea caerulea*). Après refroidissement, les échantillons sont filtrés (DigiFILTER : membrane en Teflon hydrophile® à 0,45 µm, SCP Science) et leur volume est ajusté à 25 ou 10 mL (selon les volumes d'acide introduits). Les solutions ainsi obtenues sont analysées par ICP-OES.

C et N : la composition en C et N totaux est mesurée avec un CHNS (VARIO MICRO cube, ELEMENTAR) selon les normes NF ISO 10694 et NF ISO 13878. Une prise d'essai de 7 mg de végétaux broyés est introduite dans une capsule en étain (SYLAB). La mesure consiste en une combustion à 1 150 °C sous flux d'O₂ pour convertir les éléments en CO₂, NO_x, H₂O, etc. Les composés azotés sont réduits en N₂ sur du Cu et détectés par un détecteur thermo conductif (catharomètre). Les composés formés sont quantifiés après séparation en chromatographie.

Morphologie racinaire : les racines après récolte et avant séchage sont scannées avec un scanner Epson 10 000 XL. Les images sont ensuite traitées par le logiciel Winrhizo (V. 2005c, Regent Instruments) pour mesurer la surface, la longueur et le diamètre moyen racinaire. Le logiciel est préalablement étalonné en analysant l'image d'un objet de taille connue en appliquant les mêmes paramètres de qualité d'image que ceux sélectionnés pour les échantillons de végétaux.

Coumarines : une prise d'essai de 50 mg de poudre de végétaux est additionnée de 1 mL de méthanol à 60° et de 50 µl de solution de taxifoline (20 mg mL⁻¹). L'échantillon est broyé avec un broyeur-homogénéiseur (ULTRA-TURRAX®) pendant 40 s puis centrifugé à 2 400 g pendant 10 min et le surnageant est prélevé. Une seconde extraction est effectuée sur le culot en ajoutant 1 mL de méthanol à 60°. Le culot est remis en suspension avec le broyeur-homogénéiseur pendant 40 s. Après centrifugation 10 min à 2 400 g le surnageant est ajouté au premier. Les surnageants sont évaporés pendant une nuit dans un évaporateur-concentrateur (SpeedVac™). Après 16 h, 300 µL d'eau ultra pure sont ajoutés sur le culot qui est mis en suspension, puis agité vigoureusement dans un agitateur Vortex. Par la suite, 700 µl de méthanol à 100° sont ajoutés et agités au Vortex. L'échantillon est centrifugé pendant 10 min à 13 400 g puis le surnageant est filtré sur filtre de 0,22 µm. L'échantillon est stocké à -20 °C jusqu'à l'analyse. Ce protocole a été mis au point par le Laboratoire Agronomie et Environnement (Vandoeuvre-lès-Nancy). L'analyse est effectuée à l'U-HPLC (Shimadzu Nexera) avec un détecteur spectromètre de masse simple Quadripole LCMS-2020 (Shimadzu) et une colonne Agilent Eclipse Plus C 18 (2,1*150 mm, 1,8 µm).

3.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont faites avec le logiciel R version 3.1.2 (2014-10-31) et Excel (Microsoft 2013 et 2016). Sous R, les outliers sont repérés par le test de Dixon, du packages outliers. Lorsque les données suivent une loi normale (test de Shapiro) et sont homoscedastiques (test de Levene), alors un test paramétrique est appliqué : Newman Keuls ou test t. Si les données ne remplissent pas les deux critères alors les données sont transformées en log pour pouvoir obtenir les conditions d'application des tests paramétriques. Si les données après transformation

ne suivent toujours pas une Loi Normale et/ou ne sont pas homoscédastiques, alors des tests non paramétriques sont appliqués : Wilcoxon, Kruskal-Wallis.

PARTIE 3

Potentiel des hyperaccumulateurs pour l'agromine de Ni et Co

L'optimisation des pratiques agronomiques pour la culture des plantes hyperaccumulatrices est un des défis actuels. Elle implique la sélection de plantes performantes, c'est-à-dire des plantes à forte production de biomasse et à forte concentration en métaux dans leurs parties aériennes (Tang *et al.* 2012). L'agromine s'appuie aussi sur la connaissance des mécanismes de transfert des métaux dans la plante. Ceux-ci peuvent être perturbés par la présence d'autres éléments, tels que le Co ou le Zn (Deng *et al.* 2014).

Afin de mettre en évidence les populations les plus efficaces, la variabilité d'extraction du métal, de production de biomasse et du transfert vers les parties aériennes sont évaluées en hydroponie, pour différentes populations d'*A. lesbiacum* (Adamidis *et al.* 2014), d'*A. bertolonii* (Galardi *et al.* 2007a). Par ailleurs, la réponse de différentes populations de *N. caerulescens* à des co-contaminations Ni/Zn/Cd est étudiée (Roosens *et al.* 2003; Assunção *et al.* 2008). De rares études ont été menées sur sol en présence de Cd sur 10 populations de *N. caerulescens* (Schwartz *et al.* 2006). D'autres études décrivent la composition des HA en éléments majeurs et mineurs, principalement Ca et Mg (Gambi *et al.* 1977; Bani *et al.* 2010, 2013). Ainsi, la variabilité des hyperaccumulateurs de Ni en conditions de culture sur sol a été peu étudiée. Des mesures individuelles doivent permettre d'évaluer le potentiel d'extraction de Ni au sein d'une population mais aussi d'apprécier les variations de la composition globale des plantes en fonction de leur teneur en Ni. Enfin, la capacité de certains individus pour l'extraction d'autres éléments (*e.g.* Co et Zn) peut être observée. Par ailleurs, les plantes peuvent produire des composés en réponse à leur environnement. Ces composés organiques peuvent être valorisables et leur présence n'a pas été étudiée chez les hyperaccumulateurs (HA). Dans les HA, ces molécules pourraient intervenir dans la chélation des métaux pour leur transport ou leur stockage.

En s'inspirant des principes de l'agriculture conventionnelle et de l'agroécologie, la co-culture permet d'augmenter la diversité microbienne dans la rhizosphère et ainsi d'améliorer la croissance des plantes. La co-culture d'une plante hyperaccumulatrice avec une espèce non hyperaccumulatrice permet de diminuer la charge métallique dans l'espèce non hyperaccumulatrice et ainsi d'augmenter sa biomasse (Whiting *et al.* 2001a). Elle peut permettre aussi d'augmenter la biomasse de l'hyperaccumulateur (Jiang *et al.* 2010) et le rendement d'extraction du Cu chez *Sedum alfredii* cultivé avec *Zea mays* (Xiaomei *et al.* 2005). La co-culture, uniquement avec des espèces hyperaccumulatrices, n'a pas été étudiée. D'autres techniques de culture des plantes peuvent augmenter le rendement. Par exemple, plusieurs récoltes peuvent être envisagées sur des plantes pérennes, tel que c'est le cas pour le ray-grass ou encore sur des ligneux par la mise en place de taillis à courte rotation. Chez les espèces hyperaccumulatrices, deux études ont testé la fauche sur *A. pintodasilvae* et *B. coddii*. La repousse est rapide et plus

concentrée en Ni que lors la première récolte (Varenes *et al.* 1996; Robinson *et al.* 1997a). La réalisation de coupes successives pourrait être une voie d'amélioration des rendements dans la mesure où les plantes survivent et repoussent rapidement après la coupe.

Après avoir identifié les individus et populations d'intérêts, ceux-ci doivent être multipliés. La reproduction asexuée par multiplication végétative a permis d'obtenir plusieurs clones à partir d'une partie infime d'un organe végétal. Quelques études ont été menées sur des Brassicacées. *Arabidopsis halleri* a été multipliée *in vitro* à partir d'explants de racines (Corso *et al.* 2005). *A. murale* et *A. markgrafii* ont été clonées à partir d'épicotyle sur des milieux enrichis en Ni (Vinterhalter et Vinterhalter 2005) ou en présence de *Agrobacterium rhizogenes* (Vinterhalter *et al.* 2008). *Stackhousia tryonni* (Stackhousiacées), endémique des sols de serpentine du Queensland (Australie), a été multipliée par micro propagation *in vitro* et *ex vitro* à partir d'explants de tige et de bourgeon (Bhatia *et al.* 2002a; b). Les conditions de conservation des individus performants, outre la multiplication sexuée, pourraient inclure de la multiplication végétative si les espèces utilisées répondent positivement à cette méthode.

En Europe, les hyperaccumulateurs sont principalement issus de la famille des Brassicacées et quelques-uns des Astéracées. Ils ont le potentiel d'extraire le Ni, Cd et Zn (Reeves et Adigüzel 2008; Bani *et al.* 2013; Pavlova *et al.* 2013). *Centaurea thracica* est une espèce endémique des Balkans qui n'a jamais été testée en conditions contrôlées pour son potentiel à extraire le Ni mais qui peut contenir 3 830 mg kg⁻¹ de Ni dans ses feuilles (Psaras et Constantinidis 2009). Les Astéracées produisent une biomasse élevée mais sont peu étudiées en Europe pour la phytoextraction du fait de leur faible aire de répartition dans cette région. La co-accumulation de métaux est possible chez certains hyperaccumulateurs qui disposeraient d'un système de détoxification non spécifique du métal (Reeves et Baker 1984). Cependant, la présence simultanée de métaux dans le substrat peut mener à une compétition pour l'accès à la plante et diminuer les rendements. Il est donc important d'étudier les mécanismes de compétition entre éléments pour évaluer les conditions de l'hyperaccumulation en milieu multi contaminé et son optimisation. Dans les sols de serpentine, sur lesquels les HA de Ni prélèvent essentiellement le Ni, la concentration du Ni est 5 à 10 fois supérieure à celle du Co. Certains HA de Ni ont la capacité d'hyperaccumuler le Co (Homer *et al.* 1991; Malik *et al.* 2000; Li *et al.* 2003a). Plusieurs études montrent que l'hyperaccumulation du Ni diminue en présence de concentrations élevées de Co ou de Zn chez des espèces d'*Alyssum* (Homer *et al.* 1991; Deng *et al.* 2014). Or, il y a une corrélation positive entre la concentration de l'élément dans le substrat et dans la plante chez *A. bertolonni* pour le Ni et le Co (Galardi *et al.* 2007b). Pour favoriser le transfert d'un élément, il faut donc que celui-ci soit majoritairement présent dans le sol par rapport aux autres. *A. murale* et *A. corsicum* peuvent prélever plus de 1 000 mg kg⁻¹ de Co en l'absence de Ni (Malik *et al.* 2000). Lors d'essais sur sols contaminés artificiellement, la présence en même concentration de Ni et de Co diminue de 10 fois la prise de Ni chez *A. trooddi* par rapport à un substrat sans Co, alors que la prise de Co ne varie pas selon qu'il y ait peu ou la même concentration de Ni dans le milieu (Homer *et al.* 1991; Robinson *et al.* 1999). Dans *B. coddii*, un hyperaccumulateur de Ni d'Afrique du Sud pouvant concentrer 7 880 mg kg⁻¹ de Ni dans ses parties aériennes, la présence en concentrations égales de Co et de Ni inhibe la prise de Ni (Keeling *et al.* 2003) et tend à diminuer le facteur de bioconcentration du Co par rapport à une culture sans Ni dans le substrat.

Dans un premier chapitre, le potentiel en terme de production de biomasse et d'extraction de Ni de quatre espèces de Brassicacées sera défini. Des molécules produites par ces plantes seront recherchées afin d'évaluer leur présence dans ces espèces mais aussi de permettre d'accéder à

nouveaux champs de recherche sur les chélateurs de métaux dans ces plantes. Enfin, des itinéraires de culture seront testés : i) la réalisation de la co-culture de ces espèces et ii) la réalisation de coupes successives. Les techniques de multiplication végétative seront mises en place pour examiner la faisabilité avec ces espèces et permettre à long terme la conservation des individus performants. Dans un deuxième chapitre, le potentiel d'Astéracées hyperaccumulatrices sur un substrat présentant des concentrations de Ni et Co similaires ou déséquilibrées sera testé pour mieux comprendre la compétition de ces éléments pour l'accès à la plante.

Chapitre 1 :

Potentiel d'espèces de Brassicacées pour l'agromine du Ni

Dans ce chapitre, le potentiel d'accumulation du Ni par des Brassicacées issues des Balkans est étudié à l'échelle de l'espèce, de la population et de l'individu. L'attention se porte d'abord sur la variabilité de réponse des plantes au Ni présent dans le sol. Par ailleurs, des individus peu performants pour le Ni pourraient s'avérer efficaces pour d'autres éléments tels que le Co. Ensuite, les plantes sont analysées afin de rechercher la présence de molécules organiques d'intérêt, comme les coumarines. Ensuite, l'effet de l'association de plantes hyperaccumulatrices sur l'accumulation du Ni est étudié en comparant un système en monoculture à un système en culture. Enfin, dans le but de mettre ultérieurement au point une méthode de multiplication végétative, le comportement des plantes est étudié à la suite de la coupe des parties aériennes.

1. Accumulation du Ni par différentes espèces et populations de *Brassicacées*

Le potentiel d'extraction d'hyperaccumulateurs de Ni pour identifier les individus les plus performants et connaître leur composition globale en relation avec le Ni fait appel à des Brassicacées : *A. murale* hyperaccumulateur de Ni et qui peut extraire le Co, *N. tymphaea* qui peut extraire Ni, Zn et Cd, et *L. emarginata* et *B. tymphaea*, hyperaccumulateurs de Ni (Reeves *et al.* 1983; Chardot *et al.* 2005). Toutes sont cultivées dans des conditions identiques sur un sol ultramafique.

1.1. Matériels et méthodes

Pour chacune des quatre espèces une population est testée, sauf dans le cas d'*A. murale* pour laquelle quatre populations sont retenues : trois de Grèce (S II, S IV et S V) et une d'Albanie (cf Partie 2) (Tableau 11). Pour *L. emarginata*, les graines sont sélectionnées par pesée. Le poids moyen est de $5,49 \pm 1,69$ mg (30 individus). Un lot de graines, dont la masse est comprise dans l'intervalle inter-décile, est constitué ([3,53 ; 7,56] mg). Un lot de 24 graines prises au hasard parmi les graines non calibrées est cultivé en parallèle (LNC : *L. emarginata* Non Calibrées).

Les cultures sont menées sur des plaques de végétation offrant 72 alvéoles de dimension 39*39*80 mm chacune, qui contiennent 55 g de terre ultramafique sèche (TU_Lot 1). Avant le semis, les graines sont désinfectées dans des bains de TFD9 et H₂O₂ (cf Partie 2). Après 48h à +4°C, elles sont introduites dans les alvéoles. Le nombre de graines par alvéole dépend du pourcentage de germination. Ainsi, plus le taux de germination est élevé, plus le nombre de graines semées est faible (Tableau 11).

Tableau 11 _ Liste des espèces utilisées, de leur abréviation et taux de germination et nombre de graines semées par alvéole

Espèce	Abréviation	Taux de germination sur papier filtre (%)	Nombre de graines semées par alvéole
<i>A. murale</i> Albanie S IX	AlyA	50	3
<i>A. murale</i> Grèce S IV	AlyG1	60	5
<i>A. murale</i> Grèce S II	AlyG2	10	8
<i>A. murale</i> Grèce S V	AlyG3	35	6
<i>B. tymphaea</i> S II	BORN	60	2
<i>L. emarginata</i> S II	LEPT et LNC	70	2
<i>N. tymphaea</i> S III	NOC	5	10

Une plaque est utilisée pour chaque population. Les plaques sont placées en chambre de culture avec des lampes à sodium à haute intensité ($530 \text{ photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La photopériode est de 16 h de jour / 8h de nuit ($22^\circ\text{C}/15^\circ\text{C}$ respectivement) et une humidité relative de 75%. Les alvéoles sont arrosés avec de l'eau ultra pure à 80% de la capacité de rétention en eau de la terre ultramafique. Une fertilisation est réalisée en quatre apports à deux semaines d'intervalle. Les éléments apportés sont : N ($326,8 \text{ kg N ha}^{-1}$) sous forme de NH_4NO_3 , P ($301,14 \text{ kg P ha}^{-1}$) et K^+ ($380,12 \text{ kg K ha}^{-1}$) sous forme de KH_2PO_4 , et S ($187,05 \text{ kg S ha}^{-1}$) et Ca^{2+} ($233,78 \text{ kg Ca ha}^{-1}$) sous forme de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Vingt jours après le semis, une seule plantule est conservée par alvéole (72 individus par population). Les plantes sont récoltées 70 jours après le semis. Elles sont coupées au-dessus des deux premières feuilles afin d'assurer la reprise par le développement des bourgeons axillaires. La taille, la couleur, le nombre de feuilles et le nombre de ramifications sont notés. La mesure de la taille est effectuée entre le point de coupe et le haut de la tige principale pour *A. murale*. Dans le cas de *N. tymphaea*, la taille correspond à la largeur de la rosette. Pour les deux autres espèces, elle correspond à la longueur entre le point de coupe et l'extrémité de la feuille la plus longue. Les plantes sont lavées, séchées, pesées et broyées. Puis $200 \pm 10 \text{ mg}$ de broyat de chaque individu sont minéralisés et analysés par ICP-OES (cf Partie 2).

1.2. Résultats

a) Biomasse des parties aériennes

Ainsi, sept populations d'hyperaccumulateurs de Ni ont été testées. *L. emarginata* est la population qui produit significativement le plus de biomasse (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Les plantes issues de graines non calibrées (LNC) ont une biomasse significativement supérieure à celles issues des graines calibrées (LEPT). Viennent ensuite *B. tymphaea* et *A. murale* G1 (Figure 17). Les cinq autres populations sont significativement moins productives. Parmi les quatre populations d'*A. murale* (partie gauche Figure 17), G1 est la plus efficiente. Les deux autres populations provenant de Grèce (G2 et G3) présentent les plus faibles biomasses. La population issue d'Albanie (AlyA) a un potentiel intermédiaire. Par ailleurs, certaines populations d'*A. murale* ont un potentiel similaire à *B. tymphaea* : c'est le cas d'AlyG1 alors que les populations G2 et G3 ont une production de biomasse comparable à celle produite par *N. tymphaea*. En revanche, AlyA a les individus les plus grands et AlyA et AlyG1 ont significativement plus de ramifications que les deux autres populations (Figure 18).

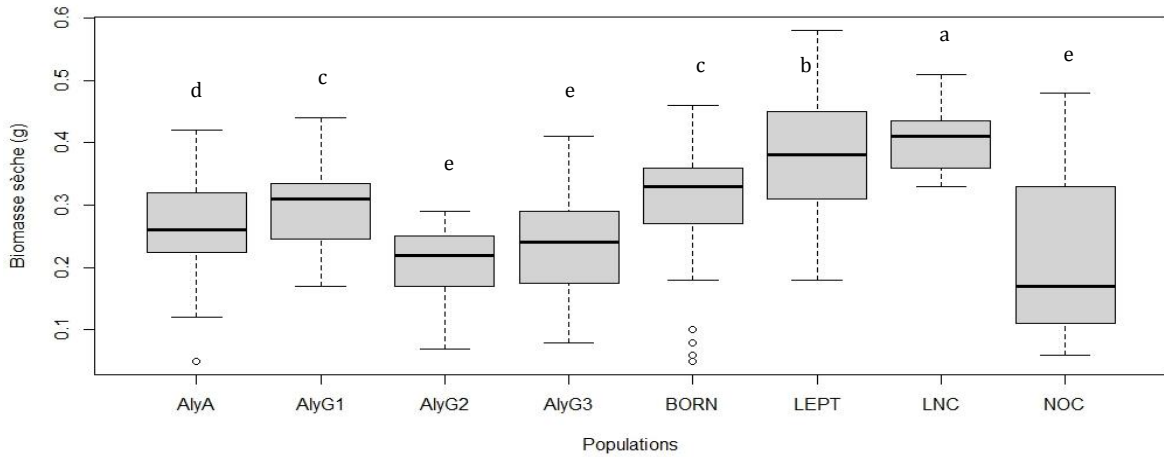


Figure 17 _ Biomasse aérienne des sept populations d'hyperaccumulateurs de Ni testées après 70 jours de culture sur sol ultramafique. AlyA : *A. murale* Albanie, AlyG1 : *A. murale* Grèce S IV, AlyG2 : *A. murale* Grèce S II, AlyG3 : *A. murale* Grèce S V, BORN : *B. tymphaea*, LEPT : *L. emarginata*, LNC : *L. emarginata* non calibrées, NOC : *N. tymphaea*. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

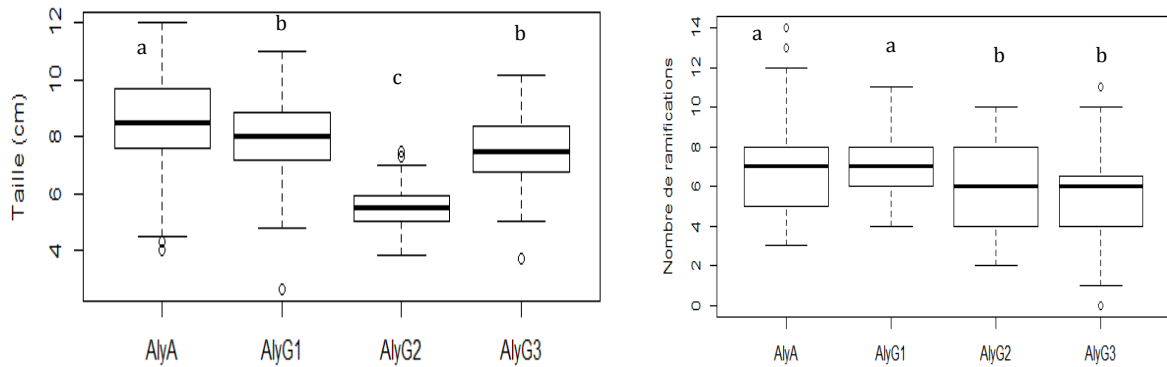


Figure 18 _ Taille et nombre de ramifications des individus des populations d'*A. murale*. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Wilcoxon ; $p < 0,05$).

b) Ni accumulé dans les parties aériennes

Après 70 jours de culture, tous les individus présentent une concentration en Ni supérieure au seuil d'hyperaccumulation ($1\ 000\ \text{mg Ni kg}^{-1}\ \text{MS}$). Avec une moyenne de $4\ 032\ \text{mg kg}^{-1}$ de Ni dans ses parties aériennes, *B. tymphaea* offre la plus forte concentration en Ni (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). *A. murale* d'Albanie est la deuxième population la plus concentrée en Ni (Figure 19). Les deux lots de *L. emarginata* issus d'un lot de graines calibrées et d'un lot non calibrées ne montrent pas de différences significatives avec des concentrations de $2\ 886 \pm 965\ \text{mg Ni kg}^{-1}$ et $2\ 623 \pm 710\ \text{mg Ni kg}^{-1}$ respectivement. En quantité de Ni extrait, *B. tymphaea* et *L. emarginata* sont donc les plus performantes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). *N. tymphaea*, *A. murale* G2 et G3 sont les moins efficaces (Figure 20).

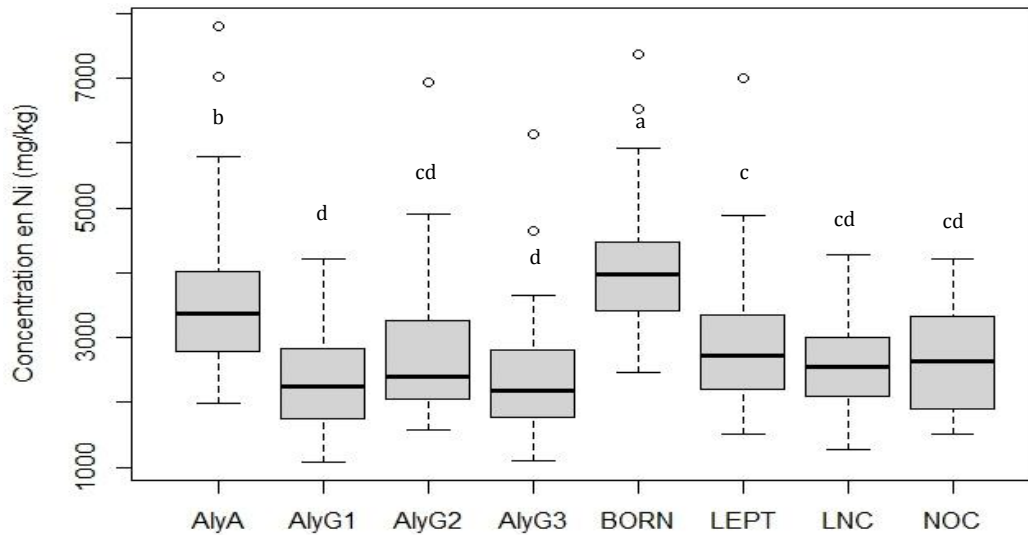


Figure 19 _ Concentration du Ni dans les parties aériennes des hyperaccumulateurs après 70 jours de culture sur sol ultramafique . AlyA : *A. murale* Albanie, AlyG1 : *A. murale* Grèce, AlyG2 : *A. murale* Grèce, AlyG3 : *A. murale* Grèce, BORN : *B. tymphaea*, LEPT : *L. emarginata*, LNC : *L. emarginata* non calibrées, NOC : *N. tymphaea*). Les populations affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

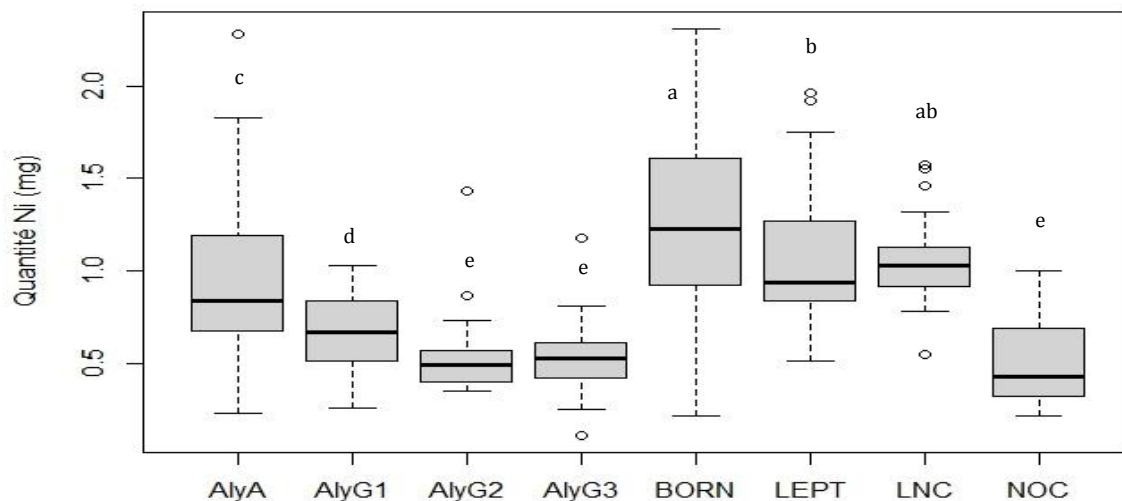


Figure 20 _ Quantité de Ni extraite par population sur sol ultramafique. AlyA : *A. murale* Albanie, AlyG1 : *A. murale* Grèce, AlyG2 : *A. murale* Grèce, AlyG3 : *A. murale* Grèce, BORN : *B. tymphaea*, LEPT : *L. emarginata*, LNC : *L. emarginata* non calibrées, NOC : *N. tymphaea*). Les populations affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

c) Composition des parties aériennes

Vingt éléments ont été analysés. Les éléments majoritaires sont K, Mg, Ca, P, Ni et S. K est l'élément le plus concentré avec plus de 11 000 mg kg⁻¹ en moyenne et Mg est le second élément principal à raison de 6 300 mg kg⁻¹. La concentration du Ni varie de 2 300 à 4 000 mg kg⁻¹ (Tableau 12). Les autres éléments majoritaires sont Ca, avec une moyenne de 3 300 mg kg⁻¹, S à 3 300 mg kg⁻¹ et P à 1 800 mg kg⁻¹. Des différences sont observées entre espèces et entre populations. Ainsi, si toutes les populations contiennent majoritairement du K puis du Mg, le troisième élément varie selon l'espèce. Les populations d'*A. murale* contiennent plus de Ca (3 500 mg kg⁻¹) que de Ni et de S (environ 2 500 mg kg⁻¹). Cette même tendance est observée dans *B. tymphaea* avec cependant une moyenne supérieure à 4 000 mg kg⁻¹ pour ces trois éléments. En revanche, *L. emarginata* et

N. tymphaea ont une concentration en Ca inférieure à celle du Ni et du S. Le P est le sixième élément majoritaire pour toutes les espèces. Les éléments mineurs sont As, Al, B, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Pb, Si, Zn présents à moins de 500 mg kg⁻¹. Ils présentent aussi des différences de concentration en fonction des espèces :

B. tymphaea et *L. emarginata* : Si>Zn>Mn>Fe>Co=B>Al

A. murale: Si>Zn≈Fe>Mn>Al>Co≈B (Figure 21)

N. tymphaea: Si>Zn≈Fe>Mn≈Al>Co≈B

N. tymphaea se distingue des autres espèces par ses concentrations significativement supérieures en Cd (4,9 mg kg⁻¹) et Zn (147 mg kg⁻¹). La population G1 d'*A. murale* se rapproche de *N. tymphaea* pour sa composition en Al, Cr, Fe, Mg et Na qui sont les plus élevées et significativement différentes des moyennes mesurées dans les autres populations pour ces éléments. Il est à noter que ces deux espèces concentrent Mg, Fe et Al, les trois éléments les plus concentrés dans le substrat de culture. Des disparités sont observées entre les quatre populations d'*A. murale* pour Al, Fe, Mn, Si et Zn dans les parties aériennes (Figure 21).

Tableau 12 _ Concentration dans les parties aériennes en mg kg⁻¹. Moy ± ET. AlyA : A. murale Albanie, AlyG1 : A. murale Grèce, AlyG2 : A. murale Grèce, AlyG3 : A. murale Grèce, BORN : B. tymphaea, LEPT : L. emarginata, LNC : L. emarginata non calibrées, NOC : N. tymphaea). Les populations affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Kruskal-Wallis, p<0,05).

	Al	As	B	Ca	Cd	Co	Cr
AlyA	27± 18 b	0,55 ± 0,10 d	16 ± 3,5 cd	3 580 ± 1 036 b	0,23 ± 0,09 c	19 ± 7,4 a	1,3 ± 0,8 b
AlyG1	43 ± 32 a	0,64 ± 0,07 b	21 ± 3,5 a	4 320 ± 739 a	0,2 ± 0,13 d	20 ± 4,9 a	2,1 ± 1,7 a
AlyG2	24 ± 12 b	0,53 ± 0,08 de	15 ± 3,0 de	3 180 ± 954 c	0,24 ± 0,14 c	15 ± 4,8 b	1,3 ± 0,7 b
AlyG3	13 ± 16 c	0,62 ± 0,09 c	14 ± 2,9 f	3 151 ± 831 c	0,21 ± 0,10 cd	15 ± 4,2 b	0,92 ± 0,87 c
BORN	9,7 ± 5,6 c	0,67 ± 0,09 a	18 ± 2,5 b	4 261 ± 807 a	0,57 ± 0,10 b	19 ± 5,0 a	0,72 ± 0,40 c
LEPT	6,2 ± 2,8 d	0,67 ± 0,06 a	13 ± 2,2 g	2 215 ± 421 e	0,18 ± 0,06 d	14 ± 3,0 b	0,45 ± 0,55 d
LNC	9,8 ± 4,6 c	0,53 ± 0,06 de	17 ± 2,9 bc	2 556 ± 363 d	0,12 ± 0,05 e	15 ± 5,1 b	0,32 ± 0,15 d
NOC	60 ± 47 a	0,5 ± 0,06 e	14 ± 3,0 ef	1 543 ± 472 f	4,9 ± 2,6 a	20 ± 5,5 a	2,7 ± 2,0 a
MOY	22 ± 25	0,61 ± 0,1	16 ± 4,1	3 326 ± 1 155	0,52 ± 1,23	17 ± 5,6	1,2 ± 1,2
	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na
AlyA	2,13 ± 0,77 a	84 ± 47 b	10 916 ± 6 559 c	5 337 ± 2 888 d	74 ± 23 a	0,59 ± 0,65 c	0,95 ± 6,41 e
AlyG1	1,97 ± 0,47 a	118 ± 74 a	11 882 ± 3 033 a	7 482 ± 1 415 a	55 ± 13 c	0,64 ± 0,62 bc	92,6 ± 120 a
AlyG2	2,02 ± 0,85 ab	82 ± 31 b	10 867 ± 4 558 bc	6 971 ± 2 579 b	60 ± 16 b	0,56 ± 0,59 c	7,14 ± 13,1 d
AlyG3	1,50 ± 0,60 c	65 ± 49 c	10 138 ± 4 282 c	6 261 ± 2 150 c	62 ± 19 b	0,68 ± 0,79 bc	69 ± 55 b
BORN	1,79 ± 0,38 b	49 ± 16 d	11 844 ± 5 200 ab	6 895 ± 2 839 bc	58 ± 10 b	0,52 ± 0,58 c	52 ± 51 c
LEPT	1,41 ± 0,35 c	36 ± 11 e	9 587 ± 2 000 c	5 030 ± 1 202 d	42 ± 10 d	0,79 ± 0,68 ab	37,4 ± 14,2 c
LNC	1,74 ± 0,31 b	36 ± 8,3 e	11 026 ± 1 406 a	5 038 ± 730 d	40 ± 10 d	0,65 ± 0,75 bc	8,85 ± 11,3 d
NOC	1,51 ± 0,39 c	147 ± 92 a	13 196 ± 5 480 a	8 677 ± 3 489 a	43 ± 12 d	1,36 ± 1,24 a	141 ± 106 a
MOY	1,8 ± 0,6	74 ± 57	11 018 ± 4 524	6 311 ± 2 491	56 ± 19	0,68 ± 0,72	50 ± 74
	Ni	P	Pb	S	Si	Zn	
AlyA	3 579 ± 1 112 b	1 694 ± 682 c	0,57 ± 0,17 b	2 852 ± 1 376 c	136 ± 32 b	86 ± 33 c	
AlyG1	2 329 ± 726 d	2 656 ± 629 a	0,55 ± 0,15 b	2 765 ± 1 085 c	183 ± 67 a	59 ± 15 d	
AlyG2	2 700 ± 1 177 cd	1 338 ± 565 d	0,45 ± 0,18 c	2 859 ± 1 267 c	123 ± 26 c	83 ± 23 c	
AlyG3	2 375 ± 844 d	1 379 ± 746 d	0,36 ± 0,13 d	3 108 ± 1 390 c	99 ± 29 d	63 ± 23 d	
BORN	4 032 ± 940 a	1 980 ± 637 b	0,73 ± 0,15 a	3 955 ± 1 206 a	128 ± 38 c	91 ± 20 b	
LEPT	2 886 ± 965 c	1 654 ± 424 c	0,43 ± 0,15 c	3 462 ± 822 b	76 ± 13 e	54 ± 16 e	
LNC	2 623 ± 710 cd	2 432 ± 326 a	0,41 ± 0,12 c	3 950 ± 685 a	87 ± 14 d	46 ± 9,0 f	
NOC	2 669 ± 804 cd	945 ± 284 e	0,42 ± 0,15 c	3 782 ± 1 306 ab	174 ± 82 ab	147 ± 59 a	
MOY	2 986 ± 1 113	1 830 ± 768	0,51 ± 0,19	3 279 ± 1 256	125 ± 55	74 ± 34	

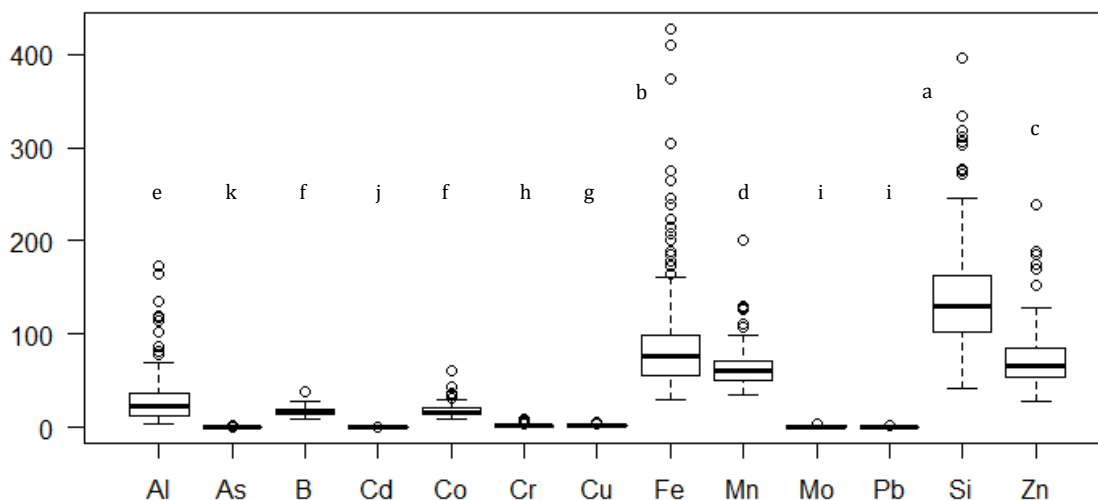


Figure 21 _ Concentrations des éléments en traces dans les parties aériennes d'*A. murale* après 70 jours de culture sur une terre ultramafique. Données des quatre populations d'*A. murale* confondues, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Wilcoxon, $p < 0,05$).

d) Corrélations du Ni avec Ca, Co et Zn

Toutes populations confondues, la biomasse est corrélée négativement à l'ensemble des éléments dosés dans les parties aériennes. Plusieurs éléments sont corrélés positivement entre eux : Al, Fe et Cr par exemple. Il y a aussi des corrélations entre éléments majeurs : K-Mg et K-S, S-Mg, des corrélations entre éléments mineurs : Al-Fe, Cr-Fe, Ni-Zn et des corrélations du Ca avec Mn, Co, Ni et Pb. Les matrices de corrélation par population indiquent trois groupes de variables, corrélées entre elles pour chacune des populations. Un premier groupe constitué de Cr, Al, Fe et Mg, un deuxième groupe incluant les éléments traces B, Mn, Co, Ni, Pb, Zn et le Ca, et enfin un troisième groupe plus variable selon les populations et constitué principalement des éléments majeurs K, S, P et parfois Mg et Cu (Annexe 5). Les deux derniers groupes sont fréquemment corrélés entre eux. Dans *N. tympheae*, ces trois groupes sont corrélés.

Le Ni est corrélé positivement avec Co, Zn, et Ca mais avec des coefficients variant selon les espèces (Annexe 6). Le Ni est fortement corrélé au Co dans AlyA et AlyG2 mais faiblement dans les deux autres espèces d'*A. murale*. Le Ni est corrélé fortement au Zn dans AlyG3 et plus faiblement dans les autres populations. Ni et Zn sont fortement corrélés dans LEPT mais pas dans *B. tympheae*. Par ailleurs, le Ni est corrélé au Co et au Zn dans *L. emarginata* issue de graines calibrées mais pas lorsque les graines sont non calibrées. Le Ni est aussi corrélé positivement avec le B, Mn et le Pb pour AlyA, Aly G2, Aly G3, *B. tympheae*, LEPT et NOC. Enfin, *N. tympheae* présente des corrélations élevées pour de nombreux éléments.

e) Variabilité de la composition

D'après Wilding (1985), si le coefficient de variation (CV) est inférieur à 0,15 alors la variation est faible, si $0,15 < CV < 0,35$, la variation est modérée et si $CV > 0,35$, alors elle est élevée. Le CV pour le Ni dans AlyG2 et G3 est supérieur à 0,35 alors qu'il est égal à 0,31 pour les deux autres populations d'*A. murale* (Annexe 7). Pour *B. tympheae*, il est faible et plus élevé dans *N. tympheae*. Pour *L. emarginata* (calibrées), il est de 0,33 et est inférieur dans *L. emarginata* (non calibrées). *N. tympheae* est la seule espèce avec un $CV > 0,35$ pour la biomasse. Ainsi, la variation est différente

selon l'espèce et la population, elle peut être liée à l'origine des graines : nombre de parents dont est issu le lot de graines.

Les coefficients de variation sont élevés (>0,35) pour les éléments Al, Cd, Cr, Mo et Na et ce pour toutes les populations. En dehors de ces éléments, *L. emarginata* présente une variabilité faible ($\leq 0,35$).

f) Individus avec des concentrations extrêmes

Les valeurs extrêmes, définies comme les valeurs distantes du 25^{ème} et du 75^{ème} percentiles de plus de 1,5 fois la valeur de l'intervalle interquartile, peuvent représenter un individu avec un potentiel exceptionnel pour l'élément considéré. Pour chacun des éléments suivants : B, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Zn, la distribution des 419 individus est observée par population pour identifier les individus avec une concentration extrême pour au moins un de ces éléments. Au total, 68 individus ont une concentration très élevée pour au moins 1 de ces éléments. *L. emarginata* (non calibrées) présente la plus grande proportion de ces individus (près de 30%) alors que *N. tymphaea*, n'a que 4% de ces individus (Figure 22a). Les éléments majeurs présentent davantage de concentrations extrêmes que les éléments traces (Figure 22b). En effet, Fe, Mg, S et Fe ont entre 5,5 et 7,5% de leurs concentrations qui sont extrêmes et le Ni le plus faible avec à peine 2%, correspondant à 8 individus (Figure 19).

Les individus avec une concentration extrême de Ni ont aussi une concentration extrême en Co, Zn et Mn et parfois plusieurs extrêmes dans le même individu. En revanche, pour le Co, Mn et Zn il y a des individus avec une concentration extrême pour un seul de ces éléments et pas pour les autres ni pour le Ni.

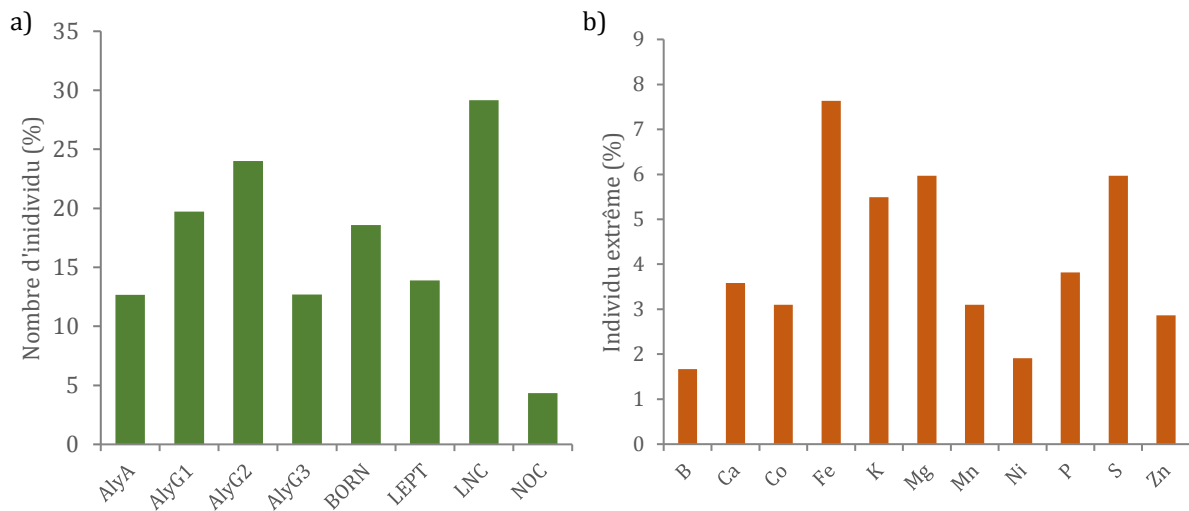


Figure 22 _ a) Répartition des individus avec au moins une valeur extrême pour un des éléments suivants : B, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Zn et b) Nombre de valeurs aberrantes par élément

g) Individus les plus efficaces pour le Ni, le Co

Individus les plus concentrés en Ni

En moyenne, la concentration du Ni est 175 fois plus élevée que celle du Co. *A. murale* a des aptitudes différentes à concentrer le Ni selon la population. La population AlyA a les concentrations les plus élevées en Ni et aussi en Co, dont trois individus ont plus de 30 mg kg⁻¹ Co

(Figure 23). La concentration du Ni est corrélée à celle du Co sauf dans AlyG1 pour laquelle à la concentration de Ni comprise entre 3 200 et 4 200 mg kg⁻¹, deux groupes d'individus se distinguent : l'un, avec cinq individus qui ont une concentration de Co de 20 ± 1 mg kg⁻¹ et l'autre, avec le même nombre d'individus et une concentration de 28 ± 2 mg kg⁻¹ de Co. Pour AlyG2, les 2 éléments sont parfaitement corrélés.

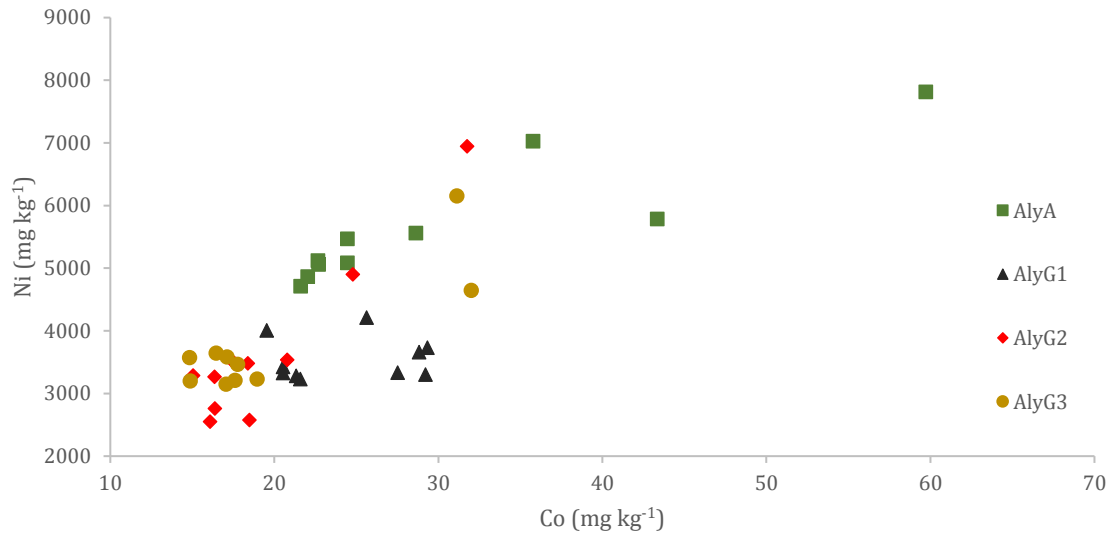


Figure 23 _ Relation entre Ni et Co dans les dix individus les plus concentrés en Ni pour chacune des quatre populations d'*A. murale*

Individus les plus concentrés en Co

Les dix individus de chaque population qui présentent les concentrations en Co les plus élevées sont représentés sur la Figure 24. Ces individus sont parfois les mêmes que ceux ayant les plus fortes concentrations du Ni. Ainsi, sept, cinq, neuf et cinq individus ont les meilleures concentrations pour le Ni et le Co pour respectivement AlyA, AlyG1, AlyG2 et AlyG3. Étant donné que les individus sont les mêmes que pour le Ni, les observations sont similaires avec la figure précédente. Il est à noter dans AlyG1, qu'un individu se distingue pour sa concentration supérieure en Co. Dans cette même population, pour une fourchette de concentration de Co de 25 à 30 mg kg⁻¹, deux groupes d'individus se distinguent : l'un avec des concentrations supérieures à 3 000 mg kg⁻¹ de Ni, l'autre avec des concentrations inférieures (individus entourés en noir Figure 24). Par ailleurs, dans le cas d'AlyA, au-delà d'une concentration de 25 mg kg⁻¹ de Co, deux groupes d'individus se distinguent (entourés en vert et rouge Figure 24) : ceux pour lesquels les concentrations du Ni et du Co sont élevées, et ceux pour lesquels la corrélation est négative entre les deux éléments (concentration du Co augmente et celle du Ni diminue).

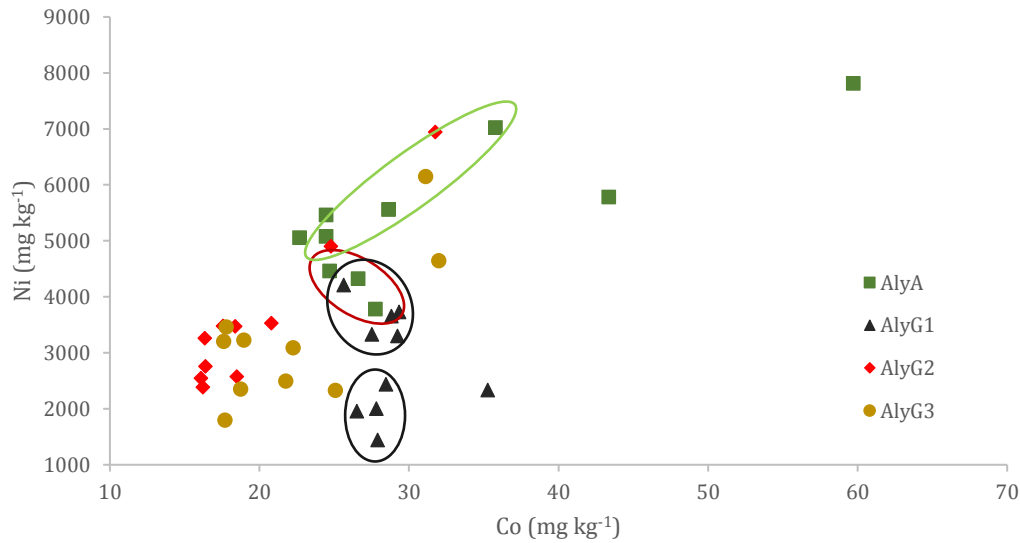


Figure 24 _ Relation entre Ni et Co pour les dix individus offrant les concentrations les plus élevées en Co des quatre populations d'*A. murale*

Ces deux groupes observés dans AlyA se retrouvent dans *L. emarginata* au-delà d'une concentration de 16 mg kg⁻¹ de Co dans les parties aériennes (Figure 25). Quand la concentration de Co est inférieure à 16 mg kg⁻¹, alors les concentrations de Co et Ni sont corrélées positivement. Mais au-delà de cette valeur, deux groupes d'individus se distinguent : l'un présente une corrélation positive entre les deux éléments et l'autre une corrélation négative.

Dans *L. emarginata* (issus de graines calibrées), au sein des dix individus avec les concentrations de Co les plus élevées, il existe deux types de profil qui se retrouvent dans les corrélations Co-Ni et Co-Zn (Figure 26) car Ni et Zn sont corrélés positivement ($r_s=0,81$).

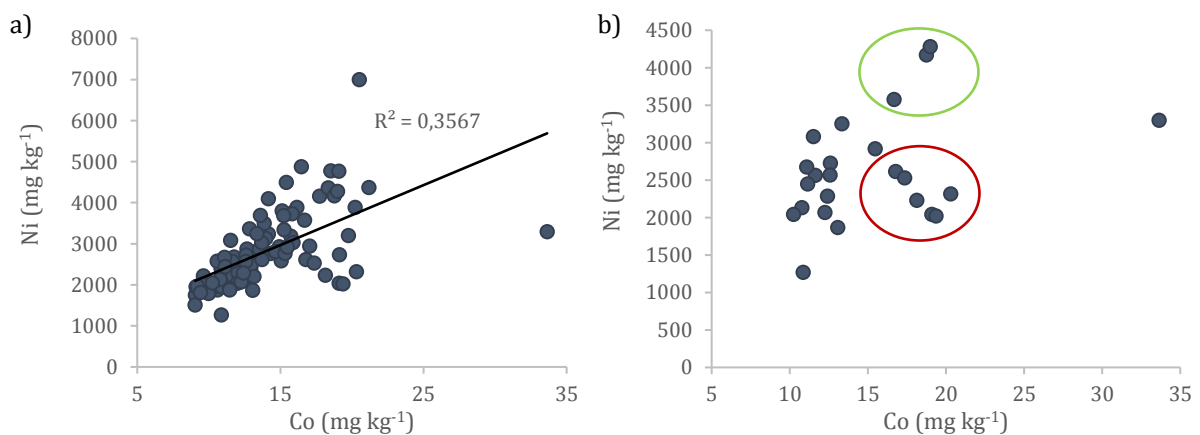


Figure 25 _ Relation entre Ni et Co dans *L. emarginata* a) individus issus de graines calibrées et non calibrées (N=72+24) et b) individus issus des graines de *L. emarginata* non calibrées (N=24)

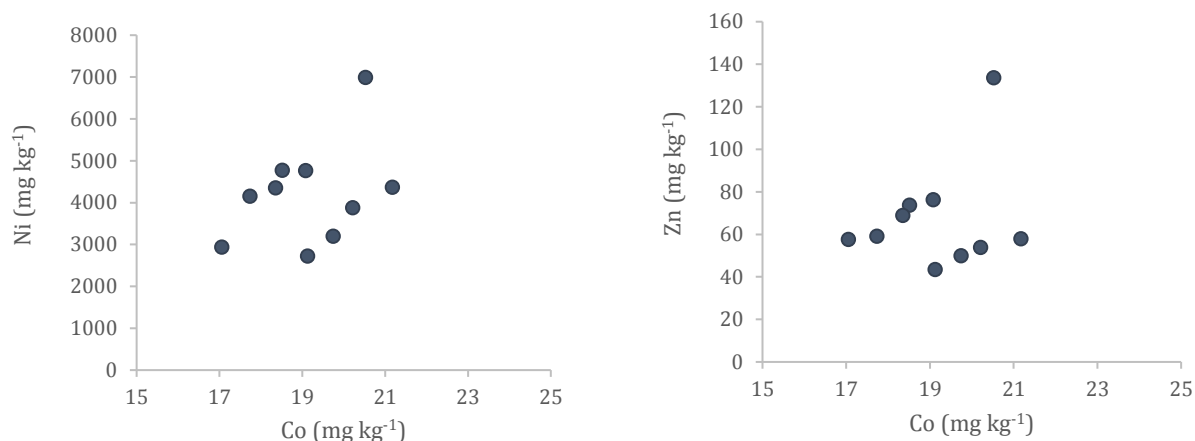


Figure 26 _ Relations du Co avec le Ni et le Zn dans les parties aériennes des dix *L. emarginata* les plus concentrés en Co (graines calibrées)

1.3. Discussion

La production de biomasse supérieure dans *L. emarginata* confirme les résultats de Chardot *et al.* (2005) de culture de cette espèce sur sol ultramafique pour laquelle la biomasse était supérieure comparée à *A. murale* et *B. tymphaea*, alors que les populations étaient différentes de celles utilisées ici. Cette même étude met en évidence une concentration du Ni de 5 595 mg kg⁻¹ dans *B. tymphaea* et supérieure aux autres espèces *L. emarginata* et *A. murale*, de 4 591 et 3 671 mg Ni kg⁻¹ MS respectivement. La concentration dans *A. murale* est similaire à celle obtenue dans notre étude pour la population d'Albanie. Les concentrations supérieures de cette étude peuvent être expliquées par le volume de sol plus grand et le temps de culture plus long. Les concentrations du Ni des quatre populations d'*A. murale* sont inférieures à celles mesurées dans *A. bertolonii* excepté pour une population (Impruneta), la moins efficace qui avait des concentrations similaires en Ni, Cr, Co, mais largement supérieure en Ca et inférieure en Mg à celles mesurées dans *A. murale* Albanie, la meilleure population de notre étude. La différence peut venir de la maturité des individus qui ont été récoltés à l'âge adulte *in situ* dans leur étude (Galardi *et al.* 2007b). Par ailleurs, les coefficients de variation du Cr, Na, Mo et Al sont élevés dans notre étude (Annexe 7), car tous supérieurs à 0,35 (Wilding 1985). Pour le Cr, ces résultats rejoignent ceux de Galardi *et al.* (2007b). La variabilité du Cr est importante dans les Brassicacées hyperaccumulatrices de Ni de ces études. La variabilité du Ni au sein des populations d'*A. murale* est comprise dans la fourchette de CV de celle d'*A. bertolonii*, 0,31 à 0,44 et 0,221 à 0,595 respectivement. La variabilité du Ca est faible dans les deux espèces et varie en fonction de la population pour le Mg et le Co. La variabilité du Co est élevée dans leur étude et beaucoup plus faible dans *A. murale* (CV compris entre 0,25 et 0,39). La variabilité de la concentration du Ni est inférieure dans *N. tymphaea* et est la plus faible pour *B. tymphaea* par rapport aux populations d'*A. murale*. Le calibrage des graines diminue la variabilité de la concentration du Ni dans les parties aériennes. Le Ni est souvent corrélé au Co et au Zn et, dans une moindre mesure, au Mn et au Pb. Il est donc difficile d'identifier une population qui pourrait préférentiellement hyperaccumuler le Ni et pas ces autres éléments dans la mesure où ils seraient présents en plus hautes concentrations, avoisinant celle du Ni. *N. tymphaea*, qui est l'espèce la plus efficace pour concentrer le Zn et dans une moindre mesure le Co, co-accumule les éléments présents. La majorité des éléments dans ses feuilles sont corrélés entre eux, ce qui limite la possibilité d'atteindre des concentrations élevées d'une part et complique l'extraction des métaux après la récolte. De plus, les plantes ont extrait en moyenne de faibles concentrations de Co, entre 15 et

20 mg kg⁻¹ selon l'espèce. Les individus ont des capacités très différentes à concentrer cet élément. Alors que *L. emarginata* a la concentration de Co la plus faible de toutes les espèces testées, il se dégage des individus avec deux profils distincts parmi le lot de graines non calibrées. Les individus avec les concentrations de Co les plus élevées se distinguent en deux groupes : ceux avec aussi les plus fortes concentrations de Ni et *a contrario*, ceux avec des concentrations de Ni plutôt basses. Ainsi, pour l'hyperaccumulation d'autres éléments, des génotypes se distinguent au sein des populations et *L. emarginata* semble posséder un génotype qui pourrait potentiellement extraire le Co dans la mesure où sa concentration dans le sol serait plus élevée que dans un sol ultramafique. Si la calibration des graines de *L. emarginata* n'a pas permis de diminuer la variabilité elle a permis, cependant, d'identifier des profils d'individus intéressants pour le Co dans le lot non calibrées.

1.4. Conclusion

Cette étude a montré une variabilité intra et inter- population élevée. Au sein de celle-ci, peuvent être identifiés des individus plus performants pour l'extraction du Ni et d'autres pour d'autres éléments. Les concentrations mesurées confirment celles de la littérature malgré le faible volume de terre mis à disposition des plantes. *L. emarginata* et *B. tymphaea* offrent le meilleur potentiel pour la phytoextraction du Ni. Des individus dans la population de *L. emarginata* ont des facultés à l'encontre du Ni alors que d'autre concentrent le Co pour un contenu en Ni plus faible. Ainsi, c'est à l'échelle de l'individu que peut s'effectuer la sélection et non à l'échelle de la population. Le potentiel de ces plantes à concentrer d'autres éléments d'intérêts que les éléments métalliques va être étudié.

2. Production de composés organiques d'intérêt par les hyperaccumulateurs de Ni

Les métabolites secondaires sont produits par la plante en réponse à un stress environnemental, *e.g.* carence en éléments nutritifs dans le milieu, stress généré par des herbivores. Jusqu'à présent, il n'existe aucune donnée concernant la production de métabolites secondaires dans les hyperaccumulateurs de Ni. Or, la toxicité du milieu, induite par la concentration des métaux, pourrait provoquer la synthèse de tels composés. Par ailleurs, les carences en éléments nutritifs peuvent aussi être à l'origine de la synthèse de composés capables de chélater les métaux (*e.g.* phytosidérophores pour Fe, Zn). Au-delà de la connaissance de la physiologie des hyperaccumulateurs, la connaissance de la composition des plantes en métabolites secondaires présente un intérêt pour une valorisation (*e.g.* pharmacologie, cosmétologie). Le travail repose sur une série d'analyses de coumarines effectuées sur un ensemble d'échantillons de plantes hyperaccumulatrices de Ni prélevées sur le terrain ou provenant d'expériences conduites durant la thèse.

2.1. Matériels et méthodes

Un criblage a été effectué sur 14 espèces hyperaccumulatrices de Ni. (*C. charrellii*, *C. thracica*, *A. murale*, *A. serpyllifolium*, *A. bertolonii*, *A. heldreichi*, *A. smolicanum*, *B. baldacii* et *B. tymphaea*, *N. tymphaea* et *N. caerulescens*, *Sedum alfreddii* (HA et non HA), *L. emarginata*). Les analyses ont porté sur les organes séparément : *C. charrellii* (feuille et tige), *C. thracica* (feuille, tige et rhizome), *A. murale* (PA et PR), *A. serpyllifolium* (PA), *A. bertolonii* (PA avec fleurs), *A. heldreichi* (PA avec siliques, racines), *A. smolicanum* (PA et PR), *B. baldacii* (PA) et *B. tymphaea* (PA et PR), *N. tymphaea*

(trois individus : PA et PR) et *N. caerulea* (quatre individus : PA), *S. alfreddii* (HA et non HA : PA), *L. emarginata* (PA et PR). Onze molécules appartenant aux coumarines ont été analysées : Angélicine, 6méthoxy-coumarine, Daphnétine, Daphnétine 8 méthyléther, Daphnétyl Diméthyléther, Esculétine, Fraxétine, Limétine, Scoparone, Scopolétine et Umbelliférone.

La recherche des coumarines a été également faite sur les parties aériennes des plantes récoltées durant l'expérimentation décrite dans la Partie 3 Chapitre 1 (*B. tymphaea* et *L. emarginata*). Trente-trois composés ont été analysés : Auraptène, Bergamottine, 6,7-Dihydroxybergamottine, Bergaptène, Bergaptol, Byakangélicine, Byakangélicol, Cnidicine, Cnidiline, Coumarine, **Daphnétyl diméthylether**, Epoxyauraptène, Epoxybergamottine, **Esculétine**, Esculine (esculétine glycosylée), 8-Géranyloxy-psoralène, Héraclénine, Héraclénol, Impératorine, Isoimpératorine, Isopimpinelline, Limétine, Osthol, Oxypeucedanine, Oxypeucedanine hydrate, Phelloptérine, Psoralène, **Scopolétine**, Scopoline. Quatorze échantillons de chacune des espèces sont analysés et la composition élémentaire est obtenue par dosage à l'ICP-OES des minéralisats.

Les échantillons de plantes sont séchés puis broyés. Deux extractions successives au méthanol sont effectuées sur une prise d'essai de 50 mg (Partie 2 « analyse des coumarines »). Les solutions sont analysées par U-HPLC.

2.2. Résultats

L'analyse de 33 échantillons de matériel végétal des 14 espèces permet de mettre en évidence la présence de plusieurs composés, dont la scopolétine et l'esculétine (Annexe 8). Ces deux molécules sont présentes à plus de 1 mg kg⁻¹ MS, essentiellement dans les Brassicacées. *L. emarginata* et *B. tymphaea* et les cinq espèces d'*Alyssum* sont les plus concentrées en ces molécules. Pour *Alyssum*, des concentrations élevées sont observées dans les parties aériennes et les racines. La scopolétine est retrouvée dans les parties aériennes de *B. tymphaea* (22 mg kg⁻¹) et *L. emarginata* (41 mg kg⁻¹). Une seconde analyse de ces deux espèces (échantillons de la Partie 3 Chapitre 1) met en évidence trois autres composés : le byakangélicol, l'époxyauraptène et la scopoline (Tableau 13) alors que l'esculétine n'est plus détectée.

Tableau 13 _ Concentration des coumarines dans les parties aériennes de *B. tymphaea* et *L. emarginata*. Moyenne ± écart-type

	N	Byakangélicol	Epoxyauraptène	Scopolétine	Scopoline	
<i>B. tymphaea</i>	14	5,07 ± 3,29	13,5 ± 6,90	279 ± 56	8,68 ± 5,73	mg kg ⁻¹
<i>L. emarginata</i>	14	15,6 ± 11,9	12,8 ± 5,62	190 ± 67	2,63 ± 2,53	mg kg ⁻¹

La concentration de la scopolétine est corrélée positivement avec celle du Ni (R²=0,29, p<0,01) et du Fe (R²=0,42, p<0,001) (Figure 27). Cette molécule montre aussi des corrélations positives avec Co (R²=0,32, p<0,01), Mn (R²=0,35, p<0,01), B (R²=0,50, p<0,001), Ca (R²=0,45, p<0,001), Mg (R²=0,26, p<0,01), Zn et P. À l'inverse, la corrélation est négative avec la biomasse (R² significatifs mais inférieurs à 0,25). Pour les autres composés organiques, bien que significatives, les corrélations sont faibles (R²<0,25). Cependant, en considérant les espèces séparément, ces molécules ne sont pas corrélées avec les mêmes éléments. Ainsi, l'époxyauraptène est corrélé positivement avec Co et Mn dans *B. tymphaea* (R² de 0,35 et 0,46 p<0,05) alors que dans *L. emarginata* il est corrélé avec Ni et Ca. Le byakangélicol est corrélé positivement avec K dans *B. tymphaea* alors que dans *L. emarginata* il l'est avec P et la scopolétine (R²>0,4 et p<0,5). La scopolétine et la scopoline sont corrélées négativement dans *B. tymphaea*. Dans le cas de

L. emarginata, la scopolétine est corrélée positivement avec B ($R^2=0,40$, $p<0,05$), P ($R^2=0,41$, $p<0,05$) et K ($R^2=0,49$, $p<0,01$), et la scopoline avec Fe ($R^2=0,34$, $p<0,05$).

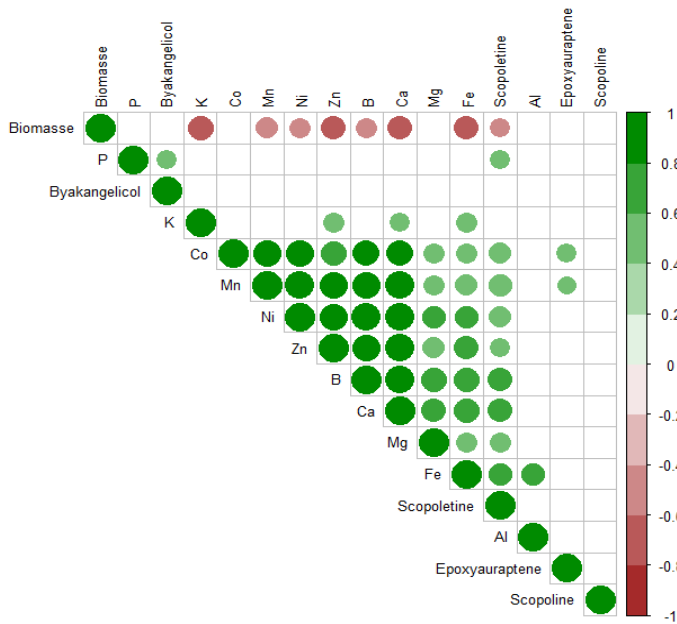


Figure 27 _ Matrice des corrélations deux à deux des éléments dosés dans les parties aériennes de *B. typharea* et *L. emarginata* (les deux espèces confondues) après 70 jours de culture sur la terre ultramafique. Coefficient de Pearson, $N=26$, les blancs signalent que le coefficient n'est pas significatif.

2.3. Conclusion

Le criblage effectué sur une série de plantes hyperaccumulatrices de Ni ayant poussé sur un sol ultramafique a permis de constater pour la première fois la présence de molécules organiques appartenant à la famille des coumarines. Elles sont principalement retrouvées dans les parties aériennes. Après quantification, il s'avère que la scopolétine est présente dans des concentrations jusqu'à 140 fois supérieures à celles mesurées dans les racines d'*A. thaliana* en absence de Fe (Schmid *et al.* 2014) où la concentration était de 2 000 ng g⁻¹ de scopolétine dans les extraits de racine. Les coumarines sont des métabolites secondaires produits en réponse à un stress ou à un besoin adaptatif. Lors d'une déficience en fer (et sous condition alcaline), *A. thaliana* libère des coumarines dans la rhizosphère qui jouent un rôle dans l'acquisition du fer par la plante (Schmid *et al.* 2014). Les Brassicacées étudiées ici produisent donc aussi de la scopolétine qui pourrait être impliquée dans la chélation des métaux par substitution de sa fonction OH. La présence de scopolétine dans les parties aériennes pourrait être alors liée à des processus de détoxification du Ni dans les feuilles. À l'inverse, les concentrations faibles de ces molécules retrouvées dans les racines suggèrent une faible implication dans le transport des métaux. Les coumarines ont été observées dans des HA de Ni développés sur un sol ultramafique, riche en fer. Leur concentration est corrélée positivement avec celle du Fe et du Ni. Les corrélations observées entre ces molécules et certains éléments tels que Ni, Fe, Ca ou Co laissent penser que la synthèse de ces molécules et le transport des éléments sont intimement liés. En l'absence de Fe dans le milieu, la concentration en scopolétine pourrait-elle augmenter pour aider la nutrition en Fe ? La production aurait-elle lieu dans les racines ? Des expériences complémentaires sont nécessaires en faisant varier les concentrations en Fe et Ni afin de comprendre les conditions de synthèse de ces molécules. Leur rôle dans l'absorption, le transport et la séquestration des métaux, tels que Fe et Ni, reste à démontrer.

3. Effet de la co-culture sur l'accumulation du Ni

L'optimisation des itinéraires techniques dans le cas de l'agromine a pour but d'augmenter la biomasse et la concentration du Ni. Elle peut s'envisager de différentes façons : par utilisation d'engrais minéraux (Bani *et al.* 2007), par apport d'amendements (Rees *et al.* 2015, 2016; Wiszniewska *et al.* 2016; Álvarez-López *et al.* 2016), par inoculation de souches « plant growth promoting » (Abou-Shanab *et al.* 2003, 2006; Glick *et al.* 2011; Sessitsch *et al.* 2013; Cabello-Conejo *et al.* 2014; Durand *et al.* 2016), ou par la densité des plantes (Bani *et al.* 2015a; b). Une voie possible est de diversifier le couvert végétal qui permet d'augmenter le nombre de fonctions rhizosphériques qui interviennent dans la croissance et le développement des plantes. Dans le cas d'espèces hyperaccumulatrices, la co-culture peut augmenter la production de biomasse et donc la quantité extraite (Jiang *et al.* 2010) et la concentration du métal dans les parties aériennes de l'espèce hyperaccumulatrice (Jiang *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011). Une culture en conditions contrôlées a été conduite afin de comparer deux modalités de couvert végétal : mono-spécifique ou co-culture d'hyperaccumulateurs, en vue de déterminer les conditions qui permettent la production de Ni la plus élevée.

3.1. Matériels et méthodes

Quatre espèces, *A. murale* (S II), *B. tymphaea* (S II), *L. emarginata* (S II) et *N. tymphaea* (S III) sont cultivées en vases de végétation, seules (couvert mono-spécifique) ou ensemble (co-culture). Une modalité sans plante « sol nu » est préparée pour étudier l'effet du couvert. Dans chaque vase, sont placés 3 kg de terre ultramafique. Huit individus sont conduits pour les couverts mono-spécifiques et deux individus des quatre espèces pour la co-culture. Chaque modalité comporte sept répétitions. Les vases de végétation sont disposés en chambre de culture selon sept blocs aléatoires. Les conditions de culture sont : photopériode de 16h jour, 8h nuit, température 22°C jour, 15°C nuit, hygrométrie 70%, luminosité 2000 Lux (soit 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^2$). L'humidité du sol est fixée à 75 % de la capacité au champ et maintenue constante par un arrosage toutes les 48 h. La récolte est effectuée après 120 jours de culture. Pour les modalités « monoculture », un échantillon des parties aériennes coupées au collet et un échantillon des racines sont constitués. Pour la modalité co-culture, les parties racinaires de chaque espèce sont séparées dans la mesure où il est possible d'identifier leur appartenance. Les amas racinaires non affiliés à une espèce sont mis à part. Les biomasses aériennes et racinaires sont pesées, puis minéralisées et leur composition est analysée par ICP-OES après minéralisation. La terre adhérente (*i.e.* rhizosphérique) est récoltée et sont mesurés le pH, les éléments extractibles au DTPA, la capacité d'échange cationique (cobaltihexamine) et les éléments pseudo-totaux (eau régale).

3.2. Résultats

a) Biomasse et extraction du Ni

En culture mono-spécifique, *N. tymphaea* produit une biomasse aérienne plus élevée à celle de *B. tymphaea* et d'*A. murale*. La production de *L. emarginata* est intermédiaire (Figure 28a) (Wilcoxon, $p < 0,10$). En comparaison, lors de la co-culture, la biomasse de *L. emarginata* diminue significativement tandis que celle de *B. tymphaea* tend à augmenter. La biomasse racinaire de *L. emarginata* est significativement supérieure à celles de *N. tymphaea* et *A. murale*. La concentration du Ni dans les parties aériennes est la plus élevée pour *B. tymphaea* et la plus faible pour *L. emarginata* en monoculture. Dans le couvert mixte, elle augmente dans ces deux espèces

alors qu'elle n'est pas différente dans *N. tymphaea* et *A. murale* de celle obtenue lors de la culture seule (Figure 28b). Le facteur de translocation (FT) (concentration dans les PA/concentration dans les PR) du Ni est le plus élevé pour *N. tymphaea* et *B. tymphaea* (Figure 29a). En co-culture, le FT est plus faible pour *B. tymphaea* et *A. murale* par rapport à la monoculture. Le facteur de bioconcentration (FBC) (concentration de Ni dans les parties aériennes/ la concentration de Ni_{DTPA} à l'issue de la culture), est supérieur dans *B. tymphaea* quel que soit le mode de culture (Figure 29b). *A. murale* seul extrait seulement 11 mg de Ni par vase de végétation, quantité significativement inférieure à toutes les autres modalités (20 à 26 mg Ni par vase selon le couvert) (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log). La quantité extraite par individu en mono- spécifique et co-culture ne varie pas avec *B. tymphaea*, *A. murale* et *N. tymphaea* mais elle diminue significativement avec *L. emarginata* (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Figure 30). *B. tymphaea* a un rendement de Ni significativement supérieur aux trois autres espèces en co-culture.

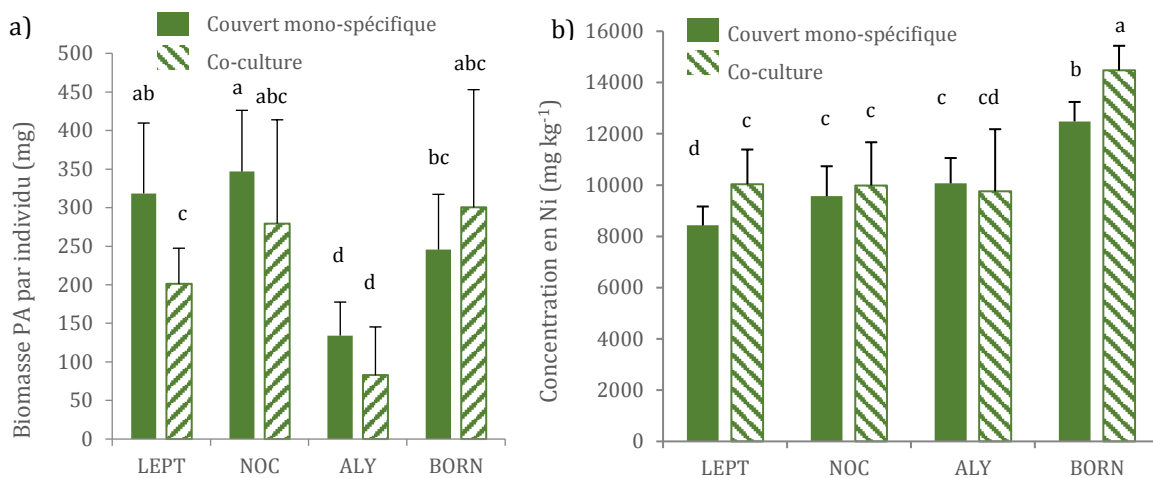


Figure 28 _ a) Biomasse et b) Concentration du Ni des parties aériennes des quatre espèces hyperaccumulatrices selon le mode de culture. LEPT : *L. emarginata*, NOC : *N. tymphaea*, ALY : *A. murale*, BORN : *B. tymphaea*. Les barres verticales représentent les écarts-types (N=7). Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Wilcoxon, $p < 0,10$).

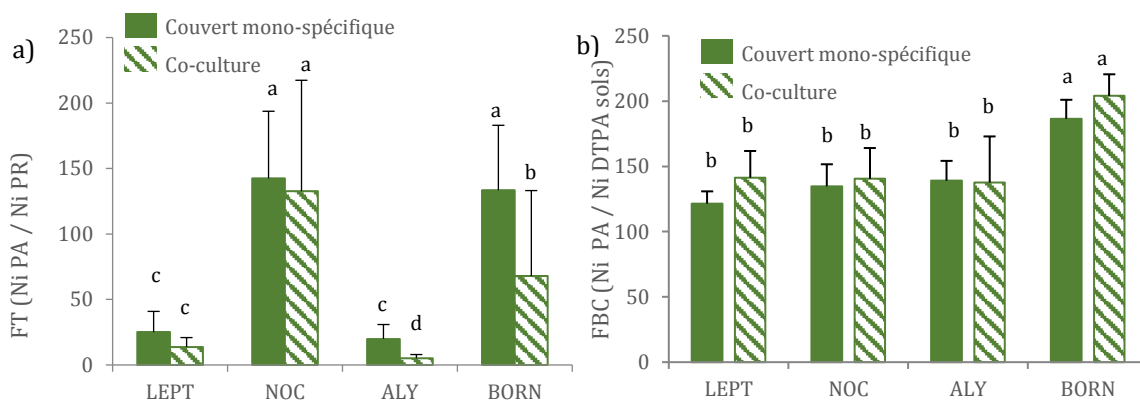


Figure 29 _ Facteur de a) translocation du Ni et de b) bioconcentration du Ni. LEPT : *L. emarginata*, NOC : *N. tymphaea*, ALY : *A. murale*, BORN : *B. tymphaea*. Les barres verticales représentent les écarts-types. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log dans le cas de TF).

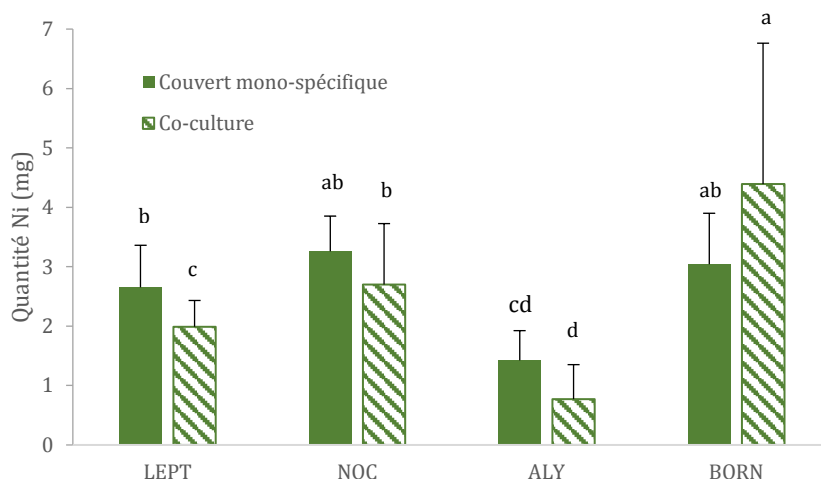


Figure 30 _ Quantité de Ni extrait par individu selon l'espèce et le type de couvert (mono-spécifique ou en co-culture). LEPT : *L. emarginata*, NOC : *N. tymphaea*, ALY : *A. murale*, BORN : *B. tymphaea*. Les barres verticales indiquent les écarts-types. Les lettres indiquent les différences significatives (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

b) Composition des parties aériennes et racinaires

En couvert mono-spécifique, *B. tymphaea* offre les concentrations les plus élevées en éléments majeurs Ca, K, Mg et Na dans les PA, ainsi qu'en Ni et Pb (Tableau 14). *A. murale* et *N. tymphaea* concentrent plus d'Al et de Fe dans leur PA et plus de Cu et Zn dans les PR que *L. emarginata* et *B. tymphaea*. *N. tymphaea* transfère plus de Cd, Zn et Co vers les PA que les autres espèces. La plante concentre faiblement le Ca. Les concentrations en Fe et Cd sont plus élevées dans ses PR. *L. emarginata* se distingue des trois autres espèces par ses plus faibles concentrations dans les PA en Al, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb et Zn, et dans les PR en Mn, Cr et Cd. **En co-culture**, les concentrations de Fe augmentent dans les PA de toutes les espèces ainsi que celles du Ca et du Zn dans les PR. Les concentrations racinaires du Co, Cr, Fe, Mn, Pb diminuent (Tableau 14). La co-culture n'a pas d'effet sur le transfert du Co, Cu, Na et Zn dans les PA. Dans *B. tymphaea*, l'augmentation de Ni dans les PA pourrait être due à la diminution de Ca et de Mn dans les PA. En effet, le Ni et le Ca sont corrélés positivement dans les PA en monoculture ($R^2=0,81$), mais ils ne sont plus corrélés dans les parties aériennes en co-culture ($R^2=0,14$). Dans les parties racinaires, c'est le contraire : Ni et Ca ne sont pas corrélés en monoculture mais en co-culture ($R^2=0,74$) où la concentration des deux éléments augmente dans les PR. Enfin, le K est multiplié par 11 dans les PR de *B. tymphaea* en co-culture, et une corrélation du Ni et du Cu apparaît dans les PA ($r_s=0,64$) et dans les PR ($r_s=0,82$). De plus, l'augmentation de Ni dans les PA de *B. tymphaea* et *L. emarginata* peut s'expliquer par l'augmentation du Ni dans les PR et la diminution du Co et Mn dans les PR. Aussi, dans *L. emarginata*, le Mg et le Ni augmentent de 1,2 fois dans les PA. Cependant, dans *N. tymphaea*, alors que Mg et K augmentent dans les PA, ils n'augmentent pas dans les PR et le Ni augmente ni dans les PA ni dans les PR. Par contre, le Cd augmente dans les PR et les PA. Dans *A. murale*, le Ni augmente dans les PR mais pas dans les PA. Il y a une augmentation de Ca dans les PA. Elle est expliquée par l'augmentation de Ca dans les PR accompagnée par une augmentation du Mg dans les PR ($r_s=0,63$).

c) Composition de la terre rhizosphérique

Le pH n'est pas différent entre les sols plantés et non plantés. Cependant, il est inférieur en présence de *B. tymphaea* par rapport à *A. murale* et *L. emarginata*. Les concentrations de Ni_{DTPA} ,

K_{CEC} et Mg_{CEC} diminuent en présence d'un couvert, à l'exception de *N. tymphaea*. Les concentrations de Cu_{DTPA} , Mn_{DTPA} , Pb_{DTPA} , Na_{CEC} , Mn_{CEC} et Ca_{CEC} augmentent en présence d'un couvert, sauf avec *A. murale* (Tableau 15). Les concentrations pseudo-totales après culture varient très peu d'une modalité à une autre. Celle du Ni diminue sauf avec *A. murale*. Celle du Co diminue avec *B. tymphaea*.

Tableau 14 _ Biomasse individuelle et composition des parties aériennes (PA) et racinaires (PR) selon l'espèce et le couvert. ALY : *A. murale*, BORN : *B. tymphaea*, LEPT : *L. emarginata*, NOC : *N. tymphaea*, mono: couvert mono-spécifique, mixte: couvert multispécifique. Moy ± écart-type. Pour chaque variable, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Espèce	Couvert	Biomasse_PA	Al_PA	Al_PR	Ca_PA	Ca_PR	Cd_PA	Cd_PR	Co_PA	Co_PR
ALY	mono	0,13 ± 0,04 d	166 ± 140 b	501 ± 301 b	26 415 ± 1 851 d	405 ± 153 bc	2,3 ± 0,5 d	0,63 ± 0,12 d	68 ± 8 b	3,7 ± 1,2 ab
BORN	mono	0,25 ± 0,07 bc	44 ± 50 c	794 ± 593 a	36 156 ± 1 949 a	546 ± 326 b	4,6 ± 0,6 c	0,9 ± 0,15 c	74 ± 7 b	4,5 ± 3,2 ab
LEPT	mono	0,32 ± 0,09 ab	17 ± 12 c	377 ± 110 b	16 131 ± 1 305 e	325 ± 84 c	1,0 ± 0,2 e	0,31 ± 0,07 e	50 ± 8 c	2,9 ± 0,7 bc
NOC	mono	0,35 ± 0,08 a	134 ± 107 b	737 ± 204 a	6 016 ± 595 f	131 ± 47 d	48 ± 12 b	1,9 ± 0,7 b	127 ± 26 a	5,9 ± 3,8 a
ALY	mixte	0,08 ± 0,06 d	410 ± 314 a	314 ± 91 bcd	29 309 ± 4 309 c	1 312 ± 535 a	2,4 ± 0,8 d	0,8 ± 0,6 d	68 ± 18 b	2,4 ± 0,7 cd
BORN	mixte	0,3 ± 0,15 b	135 ± 90 b	227 ± 65 d	31 574 ± 1 941 b	1 296 ± 595 a	4,5 ± 0,9 c	1,2 ± 0,3 b	75 ± 11 b	1,4 ± 0,2 f
LEPT	mixte	0,2 ± 0,05 c	113 ± 60 b	278 ± 70 cd	15 194 ± 1 889 e	484 ± 160 b	0,94 ± 0,24 e	0,30 ± 0,06 e	50 ± 6 c	1,6 ± 0,2 ef
NOC	mixte	0,28 ± 0,13 bc	319 ± 277 a	365 ± 127 bc	6 729 ± 1 177 f	480 ± 207 bc	62 ± 15 a	6,3 ± 1,5 a	127 ± 25 a	2,5 ± 2,3 de
Espèce	Couvert	Cr_PR	Cu_PA	Cu_PR	Fe_PA	Fe_PR	K_PA	K_PR	Mg_PA	Mg_PR
ALY	mono	29 ± 14 bc	5,1 ± 0,8 a	8,4 ± 2,5 ab	552 ± 459 bc	1406 ± 688 bc	24 814 ± 3 298 a	459 ± 264 b	11 437 ± 1 123 cd	1 155 ± 595 bc
BORN	mono	43 ± 29 ab	5,2 ± 1,0 a	4,7 ± 0,9 c	167 ± 157 d	2 020 ± 1 371 ab	23 622 ± 4 845 ab	380 ± 187 b	18 547 ± 1 930 a	1 183 ± 289 bc
LEPT	mono	22 ± 5 c	3,1 ± 0,5 c	4,5 ± 1,3 cd	82 ± 36 d	1 013 ± 254 cd	16 416 ± 2 645 d	419 ± 294 b	11 674 ± 2 934 d	1 002 ± 244 c
NOC	mono	44 ± 10 a	4,0 ± 1,0 b	12 ± 9 a	417 ± 323 c	2 109 ± 509 a	17 086 ± 3 862 d	174 ± 99 c	11 354 ± 1 133 d	1 321 ± 320 abc
ALY	mixte	2,5 ± 2,7 e	4,5 ± 4,0 ab	6,9 ± 2,3 b	1 290 ± 1 043 a	707 ± 158 ef	19 255 ± 6 623 cd	2 024 ± 1 286 a	12 388 ± 3 432 bcd	1 708 ± 397 a
BORN	mixte	5,2 ± 2,0 e	4,5 ± 0,6 ab	4,2 ± 0,4 cd	439 ± 282 c	536 ± 149 f	25 075 ± 3 566 a	4 317 ± 3 467 a	20 789 ± 1 585 a	1 462 ± 608 ab
LEPT	mixte	8,1 ± 3,3 d	2,9 ± 0,7 c	3,6 ± 1,5 d	371 ± 191 c	665 ± 154 ef	17 598 ± 3 548 cd	1 118 ± 1 011 a	13 892 ± 2 256 b	1 266 ± 309 bc
NOC	mixte	7,7 ± 3,0 d	4,8 ± 1,2 a	7,1 ± 1,3 b	938 ± 747 ab	824 ± 317 de	20 321 ± 4 867 bc	356 ± 296 bc	14 092 ± 3 273 bc	974 ± 331 c
Espèce	Couvert	Mn_PA	Mn_PR	Na_PA	Ni_PA	Ni_PR	Pb_PA	Pb_PR	Zn_PA	Zn_PR
ALY	mono	204 ± 34 ab	26 ± 9 bc	65 ± 18 bcd	10 068 ± 987 b	671 ± 373 bc	4,1 ± 0,4 de	15 ± 4 bc	631 ± 97 d	80 ± 35 b
BORN	mono	197 ± 23 b	38 ± 34 ab	138 ± 42 a	12 484 ± 758 a	106 ± 44 e	5,3 ± 0,3 ab	16 ± 5 ab	789 ± 63 c	34 ± 11 d
LEPT	mono	168 ± 15 cd	18 ± 5 cd	51 ± 25 cd	8 427 ± 737 c	453 ± 274 cd	3,0 ± 0,2 f	16 ± 5 ab	277 ± 37 e	46 ± 19 d
NOC	mono	113 ± 20 e	51 ± 41 a	100 ± 76 ab	9 567 ± 1 167 b	72 ± 18 e	4,1 ± 0,8 de	22 ± 11 a	2 256 ± 523 a	49 ± 23 cd
ALY	mixte	252 ± 65 a	18 ± 7 d	46 ± 82 cd	9 759 ± 2 420 b	2 180 ± 901 a	5,1 ± 1,3 bc	6,3 ± 2,3 d	638 ± 182 d	218 ± 83 a
BORN	mixte	176 ± 20 c	14 ± 6 de	145 ± 79 a	14 478 ± 954 a	355 ± 215 d	6,1 ± 0,6 a	7,5 ± 1,6 d	884 ± 107 b	99 ± 47 b
LEPT	mixte	161 ± 18 d	11 ± 3 e	34 ± 32 d	10 033 ± 1 353 b	906 ± 434 b	3,8 ± 0,6 e	6,2 ± 1,4 d	291 ± 53 e	67 ± 19 bc
NOC	mixte	107 ± 23 e	11 ± 7 e	79 ± 71 bc	9 986 ± 1 685 b	102 ± 55 e	4,5 ± 1,4 cd	12 ± 4 c	2 799 ± 793 a	261 ± 146 a

Tableau 15 _ Caractérisation des substrats après culture. SN : sol nu, A : *A. murale*, B : *B. tymphaea*, L : *L. emarginata*, N : *N. tymphaea* et LNAB : couvert mixte des quatre espèces. pH_{eau} , CEC : capacité d'échange cationique après extraction à la cobalthexamine ($mg\ kg^{-1}$, sauf $TOTAL_{CEC}$ en $cmol^+ kg^{-1}$), DTPA : extraction au DTPA ($mg\ kg^{-1}$), ER : concentration pseudo-total après extraction à l'eau régale ($mg\ kg^{-1}$). Moy \pm écart-type. Pour chaque variable, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Couvert	pH	Al _{CEC}	Ca _{CEC}	Fe _{CEC}	K _{CEC}	Mg _{CEC}	Mn _{CEC}	Na _{CEC}	Ni _{CEC}	TOTAL _{CEC}
SN	5,8 \pm 0,02 ab	3,4 \pm 1,4 bc	478 \pm 17 d	1,5 \pm 0,8 a	87 \pm 4 a	3 672 \pm 53 a	23 \pm 5 c	66 \pm 12 b	29 \pm 5 a	30 \pm 0,02 a
A	5,81 \pm 0,04 a	3,0 \pm 0,6 c	558 \pm 41 bc	1,3 \pm 0,4 a	75 \pm 3 bc	3 528 \pm 131 bc	28 \pm 4 bc	82 \pm 7 a	22 \pm 1 b	29 \pm 1 ab
B	5,73 \pm 0,06 b	4,9 \pm 1,2 ab	505 \pm 60 cd	1,9 \pm 0,3 a	71 \pm 4 c	3 458 \pm 84 cd	33 \pm 5 ab	84 \pm 11 a	23 \pm 2 b	28 \pm 0,4 b
L	5,8 \pm 0,07 a	5,3 \pm 2,4 a	604 \pm 78 ab	2,1 \pm 0,9 a	74 \pm 6 bc	3 390 \pm 122 d	34 \pm 8 ab	93 \pm 19 a	25 \pm 4 b	29 \pm 1 ab
N	5,77 \pm 0,07 ab	5,2 \pm 1,8 a	656 \pm 90 a	2,1 \pm 1,1 a	78 \pm 7 b	3 428 \pm 75 cd	36 \pm 4 a	100 \pm 19 a	25 \pm 4 ab	29 \pm 0,6 b
LNAB	5,78 \pm 0,04 ab	4,4 \pm 2,3 abc	557 \pm 52 bc	1,9 \pm 1,0 a	76 \pm 5 b	3 605 \pm 104 ab	301 \pm 8 b	84 \pm 10 a	25 \pm 6 b	29 \pm 1 a

Couvert	Al _{DTPA}	Cd _{DTPA}	Co _{DTPA}	Cr _{DTPA}	Cu _{DTPA}	Fe _{DTPA}	Mn _{DTPA}	Ni _{DTPA}	Pb _{DTPA}	Zn _{DTPA}
SN	11 \pm 2 b	0,08 \pm 0 cd	0,63 \pm 0,03 d	0,07 \pm 0,01 c	0,96 \pm 0,03 b	248 \pm 12 ab	6,9 \pm 0,9 c	77 \pm 2 a	11 \pm 1 d	3,8 \pm 0,1 bc
A	12 \pm 2 a	0,09 \pm 0 b	0,67 \pm 0,06 cd	0,07 \pm 0,01 bc	1,6 \pm 0,2 a	245 \pm 12 ab	8,0 \pm 0,6 b	72 \pm 1 b	13 \pm 1 c	4,2 \pm 0,4 a
B	13 \pm 2 a	0,09 \pm 0 bc	0,76 \pm 0,04 a	0,08 \pm 0,01 ab	1,5 \pm 0,2 a	251 \pm 12 ab	8,7 \pm 1,2 ab	67 \pm 3 d	14 \pm 1 abc	3,7 \pm 0,3 cd
L	12 \pm 1 ab	0,09 \pm 0 a	0,74 \pm 0,05 ab	0,08 \pm 0,01 a	1,4 \pm 0,2 a	255 \pm 6 a	8,1 \pm 0,7 b	69 \pm 2 d	15 \pm 2 ab	4,0 \pm 0,2 ab
N	14 \pm 3 a	0,06 \pm 0,01 e	0,73 \pm 0,06 ab	0,07 \pm 0,01 bc	1,5 \pm 0,3 a	239 \pm 16 b	9,4 \pm 0,5 a	71 \pm 2 bc	15 \pm 1 a	3,3 \pm 0,4 d
LNAB	13 \pm 3 a	0,08 \pm 0 d	0,7 \pm 0,06 bc	0,07 \pm 0,01 bc	1,7 \pm 0,6 a	245 \pm 13 ab	8,5 \pm 1,1 b	71 \pm 2 c	14 \pm 2 bc	3,9 \pm 0,2 ab

Couvert	Al _{ER}	Cd _{ER}	Co _{ER}	Cr _{ER}	Cu _{ER}	Mn _{ER}	Ni _{ER}	P _{ER}	Pb _{ER}	Zn _{ER}
SN	19 082 \pm 478 b	2,9 \pm 0,1 a	129 \pm 21 a	1 468 \pm 51 a	9,8 \pm 0,3 c	1 731 \pm 257 a	1 210 \pm 75 a	854 \pm 43 c	89 \pm 7 c	98 \pm 4 b
A	19 250 \pm 376 b	2,8 \pm 0,1 abc	112 \pm 18 ab	1 456 \pm 59 a	12 \pm 1,7 b	1 529 \pm 199 b	1 138 \pm 75 ab	912 \pm 49 b	94 \pm 3 bc	100 \pm 4 ab
B	19 313 \pm 610 ab	2,8 \pm 0,1 bc	109 \pm 8 b	1 435 \pm 21 ab	12 \pm 1 b	1 519 \pm 106 ab	1 075 \pm 43 bc	955 \pm 49 ab	102 \pm 6 a	100 \pm 4 ab
L	19 818 \pm 335 a	2,8 \pm 0,1 abc	111 \pm 11 ab	1 434 \pm 33 ab	12 \pm 1 b	1 547 \pm 140 ab	1 060 \pm 42 c	987 \pm 63 a	106 \pm 8 a	102 \pm 5 a
N	19 355 \pm 592 ab	2,7 \pm 0,1 c	112 \pm 9 ab	1 422 \pm 74 b	12 \pm 1 ab	1 543 \pm 102 ab	1 081 \pm 74 c	939 \pm 32 ab	100 \pm 8 ab	98 \pm 3 ab
LNAB	19 563 \pm 552 ab	2,9 \pm 0,1 ab	120 \pm 14 ab	1 442 \pm 40 ab	25 \pm 30 a	1 628 \pm 152 ab	1 080 \pm 54 bc	968 \pm 65 ab	101 \pm 8 ab	102 \pm 5 ab

3.3. Discussion

La co-culture d'*A. murale*, *L. emarginata*, *B. tymphaea* et *N. tymphaea* n'augmente pas l'extraction du Ni comparé à un couvert composé de l'espèce seule. Le rendement de Ni de chacune des espèces n'est pas augmenté lors de la co-culture et diminue dans *L. emarginata* malgré l'augmentation de la concentration du Ni. Cependant, la concentration de Ni dans *B. tymphaea* augmente en co-culture. La co-culture augmente la concentration de Ca, Mn, Zn dans les racines des quatre espèces. Les quatre espèces peuvent avoir un développement racinaire différent et ainsi coloniser le volume de sol différemment et donc mieux l'explorer que dans les vases en monoculture, Les plantes peuvent aussi avoir des vitesses de croissance et d'absorption différentes, *A. murale* et *N. tymphaea* pourraient favoriser l'altération dans la rhizosphère, et donc affecter la disponibilité des métaux qui seraient prélevés préférentiellement par les plantes voisines, *L. emarginata* et *B. tymphaea*. Cela supposerait que, localement, les racines des plantes exercent des modifications sensibles du pH de la rhizosphère. Les hyperaccumulateurs ont un potentiel à augmenter la disponibilité des éléments traces métalliques dans la rhizosphère. En co-culture, la concentration du Ni est supérieure dans les racines par rapport à la monoculture (tout comme Ca, Mn et Zn). Sur une durée d'expérience plus longue, le Ni aurait pu être transféré dans les PA en co-culture dans des concentrations supérieures à celles de la mono culture. Pour aller plus loin, il s'agirait de faire co habiter différentes familles botaniques. La diversité des services fournis par la microflore au niveau de la rhizosphère pourrait être augmentée, par exemple avec Brassicacées et Astéracées hyperaccumulatrices de Ni.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article : Rue *et al.* 2015.

4. Techniques de conservation des individus performants

Une autre voie d'optimisation des itinéraires techniques est de réaliser plusieurs récoltes sur les mêmes individus. Cette technique est pratiquée sur des espèces pérennes et pourrait être appliquée à des espèces annuelles ou bisannuelles dans la mesure où celles-ci ont la capacité de survivre à la coupe et de repousser rapidement après celle-ci. Nous rapportons dans ce qui suit, une série d'essais et d'observations destinés à étudier les possibilités d'effectuer, d'une part, des coupes successives sur les mêmes plantes et, d'autre part, de propager les individus les plus performants par multiplication végétative.

4.1. Coupes successives

Au cours de l'expérimentation présentée dans le paragraphe « 1. Accumulation du Ni par différentes espèces et populations de Brassicacées », les individus ont subi une coupe au-dessus des deux premières feuilles lors de la récolte. Ce prélèvement a donc permis, d'une part, d'évaluer le potentiel de chaque individu (présenté dans le paragraphe 1.) et, d'autre part, de conserver les individus. En effet, après cette coupe, le taux de reprise des individus a été évalué par le développement des bourgeons axillaires des deux premières feuilles. Dans le cas où, au moins un de ces deux bourgeons s'est développé alors l'individu est considéré comme ayant survécu à la coupe. Le taux de survie était supérieur à 50% et atteignait même 100% (Tableau 16).

Tableau 16 _ Survie des individus après la première coupe selon la population

Population	Survie à la coupe (%)
<i>A. murale</i> Albanie	99
<i>A. murale</i> S IV	100
<i>A. murale</i> S II	83
<i>A. murale</i> S V	99
<i>L. emarginata</i> S II	100
<i>B. tymphaea</i> S II	100
<i>N. tymphaea</i>	55

Les causes de mortalité étaient probablement liées à l'excès d'humidité, induit par l'installation d'un système d'arrosage automatique à la suite de la récolte, plutôt qu'à l'impact de la coupe. Neuf mois après la coupe, des plants de *N. tymphaea*, *B. tymphaea* et *A. murale* ont fleuri. La floraison s'est étalée entre 9 à 10 mois selon l'espèce.

Par ailleurs, une expérimentation avec les quatre espèces *N. tymphaea*, *L. emarginata* (SII), *A. murale* (SII) et *B. tymphaea* est conduite à partir de quatre individus de la même espèce par vase de végétation contenant 900 g de terre ultramafique. Après trois mois de culture en conditions contrôlées dans chaque vase de végétation : un individu est coupé en dessous des deux premières feuilles, un au-dessus des deux premières feuilles et un au-dessus des quatre premières feuilles. Enfin, le quatrième est laissé intact. Après trois semaines, les bourgeons axillaires se développent à la base de chaque feuille sur les individus coupés. Les ramifications se développent plus vite lors de la coupe la plus basse sur la tige (Figure 31).



Figure 31 _ Photographie de *L. emarginata*, a) Trois semaines après la coupe de trois individus sur quatre et b) Huit semaines après la coupe

4.2. Multiplication par bouturage pour la conservation d'individus performants

Le bouturage est une technique de multiplication végétative qui permet de reproduire à l'identique l'individu parent et donc d'obtenir des clones. Des morceaux de feuilles de *L. emarginata* sont mises dans de la terre ultramafique. Après dix semaines, des racines se sont formées au niveau du point de coupe (Figure 32).



Figure 32 _ Photographies d'une feuille et d'une demie feuille de *L. emarginata* après multiplication végétative

Des échantillons de tiges (ramifications) et de feuilles de jeunes individus d'*A. murale* (SIV), *L. emarginata* (SII) (non calibrées), *N. tymphaea* (SIII) et *B. tymphaea* (SII), sont constitués et mis dans de la terre ultramafique contenue dans des vases de végétation (Figure 33). La terre reçoit une solution d'hormones (stimulateur de croissance OSIRYL® : 40% (m) de matière active) et les vases sont placés en conditions contrôlées et arrosés toutes les 48h à l'eau ultra pure.



Figure 33 _ Photographies des boutures dans de la terre ultramafique a) *B. tymphaea*, b) *L. emarginata*, c) *A. murale* et d) *N. tymphaea*

Entre cinq et dix semaines après le bouturage, *B. tymphaea* présente un allongement de la tige. De nouvelles feuilles se forment avec *L. emarginata* au niveau du méristème apical. Pour *N. tymphaea*, les nouvelles feuilles apparaissent entre 10 à 14 semaines après le bouturage (Figure 34). Par ailleurs, des racines aériennes sont observées sur certains individus d'*A. murale* et de *N. tymphaea* (Figure 35).

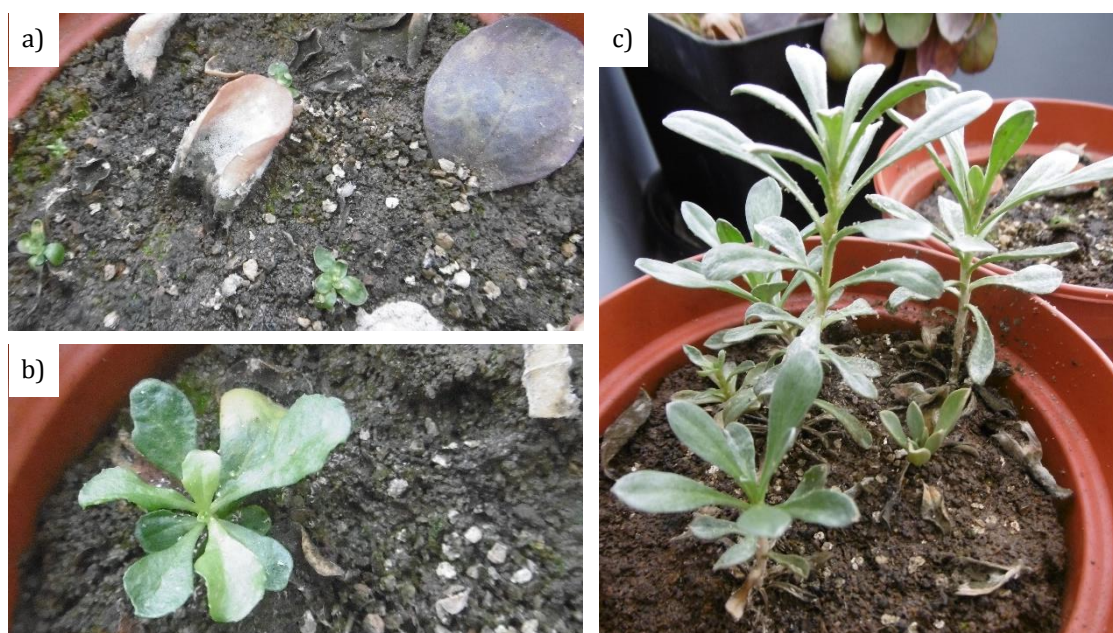


Figure 34 _ Photographies des boutures âgées de 15 semaines a) *N. tymphaea*, b) *L. emarginata* et *B. tymphaea*

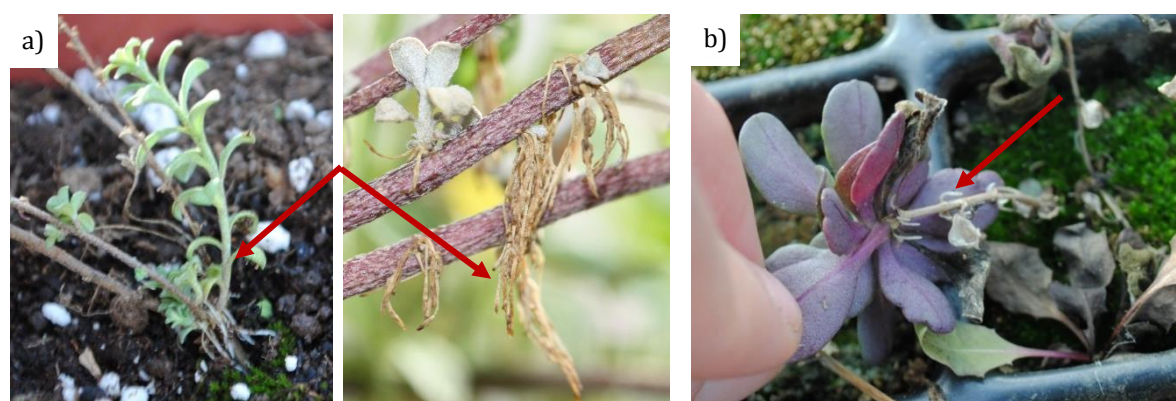


Figure 35 _ Photographies de racines aériennes de a) *A. murale* et b) *N. tymphaea*

4.3. Conclusion

Les essais de repousse des végétaux démontrent que la coupe n'entraîne pas nécessairement la mort des plantes testées. Dans ce cas, les plantes peuvent alors se redévelopper et produire à nouveau de la biomasse. Les essais de bouturage effectués avec des hyperaccumulateurs de Ni de la famille des Brassicacées démontrent qu'il est possible de multiplier les individus par voie végétative. Trois espèces, *N. tymphaea*, *L. emarginata* et *B. tymphaea*, ont particulièrement bien répondu. Dans le cas d'*A. murale*, les boutures n'ont pas survécu au-delà de 10 semaines, mais la présence de racines aériennes sur d'autres individus indique que le bouturage devrait être possible également avec cette espèce. Le bouturage est possible avec des morceaux de tige et de de feuilles dans le cas de *L. emarginata* et *N. tymphaea*. Les boutures ont produit des racines et de nouvelles feuilles avec et sans utilisation d'hormones de croissance dans le cas de *L. emarginata*. Ainsi, les hyperaccumulateurs de la famille des Brassicacées peuvent être bouturés. Cette technique ne nécessite pas d'attendre la production de graines, 18 mois après le semis pour ces espèces qui sont des bisannuelles. Elle permet de multiplier des d'individus sélectionnés pour leur potentiel et d'assurer leur conservation. Le développement de racines aériennes sur des individus

en serre montre aussi le potentiel de ces espèces pour effectuer la rhizogénèse à partir d'organes aériens, ce que confirme le bouturage. Ainsi, il peut être envisagé de conserver les individus performants en sectionnant un morceau de leur partie aérienne et en les placant dans un substrat pour permettre la formation de racines. Cette technique garantit la conservation parfaite du patrimoine génétique de l'individu. Cependant, l'apparition de racines et la production de nouveaux éléments aériens (bourgeon, feuille, ramification) peuvent nécessiter plusieurs semaines. En résumé, l'association de la coupe et du bouturage des hyperaccumulateurs peut permettre en ajustant la hauteur de coupe i) d'assurer la survie des individus récoltés et ii) d'utiliser une partie de la récolte pour cloner les individus performants. Les individus coupés survivent et peuvent monter en floraison l'année suivante, même avec une coupe à 70 jours dans la mesure où celle-ci n'est pas effectuée en dessous des premiers bourgeons. Bien entendu, ces résultats préliminaires prometteurs doivent être confortés par des essais qui couvrent l'ensemble du cycle des plantes et qui permettent de vérifier que les propriétés des plantes sont aussi conservées.

5. Conclusion

L'aptitude à extraire le Ni des hyperaccumulateurs testés varie selon l'espèce et la population. La réponse des plantes peut être très variable au sein même d'une même population, confirmant l'intérêt d'opérer une sélection afin d'améliorer l'agromine. Les espèces *B. tymphaea* et *L. emarginata*, d'une part, et *B. tymphaea* et *N. tymphaea*, d'autre part, se sont montrées les plus performantes pour l'extraction du Ni dans nos expériences. Le potentiel supérieur de *N. tymphaea* et *B. tymphaea* sur une période de culture de six mois peut être expliqué par leur floraison précoce par rapport aux deux autres espèces, étant donné que la concentration du Ni augmente au cours du développement de l'individu. Les concentrations supérieures peuvent s'expliquer par un cycle de développement plus rapide de ces espèces et donc une maturité supérieure au moment de la récolte.

Outre l'accumulation attendue des métaux, nos analyses ont démontré que *L. emarginata* et *B. tymphaea* synthétisent un composé phénolique dans leurs parties aériennes à des concentrations très élevées. Il s'agit de la scopolétine qui présente un intérêt pour l'industrie pharmaceutique. Le rendement de l'extraction du Ni et de la production de molécules d'intérêt dépend de la biomasse produite et du potentiel des individus. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats et expliquer les conditions de synthèse de ces molécules par les hyperaccumulateurs.

B. tymphaea présente une hyperaccumulation du Ni plus élevée lorsqu'elle est cultivée en co-culture, du fait d'une diminution du transfert du Ca vers les parties aériennes. En effet, la compétition entre éléments mineurs et /ou majeurs est une limitation à l'hyperaccumulation du Ni.

Nous avons aussi démontré la possibilité d'envisager plusieurs récoltes de *N. tymphaea*, *L. emarginata*, *B. tymphaea* et *A. murale*. Il est toutefois nécessaire de conduire des expérimentations complémentaires avec le suivi de la croissance et l'analyse des plantes afin d'en caractériser les performances dans ces conditions. (Varennès *et al.* 1996; Robinson *et al.* 1997a) Par ailleurs, la multiplication végétative a permis de montrer le potentiel de totipotence des cellules de ces mêmes espèces et donc la possibilité de multiplier les individus sans passer par la fructification.

Chapitre 2 :

Potentiel d'Astéracées pour l'agromine du Ni et du Co

Ce chapitre est consacré à l'étude du potentiel de deux Astéracées hyperaccumulatrices de Ni à extraire le Co. Ces deux éléments, proches chimiquement, sont transférés dans la plante lorsque l'un ou l'autre est majoritaire dans le milieu. Mais à concentrations équivalentes une compétition pour l'accès à la plante est observée, le Ni étant alors moins transféré vers les parties aériennes. *B. coddii* a la faculté d'extraire le Co et le Ni et *C. thracica* a été identifiée *in situ* comme hyperaccumulateur de Ni mais son potentiel en conditions contrôlées pour l'hyperaccumulation n'a jamais été rapporté. Les objectifs de ce chapitre sont i) de comprendre le transfert de Ni en présence ou en absence de Co, ii) d'identifier les conditions permettant la concentration du Co dans ces hyperaccumulateurs et de iii) localiser ces deux éléments dans la plante selon les organes et les concentrations dans le sol des deux éléments dans le substrat.

Les deux espèces sont cultivées sur un sol amendé en Ni et Co selon différents ratios, ainsi l'expérience compare le transfert du Ni et du Co dans les plantes cultivées sur quatre modalités : un rapport avec 10 fois plus de Ni que de Co, le rapport contraire ainsi qu'une modalité avec peu des deux éléments (10 mg kg⁻¹) et une modalité avec 100 mg kg⁻¹ de chaque élément.

1. Matériels et méthodes

La terre utilisée provient du sol agricole décrit en Partie 2. Il s'agit d'un sol brun limoneux (540 g kg⁻¹ limons), acide (pH 6,03) avec 2,8% de matière organique et un rapport C/N de 10. La terre est tamisée à 1 cm puis disposée dans des bacs de culture à raison 15 kg de terre à 17% d'humidité. Elle est ensuite amendée avec un sel de Ni (II) (Co(NO₃)₂·6H₂O, Fischer) et de Co (II) (Ni(NO₃)₂·6H₂O, Fischer) afin d'obtenir quatre modalités : i) FOR- 100 mg kg⁻¹ Ni et Co ; ii) NIC- 100 mg kg⁻¹ Ni et 10 mg kg⁻¹ Co ; iii) COB -10 mg kg⁻¹ Ni et 100 mg kg⁻¹ Co ; iv) FAI- 10 mg kg⁻¹ Ni et Co.

Les bacs sont installés en chambre de culture avec les conditions suivantes : 18 h jour/8 h nuit, 25°C/19°C, et 50% d'humidité. Trois répétitions sont préparées par modalité, disposées en trois blocs perpendiculaires au gradient induit par la ventilation. Les hyperaccumulateurs de Ni semés sont *C. thracica* (Grèce) et *B. coddii* (Afrique du Sud) de la famille des Astéracées (Partie 2). L'irrigation est effectuée par un système de goutte à goutte automatique pendant la durée de l'expérience afin de maintenir le substrat entre 70 et 90% de sa capacité de rétention en eau. L'analyse de l'eau est disponible en Annexe 3 : « Eau robinet Brabois ».

Une première récolte est effectuée pour *B. coddii* au fur et à mesure de la floraison des individus. Les individus sont récoltés lorsque le bouton principal, c'est à dire celui qui fleurit le premier et qui est localisé à l'extrémité de la tige principale, est fané. Des paramètres morphologiques sont alors mesurés et la composition élémentaire des différents organes de la plante analysée. Cette

récolte concerne les tiges et les feuilles : huit échantillons par plante sont constitués, le nombre et la longueur des feuilles et le diamètre et la longueur des tiges sont mesurés (Figure 36). Les boutons floraux sont séparés selon leur maturité : fermé, jeune, ouvert, fané (Figure 37). Pour chaque groupe de boutons floraux, les pièces florales sont séparées en cinq organes : bractées, réceptacle, fleurs ligulées, fleurs tubulées et graines (Figure 37). Le nombre de boutons floraux par groupe est noté, et le diamètre des réceptacles est mesuré.

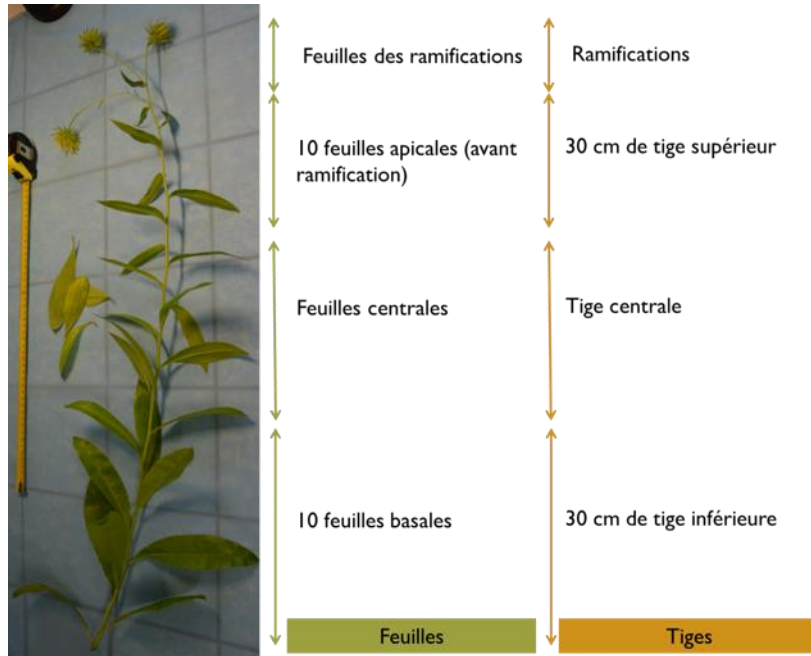


Figure 36 _ Répartition des échantillons de feuilles et de tiges par individu

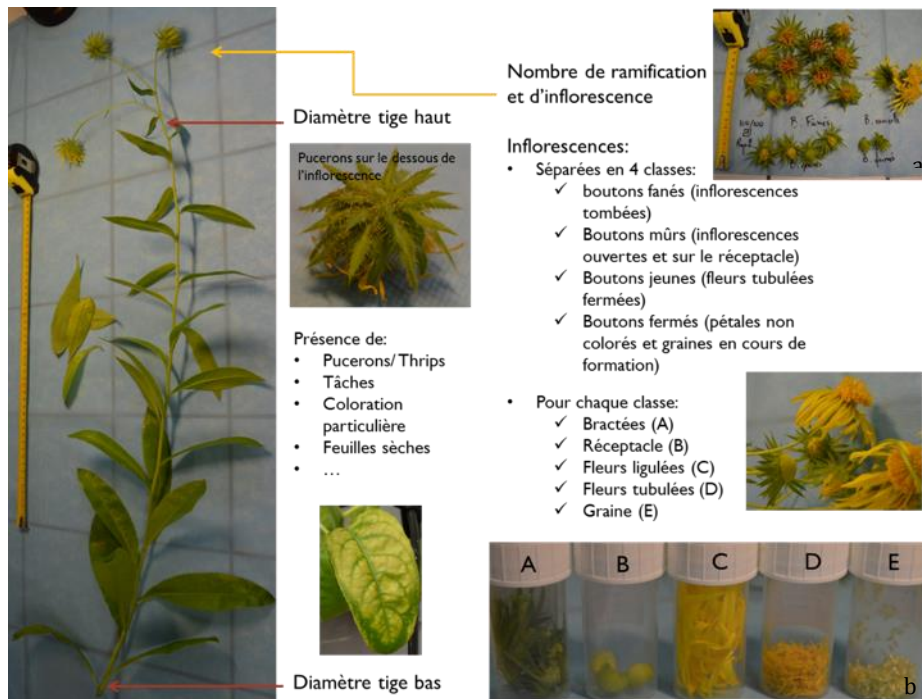


Figure 37 _ Photographies des échantillons collectés lors de la récolte des pièces florales a) séparation des boutons selon leur maturité b) séparation des organes floraux

Une seconde récolte de toutes les plantes est effectuée 14 mois après le premier semis dans tous les bacs (Tableau 17). Dans le cas de *B. coddii* certains individus sont donc coupés pour la seconde fois. Pour *C. thracica* il s'agit d'une unique récolte (aucune floraison au cours de l'expérience).

Tableau 17 _ Schéma temporel de la culture de *B. coddii* et *C. thracica*

	2016						2017								
	Jui	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	Janv	Fév	Mars	Avr	Mai	Juin	Jui	Août	Sept
Semis de <i>B. coddii</i> et <i>C. thracica</i>															
Récolte n°1 _ Parties aériennes de <i>B. coddii</i> (uniquement les individus en fleurs)															
Récolte n°2 _ Parties aériennes et racinaires de tous les individus de <i>B. coddii</i> et <i>C. thracica</i>															

Lors de la seconde récolte, les parties aériennes (PA) sont analysées dans leur globalité, sans séparer les organes. Dans le cas de *B. coddii* il s'agit de feuilles, de tiges et parfois de fleurs, pour *C. thracica* uniquement de feuilles. Des racines sont prélevées dans chacun des bacs et séparées selon leur taille, lorsque la biomasse était suffisante. Dans le cas de *B. coddii*, elles sont séparées en quatre lots : le tubercule (T), les racines moyennes (M), les petites racines (P) et les racines fines (F) (Figure 38). Dans le cas de *C. thracica*, elles sont divisées en 2 catégories : le tubercule (T) et les racines sans distinction de taille entre les moyennes, petites et fines (M/P/F) (du fait de la faible biomasse).



Figure 38 _ Photographies des racines de a) *B. coddii* ; b) *C. thracica* et c) détails des racines de *B. coddii*. T : tubercule, M : racines moyennes, P : petites racines, F : racines fines

Tous les échantillons des PA sont pesés frais, lavés puis séchés à 50°C. Les fleurs tubulées et ligulées ne sont pas lavées pour ne pas éliminer le pollen. Les racines sont lavées à l'eau ultra pure autant de fois que nécessaire pour obtenir une eau de rinçage ultra propre. Les tubercules sont frottés avec une brosse lorsque cela est nécessaire puis séchés à 50°C. Les échantillons sont broyés et Ni, Co et les éléments majeurs sont dosés par ICP-OES. Certains échantillons (morceaux de feuilles sèches) sont aussi analysés par XRF portable (Niton) avant d'être minéralisés ($m < 0,50$ mg) sans broyage et analysés par ICP-OES. Les valeurs obtenues par les deux appareils sont comparées (Annexe 9).

Parallèlement, une partie des échantillons est congelée dans de l'azote liquide en vue des analyses en micro-PIXE destinées à localiser le Ni et le Co dans la plante et à faire des hypothèses sur leur spéciation dans les tissus. Enfin, des fragments de racines sont collectés afin de déterminer la présence de mycorhizes (observations réalisées au Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux de Nancy).

2. Résultats

2.1. Comparaison des biomasses et concentrations dans les organes de *B. coddii*

a) Biomasse de *B. coddii*

Les feuilles de *B. coddii* présentent des chloroses avec toutes les modalités (Figure 39). Mais elles paraissent se manifester différemment selon la composition en Ni et Co. En général, il s'agit de chloroses internervaires mais plus ou moins marquées selon la modalité, en particulier avec NIC (100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 de Co). La chlorose est doublée d'une nécrose avec les faibles concentrations en Ni et Co (FAI). En présence de 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 de Co (COB), le limbe entier est affecté par la chlorose, y compris les nervures.

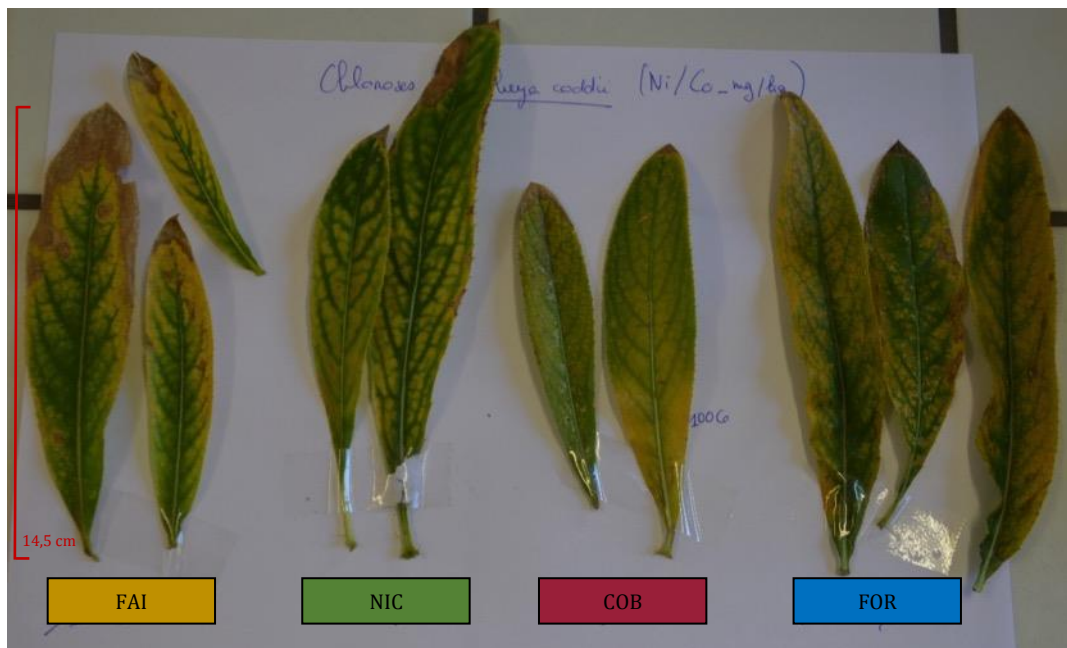


Figure 39 _ Photographies de feuilles chlorosées de *B. coddii* selon la modalité. FAI : faibles concentrations, NIC : 10 fois plus de Ni, COB : 10 fois plus de Co, FOR : fortes concentrations

La taille des individus de *B. coddii* varie de 90 à 190 cm. *B. coddii* a fleuri entre cinq mois et demi et dix mois après le semis. La biomasse et les paramètres morphologiques (taille totale de l'individu, nombre de feuilles, diamètre inférieur des tiges, nombre de boutons floraux) varient en fonction des modalités (Tableau 18). En général, avec les modalités FOR et FAI, la biomasse et la taille des individus sont supérieures à celles obtenues avec les deux autres modalités (NIC et COB). Le nombre de boutons floraux est significativement supérieur avec COB et FOR.

Les tiges représentent environ la moitié de la biomasse totale individuelle, suivies par les feuilles. La modalité FOR a une biomasse florale significativement plus élevée que les trois autres (Figure 40). Pour les modalités FAI et NIC, six individus ont été récoltés. Trois ont été récoltés pour COB et FOR (Annexe 10). Sur COB et FOR, les germinations étaient moins nombreuses et moins d'individus étaient présents dans les bacs.

Tableau 18 _ Paramètres mesurés sur *B. coddii* selon la modalité. *N* : nombre de répétitions, *Âge* (*j*), *biomasse* (*g*), *hauteur* (*cm*), *Diam inf* : diamètre inférieur (*cm*), *Nb feu.* : nombre de feuilles avant les ramifications, *Nb bou.* : nombre de boutons floraux. Moyenne \pm erreur standard. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. Pour chacune des variables, les modalités affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Anova à un facteur sur chaque variable sauf Nb bou. : test de Student, $p < 0,05$, données transformées en log).

	N	Age	Biomasse	Hauteur	Diam inf	Nb feu.	Nb bou.
FAI	6	229 \pm 20	19 \pm 3	146 \pm 12	0,81 \pm 0,03	46 \pm 6	9,2 \pm 2,8
NIC	6	194 \pm 9	13 \pm 2	127 \pm 9	0,71 \pm 0,04	34 \pm 1	4,7 \pm 1,0
COB	3	224 \pm 15	14 \pm 1	126 \pm 14	0,72 \pm 0,07	36 \pm 4	12 \pm 2,1
FOR	3	219 \pm 22	22 \pm 3	147 \pm 4	0,77 \pm 0,08	40 \pm 6	16 \pm 2,9

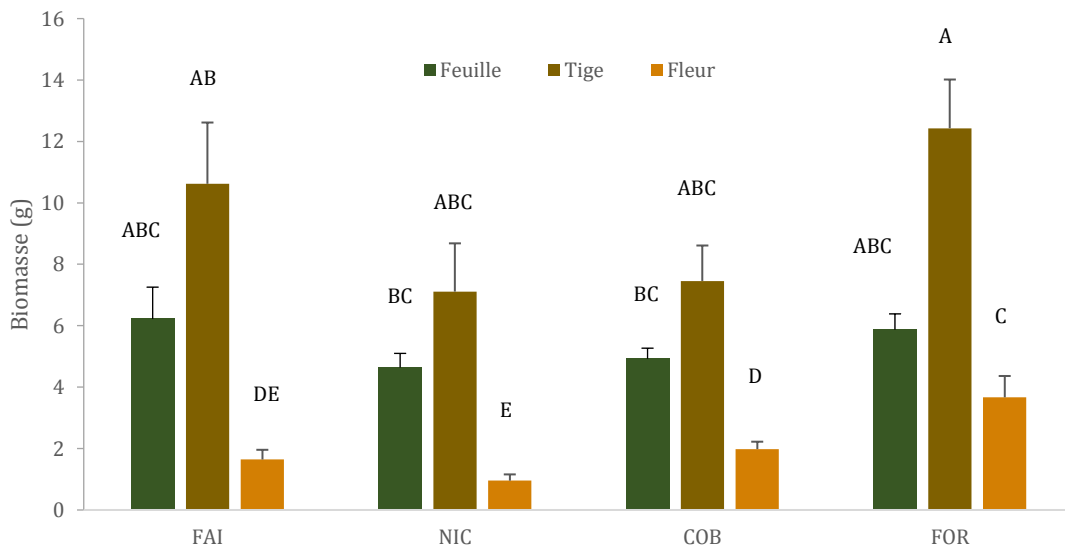


Figure 40_ Biomasse de *B. coddii* selon l'organe végétal et les concentrations du Ni et du Co dans le substrat. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, respectivement N : 6, 6, 3, 3. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log).

b) Transfert du Ni et du Co dans les plantes

➤ Tiges, feuilles et fleurs

La concentration de Ni est significativement différente entre les quatre modalités (test de Student, $p < 0,10$, données transformées en log) (Tableau 19). Elle est la plus élevée pour NIC et la plus faible pour COB, de plus, celle de FOR est supérieure à FAI. La concentration du Co sur les modalités COB et FOR est significativement supérieure à celle de NIC et FAI (test de Student, $p < 0,10$, données transformées en log).

Tableau 19 _ Concentration du Ni et du Co dans *B. coddii*. Moyenne \pm erreur standard, N : nombre de répétitions. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. Pour chacune des concentrations, les modalités affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Students, $p < 0,10$, données transformées en log).

Modalité	N	Ni		Co		
FAI	6	345 \pm 35	c	27 \pm 6	C	mg kg ⁻¹
NIC	6	3 461 \pm 358	a	44 \pm 7	B	mg kg ⁻¹
COB	3	96 \pm 11	d	743 \pm 15	A	mg kg ⁻¹
FOR	3	573 \pm 140	b	503 \pm 152	A	mg kg ⁻¹

La concentration du Ni est plus élevée dans les feuilles que dans les fleurs et elle est la plus faible dans les tiges (Figure 41). Pour chaque organe, la concentration diminue selon l'ordre : NIC>FOR>FAI>COB. Dans les feuilles, elle est de 7 300 mg kg⁻¹ sur NIC, et de 1 100, 700 et 200 mg kg⁻¹ sur les modalités FOR, FAI et COB, respectivement.

De la même manière que pour le Ni, les feuilles sont les organes les plus chargés en Co, et les tiges les plus faibles (Figure 42). La concentration dans les feuilles est de 2 000 et 1 600 mg kg⁻¹ sur COB et FOR, respectivement, et significativement supérieure à celle sur NIC et FAI, respectivement 110 et 70 mg kg⁻¹. Dans les tiges, les concentrations sont inférieure à 60 mg kg⁻¹ pour toutes les modalités. Le rapport des concentrations Ni/Co décroît selon l'ordre : NIC>FAI>FOR>COB (Figure 43). Dans les organes de COB et les feuilles de FOR, le rapport est inférieur à 1. Les modalités NIC et FAI ont un rapport supérieur à 10 quel que soit l'organe. Les tiges ont un rapport supérieur à celui des fleurs (significatif seulement sur FOR), lui-même supérieur à celui des feuilles.

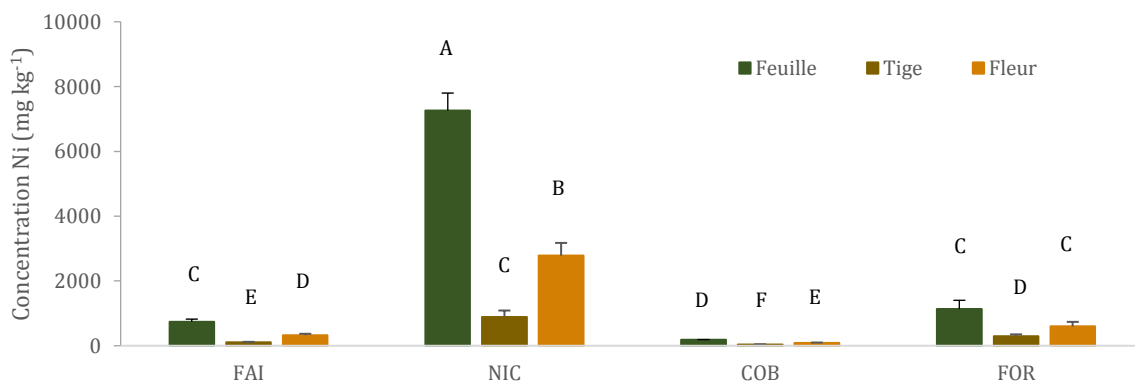


Figure 41 _ Concentration du Ni dans les différents organes aériens de *B. coddii*. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, respectivement N : 6, 6, 3, 3. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log).

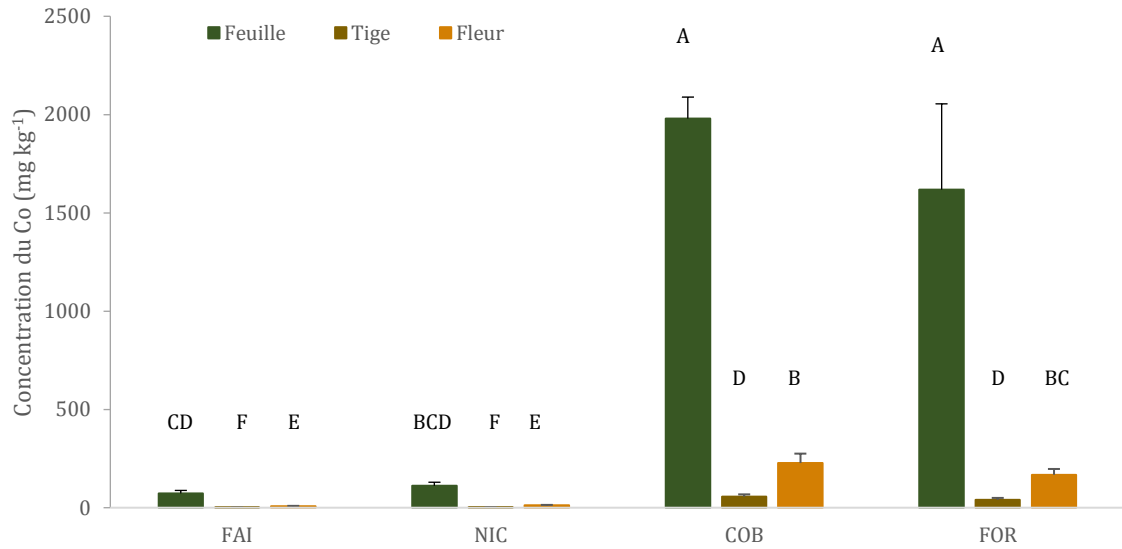


Figure 42 _ Concentration du Co dans les différents organes aériens de *B. coddii*. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, respectivement N : 6, 6, 3, 3. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, p<0,05, données transformées en log).

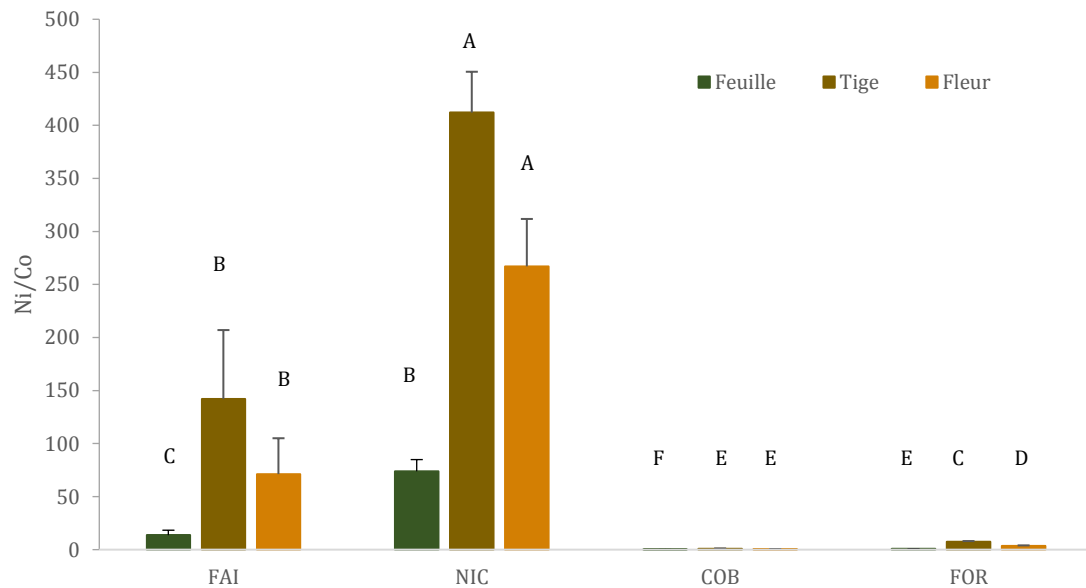


Figure 43 _ Rapport Ni/Co des concentrations massiques dans les organes aériens de *B. coddii*. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, p<0,05, données transformées en log).

➤ **Ni et Co selon l'âge et la localisation des pièces végétales.**

Ni et Co ne sont pas distribués uniformément dans la plante. La concentration du Ni tend à être plus élevée dans les feuilles apicales que dans les feuilles basales pour FOR et NIC mais ce n'est pas statistiquement significatif. Pour le Co, c'est l'inverse : les feuilles basales sur les modalités avec 100 mg kg⁻¹ Co sont significativement plus concentrées en Co que les feuilles apicales (Newman Keuls, p<0,05) (Figure 44). Pour les autres modalités, la même tendance est observée : le Co est supérieur dans les feuilles basales. Le rapport Ni/Co dans les feuilles apicales est le plus

élevé avec les modalités NIC et FAI (Figure 45). Du fait de la diminution du Co dans les feuilles apicales, Ni/Co augmente, cependant la concentration du Ni ne varie pas significativement. Dans les fleurs, la concentration du Ni est la plus élevée sur NIC et est la plus faible sur COB (Figure 46). Il n'y a pas de variation de la concentration selon la maturité du bouton florale.

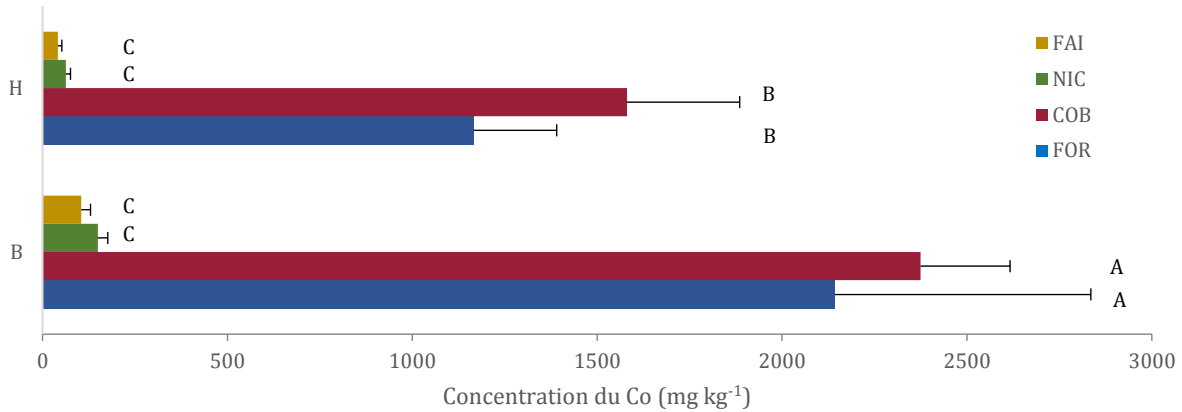


Figure 44 _ Concentration du Co dans les feuilles basales (B) et apicales (H) de *B. coddii* selon le substrat. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. Les modalités affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, p<0,05).

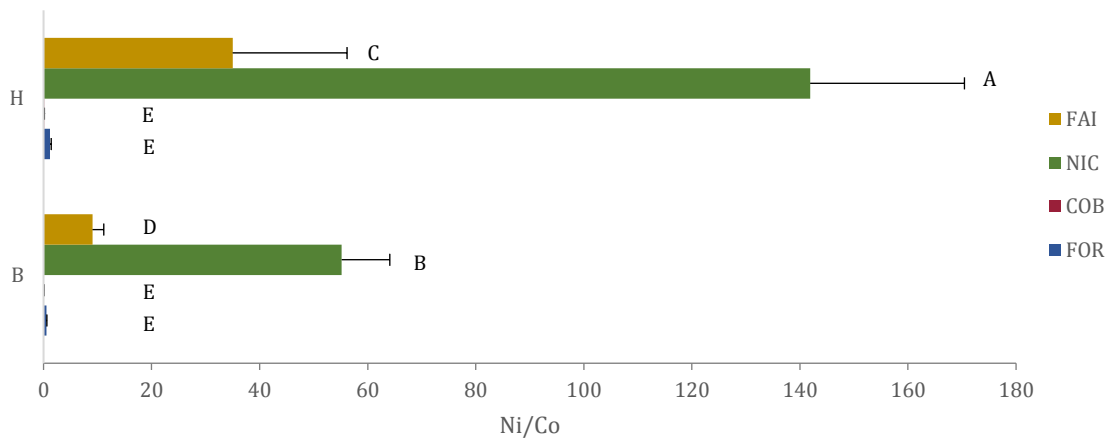


Figure 45 _ Rapport des concentrations massiques de Ni/Co dans les feuilles basales (B) et apicales (H) de *B. coddii* selon le substrat. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. Les barres horizontales indiquent les erreurs standards. Les modalités affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Wilcoxon, p<0,10).

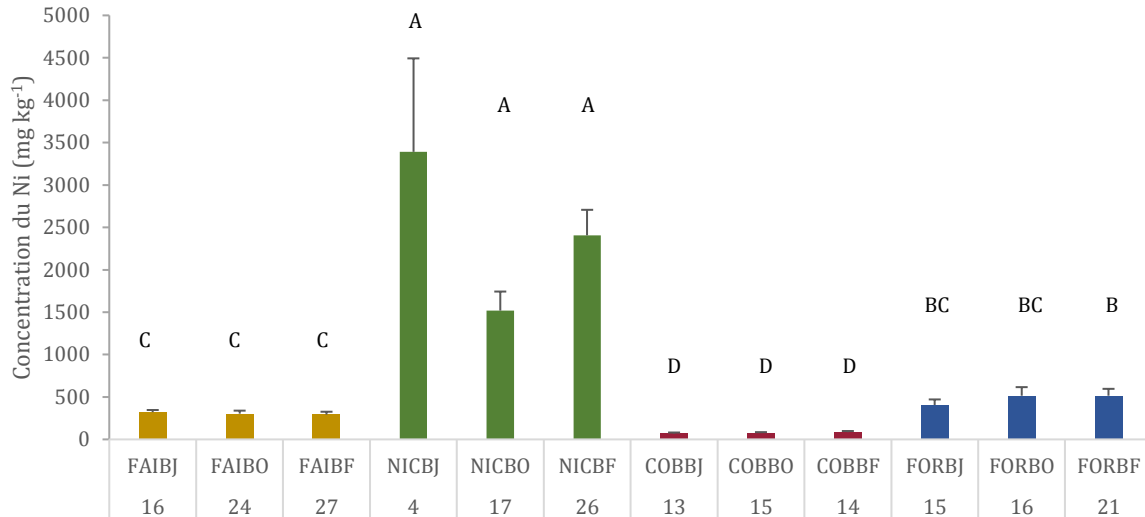


Figure 46 _ Concentration du Ni dans les boutons floraux selon leur maturité et les concentrations du Ni et du Co dans le substrat. BJ : jeune bouton, BO : bouton ouvert, BF : bouton fané. FAI : faibles concentrations (en jaune), NIC : 10 fois plus de Ni (en vert), COB : 10 fois plus de Co (en rouge), FOR : fortes concentrations (en bleu). Les chiffres correspondent au nombre de répétitions. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Les différentes pièces florales, bractées, réceptacles, fleurs tubulées et ligulées et graines, ont des concentrations différentes en Ni et Co. Les bractées sont les pièces florales avec la concentration du Ni la plus élevée (

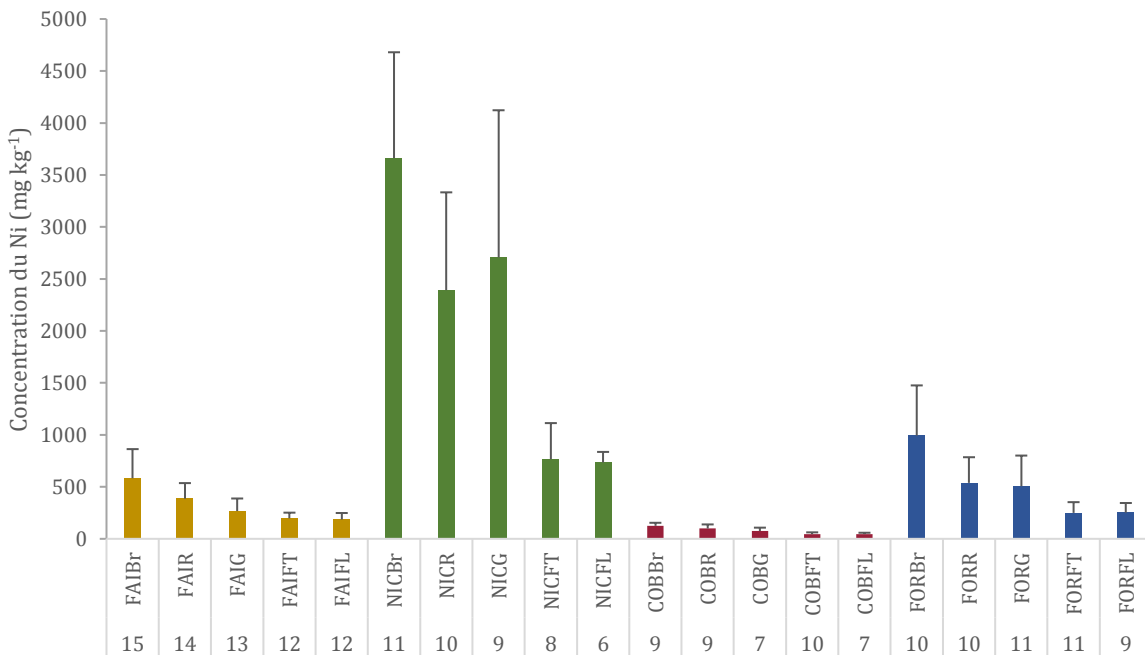


Figure 47), tandis que les fleurs tubulées et ligulées ont les concentrations les plus faibles. Les réceptacles et les graines ont des concentrations intermédiaires. Elles sont supérieures dans les réceptacles. La concentration en Co dans les pièces florales n'est pas différente entre COB et FOR et est 10 à 25 fois supérieure à celles de FAI et NIC, selon la pièce florale considérée (Figure 48). Les bractées ont une concentration en Co significativement supérieure à celle des autres organes,

quelle que soit la modalité. Au sein de chaque modalité, le rapport Ni/Co ne varie pas selon la maturité du bouton, excepté dans le cas de la modalité FOR (Figure 49). Dans les fleurs tubulées et ligulées, le rapport Ni/Co diminue avec la maturité du bouton, alors que pour les graines et les réceptacles il augmente. Par ailleurs, la concentration en Ni dans les graines augmentent lors de la maturation des graines sur NIC. Elle est de 1 850 mg kg⁻¹ Ni dans les graines des boutons ouverts et de 3 150 mg kg⁻¹ dans les graines des boutons fanés.

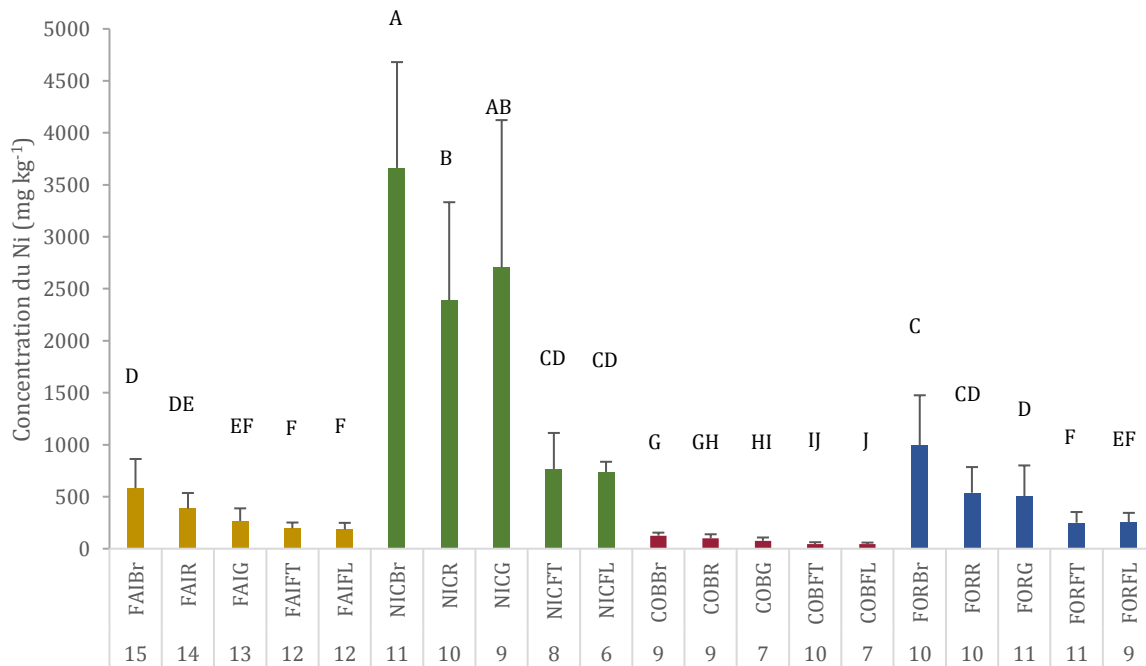


Figure 47 _ Concentration du Ni dans les pièces florales. Quatre modalités : FAI : faibles concentrations (en jaune), NIC : 10 fois plus de Ni (en vert), COB : 10 fois plus de Co (en rouge), FOR : fortes concentrations (en bleu). Cinq pièces florales ; Br : bractées, R : réceptacle, G : graines, FT : fleurs tubulées, FL : fleurs ligulées. Les chiffres correspondent au nombre de répétition. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

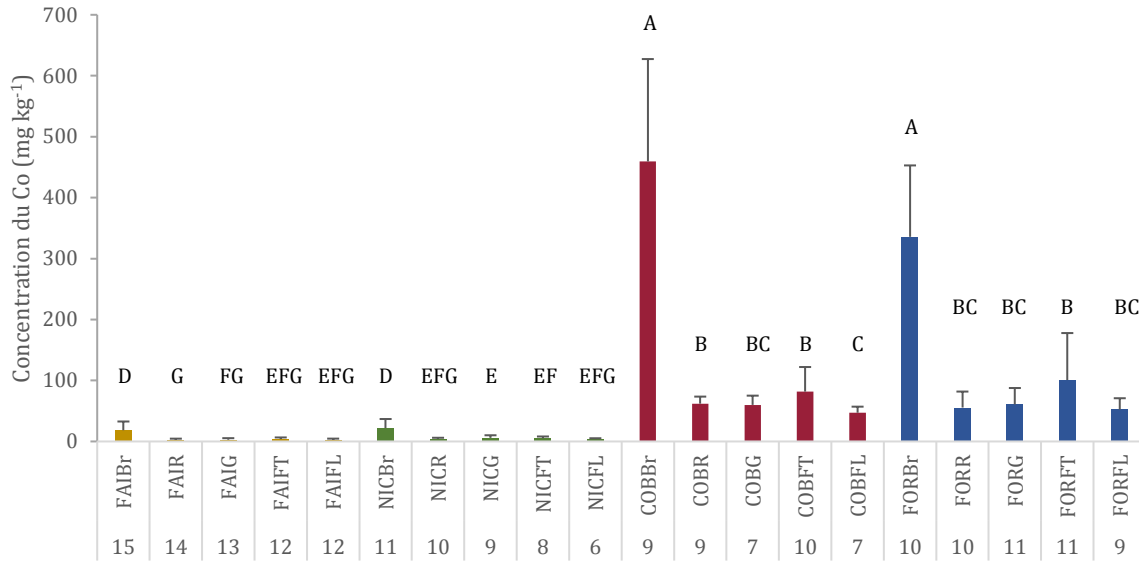


Figure 48 _ Concentration du Co dans les pièces florales. Quatre modalités : FAI : faibles concentrations (en jaune), NIC : 10 fois plus de Ni (en vert), COB : 10 fois plus de Co (en rouge), FOR : fortes concentrations (en bleu). Cinq pièces florales ; Br : bractées, R : réceptacle, G : graines, FT : fleurs tubulées, FL : fleurs ligulées. Les barres verticales représentent les erreurs standards. Les chiffres correspondent au nombre de répétition. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

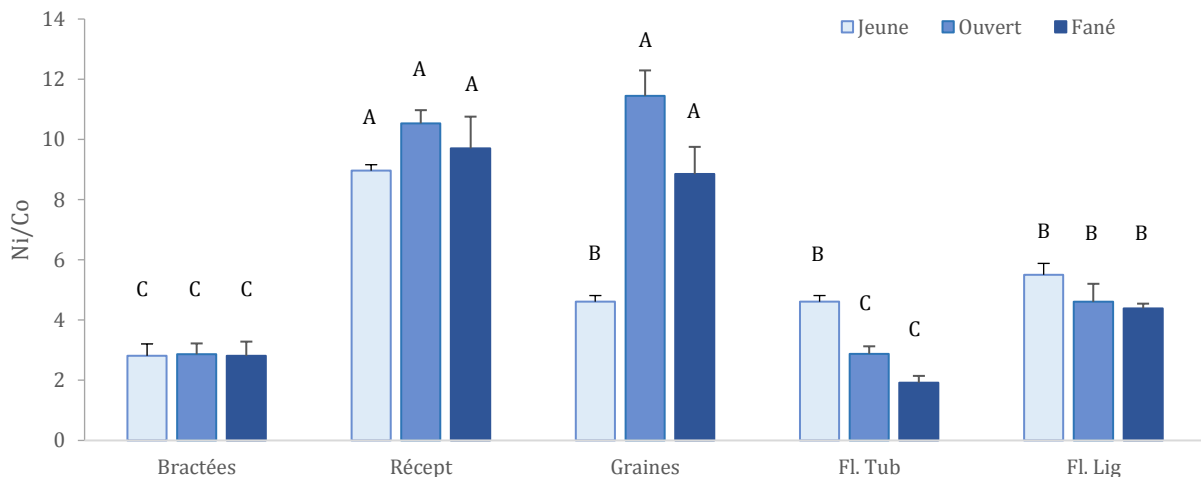


Figure 49 _ Rapport des concentrations massiques de Ni/Co dans les différentes pièces florales de *B. coddii* selon la maturité du bouton sur FOR (100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co). Maturité du bouton ; BJ : bouton jeune, BO : bouton ouvert, BF : bouton fané et cinq pièces florales ; Br : bractées, R : réceptacle, G : graines, FT : fleurs tubulées, FL : fleurs ligulées. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log).

c) Composition de *B. coddii*

Une analyse en composantes principales sur l'ensemble des éléments dosés dans les feuilles présente une hiérarchisation des feuilles selon leur position sur la tige (Figure 50). Les feuilles basales ont les biomasses les plus élevées et sont plus concentrées en Na, K, B et Ca que les feuilles situées plus haut sur la tige pour lesquelles les concentrations en Cu et Mn augmentent. Les mêmes observations sont faites pour la tige selon son éloignement de la graine (Figure 51). Plus le dosage est effectué haut sur la tige, plus il y a de P, Cu, K et Fe. En revanche, en bas de la tige, les

concentrations sont plus élevées en Mn, Na, Zn, Cd, Mg et Ca. NIC et FAI sont proches de par leur composition caractérisée par des concentrations plus élevées en Ni, Zn, Mg, P, Cd, K que celles observées avec FOR et COB (Figure 52). Eux sont caractérisés par des concentrations élevées en Co, S, Ca, Fe et ont un nombre de boutons floraux plus élevé que les deux autres modalités (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log). Les individus FAI sont caractérisés par un nombre de feuilles, une taille et un âge supérieurs aux individus des autres modalités.

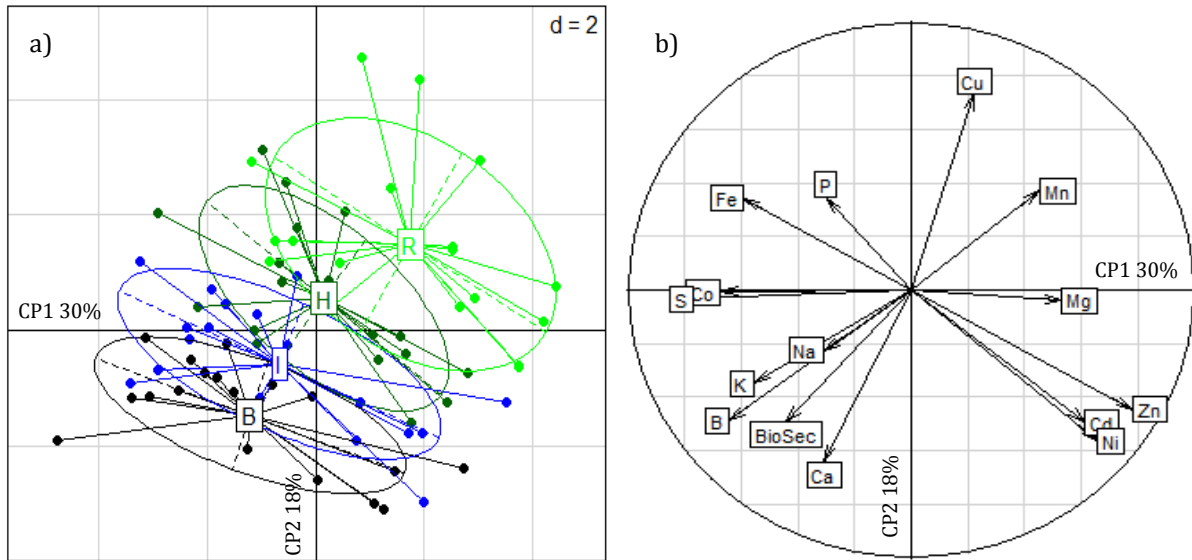


Figure 50 _ Analyse en composantes principales de la composition des feuilles selon leur localisation sur la tige pour les quatre modalités confondues dans le plan 1-2. a) Représentation des feuilles selon leur localisation B : basale, I : intermédiaire, H : haut de la tige, R : feuilles des ramifications et b) représentation des variables mesurées BioSec : biomasse et la concentration des éléments : Cu, Mn, Mg, Cd, Ni, Ca, Na, K, B, S, Co, Fe, P

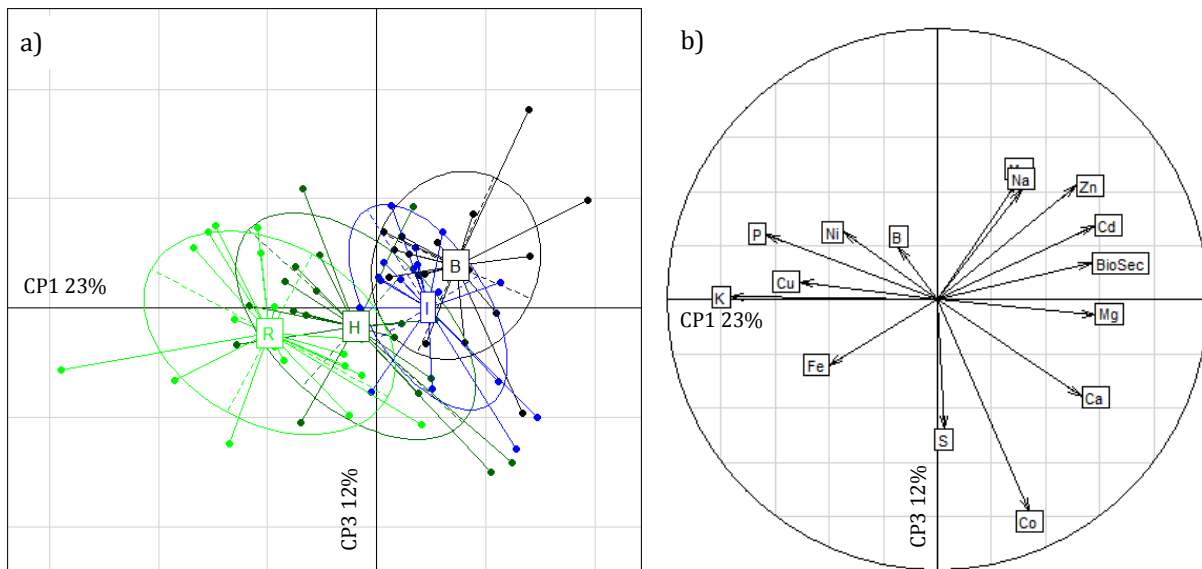


Figure 51 _ Analyse en composantes principales de la composition de la tige selon son éloignement de la graine pour les quatre modalités confondues dans le plan 1-3. a) Représentation de la localisation des tiges B : basale, I : intermédiaire, H : haut, R : tiges des ramifications et b) représentation des variables mesurées BioSec : biomasse et la concentration des éléments : Cu, Mn, Mg, Cd, Ni, Ca, Na, K, B, S, Co, Fe, P

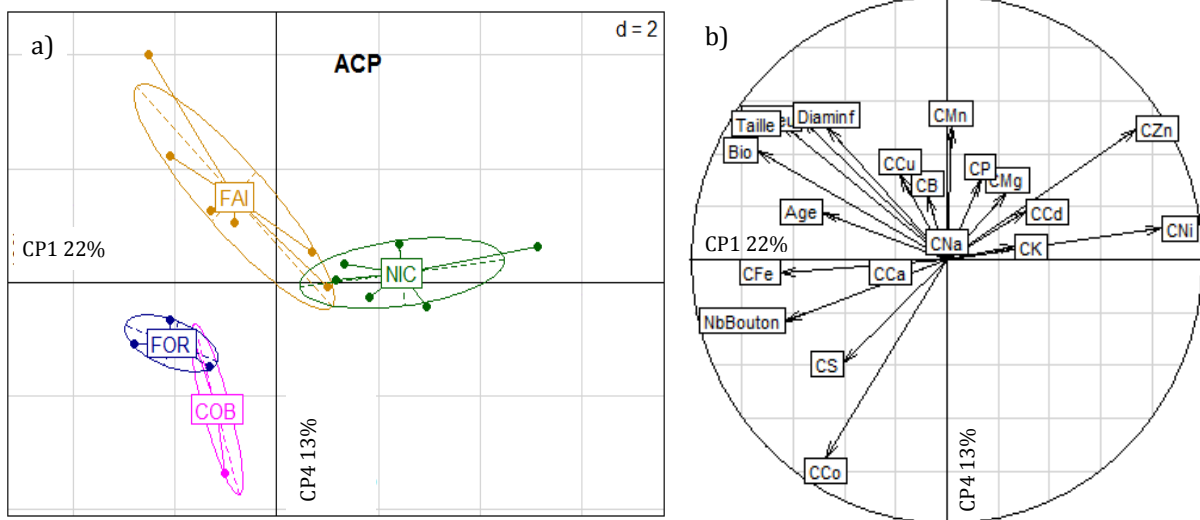


Figure 52 _ Analyse en composantes principales sur les concentrations totales des *B.coddii* selon la modalité dans le plan 1-4. a) Représentation des individus FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co et b) représentation des variables mesurées Bio: biomasse, NbBouton: nombre de bouton, Diaminf: diamètre inférieure des tiges, hauteur, âge et la concentration des éléments dans la plante entière: Cu, Mn, Mg, Cd, Ni, Ca, Na, K, B, S, Co, Fe, P

Le Co et le Ni sont corrélés positivement dans les feuilles sur NIC ($R^2=0,20$, $p<0,05$) et FAI ($R^2=0,41$, $p<0,001$) (Figure 53). Il n'y a pas de corrélation sur COB et FOR. Cependant en supprimant un individu de FOR, il y a une corrélation négative entre Ni et Co dans les feuilles ($R^2=0,84$, $p<0,01$). Dans la plante entière, toutes modalités confondues, le Ni est corrélé positivement avec le Zn ($R^2=0,56$, $p<0,001$) et le Cd ($R^2=0,37$, $p<0,01$). Le Co est corrélé positivement avec le S ($R=0,45$, $p<0,01$). Les autres corrélations observées du Ni et du Co avec certains éléments majeurs varient selon les modalités. Sur FAI, le S est corrélé positivement avec le Ni ($R^2=0,69$, $p<0,05$) et avec les Co ($R^2=0,71$, $p<0,05$), le Co est aussi corrélé avec le Fe ($R^2=0,74$, $p<0,05$) et le Cu ($R^2=0,85$, $p<0,01$). Le Ni est corrélé positivement avec K ($R^2=0,40$, $p<0,01$) et Ca ($R^2=0,31$, $p<0,01$) dans les tiges de NIC, et avec Ca dans les tiges de FOR ($R^2=0,65$, $p<0,01$). Dans les feuilles, le Ni est corrélé positivement avec le K uniquement sur NIC ($R^2=0,31$, $p<0,01$).

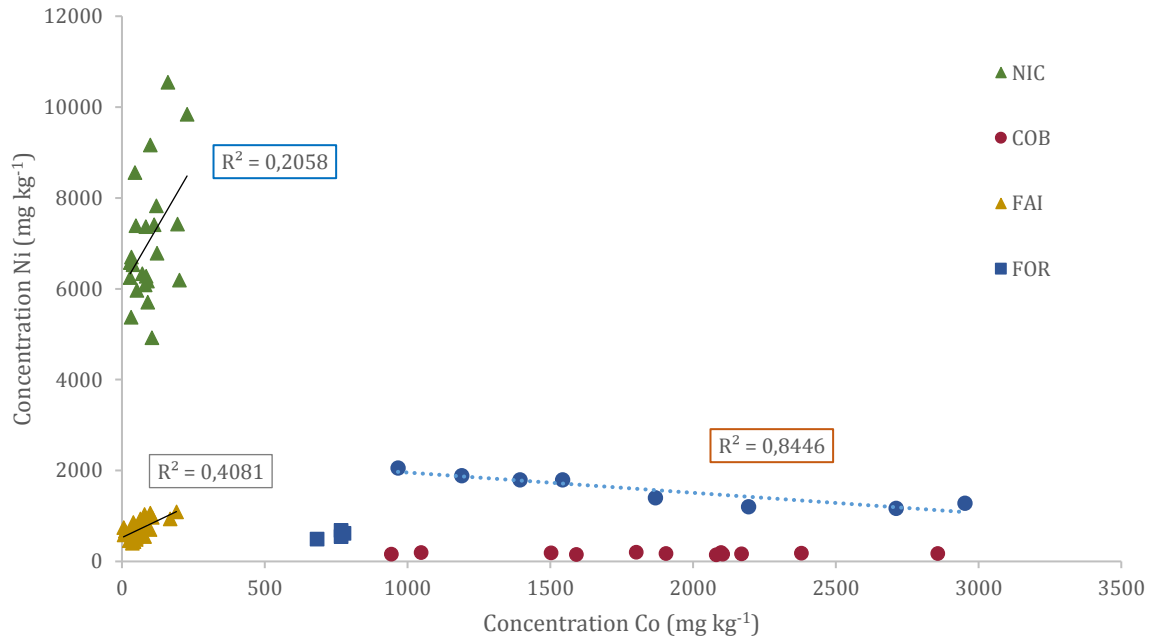


Figure 53 _ Concentration du Ni en fonction du Co dans les feuilles de *B. coddii*. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co

2.2. Comparaison des biomasses et concentrations dans *B. coddii* et *C. thracica*

Dans ce paragraphe (2.2.), les résultats pour les deux espèces sont présentés après analyse de l'ensemble des individus récoltés : récoltes nos1 et 2. Dans le cas de *B. coddii*, deux récoltes ont été effectuées. En revanche, *C. thracica* a été récoltée uniquement lors de la récolte n°2 (Tableau 17).

Pour la modalité FOR (100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co), seulement deux bacs (donc deux répétitions) présentent le développement de plantes. Sur la modalité COB (10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co), une seule des trois répétitions a des *C. thracica*. Pour les PR, les répétitions varient selon la quantité de racines au sein des bacs. Sur FOR, les deux bacs présentant des *B. coddii* sont séparés car leur concentration était très différente entre les deux bacs mais homogène au sein du bac (deux individus par bac). L'absence de répétitions ne permet donc pas de réaliser des tests statistiques.

a) Concentration du Ni et du Co dans *B. coddii* et *C. thracica*

La concentration du Ni dans les PA est supérieure à celle du Co sur toutes les modalités sauf COB, où le Co est majoritaire dans le substrat. La concentration du Ni dans les PA est supérieure dans *B. coddii* sur les modalités FAI, NIC et COB. Cependant sur FOR, elle est supérieure dans *C. thracica* (Figure 54). La concentration du Co dans les PA est inférieure à 30 mg kg⁻¹ sur les modalités FAI et NIC des deux espèces mais elle est plus élevée dans *B. coddii*. Sur COB, elle est supérieure dans *B. coddii* et sur FOR, elle est supérieure dans *C. thracica*.

Dans les PR, la concentration du Ni est supérieure à celle du Co sur les modalités FAI, NIC, FOR. Elle est similaire entre les deux éléments sur COB, pour les deux espèces (Figure 55 et Figure 56). La concentration du Ni est supérieure dans *C. thracica* sur FAI et NIC et est similaire entre les 2 espèces sur COB et FOR. La concentration du Co est similaire dans les deux espèces et inférieure à 5 mg kg⁻¹ sur FAI et NIC. Elle varie entre 30 et 80 mg kg⁻¹ sur COB pour les deux espèces et est

supérieure dans *C. thracica* sur FOR. La concentration du Ni varie selon la taille des racines : elle est la plus élevée dans le tubercule pour toutes les modalités et dans les deux espèces (sauf sur un bac de FOR dans *B. coddii* et sur COB dans *C. thracica*). Dans *B. coddii*, la concentration du Ni diminue dans les racines moyennes et encore plus dans les petites racines. Cependant, elle est similaire dans les racines fines à la concentration dans les racines moyennes sur FAI et FOR (qui sont les deux modalités où la biomasse a permis de séparer les racines en quatre classes de taille) (Figure 55). La concentration du Co varie similairement au Ni sur un bac de FOR dans *B. coddii* et sur FOR dans *C. thracica*.

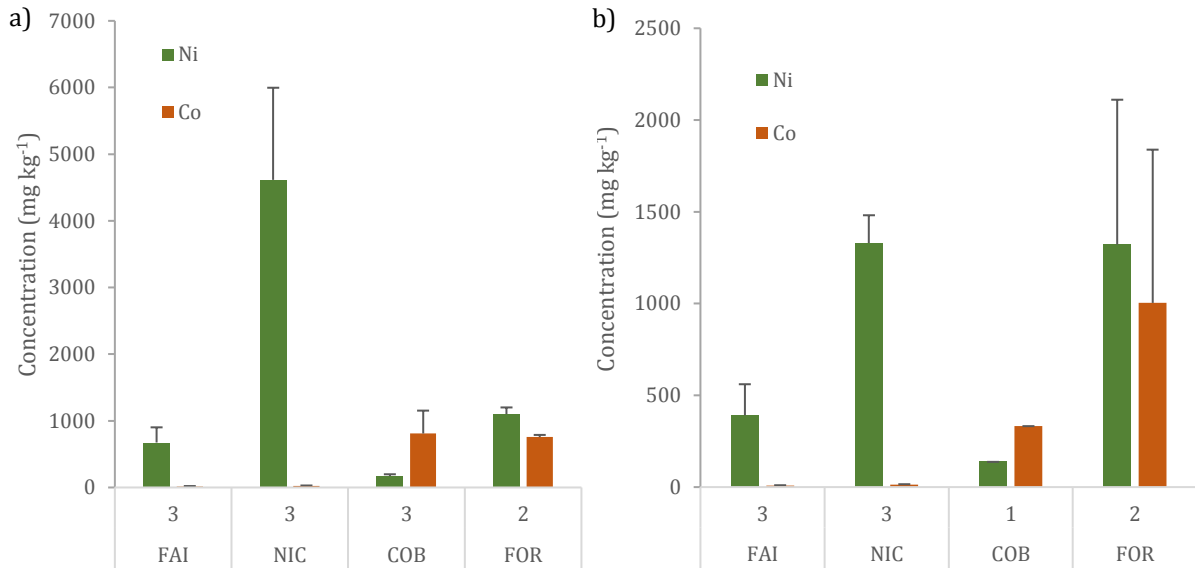


Figure 54 _ Concentrations du Ni et du Co dans les parties aériennes de a) *B. coddii* et b) *C. thracica* selon les concentrations du Ni et Co dans le substrat. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. Les chiffres sous l'axe des abscisses indiquent le nombre de répétitions.

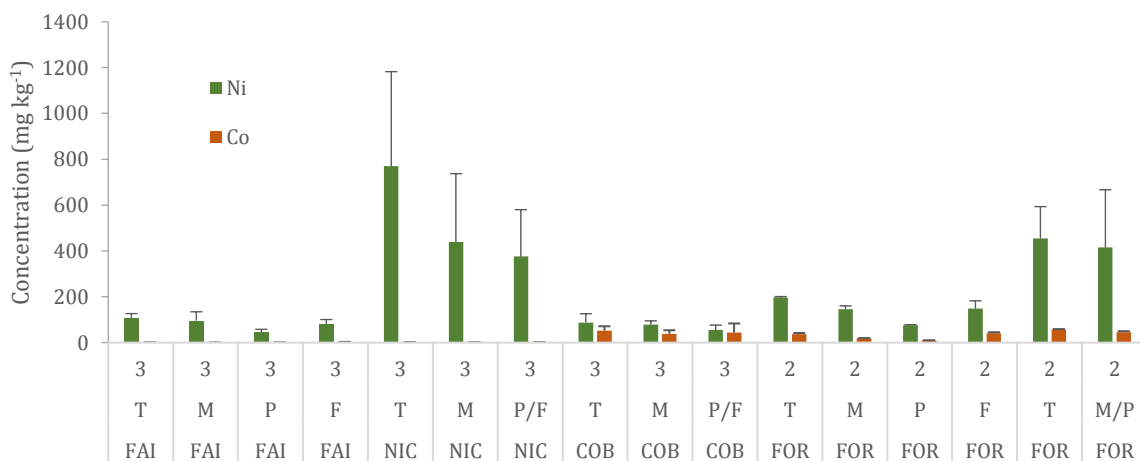


Figure 55 _ Concentration du Ni et du Co dans les parties racinaires de *B. coddii* selon les concentrations de Ni et Co dans le substrat et selon la taille de la racine. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. T : tubercule, M : racines moyennes, P : petites racines, F : racines fines. Les chiffres sous l'axe des abscisses indiquent le nombre de répétitions.

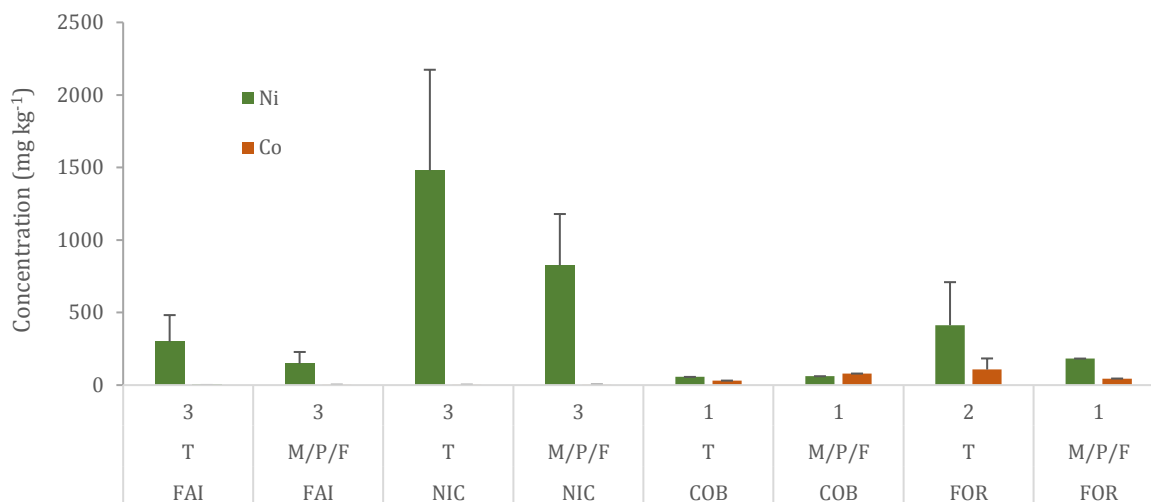


Figure 56 _ Concentration du Ni et du Co dans les parties racinaires de *C. thracica* selon les concentrations de Ni et Co dans le substrat et selon la taille des racines. FAI : 10 mg kg⁻¹ de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg⁻¹ de Ni et 10 mg kg⁻¹ de Co, COB : 10 mg kg⁻¹ de Ni et 100 mg kg⁻¹ de Co, FOR : 100 mg kg⁻¹ de Ni et de Co. T : tubercule, M/P/F : racines moyenne, petites et fines. Les chiffres sous l'axe des abscisses indiquent le nombre de répétitions.

b) Comparaison des rendements de *B. coddii* lors de deux récoltes effectuées au cours d'une culture de 14 mois.

Les individus récoltés à la floraison, et qui ont fait l'objet du paragraphe 2.1. de ce chapitre, sont récoltés de nouveau à la fin de l'expérimentation : 14 mois après le premier semis. L'âge des individus varie entre les deux coupes. Pour neuf individus sur 15, il est supérieur lors de la seconde coupe (Tableau 20). Sur FAI, la biomasse est souvent inférieure lors de la seconde coupe mais la concentration du Ni augmente dans tous les individus alors que celle du Co est inférieure à la première coupe. Sur COB, les résultats sont mitigés : le Ni augmente dans la seconde coupe et le Co que dans un individu, l'autre étant très jeune au moment de la seconde coupe. Sur NIC, l'âge des individus est similaire entre les deux coupes. Il se distingue deux catégories d'individus ; ceux produisant plus de biomasse lors de la seconde coupe mais avec une diminution de la concentration du Ni (NIC 1, 2 et 6) et les autres pour lesquels le contraire est observé (NIC 3 et 5). La concentration du Co est inférieure à la première coupe dans tous les individus. Sur FOR, la biomasse augmente ainsi que l'extraction de Ni et de Co. Sur la répétition n°2 les quantités de Ni et de Co extraites lors de la seconde coupe sont supérieures de huit à dix fois à la première coupe, respectivement.

À l'issue d'un an de culture et de deux récoltes, *B. coddii* a un rendement potentiel de 6,4 à 9,3 T (MS) ha⁻¹, selon la modalité (Tableau 21). Avec 10 mg kg⁻¹ de Ni dans le substrat, *B. coddii* a extrait 37% de celui-ci et 20% lorsque la concentration est de 100 mg kg⁻¹. En présence de 100 mg de Co dans le substrat, *B. coddii* a extrait environ 6% de Ni présent. Le Co extrait est de l'ordre de 3,3 à 5,2 % lorsque 100 mg kg⁻¹ de Co sont dans le substrat et de 1,4 % s'il y a 10 mg kg⁻¹ de Co. Dans les meilleures conditions de notre expérience, *B. coddii* peut extraire 25 kg de Ni ha⁻¹ en présence de Ni et de peu de Co, et de 4,2 à 6,7 kg de Co ha⁻¹ en présence de 100 mg de Co dans le substrat.

Tableau 20 _ Comparaison des rendements entre la première et la seconde coupe de *B. coddii* C1 : 1^{ère} coupe, C2 : 2nde coupe

C_{Ni}/C_{Co} dans le substrat (mg kg ⁻¹)	N° de la répétition	Nombre individus	CODE ECH	Age C2/C1	Biomasse C2/ C1	CNi C2/C1	CCo C2/C1	QNi C2/C1	QCo C2/C1
10/10	1	1	FAI 1	1,5	0,7	1,9	0,6	1,4	0,5
10/10	1	1	FAI 2	0,9	0,2	2,4	0,5	0,5	0,1
10/10	1	1	FAI 3	0,6	0,2	1,8	0,3	0,3	0,1
10/10	2	1	FAI 4	1,1	1,5	1,5	0,3	2,2	0,4
10/10	2	1	FAI 5	1,1	0,9	1,3	0,2	1,2	0,2
10/10	2	1	FAI 6	0,5	0,3	1,5	0,5	0,4	0,1
10/100	1	1	COB 1	1,2	1,4	1,7	1,1	2,4	1,5
10/100	2	1	COB2	0,3	0,9	1,5	0,6	1,4	0,5
100/10	1	1	NIC 1	1,3	1,1	0,8	0,2	0,9	0,3
100/10	1	1	NIC 2	1,0	2,3	0,9	0,6	2,1	1,3
100/10	1	1	NIC 3	1,0	0,3	1,4	0,5	0,4	0,1
100/10	3	1	NIC 5	1,5	0,5	1,5	0,6	0,8	0,3
100/10	3	1	NIC 6	0,8	1,2	0,8	0,3	1,0	0,3
100/100	1	2	FOR 1 et 2	0,7	1,2	1,6	1,2	2,0	1,5
100/100	2	1	FOR 3	1,2	2,3	3,5	4,5	7,9	10,3

Tableau 21 _ Rendement potentiel de biomasse et de métaux extrait par *B. coddii* pendant un an sur les quatre modalités, à l'issue de deux récoltes

C_{Ni}/C_{Co} dans le substrat (mg kg ⁻¹)	N	Code	Ni extrait du substrat par <i>B. coddii</i> (%)	Co extrait du substrat par <i>B. coddii</i> (%)	Rendement biomasse (t ha ⁻¹)	Rendement Ni (kg ha ⁻¹)	Rendement Co (kg ha ⁻¹)
10/10	3	FAI	36,9 ± 7,2	1,27 ± 0,90	8,76 ± 2,12	4,69 ± 0,92	0,162 ± 0,114
100/10	3	NIC	19,6 ± 2,1	1,53 ± 0,61	6,39 ± 2,17	25,0 ± 2,7	0,195 ± 0,078
10/100	3	COB	6,05 ± 4,59	3,31 ± 2,40	4,96 ± 3,30	0,769 ± 0,584	4,21 ± 3,05
100/100	2	FOR	6,54 ± 0,17	5,23 ± 0,35	9,30 ± 0,77	8,32 ± 0,22	6,65 ± 0,44

2.3. Sols après culture

Le pH du sol est plus faible après culture. Il est significativement inférieur sur FOR, par rapport à FAI et NIC (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log). La conductivité augmente significativement de 86 $\mu\text{S cm}^{-1}$ avant culture à 209 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en moyenne après culture (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log). Elle est la plus élevée sur COB et la plus faible sur NIC.

Les concentrations du Ni et du Co extractibles au DTPA sont inférieures à 10 mg kg⁻¹ sur FAI et il y a 6 fois plus de Ni que de Co (Figure 57). Sur NIC, le Ni est 50 fois supérieur au Co qui lui, a la même concentration que sur FAI. Sur COB et FOR, l'écart de concentrations entre les deux éléments est plus faible. Il y a 2,3 fois plus de Co que de Ni sur COB et 2,8 fois plus de Ni que de Co sur FOR. Là encore, la concentration en Co entre ces deux modalités est similaire. Le rapport Ni/Co

des extractions DTPA est significativement différent entre les quatre modalités selon l'ordre NIC>FAI>FOR>COB (Newman Keuls, $p<0,05$).

Sur FOR, la concentration du Ni et du Co sont significativement différentes en fin de culture alors que le sol a été amendé avec la même concentration de chacun de ces deux éléments : 100 mg kg^{-1} . Le prélèvement par les plantes n'explique pas cette différence étant donné que le rapport Ni/Co dans la plante est proche de 1. Elle n'est donc pas responsable de la diminution de Co dans le sol par rapport à Ni. Co doit donc être d'avantage immobilisé sur le substrat que ne l'est Ni.

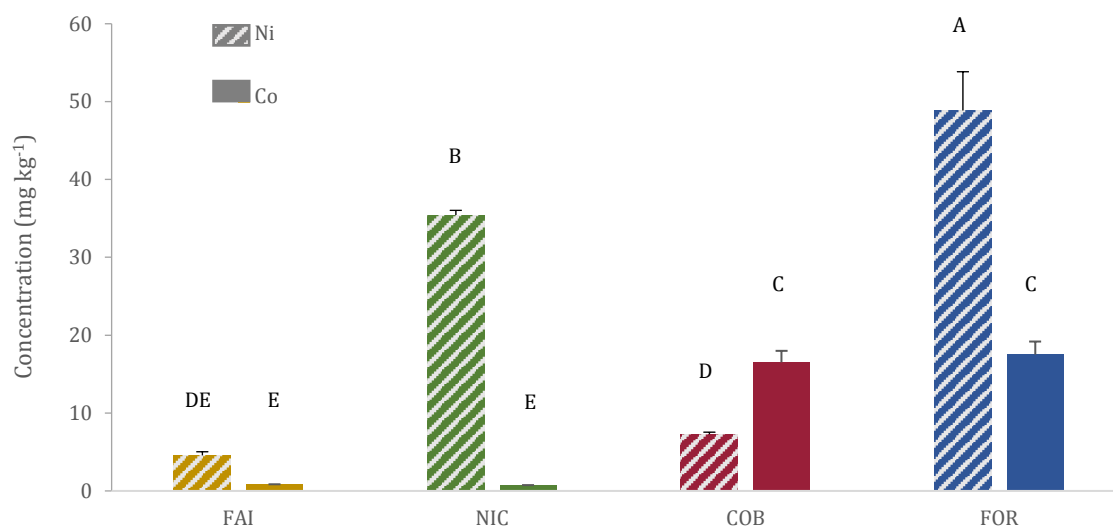


Figure 57 _ Ni et Co extractible au DTPA après culture de *B. coddii*. FAI : 10 mg kg^{-1} de Ni et de Co, NIC : 100 mg kg^{-1} de Ni et 10 mg kg^{-1} de Co, COB : 10 mg kg^{-1} de Ni et 100 mg kg^{-1} de Co, FOR : 100 mg kg^{-1} de Ni et de Co. Les barres affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test t, $p<0,05$).

3. Discussion

B. coddii et *C. thracica* peuvent hyperaccumuler le Ni (plus de $1\,000 \text{ mg kg}^{-1}$) dans la mesure où celui-ci est présent à une concentration de 100 mg kg^{-1} dans le substrat. En effet, à 10 mg kg^{-1} , le seuil d'hyperaccumulation n'est pas atteint. Pour le Co, le seuil (300 mg kg^{-1}) est atteint pour les deux espèces lorsqu'il y a 100 mg kg^{-1} de Co dans le substrat. Dans *B. coddii* la concentration est de 800 mg kg^{-1} dans les PA quelle que soit la concentration du Ni dans le substrat. Dans *C. thracica*, la concentration est supérieure dans les PA avec 100 mg kg^{-1} de Ni dans le substrat mais la variabilité est élevée. Les concentrations supérieures des deux éléments dans les racines de *C. thracica* par rapport à *B. coddii* peuvent être dues au décalage de stade phénologique. Une partie des *B. coddii* a déjà fleuri ou présente un allongement de la tige au moment de la récolte, alors que *C. thracica* ne présente pas de développement de hampe florale, due à l'absence de vernalisation au cours de l'expérimentation. La modalité avec 100 mg kg^{-1} de Ni et de Co dans le substrat permet d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction pour le Co. Cependant, la concentration élevée en Ni dans les tissus implique de réaliser la séparation de ces deux éléments lors de leur récupération dans un objectif de valorisation. Il est donc préférable de produire de la biomasse en Co sur un substrat contenant une faible concentration de Ni afin qu'il soit peu transféré dans les parties aériennes.

Il y a des **interactions entre Ni et Co** pour l'absorption. L'augmentation de la concentration de Co dans le sol induit une augmentation du Co dans la plante, indépendamment de la concentration

du Ni dans le sol. Cependant, l'augmentation de la concentration de Ni dans le sol n'induit pas ici une augmentation de l'extraction de Ni par *B. coddii*. Or, dans les travaux de Robinson *et al.* (1997a), le Ni dans la biomasse de *B. coddii* est directement relié au Ni disponible dans le substrat. Mais si un élément tel que le Co est présent à concentration équivalente de celle du Ni, alors le transfert du Ni vers les parties aériennes de la biomasse est limité. De même, lors d'une concentration élevée et équimolaire en Ni et Zn, les deux métaux sont prélevés dans une concentration similaire mais inférieure à celle du Ni prélevé lorsqu'il est seul dans le milieu (Deng *et al.* 2014). En revanche, lorsque les deux éléments sont en faibles concentrations dans le substrat, le Ni est transféré préférentiellement au Co.

La **distribution du Ni et Co** est hétérogène dans la plante. Dans *B. coddii*, les racines fines et les tubercules ont des concentrations supérieures par rapport aux racines de tailles intermédiaires. Les racines fines seraient la zone d'absorption principale des éléments qui transiteraient par les racines petites puis moyennes pour être stockés dans le tubercule, organe de stockage à partir duquel les éléments sont redistribués vers les parties aériennes. Dans les parties aériennes, le Ni ne varie pas selon l'âge des feuilles alors qu'il aurait pu être plus concentré dans les feuilles âgées (Robinson *et al.* 2003). Cependant, le Co est d'avantage présent dans les feuilles âgées que dans les jeunes feuilles, quelle que soit la concentration des deux éléments dans le substrat. Le Ni est préférentiellement transféré vers le haut de la tige, ce qui confirme les travaux de Robinson *et al.* (2003). Le Co est réparti de façon plus homogène le long de la tige, malgré une grande variabilité, alors qu'il a été montré, pour la tomate, qu'il était plus présent dans le bas de la tige que dans le haut (Bakkaus *et al.* 2005). Au niveau des pièces florales, la concentration du Ni augmente dans les graines au cours de la maturité alors qu'elle diminue dans les fleurs tubulées. La différence de localisation peut être due aux mécanismes de transport et en particulier aux molécules intervenant dans la chélation, tels que le citrate et le malate dans le cas du Ni (Montargès-Pelletier *et al.* 2008) qui peuvent être différentes dans le cas du Co. Dans celui-ci, l'oxalate et le malate, et non pas le citrate, ont été mis en évidence dans le xylème en présence de Co (Wei *et al.* 2009).

Des **chloroses** sont observées sur les feuilles de *B. coddii*, particulièrement les feuilles basales. Ces chloroses sont observées sur toutes les modalités mais diffèrent selon les concentrations dans les substrats. En présence de Co, le limbe entier est affecté. Les premiers signes de toxicité au Co surviennent pour une concentration de 20 mg kg⁻¹. Le Co est plus fortement retenu que le Ni sur la phase solide du sol et est donc moins disponible pour les plantes. Ainsi, les concentrations extractibles et non pas totales sont à prendre en compte pour évaluer la contamination et l'éventuelle compétition entre éléments, même dans le cas de contamination « fraîches ». L'augmentation de la concentration de Co accroît le Co disponible dans le substrat. Elle peut affecter la production de biomasse par *B. coddii* mais pas la concentration du Co (Keeling *et al.* 2003).

B. coddii serait un bon candidat pour la décontamination de substrat contenant du Ni. La totalité du Ni présent (en faisant l'hypothèse d'un prélèvement constant d'une année sur l'autre) serait retirée en trois ans sur un substrat avec 10 mg kg⁻¹ de Ni et en 5 ans sur un substrat avec 100 mg kg⁻¹ de Ni et en l'absence d'autres éléments (Co). En plein champ, *B. coddii* peut atteindre un rendement de 22 t ha⁻¹ (MS), avec une concentration de 3 500 mg kg⁻¹ de Ni (MS) dans les plantes. Le rendement de Ni est donc de 77 kg ha⁻¹. Pour le Co, il serait de 16,5 kg ha⁻¹. *B. coddii* n'extrait pas aussi efficacement le Co que le Ni, même s'il est majoritaire dans le sol. Le rendement de métal peut être amélioré par l'apport de fertilisant (Bani *et al.* 2015a) et par inoculation. Cette dernière augmente jusqu'à 20 fois la quantité de Ni extraite par *B. coddii* par rapport au témoin

non inoculé (Orłowska *et al.* 2011). Le premier individu a fleuri à 5,5 mois. Récolté à 6,5 mois il a entamé sa seconde floraison cinq mois après la coupe. Donc deux récoltes sont possibles en un an en conditions contrôlées.

Les Astéracées étudiées développent des tubercules pérennes qui peuvent être réutilisés d'une année à la suivante en restant en place ou en les récoltant pour les utiliser sur d'autres substrats. Cela représente un avantage de choix pour la sélection et la conservation des individus d'intérêts. Des expérimentations sur *C. thracica* avec une période de vernalisation nécessaire à la floraison permettront d'évaluer le potentiel de cette espèce. Il est possible d'effectuer deux récoltes par an sur des cultures de *B. coddii* en conditions contrôlées, permettant d'obtenir une biomasse de 5 à 9,3 t MS ha⁻¹. Ce rendement pourrait être augmenté par une profondeur de substrat plus importante, de quelques dizaines de cm. Il est cependant nécessaire de réaliser des essais en plein champ pour observer la tolérance de cette espèce aux températures saisonnières.

Conclusion de la Partie 3

Finalement, dans un objectif d'agromine du Ni sur des substrats multi-contaminés, il est nécessaire de mieux comprendre les relations entre les différents éléments dans le sol et leur comportement vis-à-vis de la plante : entrée dans les racines et transfert vers les parties aériennes. Une compétition entre Ni et Co a été mise en évidence pour le transfert vers *B. coddii* et *C. thracica*. D'autres études ont montré la compétition du Ni avec le Zn ou encore avec le Mn pour l'accès à la plante. Ces compétitions entraînent une diminution du Ni transféré vers les parties aériennes de l'hyperaccumulateur.

La présence de ces éléments dans les substrats de culture doit donc être prise en compte afin de prévoir les conditions d'hyperaccumulation en fonction des objectifs de rendement de métal voulus. La partie suivante va s'intéresser à l'hyperaccumulation du Ni sur des matrices potentiellement co-contaminées et tester des améliorations du substrat par exemple par apport d'amendement pour optimiser le transfert du Ni. Le défi est donc d'améliorer les conditions de l'hyperaccumulation du Ni sur des matrices co-contaminées.

PARTIE 4

Élaboration de substrats à partir de matériaux secondaires et réponse des hyperaccumulateurs : Cas du biochar

Les plantes hyperaccumulatrices sont utilisées pour extraire les éléments d'intérêt présents dans les substrats métalliques. La translocation de ces éléments vers les parties aériennes permet ensuite leur récupération directement à partir de la biomasse récoltée ; c'est le fondement de l'agromine où la plante agit comme un filtre biologique, plus ou moins sélectif, qui permet de recueillir à partir des substrats métalliques les éléments d'intérêt. L'agromine est déjà démontrée à l'échelle de la parcelle pour les sols ultramafiques (Li *et al.* 2003b; Bani *et al.* 2007).

L'enjeu ici est de mettre en place les conditions pour une agromine de matériaux contenant de fortes concentrations métalliques considérés comme des déchets issus de l'activité industrielle. Il s'agit d'identifier des matériaux délaissés par l'industrie mais d'intérêt pour l'agromine (présence et disponibilité du Ni), puis de formuler des substrats non phytotoxiques à partir de mélanges adaptés utilisant différents matériaux de remplissage et des amendements. Il est aussi nécessaire de choisir les plantes les plus adaptées à ces conditions drastiques et suffisamment performantes pour optimiser l'extraction des métaux depuis la matrice créée. Cette démarche est à la base de la filière qui aboutit par la mise en œuvre de procédés hydrométallurgiques de récupération des métaux dans les plantes (Barbaroux *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2016).

Chapitre 1 :

Comportement des hyperaccumulateurs sur substrats phytotoxiques

Afin d'atteindre ces objectifs, il est d'abord nécessaire de tester le comportement de plantes hyperaccumulatrices sur des matériaux fortement pourvus en métaux et, le cas échéant, d'élaborer des mélanges qui permettent l'atténuation de la phytotoxicité tout en ménageant l'extraction des métaux d'intérêt. Ainsi, ce chapitre est consacré à la formulation de substrats pour l'agromine du Ni, qui s'appuie sur une démarche de génie pédologique. Ce substrat doit être fertile pour le développement des hyperaccumulateurs et permettre le passage des métaux dans la plante par une disponibilité des éléments suffisante dans la matrice. Le Ni est le métal ciblé et les hyperaccumulateurs de Ni sont ceux déjà testés dans d'autres circonstances, notamment sur sol ultramafique (Bani *et al.* 2007). La démarche s'appuie sur la combinaison de tests de germination et de tests de croissance en vases de végétation en conditions contrôlées. Ces derniers doivent permettre d'évaluer le rendement qui peut être obtenu par la culture de plantes hyperaccumulatrices sur différentes matrices.

1. Tests de germination

Afin de déterminer le potentiel des matériaux délaissés à la végétalisation, des tests de germination sont menés en préalable aux tests de croissance en vases de végétation. Une attention particulière est accordée à la boue de phosphatation étant donné la stabilité de sa composition dans le temps et l'importance de son gisement. Le biochar est utilisé en tant qu'amendement qui modifie significativement la disponibilité des métaux, diminuant la toxicité du milieu (Rees *et al.* 2014). De plus il a un effet positif sur la germination et l'élongation racinaire et améliore la croissance des plantes (Rees *et al.* 2015, 2016). Trois essais de germination sont effectués avec des hyperaccumulateurs de Ni, dans le but de :

- tester la germination des graines sur la boue de phosphatation en faisant varier la fraction massique de boue dans le mélange ;
- affiner la formulation du substrat en modifiant les proportions de matériaux ;
- comparer deux méthodes de formulation des substrats : i) mélange de matériaux secs et tamisés à 2 mm, ii) mélange en suspension dans l'eau.

1.1. Matériels et méthodes

a) Matériels

Les espèces végétales testées sont : *L. emarginata* (Site II), *A. murale* (Site V), *B. tymphaea* (Site VI) et *Zea mays* (Annexe 11). Les graines de *L. emarginata* sont préalablement calibrées : seules sont retenues celles de masse comprise entre 3,53 et 7,56 mg (valeurs obtenues après avoir pesé 30 graines et en éliminant les 10% les plus lourdes et les plus légères) et sans signes distinctifs (forme

ou couleur particulière). Les graines sont placées 2 h dans de l'eau ultra pure afin de ramollir leur tégument. Certaines graines de *B. tymphaea* ont développé une enveloppe de pectine autour de leur tégument, ce qui n'est pas le cas de *L. emarginata*.

Les substrats sont élaborés à partir de la boue de phosphatation (Boue A, Lot 1), de la terre de biopile (TB, Lot 1), du biochar (N°1) et de vermiculite (cf. Partie 2). Dans chaque test la boue de phosphatation est amendée avec le biochar et/ou la terre de biopile dans différentes proportions. Les matériaux sont préalablement séchés à l'air et tamisés à 2 mm.

b) Tests de germination

Les tests de germination sont effectués en boîte de Petri sur du papier filtre sur lequel est déposé le substrat à tester. Les graines (10 à 20 par boîte) sont placées à égale distance les unes des autres. Les boîtes sont placées à l'obscurité dans une enceinte close à 25 °C pendant 10 à 20 jours (cf Partie 2 « Tests de germination »). Les substrats sont humidifiés si nécessaire, avec de l'eau ultra pure et en favorisant l'entrée de l'eau par le bord du substrat. Des boîtes témoins sont obtenues en déposant des graines sur papier filtre, sans substrat, afin de s'assurer du pouvoir germinatif des graines utilisées. Pour chaque modalité, une boîte est faite, soit une répétition.

Un premier test est conduit avec *L. emarginata* sur la boue de phosphatation amendée avec différentes proportions de biochar et de terre de biopile. Neuf substrats sont élaborés, contenant 0 à 100% de boue. Trois substrats correspondant à des fractions intermédiaires de boue (3, 18 et 39% de boue) sont préparés avec et sans biochar. Les fractions massiques des matériaux secs apportés sont indiquées dans le Tableau 22. Les fractions massiques correspondent aux matériaux en l'état, non séchés, avec des humidités initiales de 3% pour la terre de biopile, 59% pour la boue métallique et 2% pour le biochar. Dans chaque boîte sont disposées 15 graines. Le test de germination est conduit pendant 13 jours.

Tableau 22 _ Composition des substrats utilisés pour le premier test de germination

Modalité	Biopile (2mm)	Boue de phosphatation	Biochar (2mm)	Modalité	Biopile (2mm)	Boue de phosphatation	Biochar (2mm)
	Fraction massique sur matériaux frais (%)				Fraction massique sur matériaux secs (%)		
A	0	100	0	A	0	100	0
B	50	50	0	B	61	39	0
C	0	50	50	C	0	39	61
D	75	25	0	D	82	18	0
E	50	25	25	E	55	18	28
F	90	10	0	F	93	7	0
G	90	5	5	G	92	3	5
H	95	5	0	H	97	3	0
I	100	0	0	I	100	0	0

Dans une deuxième expérience, la germination de deux hyperaccumulateurs de Ni (*A. murale* et *L. emarginata*) est testée sur la boue de phosphatation amendée avec 5% de biochar. Six modalités sont constituées avec quatre fractions massiques de boue : 0, 7, 18 et 30% (Tableau 23). L'addition de 5% biochar est testée avec les modalités avec 7, 18 et 30% de boue, en substitution de 5% terre de biopile. Pour chaque modalité, dix graines sont mises en place par boîte. La germination est suivie pendant dix jours.

Tableau 23 _ Composition des substrats du deuxième test de germination

Mélange	Biopile	Boue de phosphatation	Biochar	Mélange	Biopile	Boue de phosphatation	Biochar
	Fraction massique sur matériaux frais (%)				Fraction massique sur matériaux secs (%)		
I	55	40	5	I	65	30	5
II-SB	75	25	0	II-SB	80	18	0
II-B	70	25	5	II-B	77	18	5
III-SB	90	10	0	III-SB	93	7	0
III-B	85	10	5	III-B	88	7	5
IV	100	0	0	IV	100	0	0

Enfin, un troisième test de germination est conduit avec des substrats obtenus par mélange en suspension. La terre de biopile est remplacée par de la vermiculite ; un essai préliminaire de la bentonite a amené à écarter cette argile. Quatre types de mélanges sont préparés avec 0, 30 ou 60% de boue mélangée avec biopile ou vermiculite et avec ou sans biochar (Tableau 24).

Tableau 24 _ Composition et codage des substrats du troisième test de germination

Code du mélange selon le mode de préparation		Composition des mélanges		
Sec	Suspension	Boue de phosphatation	Matériau complémentaire	Biochar
1	I	30	Biopile	Oui
2	II	30	Biopile	Non
3	III	60	Biopile	Oui
4	IV	60	Biopile	Non
5	V	30	Vermiculite	Oui
6	VI	30	Vermiculite	Non
7	VII	0	Vermiculite	Non

Pour chacune de ces modalités, les mélanges ont été préparés selon deux protocoles : i) en mélangeant les matériaux en suspension dans de l'eau ultra pure, qui sont ensuite séchés et fractionnés et ii) en homogénéisant les matériaux secs, tamisés à 2 mm (Annexe 12).

Afin de ne pas modifier la structure physique du mélange, l'eau est apportée initialement sur le papier filtre avant dépôt du substrat. Si cette humectation est insuffisante, de l'eau est alors ajoutée sur les côtés après la mise en place du mélange, en dirigeant le jet d'eau contre les parois de la boîte de Petri.

Le test de germination est conduit avec quatre graines de *Zea maïs*, pendant 18 jours (Annexe 13).

1.2. Résultats des tests de germination

*a) Germination de *L. emarginata* sur la boue amendée avec différentes proportions de biochar et de terre de biopile*

La boue de phosphatation seule ne permet pas la germination (Figure 58). Sur le substrat témoin (terre de biopile), 100% des graines germent. Sur le mélange avec 39% de boue, aucune graine ne germe sauf si la boue est amendée en biochar à raison de 61%. Dans ce cas 73% germent. En dessous de 18% de boue, les graines germent sur toutes les modalités, mais le pourcentage de germination est supérieur en présence de biochar.

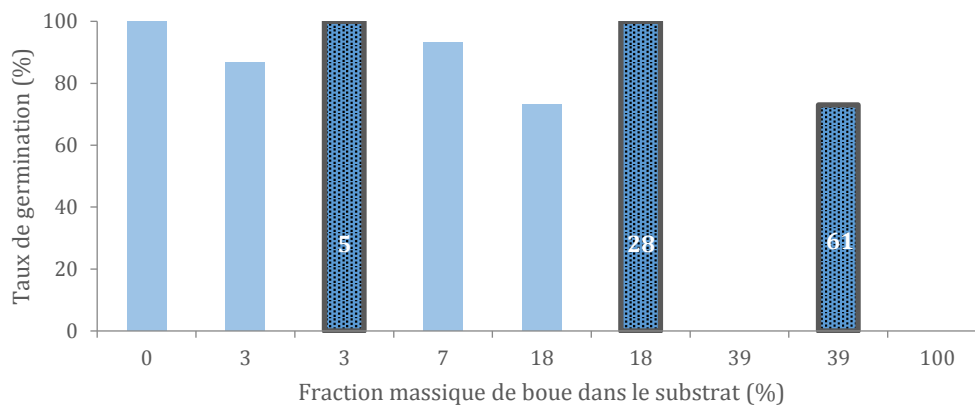


Figure 58 _ Taux de germination de *L. emarginata* en fonction de la fraction massique de boue dans le substrat après 13 jours d'incubation. Les traits foncés indiquent l'addition de biochar et la valeur indique la fraction massique de biochar dans le substrat.

En général, le plus grand nombre de graines a germé après six jours et le taux de germination se stabilise au 11^{ème} jour. La cinétique de germination est différente selon les substrats. Les graines sur les trois modalités avec biochar germent plus vite que sur les mêmes modalités sans biochar (Annexe 14).

b) Germination d'*A. murale* et *L. emarginata* sur des substrats contenant une proportion variable de boue de phosphatation, avec ou sans une dose de 5% de biochar

Les taux de germination d'*A. murale* varient de 10 à 70%. Les plus faibles sont obtenus sur les substrats sans biochar (avec 0 et 18% de boue). Ils augmentent avec l'ajout de biochar. Pour un substrat donné, le taux de germination de *L. emarginata* est systématiquement supérieur à celui d'*A. murale*. En comparaison, les taux de germination de *L. emarginata* varient de 80 à 100% (Figure 59). Ces résultats confirment pour *L. emarginata* les résultats obtenus dans le premier test.

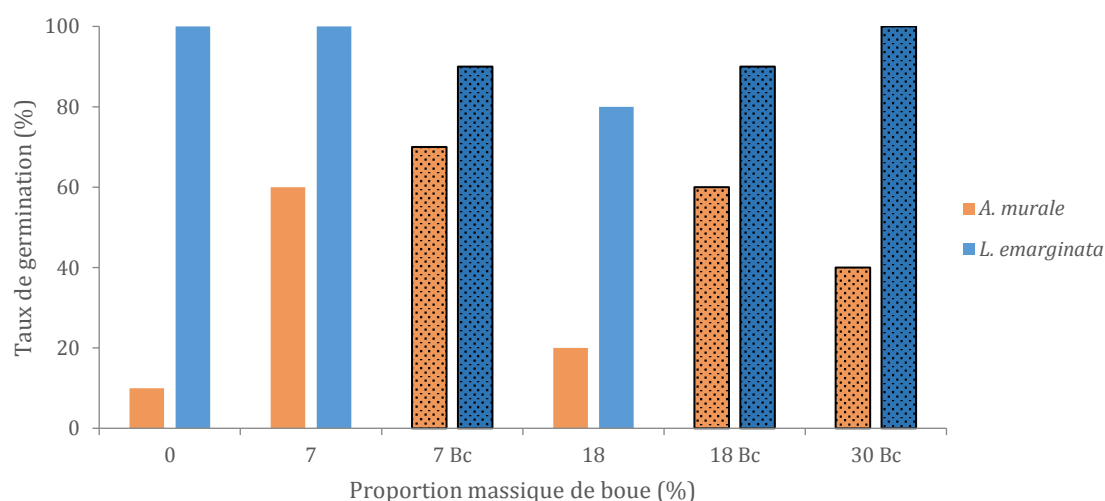


Figure 59 _ Taux de germination d'*A. murale* et *L. emarginata* neuf jours après le semis selon le substrat. 0, 7, 18 et 30% : fraction massique de boue de phosphatation, Bc : 5% de biochar

Les substrats amendés en biochar présentent une germination plus rapide et supérieure (à cinq jours) par rapport aux substrats non amendés. Dans le cas de *L. emarginata* quatre jours plus tard, les substrats non amendés ont un taux de germination équivalent aux substrats amendés (Annexe 15). L'augmentation de la concentration en boue dans le substrat diminue le taux de germination d'*A. murale* mais pas celui de *L. emarginata*. Les graines présentent des symptômes de toxicité sur certains mélanges, en particulier sur la modalité avec 30% de boue (5% de biochar et 65% de terre de biopile) (Figure 60).

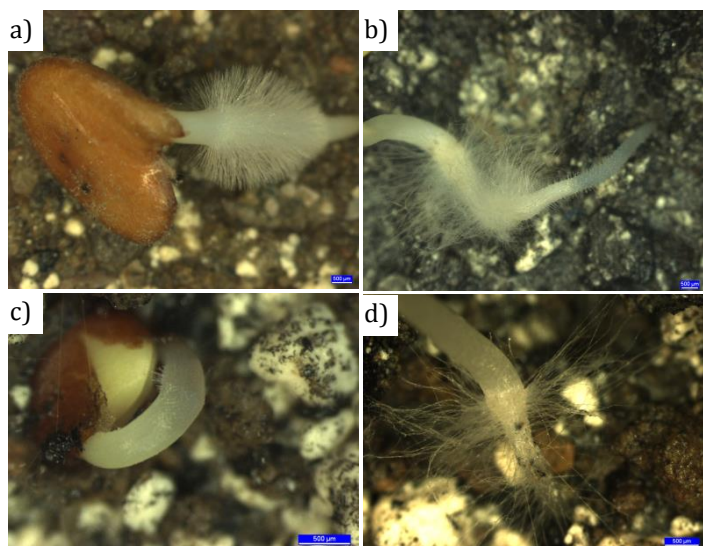


Figure 60 _ Photographies des racines et poils absorbants sur les graines. À la loupe binoculaire. a) *L. emarginata* sur le mélange avec 7% de boue et sans biochar à sept jours, sa couronne de poils absorbants témoigne d'un développement normal. b) *L. emarginata* sur le mélange avec 30% de boue et avec biochar à sept jours, signes de toxicité : racine déformée et poils absorbants courts sur la partie inférieure de la racine. c) *A. murale*, cotylédons visibles et poils absorbants très courts à cinq jours sur mélange à 30% de boue et avec biochar. d) *A. murale* à cinq jours sur le mélange à 18% de boue et biochar, poils absorbants peu denses et frêles.

c) Germination en fonction du mode de préparation du substrat

Les substrats ont été préparés i) par mélange des matériaux en suspension dans de l'eau, puis séchage et fractionnement et ii) directement à partir du mélange de matériaux secs. La germination est faible ou nulle sur les mélanges avec la fraction de boue la plus élevée (60%), surtout ceux préparés en suspension. Le nombre de graines germées et la biomasse produite sont plus élevés en présence de biochar (modalités 1/I, 3/III, 5/V en comparaison respectivement à 2/II, 4/IV, 6/VI) (Tableau 24). Par ailleurs, le développement racinaire est plus important sur les mélanges avec 30% de boue avec de la vermiculite qu'avec de la terre de biopile (Annexe 16).

Afin de comparer la germination en fonction du mode de préparation des mélanges, les taux de germination obtenus après mélange sec sont soustraits de ceux obtenus après mélange en suspension. Les résultats sont présentés Figure 61 où chaque barre représente le gain, c'est-à-dire pour un mélange donné :

Gain (%) = Taux de germination sur mélange préparé en suspension (%) – Taux de germination sur mélange préparé avec des matériaux sec (%)

Lorsque le gain est positif, le substrat préparé en suspension a un taux de germination supérieur au substrat préparé à sec et inversement (Figure 61).

Les mélanges contenant de la vermiculite favorisent la germination quand ils sont préparés en suspension. C'est l'inverse avec ceux élaborés à partir de terre de biopile, qui favorisent la germination lorsqu'ils sont préparés à sec (exception faite du mélange 60% de boue et 40% de biopile) (Figure 61). Le biochar améliore la germination sur les mélanges secs mais pas sur les

autres. La vermiculite seule et le mélange boue-vermiculite-biochar ne sont pas affectés par la méthode de préparation.

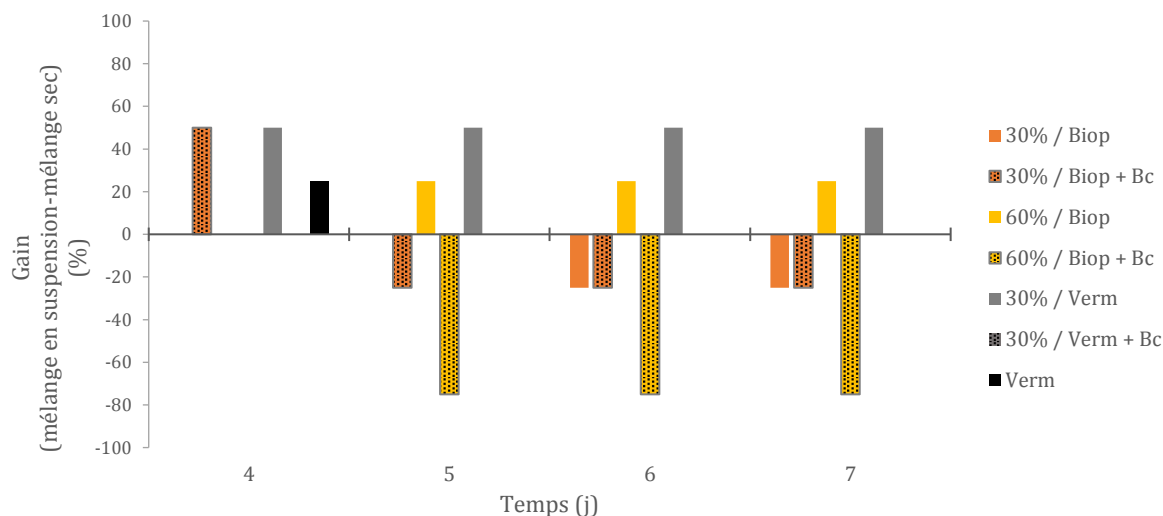


Figure 61 _ Gain de taux de germination de *Z. mays* avec le mélange préparé en suspension en comparaison avec le mélange préparé à sec. La composition du substrat est indiquée dans la légende : boue (%)/type d'amendement (Verm : vermiculite et Biop : terre de biopile) + 5% de biochar (Bc) ou rien si pas de biochar.

Après sept jours, tous les mélanges présentent un taux de germination d'au moins 50% (excepté celui avec 60% de boue) (Annexe 17). De plus, les substrats contenant de la vermiculite et préparés en suspension atteignent 100% de germination. Ceux contenant du biochar atteignent 100% de germination lorsque les matériaux ont été mélangés secs. Après le septième jour, aucune nouvelle germination n'est observée. Au 11^{ème} jour, le nombre de graines germées mais mortes indique que le développement est avorté, principalement sur les mélanges effectués en suspension (Annexe 18).

Lorsque 30% de boue sont intégrés au mélange :

- En présence de vermiculite, 100% de germination de *Z. mays* sont obtenus en préparant le mélange en suspension et 50% à sec (Annexe 18).
- En présence de terre de biopile, le taux de germination est de 75% sur le mélange en suspension (mais seulement 50% après 11 jours) et 50% si le mélange est effectué à sec.

Ainsi, en suspension, la vermiculite donne lieu à de meilleurs résultats que la terre de biopile, mais en suspension la survie des graines germées est moindre. Le taux de germination est amélioré par le biochar particulièrement dans les mélanges effectués à sec.

1.3. Discussion

L'installation de végétaux sur les substrats métalliques impose d'abord que les graines des hyperaccumulateurs soient capables de germer et de survivre sur ces milieux particulièrement hostiles par leur concentration en métaux et leur pH. Une gamme de substrats et de modalités de mélanges a été testée avec deux hyperaccumulateurs et une plante de référence, le maïs. Les essais démontrent que la boue de phosphatation seule inhibe totalement la germination des hyperaccumulateurs de Ni. Par contre, l'addition de biochar lève cette inhibition, d'autant plus que la dose de biochar est élevée. L'amendement en biochar améliore la germination même à faible concentration (5%). Si le biochar entraîne en général une réduction de la disponibilité des métaux

(Rees *et al.* 2014) ; à forte dose, il peut augmenter la toxicité du milieu (Oleszczuk *et al.* 2013). Ici, la présence du biochar qui permet la germination même avec près de 40% de boue, paraît réduire la vitesse de germination à forte dose (60%), en relation avec son propre effet inhibiteur. Bien entendu, une telle dose n'est pas réaliste pour des raisons économiques et pratiques (coût, densité). Cinq pourcents paraît un bon compromis qui permet de lever l'inhibition de la germination tout en restant faisable (Rees *et al.* 2015). Une formulation contenant 30% de boue de phosphatation et 5% de biochar assure une germination optimale et peut être retenue pour les essais de croissance et développement des hyperaccumulateurs. La réponse des plantes à l'inhibition de la germination dépend de l'espèce. Ainsi, *L. emarginata* offre une aptitude supérieure pour germer sur ces milieux extrêmes par rapport à *A. murale*, ce qui peut être dû aux plus larges réserves de la graine. Enfin, la germination est liée à la façon dont a été préparé le mélange. Si un mélange en suspension dans l'eau assure une meilleure homogénéisation du substrat, il paraît défavorable à la survie des individus par rapport à un mélange opéré à l'aide de matériaux secs. D'une part, il est possible que la suspension conduise à un mélange vierge non structuré et donc avec une faible macroporosité. D'autre part, la suspension peut remettre en solution une fraction des métaux qui sont ensuite redistribués sur la matrice où ils sont particulièrement disponibles. Toutefois, la vermiculite en suspension, de par son fort pouvoir absorbant/gonflant, peut générer des espaces en se déshydratant, et adsorber probablement les métaux mis en solution, réduisant leur disponibilité et, par conséquent, la toxicité du milieu. En revanche, cette diminution peut être incompatible avec un fort prélèvement des métaux par les hyperaccumulateurs. Au contraire, à 5%, la capacité du biochar à limiter la disponibilité des métaux est atténuée par un effet de dilution au sein de la suspension.

2. Effet du biochar sur l'hyperaccumulation sur sol ultramafique

Etant donné l'intérêt du biochar, en tant qu'amendement pour réduire la toxicité de substrats à forte concentration en métaux, qui se dégage, d'une part, de la littérature (Rees *et al.* 2015) et, d'autre part, des tests de germination, il nous a paru nécessaire de vérifier comment ce processus pouvait affecter le prélèvement et l'accumulation du Ni à partir de sols ultramafiques qui constituent le substrat naturel des hyperaccumulateurs testés. Dans le cas de la tomate, un amendement de 5% de biochar sur un sol ultramafique diminue de plus de 90% la bioaccumulation du Ni (Herath *et al.* 2015), qu'en serait-il avec une plante hyperaccumulatrice ? L'effet positif du biochar sur l'accumulation du Cd a été démontré avec l'hyperaccumulateur de Cd *Noccaea caerulescens* qui tend à accumuler plus de Cd en présence de biochar (Rees *et al.* 2015). Cela n'a jamais été testé dans le cas de l'hyperaccumulation du Ni. Aussi, un essai en vases de végétation a été conduit en utilisant de la terre issue d'un sol ultramafique et avec un hyperaccumulateur de Ni afin de tester l'effet sur la biomasse produite et l'accumulation du Ni d'un apport de biochar au sol.

2.1. Matériels et méthodes

L. emarginata est cultivée sur de la terre prélevée d'un sol ultramafique (TU_Lot 1). Dans des vases de végétation d'un volume de 0,25 L, une couche drainante de gravier est installée au fond puis recouverte de 150 g de terre. Deux modalités sont alors testées : sol ultramafique seul et sol ultramafique avec 6,5% (m) de biochar (n°1), trois répétitions par modalité. Après remplissage des vases de végétation avec la terre, les coupelles sont remplies d'eau pour humecter le substrat par capillarité. Deux jours plus tard, cinq graines de *L. emarginata* (site II) sont semées dans

chaque vase. La culture est maintenue pendant 33 semaines (environ 7,3 mois). À la récolte, les parties aériennes sont coupées au collet, lavées trois fois à l'eau déminéralisée puis séchées à 70°C pendant 48h. Elles sont broyées dans un bol en tungstène puis minéralisées avec HNO₃. Le filtrat est alors analysé par ICP-OES afin de déterminer les concentrations en métaux. Après dépotage, les sols sont tamisés à 2 mm puis séchés à 40°C pendant 48h. Le pH est mesuré ainsi que la concentration en éléments extractibles au DTPA.

2.2. Résultats

Après 33 semaines de culture, tous les vases de végétation comportent quatre individus sauf une des répétitions sans biochar (trois individus) et une autre avec biochar (deux individus). La biomasse produite par individu ou par vase de végétation est supérieure sur sol amendé (Figure 62). Elle est plus du double en présence de biochar. La concentration du Ni dans les parties aériennes de *L. emarginata* cultivé sans biochar est supérieure à 10 000 mg kg⁻¹. En présence de biochar, cette concentration s'élève à près de 13 000 mg kg⁻¹ (Figure 63). En début d'expérience, l'apport de 6,5% de biochar induit une augmentation du pH alors que la conductivité ne change pas (Figure 64). À l'issue de la culture de *L. emarginata*, le pH et la conductivité ont augmenté en absence et en présence de biochar. La concentration en Ni extractible au DTPA diminue en présence de biochar. À l'issue de la culture, la concentration est diminuée sur les deux modalités et particulièrement sur la terre amendée en biochar (Figure 65).

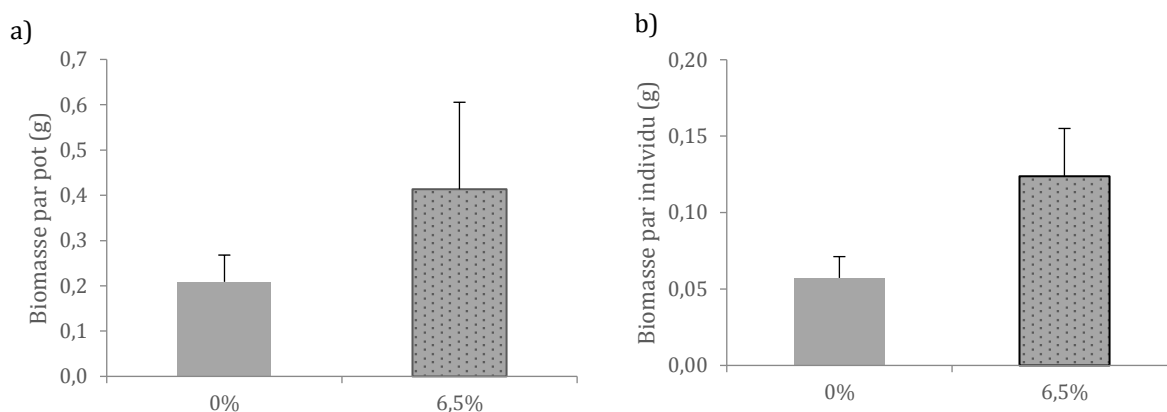


Figure 62 _ Biomasse de *L. emarginata* a) par vase de végétation et b) par individu selon l'amendement en biochar (m)

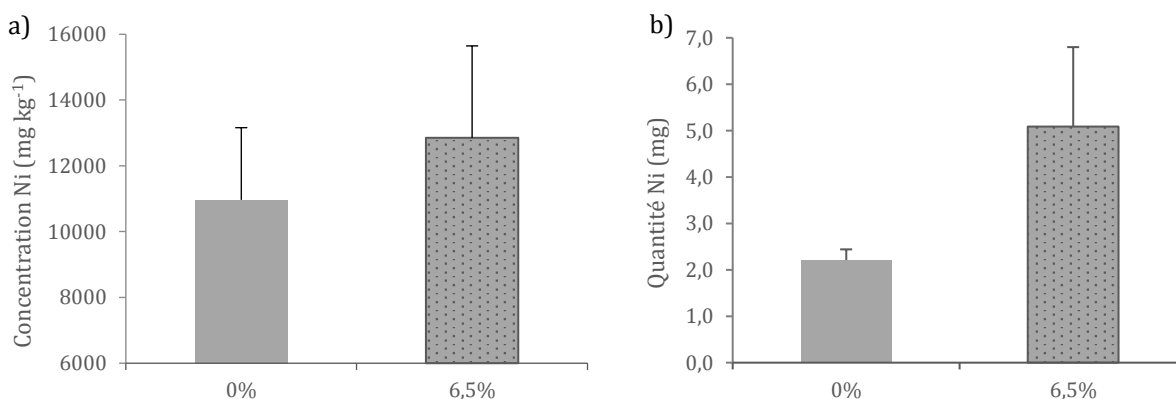


Figure 63 _ a) Concentration en Ni dans les parties aériennes de *L. emarginata* et b) quantité de Ni extraite par vase de végétation, selon l'amendement en biochar (m)

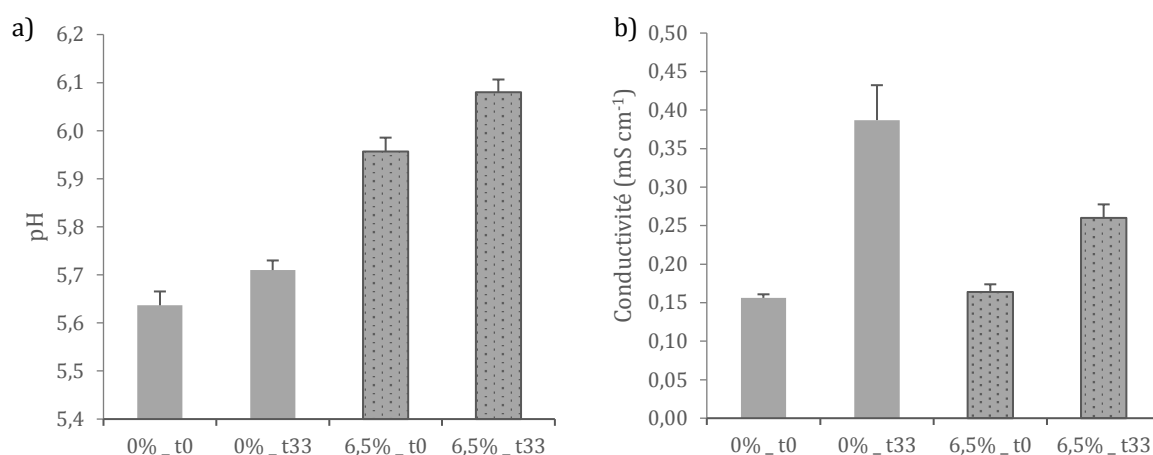


Figure 64 _ a) pH et b) conductivité de la terre ultramafique avant et après culture. 0% sans amendement, 6,5% : amendement (m) de biochar, t0 : au début de l'expérience, t33 : après 33 semaines de culture de *L. emarginata* (N=3)

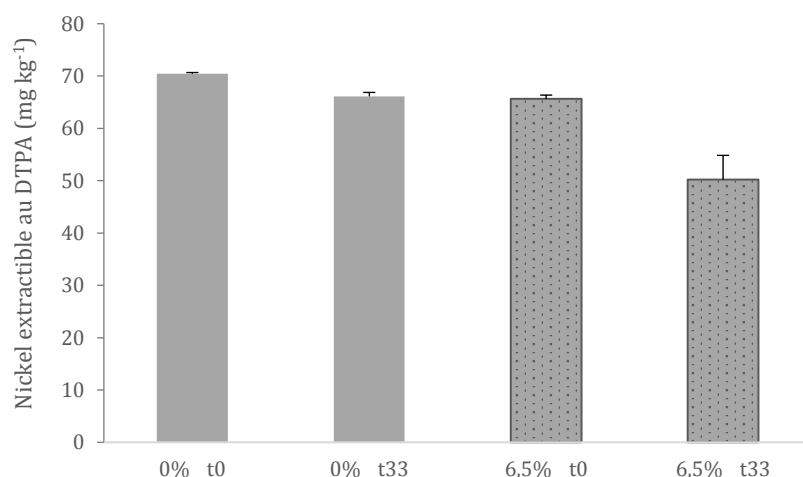


Figure 65 _ Concentration en Ni_{DTPA} de la terre ultramafique avant et après culture. 0% sans amendement, 6,5% : amendement (m) de biochar, t0 : au début de l'expérience, t33 : après 33 semaines de culture de *L. emarginata* (N=3)

2.3. Discussion

Le sol amendé par du biochar à hauteur de 6,5% en masse dans le sol, augmente la biomasse produite et la concentration en Ni dans les tissus aériens de *L. emarginata*. Le biochar a donc permis d'augmenter le Ni extrait de ce sol ultramafique. Dans le cas d'une plante non hyperaccumulatrice, Herath *et al.* (2015) ont montré que la culture de tomate sur un sol ultramafique amendé avec 5% de biochar augmente de 40 fois la biomasse produite et diminue de plus de 90% la bioaccumulation de Cr, Ni et Mn. La fraction biodisponible de ces mêmes éléments est diminuée de 99, 61 et 42%, respectivement en présence de 5% de biochar. Ainsi, le biochar diminue les concentrations de certains éléments en solution. Ces travaux sur le Ni et d'autres travaux sur Cd et Zn (Rees *et al.* 2015, 2016; Kanso 2016), indiquent qu'en présence de biochar le transfert du métal dans une plante hyperaccumulatrice augmente.

3. Croissance et développement d'hyperaccumulateurs de Ni sur les substrats élaborés à partir d'une boue industrielle amendée en biochar

Les essais de germination ont permis de tester une gamme de substrats permettant la germination de graines d'hyperaccumulateurs de Ni et de démontrer qu'il est possible d'obtenir l'installation de plantes, au moins provisoirement, sur des substrats particulièrement hostiles à la vie. Cela fait appel à l'emploi, d'une part, de matériaux de remplissage et, d'autre part, d'amendements qui contrôlent la disponibilité des métaux. C'est ainsi que le biochar est confirmé en tant qu'amendement efficace pour réduire la toxicité du substrat. Un essai cultural en vases de végétation utilisant le substrat naturel des plantes hyperaccumulatrices a permis de démontrer que malgré une diminution de la disponibilité du Ni dans le sol, l'hyperaccumulation est augmentée de près de 20%.

Il s'agit à présent d'éprouver le potentiel des substrats choisis en tant que supports pour la croissance et le développement de plantes hyperaccumulatrices. Deux hyperaccumulateurs de Ni sont choisis pour leur aptitude à germer sur ces milieux, *A. murale* et *L. emarginata*. Ils sont cultivés sur le substrat qui a offert les meilleures performances en matière de germination, composé d'un mélange de terre de biopile, de boue de phosphatation en différentes proportions (0-30%) et de biochar (5%) préparé à partir de matériaux secs. L'expérience est conduite de façon à pouvoir mesurer l'effet du substrat sur la survie des individus, la production de biomasse et l'accumulation du Ni dans les parties aériennes.

3.1. Matériels et méthodes

a) Espèces végétales

A. murale (S V) et *L. emarginata* (S II, 2013) sont sélectionnées pour leur potentiel à hyperaccumuler le Ni, leur croissance rapide et leur taux de germination élevé sur les substrats testés. Comme précédemment, les graines de *L. emarginata* de masse comprise entre 3,53 et 7,56 mg sont choisies. Les graines sont désinfectées au préalable (cf. Partie 2_Préparation des graines) puis mises à +4°C pendant 12 h.

b) Substrats

Les substrats sont préparés à partir d'un mélange de terre de biopile (TB_Lot 1), de boue de phosphatation (BA_Lot 1) et de biochar de bois (n°1). Chaque vase de végétation a un volume de 0,25 L. Les proportions des matériaux sont celles testées dans le second test de germination (Tableau 23). À partir de trois doses de boue : 7, 18 et 30% (m) MS, des mélanges sont effectués avec de la terre de biopile et 5% de biochar sont intégrés (B) ou non (SB), excepté pour le mélange avec 30% où la modalité sans biochar ne permet pas une germination suffisante pour envisager la croissance. Un témoin est constitué avec 100% de terre de biopile. Ainsi six modalités sont testées (Tableau 25). La concentration du Ni dans les substrats varie de 40 à 1 590 mg kg⁻¹.

Tableau 25 _ Composition des six différents substrats

Code utilisé dans 2 ^{ème} test de germination	Modalités					
	IB	IISB	IIB	IIISB	IIIB	IVSB
5% de biochar (m) MS	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non
Boue (%) (m) MS	30	18	18	7	7	0
Quantité de boue MS par vase (g)	45	40	40	20	20	0
Quantité de Ni apportée par la boue par vase (mg)	235	210	210	105	105	0
Quantité de Ni apportée par la biopile par vase (mg)	4	7	7	11	10	14
Quantité de substrat MS par vase (g)	150	220	220	300	280	340
Concentration calculée du Ni total par vase (mg kg ⁻¹)	1 590	990	990	390	410	40
Dénomination (% de boue et Bc (B) ou non (SB))	30%B	18%SB	18%B	7%SB	7%B	0%SB

c) Plan d'expérience

Pour chacun des six substrats il y a trois couverts : *A. murale*, *L. emarginata*, sol nu. Trois répétitions sont mises en place pour chacune des 18 modalités. Dans chaque vase de végétation, deux ou trois graines sont semées à trois emplacements. Afin de pallier les déficits de germination et la mortalité des plantules, parfois, plus de trois plantes ont été gardées par vase de végétation. De même, plusieurs semis successifs ont été nécessaires. Les 54 vases de végétation sont placés en chambre de culture selon les conditions présentées dans la Partie 2, pendant 90 jours, avec des températures de 22 °C Jour / 15 °C Nuit. Ils sont disposés en trois blocs correspondant chacun à une répétition. À l'intérieur de chacun des blocs, les modalités sont disposées selon un tirage aléatoire (Annexe 19). L'humidité de la terre est ajustée à 80 % de la capacité de rétention en eau par un arrosage à l'eau ultra pure toutes les 48 h.

Le protocole de récolte est présenté dans la Partie 2. En présence d'un couvert, le sol adhérent aux racines (sol rhizosphérique) est séparé du sol non adhérent (non rhizosphérique). Les éléments pseudo-totaux sont analysés sur les matériaux avant culture. Les mesures de pH_{eau}, éléments extractibles au DTPA et capacité de rétention en eau des matériaux sont mesurés avant et après culture. Les prélèvements avant culture ont été menés sur les matériaux mélangés mais non incubés. Les parties végétales prélevées sont lavées, séchées (cf. Partie 2). Les concentrations en éléments (Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb et Zn) dans les parties aériennes et racinaires sèches sont dosées à l'ICP-OES.

3.2. Résultats

a) Développement des plantes et biomasse produite

La croissance des plantes est très inégale d'une modalité à l'autre et d'une espèce à l'autre. Le temps d'installation et la mortalité augmentent avec la quantité de boue présente dans le mélange. Ainsi, les substrats contenant les plus grandes quantités de boue ont été végétalisés plus tardivement que les autres. Après 90 jours d'expérience, la récolte est effectuée pour l'ensemble des modalités, même si les plantes ont des âges différents et inférieurs à 90 jours (47 à 77 jours). Les plantes ont germé sur les six modalités mais ne se sont pas installées en présence de 18% de boue sans biochar et 30% de boue (Figure 66). Les plantes sur la modalités sans boue présentaient des chloroses (Annexe 20a). Avec 30% de boue les graines germaient et mourraient rapidement. En présence de 7% de boue, les racines se développaient largement dans le volume de substrat (Annexe 20). La présence de biochar dans le mélange améliore significativement l'installation et

la croissance des végétaux. Ainsi, sur 18% de boue, aucune plante ne s'est installée en l'absence de biochar malgré quelques germinations. Pour la même modalité avec 5% de biochar, aucun individu d'*A. murale* ne s'est développé, alors qu'il y a un individu de *L. emarginata* (Annexe 21).

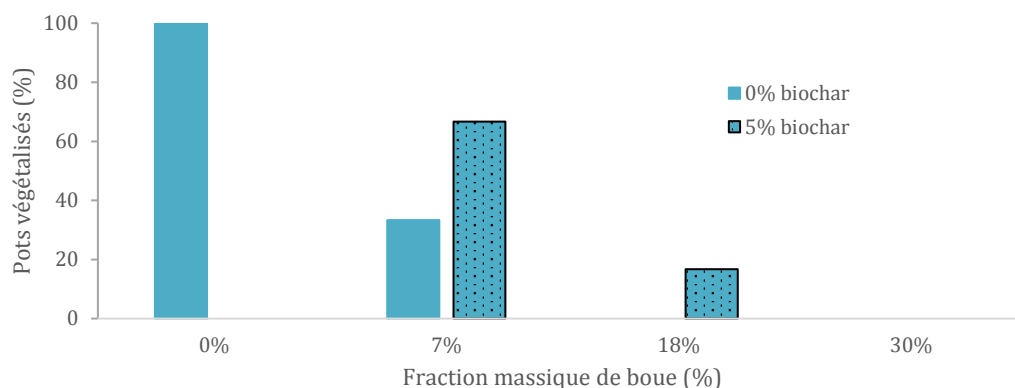


Figure 66_ Vases de végétation végétalisés après 90 jours de culture selon l'amendement en biochar. Il n'y a pas de modalité 0% boue+Biochar et 30% sans biochar.

La modalité avec 7% de boue et 5% de biochar a produit la plus forte **biomasse** cumulée (Annexe 22). Pour les modalités à 0% et 7% de boue, les deux espèces se sont développées mais *L. emarginata* a produit plus de biomasse qu'*A. murale*. Bien que tous les vases de végétation du témoin soient végétalisés, les individus développés présentent une plus faible biomasse que ceux des autres modalités (Figure 67).

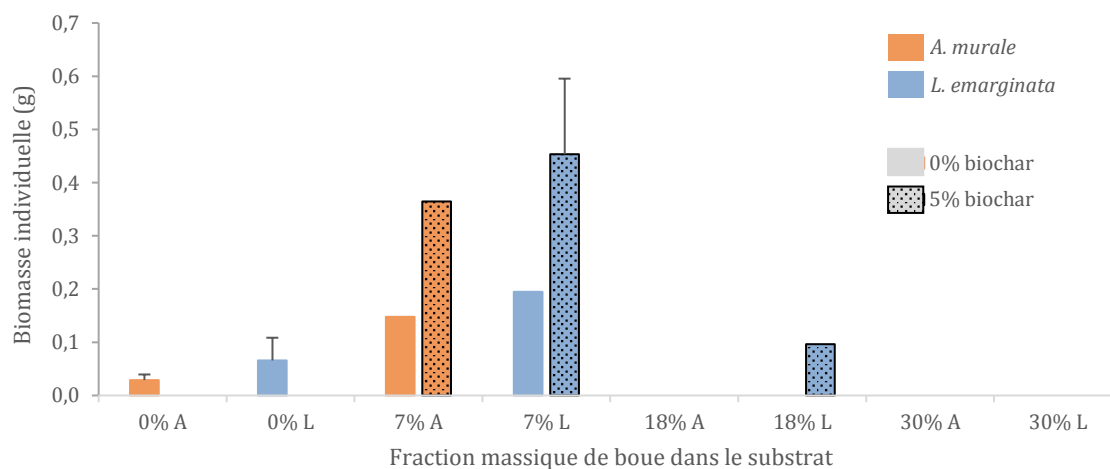


Figure 67_ Biomasse aérienne moyenne par individu. A : *A. murale* et L : *L. emarginata*, les barres avec pointillés représentent les modalités avec biochar. Il n'y a pas de modalité 0%+Biochar et 30% sans biochar. Les barres verticales indiquent l'écart-type quand il y a plusieurs vases végétalisés.

b) Transfert du Ni dans les plantes

La concentration du Ni dans les parties aériennes augmente avec la concentration de boue dans le substrat (

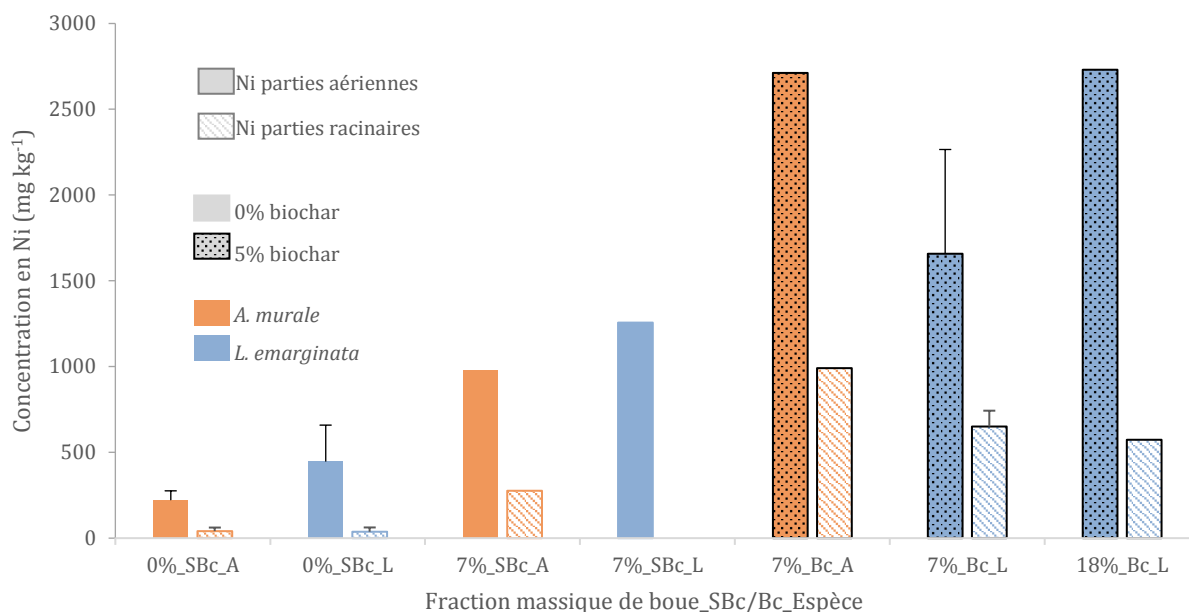


Figure 68). À 7% de boue, la concentration de Ni dans les parties aériennes est supérieure en présence de biochar. *L. emarginata* sur 18% boue avec biochar et *A. murale* sur 7% boue avec biochar ont une concentration de 2 700 mg kg⁻¹ de Ni. Toutefois, il faut noter que *A. murale* a 1,3 fois l'âge de *L. emarginata*. En terme de quantité de Ni extrait, les plantes développées sur le substrat avec 7% de boue et avec du biochar présentent la plus grande quantité de Ni extraite : 1 à 2,5 mg par vase de végétation (Figure 69). Au regard de la quantité de Ni présente dans le substrat, les plantes ont extrait près de 2% du Ni total en présence de 7% de boue et de biochar (Annexe 23). Les mêmes tendances que précédemment sont observées pour l'efficacité d'extraction des couverts les uns par rapport aux autres. À noter cependant qu'en l'absence de boue, *L. emarginata* a prélevé presque 1% du Ni total de la terre de biopile. Dans les deux espèces et particulièrement en présence de boue dans le substrat, Zn est peu transféré dans les parties aériennes : les concentrations sont supérieures dans les parties racinaires (Annexe 24). Par ailleurs, elles varient de 400 à 1 000 mg kg⁻¹ dans les parties aériennes et sont inférieures à celles du Ni. Cependant dans les parties racinaires elles sont deux à sept fois supérieures à celles du Ni pour les substrats contenant de la boue.

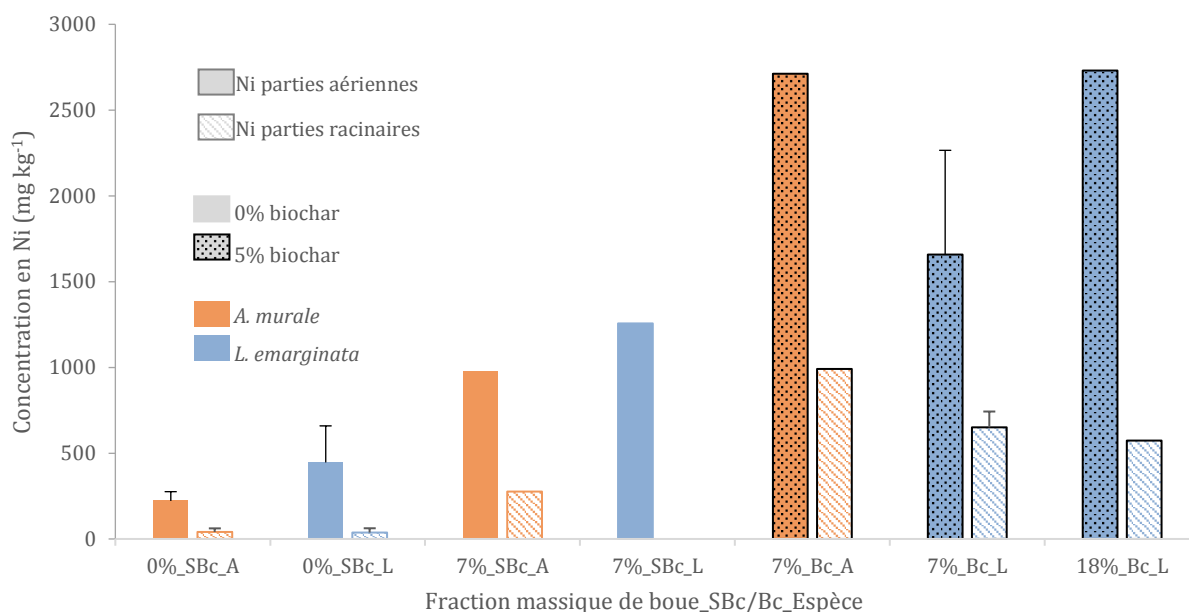


Figure 68 _ Concentration du Ni dans les parties aériennes et racinaires d'*A. murale* et *L. emarginata*
 Barres pleines : parties aériennes, barres hachurées : parties racinaires, Code abscisse : % (m) de boue dans le substrat_ SBc : sans biochar, Bc : 5% de biochar _ Espèces : A : *A. murale* et L : *L. emarginata*.

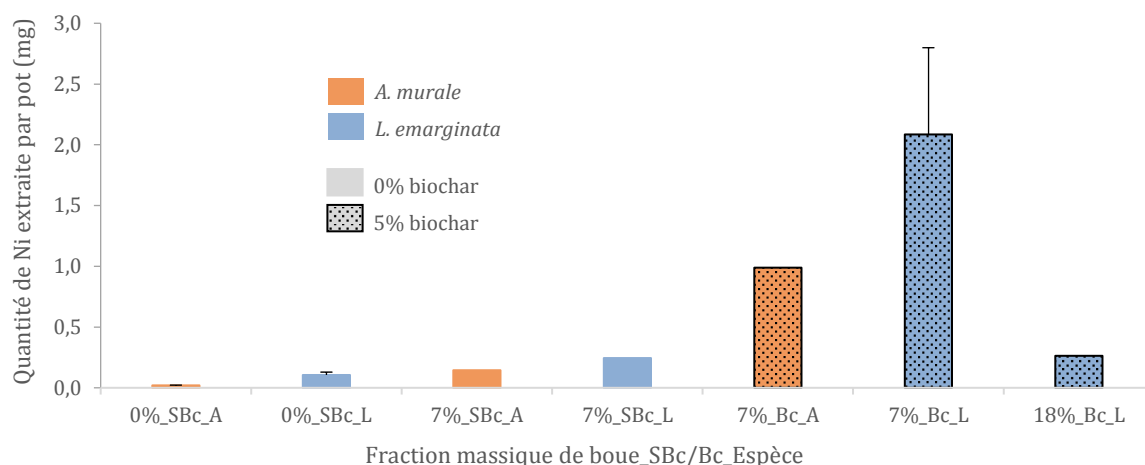


Figure 69 _ Quantité de Ni extraite dans les parties aériennes de *A. murale* (en rouge, A) et *L. emarginata* (en bleu, L) par vase de végétation selon une dose croissante de boue dans le substrat et en absence de biochar (SBc) ou avec 5% de biochar (Bc). Les barres verticales indiquent les écarts-types lorsque plusieurs vases de végétation étaient végétalisés (N=3).

c) Propriétés physiques et chimiques des substrats

La boue a un **pH** de 3,86 et la terre de biopile de 8,28. À t_0 , lorsque la proportion de boue diminue dans le mélange, le pH augmente et la conductivité diminue (Figure 70). Le biochar amplifie ces effets. En conditions contrôlées, un arrosage toutes les 48 h pendant 90 jours équivaut à autant de cycles d'humectation-dessiccation. Après cette période, le pH a augmenté pour tous les substrats mais la tendance reste la même : le pH augmente en présence de biochar et lorsque la fraction de boue diminue (Figure 70). La **conductivité** à l'issue de la période d'incubation varie fortement mais avec la même tendance qu'initialement : elle diminue avec la baisse de la dose de boue dans

le substrat. Elle diminue de moitié au cours de l'incubation dans les mélanges avec 18 et 30% de boue. Les modalités avec biochar ont une conductivité moyenne inférieure à celle de la même modalité non amendée. Par ailleurs, l'écart de pH et de conductivité entre le début et la fin de l'expérience est d'autant plus important que la quantité de boue dans le substrat est élevée. Bien qu'il n'y ait pas toujours de répétition, le sol rhizosphérique montre systématiquement un pH plus élevé que le sol non rhizosphérique (Annexe 25). Les substrats contenant de la boue présentent une plus grande variabilité que les substrats sans boue.

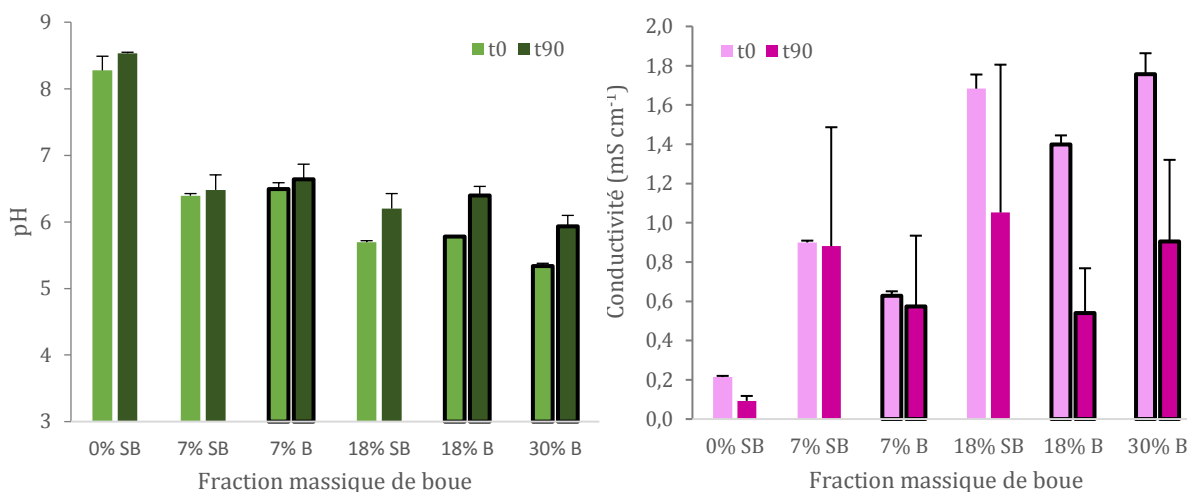


Figure 70 _ pH et conductivité des substrats non plantés à t0 et après incubation de 90 jours. $N=3$, le pourcentage en abscisses correspond à la fraction massique de boue dans le substrat suivi de SB : pas de biochar ou B : 5% de biochar (barre encadrée en noir).

La **capacité de rétention en eau** de la boue seule est de 160% ; elle est conditionnée à ce taux d'humidité (saturée en eau). En comparaison, celle de la terre de biopile est de seulement 17% (Annexe 26). En conséquence, la capacité de rétention en eau des substrats augmente avec la concentration de boue dans le mélange. Le biochar contribue à encore augmenter la capacité de rétention en eau. De même, le **point de flétrissement** est plus haut lorsque la concentration en boue augmente. L'humidité du sol après récolte est proportionnelle à la quantité de boue dans le mélange. Elle est inférieure dans le sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique (Annexe 27).

Le **Ni extrait au DTPA** dans les substrats après culture augmente avec l'augmentation de la fraction massique de boue. De plus, il est plus faible dans les sols rhizosphériques que dans les sols non rhizosphériques (Figure 71), ces derniers ayant des concentrations similaires à celles des sols nus. Ces observations sont valables sur toutes les modalités même si le Ni_{DTPA} est très inférieur sur la modalité témoin, pour laquelle il est de l'ordre de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$. Il est à noter que sur les mélanges avec boue, le Ni_{DTPA} correspond à environ 10% du Ni total (Tableau 25).

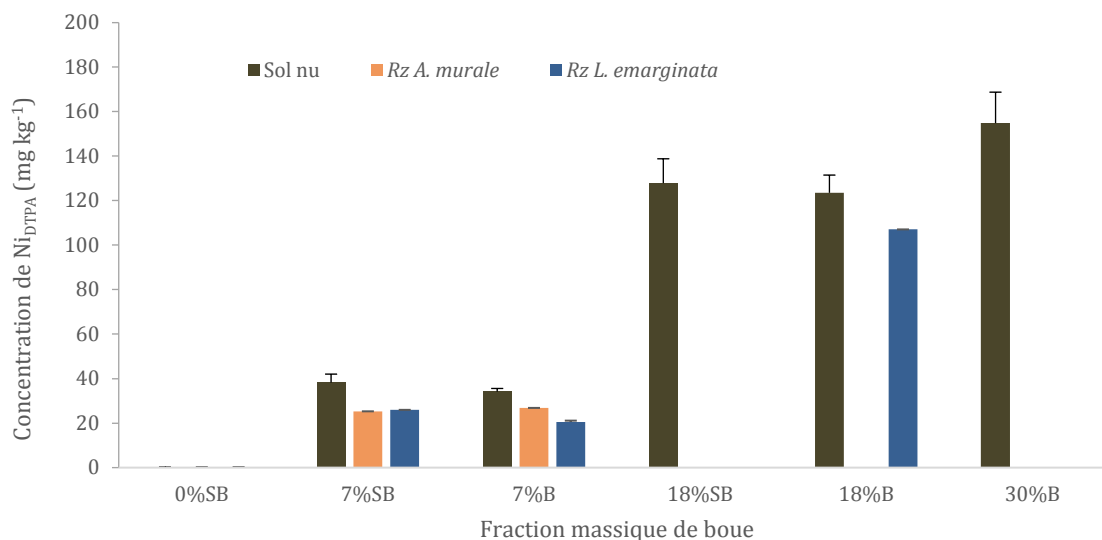


Figure 71_ Concentration du Ni disponible dans les substrats selon une dose croissante de boue, avec et sans amendement en biochar. Rz : sol rhizosphérique, SB : sans biochar, B : avec 5% (m) de biochar

Parmi les autres éléments extraits au DTPA, plus le substrat contient de boue, plus les concentrations en Zn, Mn, Fe, P, Na, et dans une moindre mesure Mg sont élevées. Pour une concentration en boue donnée, la présence de biochar diminue la concentration extraite au DTPA du Mn, Na, S et Mg mais ne semble pas avoir d'effet sur Ni, Zn et Fe. Les concentrations mesurées dans les sols rhizosphériques présentent une diminution du Na, Mg, K, S, P et Mn alors que la concentration en Fe est plus élevée dans le sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique.

3.3. Discussion

Avec un substrat approprié, nous avons démontré que les plantes hyperaccumulatrices pouvaient germer et se développer, au moins partiellement, en présence de boue industrielle chargée en métaux. À l'aide d'essais de croissance en vases de végétation, nous démontrons ici qu'il est possible de conduire certains individus jusqu'à 90 jours et d'obtenir une récolte de biomasse contenant du Ni. La concentration en Ni dans les plantes récoltées est supérieure au seuil d'hyperaccumulation sur toutes les modalités contenant de la boue. Il est possible que parmi les individus qui ont poursuivi leur cycle de culture, existent des génotypes particulièrement résistants que la variabilité des lots de semences obtenues dans le milieu naturel permet de mettre en évidence. Il est remarquable de noter qu'en absence de boue (témoin), les plantes ont manifesté très rapidement des symptômes de carence et ont produit peu de biomasse en comparaison des traitements avec boues. Sur la modalité avec 30% de boue, les plantes ont rapidement présenté des symptômes de toxicité (chloroses).

Dans cette expérience, nous avons choisi de renouveler les plantes mortes en procédant à de nouveaux semis, ce qui a permis, d'une part, de tester la production de biomasse et métallomasse sur plusieurs mois et, d'autre part, de mettre en évidence une atténuation de la toxicité par l'observation d'une survie supérieure des plantes semées dans un second temps. Cela démontre qu'une période de stabilisation des mélanges serait nécessaire afin de faciliter la survie des plantes. Cette action qui pourrait contribuer à diminuer la toxicité peut aussi avoir des effets favorables sur les propriétés physiques du substrat, facilitant le développement des racines, qui constituent l'organe en contact direct avec le substrat. Toutefois, elle ne doit pas affecter significativement le prélèvement des métaux d'intérêt. Il est donc nécessaire de savoir quels sont

les métaux affectés par ces processus d'immobilisation et l'amplitude des processus. La différence de concentration observée entre le sol rhizosphérique et le sol non rhizosphérique au sein du même vase de végétation montre que la plante n'a pas colonisé l'ensemble du volume, en relation probablement avec sa toxicité. Ainsi, le sol rhizosphérique représente bien le volume de sol colonisé par les racines, au sein duquel l'eau et les éléments sont prélevés (nutriments et Ni). Si la toxicité se manifeste tout au long de la croissance, il est possible aussi que la maturation du substrat conduise à la réduction de la disponibilité de certains métaux phytotoxiques (*e.g.* Zn), par des processus de sorption sur la matrice du matériau de remplissage et sur le biochar. Le système racinaire, quand il est suffisamment développé, peut aussi jouer un rôle d'immobilisation des métaux sur les parois cellulaires ou par changement d'état chimique (*e.g.* précipitation par élévation localement du pH). Enfin, au plan pratique, la biomasse la plus élevée a été obtenue sur le substrat contenant 7% de boue et en présence de 5% biochar, ce qui constitue des conditions réalistes dans le cadre d'une application en vraie grandeur du procédé ainsi testé. *L. emarginata* a produit une biomasse supérieure à *A. murale* quelles que soient les modalités. La plante se maintient aussi avec 18% de boue, alors que *A. murale* ne s'est pas développée. Cependant, sur 7% *A. murale* a extrait plus de Ni que *L. emarginata* sur 18%. Ces observations font de ces deux espèces des candidats pertinents pour optimiser l'agromine dans le but de traiter des volumes plus importants de boue.

3.4. Conclusion

Dans cette série de tests de germination et de croissance, nous avons démontré qu'il est possible d'installer durablement des plantes hyperaccumulatrices sur des substrats composés en partie de boues industrielles toxiques par leur concentration en métaux et leur pH acide. C'est avec la combinaison de matériaux de remplissage, comme de la terre traitée en biopile, et d'amendements, tels que le biochar, que cette installation est envisageable. Nous avons aussi démontré pour la première fois que le biochar n'altère pas l'accumulation du Ni par les hyperaccumulateurs testés. Au contraire, nous avons enregistré une augmentation de l'accumulation du Ni dans la plante en présence de biochar dans le substrat (5%) et, par conséquent, que l'agromine est envisageable à partir de mélanges adaptés fondés au minimum sur des boues industrielles métalliques et de biochar. Avec 30% de boues et 5% de biochar les conditions de développement sont limitées, et les performances faibles car la mortalité des plantes est importante. De plus, la toxicité évolue en lien avec l'évolution de la disponibilité des métaux du substrat au cours du temps. Dans cette optique, une préparation des substrats qui imposerait une période de maturation, analogue au vieillissement observé dans les sols, pourrait être testée, rejoignant les conclusions du programme SITERRE. La réponse des plantes à long terme, sur un cycle complet de culture ou sur plusieurs cycles dans le cas d'espèces pérennes, reste très incertaine. Ainsi, il est nécessaire d'optimiser la composition des substrats afin d'assurer une toxicité faible pour les hyperaccumulateurs et une disponibilité suffisante des métaux destinés à l'hydrométallurgie. Enfin, dans le cas de boues polymétalliques, il est important d'établir si les hyperaccumulateurs sont capables d'assurer le rôle de filtre qui leur est attribué et démontré dans le milieu naturel, ce qui permet d'éviter l'accumulation dans la plante de métaux d'intérêt industriel secondaire (*e.g.* Fe, Zn) et qui perturbent les procédés d'extraction et de séparation hydrométallurgiques.

Chapitre 2 :

Croissance des plantes et accumulation du Ni en présence de biochar

Les plantes hyperaccumulatrices de Ni répondent aux substrats métalliques par la manifestation de symptômes de toxicité mais aussi par une remarquable adaptation de certains individus qui survivent sur de longues périodes. À leur récolte, ils contiennent des teneurs en Ni comparables à celles observées *in situ* dans des hyperaccumulateurs développés sur les sols ultramafiques. Toutefois, la disparition de nombreux individus réduit notablement les performances de l'agromine. Le chapitre précédent a rapporté aussi que la toxicité peut être contrôlée par l'ajout de biochar, à l'instar de ce qui a été démontré par Rees *et al.* (2015, 2016) qui ont montré que la plante *N. caerulescens* répond favorablement à un apport de biochar par une accumulation accrue de Cd dans ses parties aériennes. L'expérience en vases de végétation présentée dans le chapitre précédent a permis d'observer un effet similaire du biochar pour l'accumulation du Ni. Toutefois, les rendements d'extraction obtenus dans cette expérience restent limités en raison, d'une part, de la mortalité des plantules et, d'autre part, de l'incapacité d'agir et d'optimiser le procédé de phytoextraction en absence de connaissance sur les processus à l'origine de ces effets.

Aussi, il est nécessaire i) de vérifier que la présence de biochar dans le substrat favorise la production de biomasse par ces deux espèces, en comparaison à un substrat non amendé en biochar ; ii) de déterminer si le transfert du Ni en présence de biochar est augmenté vers un hyperaccumulateur et diminué vers une plante tolérante mais non hyperaccumulatrice ; iii) d'établir, dans un but d'optimisation du procédé, la dose de biochar à utiliser en vraie grandeur pour une extraction maximum et un coût minimum.

Dans ce but, une expérience en vases de végétation a été conduite pour tester l'influence du biochar sur la croissance et le transfert du Ni avec une espèce hyperaccumulatrice, *A. murale*, et une espèce tolérante, le ray-grass (*Lolium multiflorum*). Les plantes sont mises en culture, d'une part, sur un substrat élaboré à partir de boue industrielle métallique amendée en biochar et, d'autre part, sur une terre issue d'un sol ultramafique également amendée en biochar. En complément, des témoins sans plante sont préparés afin de tester l'effet du couvert végétal sur les propriétés des substrats et la mobilité des métaux.

1. Matériels et méthodes

1.1. Substrats

La boue de phosphatation utilisée est celle du Lot 1 présentée dans la Partie 2 (Matériels et Méthodes). C'est un matériau amorphe, à pH acide (3,9) qui contient 0,57% Ni, 6,7% Zn, 21% P et 25% Fe, ainsi que 14 g kg⁻¹ N. Les concentrations en Ni et Zn disponibles, après extraction au DTPA,

sont de 815 et 775 mg kg⁻¹ respectivement. La terre de biopile est celle dénommée Lot 2 (cf Partie 2), issue d'un traitement biologique d'une terre polluée (Jeandelaincourt, SITA déchet). La terre du sol ultramafique est la même que dans le chapitre précédent. Elle provient d'un site ultramafique du col des Bagenelles dans les Vosges. Il s'agit d'un sol brun argilo-limoneux, riche en Ni, Fe et Cr et un rapport Ca/Mg inférieur à 1. Le pH est acide (6,58) et la CEC est à 39,7 cmol⁺ kg⁻¹ (cf Partie 2 : terre ultramafique Lot 2). Le biochar 1 est issu de la pyrolyse de bois et présenté en Partie 2.

Deux substrats ont été préparés à partir des matériaux secs. Le premier, appelé M (mélange), est élaboré avec 10% de boue de phosphatation et de 90% de terre de biopile (m/m). Le second est la terre de sol ultramafique (U). Les caractéristiques des deux substrats sont proches (e.g. pH, Ni extractible) (Tableau 26). Le biochar est incorporé à chacun de ces deux substrats à raison de 0, 1, 3 ou 5 % par rapport à la matière sèche.

Tableau 26 _ Caractérisation des substrats. Analyses effectuées par le LAS d'Arras et le LSE

Paramètre	Terre ultramafique (U)	Substrat élaboré (mélange de biopile et boue=M)	Unité
pH ¹	6,58	6,46	-
Conductivité ²	0,0677	0,873	mS cm ⁻¹
N total ³	2,14	1,79	g kg ⁻¹
C organique ³	28,7	25	g kg ⁻¹
P olsen ⁴	0,007	0,515	g kg ⁻¹
CEC ⁵	39,7	8	cmol ⁺ kg ⁻¹
Ni _{ER} ⁶	1795	586	mg kg ⁻¹
Zn _{ER} ⁶	92	6400	mg kg ⁻¹
Ni _{DTPA} ⁷	61	66	mg kg ⁻¹
Zn _{DTPA} ⁷	1,2	81	mg kg ⁻¹

¹ pH eau, NF ISO 10390 ² Conductivité totale sur extrait filtré 1/5 (m/v) à 25 °C ³ C organique et N total, NF ISO 10694 et NF ISO 13878
⁴ P disponible, méthode Olsen NF ISO 11263 ⁵ Capacité d'échange cationique à la cobaltihexamine, NF 23470 ⁶ Concentration pseudo-totale, dosage des éléments après extraction à l'eau régale (ER), NF EN ISO 11885 et NF EN 13346 ⁷ Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique, NF X 31-121/NF ISO 22036

1.2. Plantes

Les espèces choisies sont *A. murale* et *L. multiflorum* (cf Partie 2). La première a été choisie pour son potentiel à hyperaccumuler le Ni. La seconde permet de tester l'hypothèse selon laquelle un amendement en biochar diminuerait le transfert des métaux vers les plantes tolérantes et non hyperaccumulatrices. Le ray-grass est largement utilisé en prairie et donc pour la revégétalisation de sols et la phytostabilisation.

La population d'*A. murale* est choisie suite à un test de germination de huit populations de cette espèce sur la matrice avec 10% de boue et 90% de biopile (Annexe 28). Le lot avec le meilleur taux de germination est sélectionné, il s'agit de la population du Site II (cf Partie 2, Tableau 6).

1.3. Essais culturaux

Les deux espèces végétales sont cultivées en vases de végétation contenant le substrat construit avec la boue industrielle (M) ou la terre ultramafique (U), amendés en biochar. Les vases de végétation contiennent 220 g de terre U (MS) et 260 g de substrat M (MS). Chaque vase contient 395 mg de Ni_{ER} (13,5 mg de Ni_{DTPA}) pour U et 152 mg de Ni_{ER} (17 mg de Ni_{DTPA}) pour M. Une bougie

poreuse (rhizon, modèle 192122, Rhizosphere Research Products) est implantée par vase de végétation (cf Partie 2). L'humidité de la terre est ajustée à 80 % de la capacité de rétention en eau par un arrosage à l'eau ultra pure toutes les 48 h (Annexe 29). Pendant les deux semaines précédant le semis, les vases sont arrosés pour stabiliser les mélanges. La première semaine, ils sont soumis à une forte évaporation due aux conditions expérimentales (cf ci-dessous), puis, la suivante, ils sont couverts avec du papier aluminium. Dix graines d'*A. murale* sont semées par vase et, ultérieurement, sont conservés les trois individus les plus vigoureux. Pour le ray-grass, 0,5 g de graines sont semés dans 100 cm² soit 100-110 graines par vase. Au fur et à mesure de la germination, le papier aluminium est retiré. L'expérience comprend 24 modalités avec cinq répétitions chacune. Les 120 vases sont disposés en bloc en chambre de culture selon les conditions expérimentales suivantes : photopériode de 16h de jour / 8h de nuit, températures de 25°C Jour / 18°C Nuit. L'expérience est conduite pendant 120 jours. Les plantes ont une durée de culture de 12 semaines. Le détail des dates de semis, prélèvements de solutions de sol et des récoltes est présenté en Annexe 30. Les âges des plantes lors des prélèvements effectués par bougies poreuses sont répertoriés dans le Tableau 27.

Tableau 27 _ Âge des plantes au moment des prélèvements de solution de sol

Prélèvement	1	2	3
Temps d'incubation (sol nu)	4 semaines	9 semaines	14 semaines
<i>A. murale</i> sur U	1 semaine	6 semaines	11 semaines
<i>A. murale</i> sur M	0 semaine	5 semaines	10 semaines
Ray-grass sur U	0 semaine	4 semaines	9 semaines
Ray-grass sur M	0 semaine	4 semaines	9 semaines

La solution du sol est prélevée après quatre semaines d'incubation par les bougies puis toutes les cinq semaines, dans trois vases de végétation sur cinq au sein de chaque modalité. La mesure du pH et de la conductivité est effectuée sur 4 mL. Le dosage des anions et cations ainsi que le dosage des majeurs et mineurs est effectué pour chacun des trois prélèvements.

Après six semaines de culture, le ray-grass est coupé à 2 cm de hauteur. Lors de la seconde coupe, six semaines plus tard, l'intégralité des parties aériennes est récoltée, en distinguant les parties aériennes de hauteur supérieure à 2 cm des autres. Les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) sont séparées en tamisant le sol à 2 mm et récupérant les racines à la pince fine. Elles sont lavées à l'eau ultra pure, pesées, séchées à 40 °C pendant 72 h puis analysées afin d'évaluer leur composition élémentaire à l'ICP-OES. Une aliquote a été utilisée pour mesurer la composition totale en C et N. Après culture, la terre est tamisée à 2 mm, la fraction passante et le refus sont mis en pilulier et conservés à +4°C. Une aliquote de la fraction inférieure à 2 mm séchée à 40°C pendant 72 h sert à la mesure du pH_{eau} et à l'extraction au DTPA pour le dosage Al, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb et Zn. Seize vases ne sont pas récoltés mais conservés pour réaliser des lames minces (Annexe 44).

2. Résultats

2.1. Biomasse produite

a) Biomasse aérienne et racinaire

La croissance et la production de biomasse aérienne est plus élevée sur M que sur U (Figure 72). Les deux plantes se comportent de la même façon, avec toutefois un léger retard à la germination d'*A. murale* lié essentiellement aux caractéristiques de l'espèce. En absence de biochar, les graines germent peu et la croissance est lente voire nulle. Par contre, en présence de biochar, les plantes germent précocement et le développement est plus rapide : les deux paires de feuilles succédant aux feuilles cotylédonaires sont plus avancées avec la dose de biochar la plus élevée (Figure 73 et Figure 74). À la récolte, la biomasse des parties aériennes (PA) est fonction de la dose de biochar (de 0 à 5%) pour les deux substrats et les deux espèces. À dose de biochar identique, les plantes sont plus grandes sur M que sur U. Le ray-grass montre des feuilles plus larges, plus vertes et plus longues sur M que sur U (Figure 72). Les meilleures conditions de croissance du ray-grass sur M sont confirmées après la première coupe (Annexe 31).

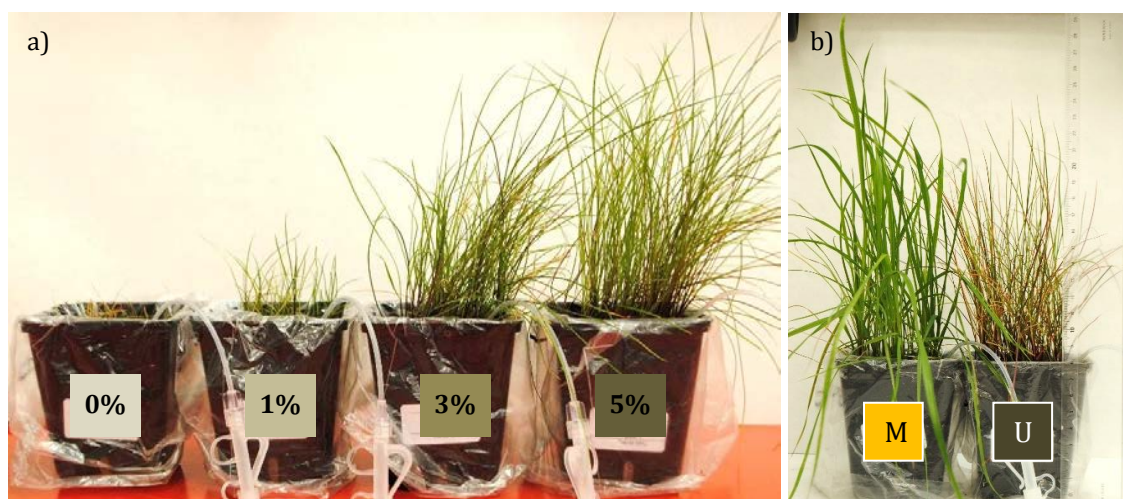


Figure 72 _ Photographie du ray-grass après a) 4 semaines de croissance sur U amendé en biochar (%) et b) 6 semaines sur M et U avec 3% de biochar

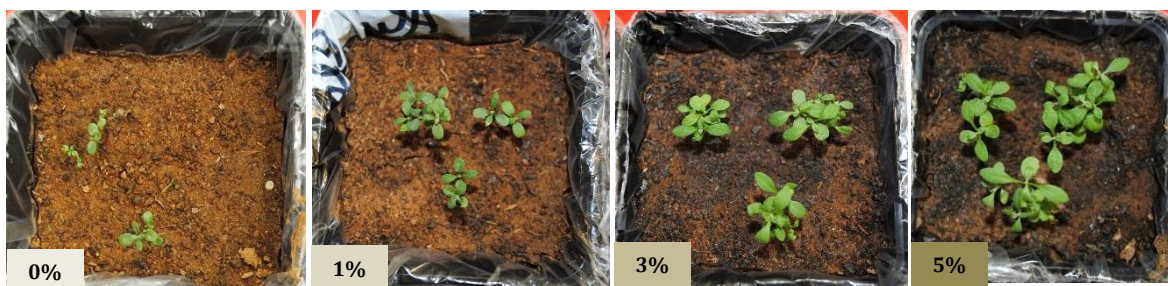


Figure 73 _ Photographie d'*A. murale* âgée de 2,5 semaines sur U amendé en biochar

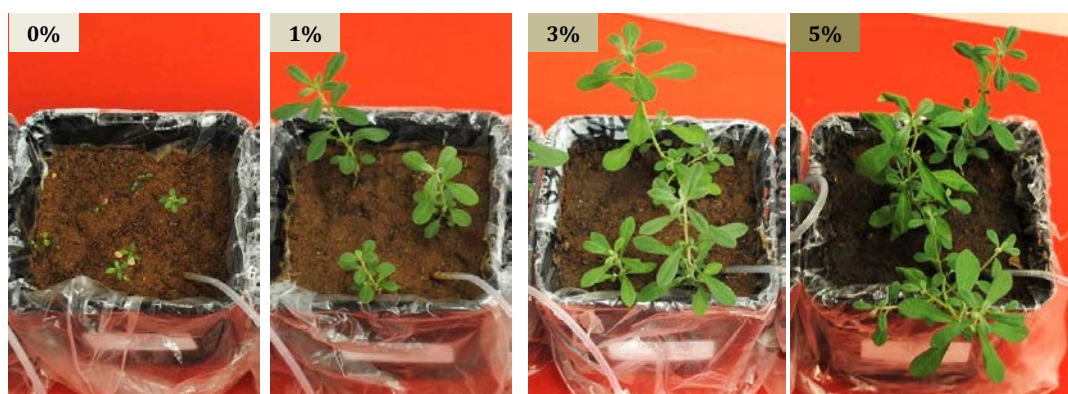


Figure 74 _ Photographie d'*A. murale* âgée de 7 semaines sur U amendé en biochar

➤ Biomasse de l'hyperaccumulateur

A. murale produit significativement plus de biomasse aérienne sur M que sur U en l'absence de biochar et avec 5% (Figure 75). Ainsi, la modalité avec 5% de biochar sur M a produit la plus forte biomasse. La biomasse produite augmente avec la quantité de biochar dans le substrat : sur U, la biomasse produite sur les modalités avec 3 et 5% de biochar est significativement supérieure aux modalités avec 0 et 1%. Sur M, la modalité avec 5% produit plus de biomasse que les modalités 0 et 1% (Figure 75). La biomasse racinaire augmente avec la dose de biochar amendée sur les 2 substrats mais cette augmentation n'est significative que pour U pour lequel les modalités avec 3 et 5% de biochar ont une biomasse racinaire supérieure aux modalités avec 0 et 1%. Elle est supérieure sur U par rapport à M (significatif seulement avec 1% de biochar).

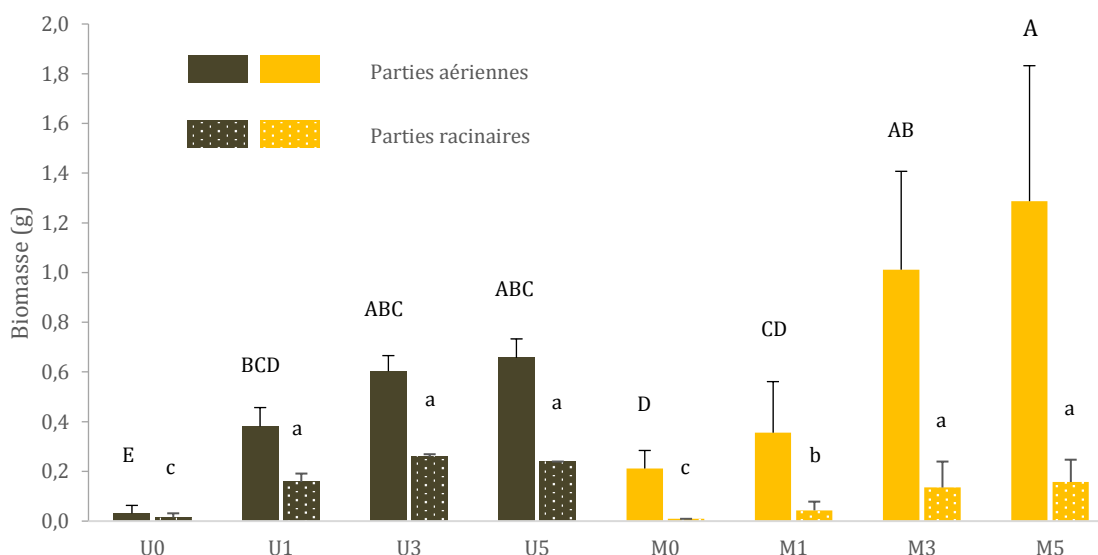


Figure 75 _ Biomasses aériennes et racinaires d'*A. murale* après 12 semaines de culture sur U et M selon une dose croissance de biochar (0, 1, 3 et 5%). Les barres verticales représentent les écarts-types. Les valeurs pour les PA affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), les valeurs pour les PR affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), après transformation des données en log.

➤ Biomasse du ray-grass

La biomasse aérienne du ray-grass (PA coupe 1 + PA coupe 2) est significativement plus élevée sur le substrat M que sur le substrat U et augmente avec la dose de biochar (Anova à deux facteurs,

$p < 0,001$). La biomasse racinaire augmente avec la dose de biochar seulement sur le sol U (Figure 76). Lors de la première coupe, la biomasse est significativement supérieure sur M que sur U avec 0 ou 1% de biochar (Annexe 32). Avec 3 et 5% de biochar, les deux substrats amènent à une production similaire. Lors de la seconde coupe, les biomasses produites sont supérieures à celles de la première coupe sur M, mais inférieures sur U.

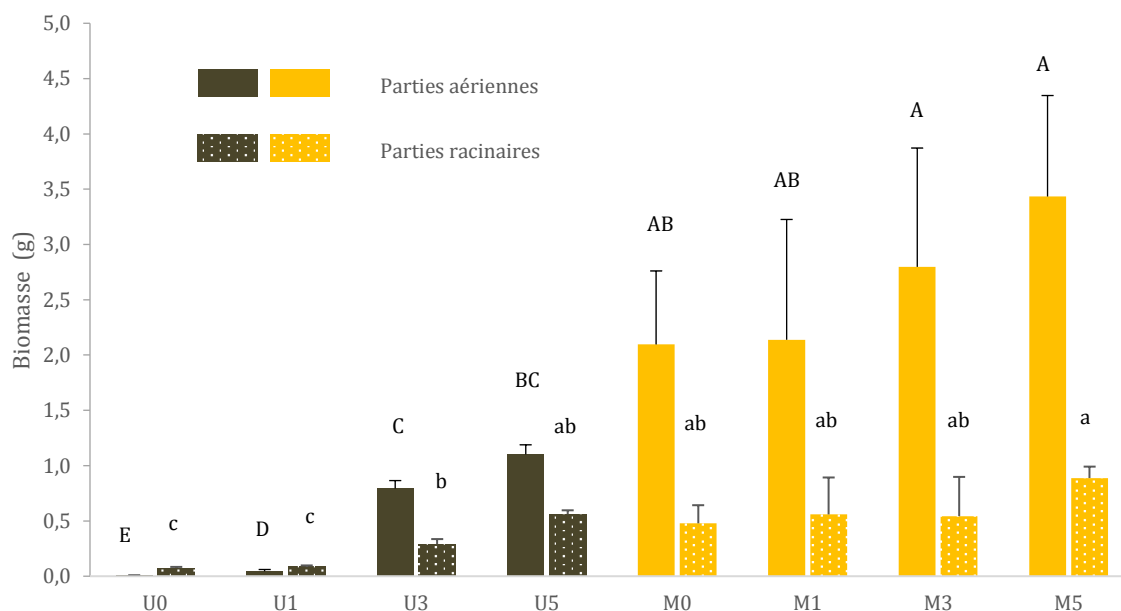


Figure 76 _ Biomasses aériennes (coupe 1 + coupe 2) et racinaires du ray-grass. Les barres verticales représentent les écarts-types. Les valeurs pour les PA affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), les valeurs pour les PR affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (test t, $p < 0,05$), après transformation des données en log.

b) Croissance et surface racinaires

La surface racinaire d'*A. murale* sur U augmente avec la dose de biochar (Annexe 33). Pour une même dose de biochar (5%), la surface racinaire sur M est inférieure à celle sur U : elle est de l'ordre de la surface racinaire produite sur le sol U avec 1%. La longueur totale de racine d'*A. murale* augmente avec la dose de biochar sur U (Annexe 34a) et confirme les résultats obtenus en termes de biomasse racinaire. Cependant, la biomasse racinaire est plus importante sur U3% que sur U1% et U5%. Le diamètre moyen des racines est plus faible sur U que sur M (Annexe 34b). Sur U5%, le diamètre des racines est plus faible que sur U1% et U3%. Donc l'augmentation de la dose de biochar induit une augmentation du taux de racines fines.

2.2. Transfert du Ni dans la biomasse

La concentration en Ni dans les PA d'*A. murale* dépend de l'interaction dose de biochar*substrat (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$). Elle est plus élevée sur U que sur M ; et sur U elle diminue avec l'augmentation de la dose de biochar, ce qui n'est pas observé avec M (Test t et Newman Keuls, $p < 0,05$) (Figure 77). La concentration du Ni dans les PR dépend de l'interaction dose de biochar*substrat (Anova à deux facteurs, $p < 0,01$). Similairement aux PA, la concentration du Ni dans les PR ne varie pas sur M selon la dose de biochar. Cependant, sur U, elle est supérieure avec 1% et diminue avec 3 et 5% de biochar. Quelle que soit la dose de biochar, la concentration de Ni dans les PA de l'hyperaccumulateur cultivé sur M varie de 1 180 à 1 280 mg kg⁻¹ alors qu'elle varie

de 17 000 à 24 000 mg kg⁻¹ selon les modalités de U. Sur U, les concentrations en Ni sont plus faibles dans les PR que dans les PA d'*A. murale*. Par contre, sur M, elles ne sont pas significativement différentes (Anova, p<0,05) (Figure 77).

Pour le ray-grass, la concentration du Ni dans les PA dépend de l'interaction de la dose de biochar*substrat*coupe (Anova à trois facteurs, p<0,001). La concentration du Ni est supérieure sur M quelle que soit la coupe considérée (Figure 78). Sur M, la concentration est plus élevée dans la première coupe ; sur U elle est supérieure dans la seconde coupe. La concentration diminue lorsque la dose de biochar augmente dans la première coupe. L'effet du biochar s'estompe dans la seconde coupe. La concentration du Ni dans les racines est élevée sur M (2 000 mg kg⁻¹) et est environ sept fois inférieure sur U. La concentration dans les PR diminue avec l'augmentation de la dose de biochar sur M (test t, p<0,05). Connaissant la biomasse produite et la concentration du Ni dans les PA, la masse de Ni extraite est calculée pour les deux espèces (Figure 79). La quantité extraite dépend de l'interaction espèce*substrat*dose de biochar (Anova à trois facteurs, p<0,001). Une fraction croissante de biochar induit une augmentation de la quantité de Ni extraite par *A. murale* par vase sur les deux sols. La quantité de Ni extraite sur M est de l'ordre de celle extraite sur U non amendé. Sur M, la quantité de Ni extraite par RG est équivalente à celle extraite par *A. murale* excepté avec 5% de biochar.

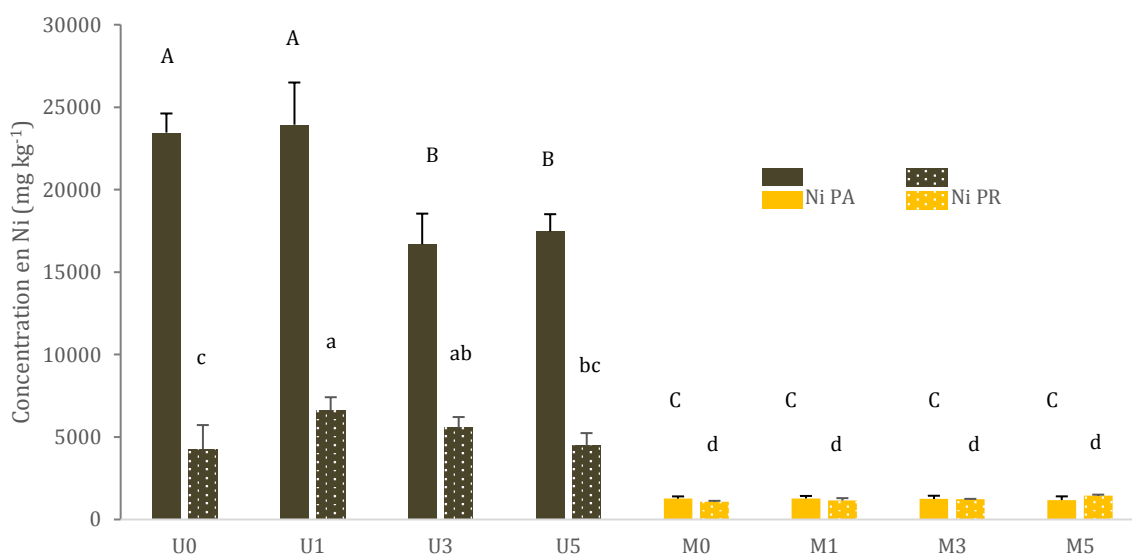


Figure 77 _ Concentration en Ni dans les parties aériennes et racinaires d'*A. murale* sur le substrat élaboré avec une dose croissante de biochar. U correspondant au sol ultramafique et M correspondant au substrat élaboré. Les chiffres 0, 1, 3 et 5 correspondent à la fraction massique de biochar apportée. Les valeurs pour les PA affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (test t, p<0,05) et les valeurs pour les PR affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (test t, p<0,05) après transformation des données en log.

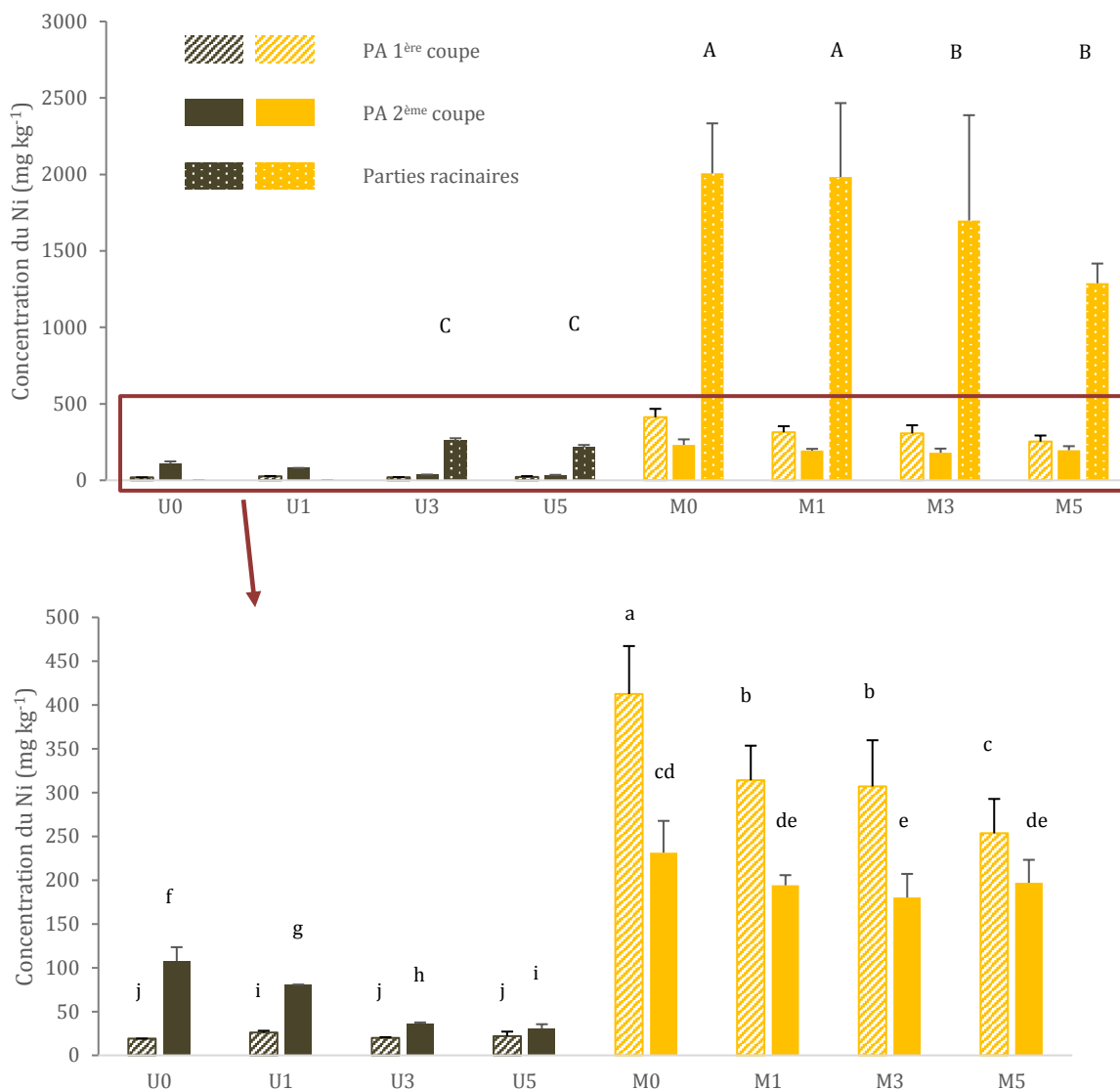


Figure 78 _ Concentration du Ni dans le ray-grass sur le sol U et le substrat M dans la première coupe et la seconde coupe et dans les parties racinaires. PA : parties aériennes. Les tests post hoc sont réalisés sur les données transformées en log. Les valeurs pour les PR affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (test t, $p < 0,05$). Les valeurs pour les PA affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (test t, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts-types. (Remarque : le dosage du Ni dans la coupe 2 pour les modalités avec 0 et 1% de biochar sur le substrat U correspond aux dosages dans les parties aériennes inférieures à 2 cm). Biomasses racinaires de U0 et U1 insuffisantes pour effectuer un dosage.

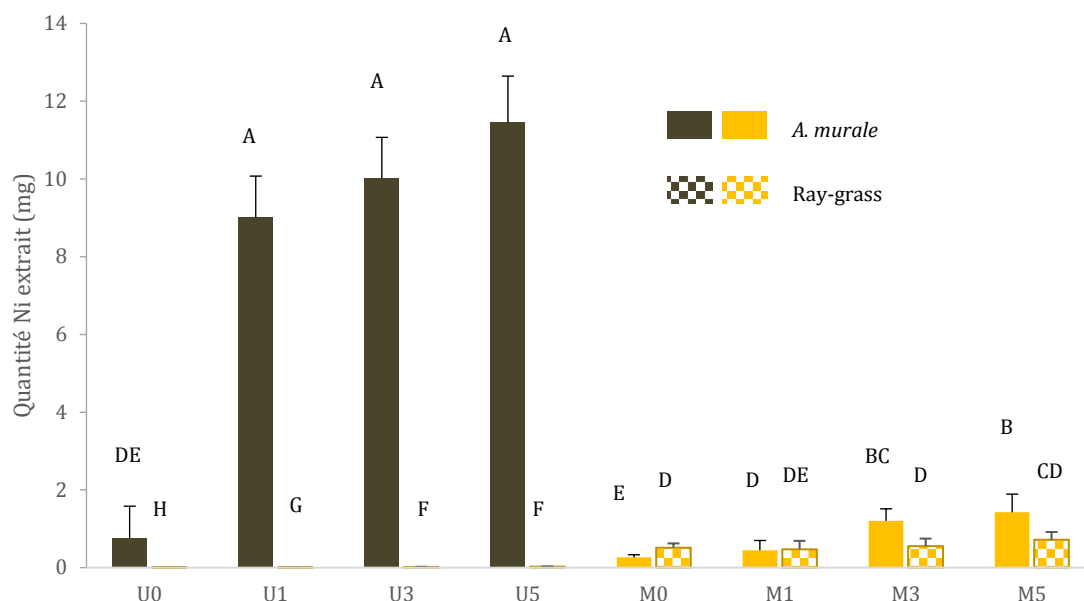


Figure 79_ Quantité de Ni extrait par *A. murale* et par le ray-grass par vase de végétation sur le sol U et le substrat M. Les chiffres 0, 1, 3 et 5 correspondent à la fraction massique de biochar apportée. Les barres verticales indiquent les écarts-types. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test t, $p < 0,05$) après transformation des données en log.

2.3. Métaux, éléments majeurs et C, N dans les plantes

a) Concentration du Zn dans les parties végétales

La concentration en Zn dans les PA d'*A. murale* sur M est élevée et proche de celle en Ni. Elle diminue avec l'augmentation de la dose de biochar pour les deux sols: de 350 à 100 mg kg⁻¹ sur U (diminution significative, Anova, $p < 0,05$) et de 800 à 650 mg kg⁻¹ sur M.

Le rapport Ni/Zn dans les PA est supérieur dans *A. murale* sur U. Sur cette modalité, il augmente avec l'augmentation de la dose de biochar (Figure 80). Il ne varie pas sur M quelle que soit la dose de biochar et l'espèce. Sur le substrat M, la concentration du Zn dans les PR d'*A. murale* est supérieure à celle du Ni. Elle tend à diminuer lorsque le taux de biochar augmente, alors que c'est l'inverse pour le Ni. Ainsi, le rapport Ni/Zn ne varie pas sur U malgré une légère diminution avec l'augmentation de la dose de biochar. Sur M, il augmente avec la dose de biochar (Figure 81).

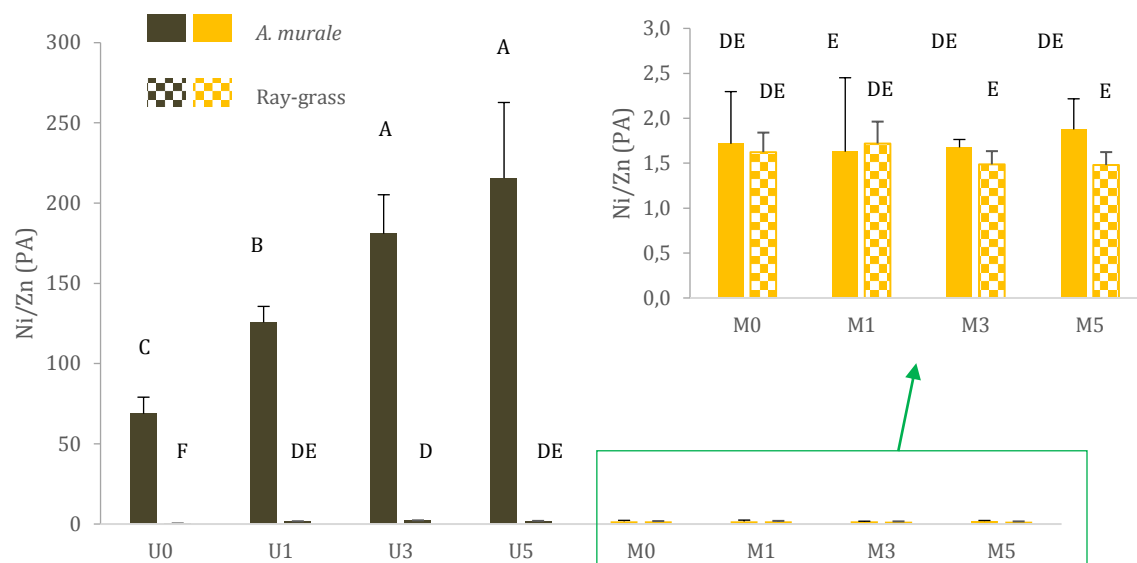


Figure 80 _ Rapport des concentrations Ni/Zn des parties aériennes d'*A. murale* et du ray-grass sur U et M. Les lettres valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test t, p<0,05).

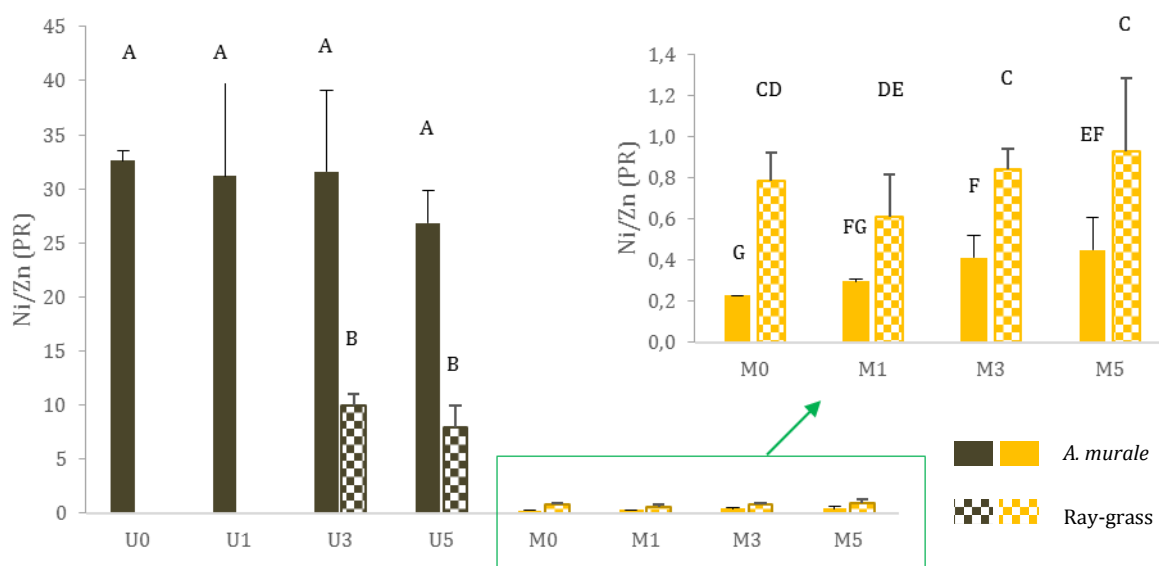


Figure 81 _ Rapport des concentrations Ni/Zn des parties racinaires d'*A. murale* et du ray-grass sur U et M. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test t, p<0,05).

b) Composition carbonée et azotée des parties végétales

La proportion de carbone dans les PA de ray-grass tend à augmenter avec la dose de biochar dans le sol M (Annexe 35). Cependant, le carbone mesuré dans la seconde coupe est supérieur à celui dosé dans la première. Le carbone alloué aux racines est supérieur à celui mesuré dans les feuilles pour toutes les modalités. En termes de composition en azote dans le ray-grass, la tendance est contraire (Annexe 36) : elle diminue dans les PA lorsque le biochar augmente. Et lors de la seconde coupe, les PA ont deux fois moins d'azote que lors de la première (Anova, p<0,05). Les PR contiennent moins d'azote que les PA. La dose de biochar n'influe pas sur la concentration en N des racines.

2.4. Suivi de la solution du sol pendant la culture

a) pH et conductivité de la solution du sol

➤ pH de la solution du sol

Le pH de la solution du sol mesuré après trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun est généralement plus élevé avec U qu'avec M (Tableau 27). La dose croissante de biochar entraîne une augmentation du pH, plus marquée sur U que sur M. De même, la présence d'un couvert végétal entraîne une augmentation du pH par rapport aux mêmes modalités non plantées.

- **pH initiaux des deux substrats :** après quatre semaines d'incubation des substrats, le pH de la solution du sol augmente avec l'augmentation de la quantité de biochar pour les deux substrats (Annexe 37). Le pH est le plus faible (5,47) correspond à M0, et le plus élevé (7,16) à U5. Il est différent significativement entre chacun des substrats (Anova, $p < 0,05$).

- **Evolution sur les substrats sans couvert :** au cours de l'expérimentation, le pH de la solution du sol U diminue en l'absence de couvert végétal quelle que soit la dose de biochar apportée (Figure 82A). La réponse temporelle sur M est plus contrastée ; en l'absence de couvert le pH des modalités à 0 et 1% de biochar augmente tandis que celui de la modalité avec 3% reste stable et que celui de la modalité avec 5% diminue (Figure 82B).

- **Effet du couvert végétal :** en présence de plantes, le pH augmente, en particulier avec un amendement de 3 et 5% de biochar sur U. Ainsi, après respectivement onze et neuf semaines de culture des deux plantes, l'écart de pH entre la modalité sans biochar et celle avec 5% est plus marqué qu'au début de l'expérimentation. Sur M, quelle que soit la dose de biochar, le pH augmente. L'augmentation est plus élevée en présence de RG que de *A. murale* (il augmente de 0,5 à 1 unité de pH, selon la dose de biochar, avec les substrats M semés en ray-grass après neuf semaines (Figure 82F)).

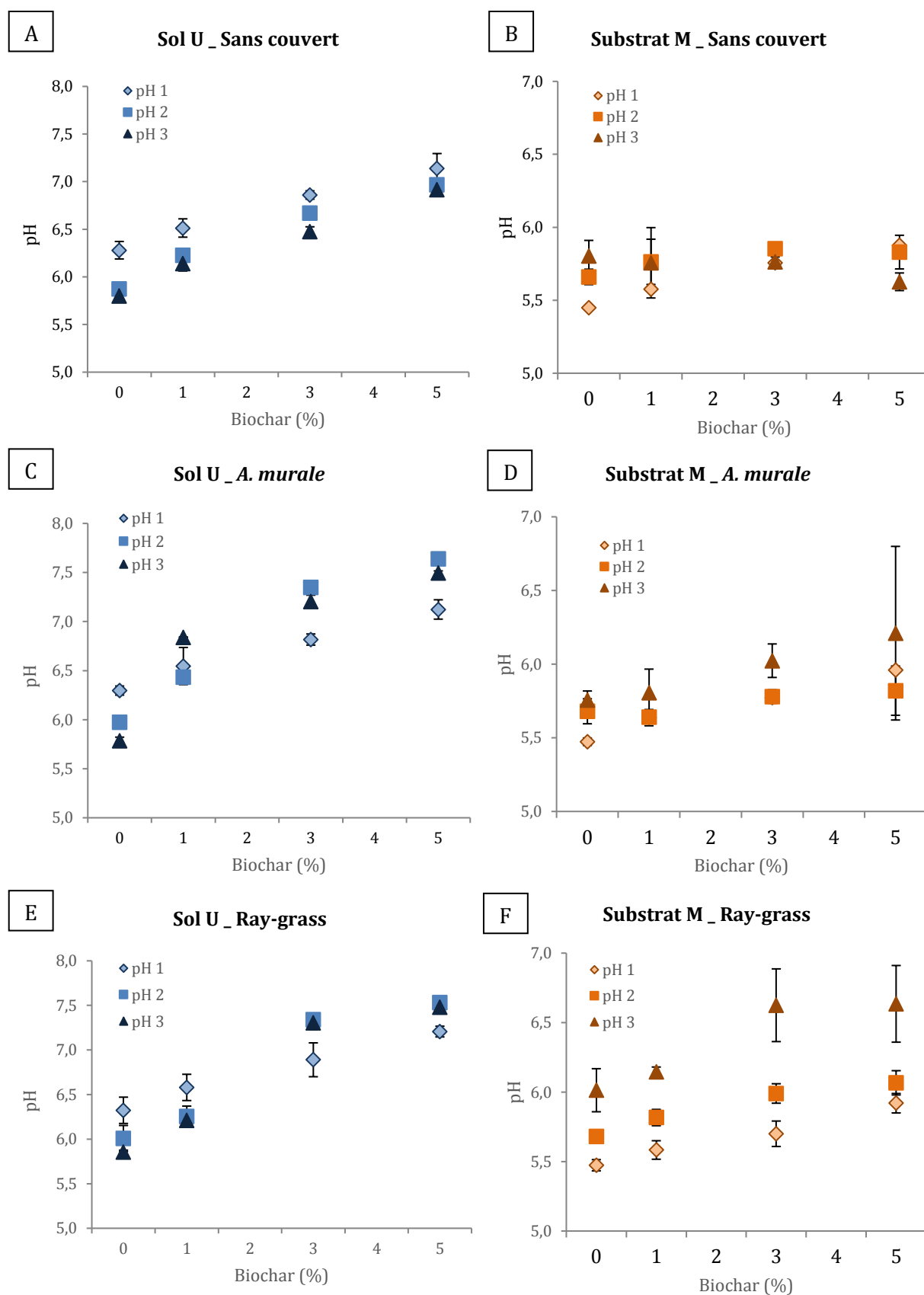


Figure 82 _ pH de la solution du sol ultramafique : U (A, C et E) et du substrat élaboré : M (B, D et F) en fonction d'une dose croissante de biochar (0, 1, 3 ou 5% en masse), sur le sol sans plante (A et B), semé avec *A. murale* (C et D), semé avec le ray-grass (E et F) lors de trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun (nos 1, 2 et 3). Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3).

➤ **Conductivité de la solution du sol**

La conductivité des solutions de sol prélevées sur M est plus élevée que sur U. Au début de l'expérimentation, l'augmentation de l'apport de biochar diminue la conductivité sur M, mais n'a pas d'effet sur U. Au cours des arrosages successifs, la conductivité augmente sur M avec l'augmentation du biochar alors que c'est le contraire sur U (Annexe 38). L'effet du couvert végétal varie selon le sol et la dose de biochar. Cependant, sur les modalités plantées et avec 3 et 5% de biochar sur les deux sols, la conductivité est stable ou diminue à l'issue de l'expérience.

- **Conductivités initiales des deux substrats :** la conductivité est supérieure sur M. L'apport de biochar diminue la conductivité dans la solution du substrat M (Annexe 38). Elle est significativement inférieure avec 3 et 5% de biochar (Anova, $p < 0,05$). Sur U, la variation de conductivité entre les différents amendements de biochar reste faible avec une conductivité moyenne de $0,68 \text{ mS cm}^{-1}$. Cependant, la conductivité est supérieure avec 5% de biochar par rapport à 1% de biochar (Anova, $p < 0,05$).

- **Évolution sur les substrats nus :** sur le sol U, la conductivité augmente avec le vieillissement du sol. Elle est multipliée par deux pour les modalités avec peu ou pas de biochar mais reste constante avec 5% de biochar. Sur le substrat M, la conductivité diminue en l'absence de biochar et augmente pour les modalités avec 3 et 5% de biochar. Ainsi, à l'issue du troisième prélèvement, alors que les substrats sont âgés de 14 semaines, la conductivité augmente avec l'augmentation de la quantité de biochar dans le substrat.

- **Évolution de la conductivité en présence d'un couvert :** sur le sol U, en présence d'*A. murale* ou de ray-grass, la conductivité augmente en absence de biochar ou avec 1%. En revanche, la conductivité diminue avec 3 et 5% de biochar en présence de l'HA. Sur le substrat M, la conductivité évolue très différemment selon la plante observée. Dans le cas d'*A. murale* la conductivité en présence de biochar augmente dans un premier temps (après cinq semaines de croissance) puis re-diminue pour être, après dix semaines de culture, proche de la valeur obtenue en début de culture. En l'absence de biochar la conductivité diminue puis remonte à sa valeur initiale. Pour le ray-grass, la conductivité diminue drastiquement pour toutes les modalités

b) Éléments métalliques dans les solutions du sol

À l'issue des quatre semaines d'incubation, les concentrations de certains éléments en solution sont très différentes d'un sol à l'autre. Par exemple, dans le cas du Ni sur les modalités sans couvert végétal (Figure 83A et B), les concentrations sont de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ pour le sol U et 72 mg L^{-1} pour le substrat M, alors que les concentrations extraites au DTPA sur les mélanges avant incubation sont similaires (Tableau 26). De grandes différences sont aussi observées pour le Zn (Figure 84) et pour d'autres majeurs tels que Ca (Figure 85), K, Mg ou encore P. Mises à part ces différences inhérentes à la composition du substrat, le biochar modifie la concentration des éléments en solution. Les concentrations élémentaires des différentes modalités sont décrites ci-dessous en balayant les concentrations du Ni, Zn, Ca, Mg, K et P. À chaque fois, les concentrations sont décrites en trois temps : comparaison des concentrations lors du premier prélèvement, puis l'évolution des substrats sans couvert végétal et enfin, l'effet des plantes. Pour rappel, les solutions du sol ont été prélevées à trois temps de l'expérimentation espacés de cinq semaines chacun. Le premier prélèvement a été effectué alors que les plantes n'étaient pas encore en place ou juste semées. Le détail de l'âge des substrats et des plantes lors des prélèvements est présenté Tableau 27.

➤ **Concentration du Ni (Figure 83)**

La concentration en Ni dans la solution du sol U est inférieure à 1 mg L⁻¹ alors qu'elle est de 65 mg L⁻¹ pour M. Au cours du temps, le biochar diminue la mobilité du Ni dans le sol U d'autant plus que la dose de biochar est élevée. C'est l'inverse sur M. Ces effets du biochar sont modifiés par la croissance végétale. L'écart de concentration en Ni entre les modalités plantées et non plantées est d'autant plus marqué que la dose de biochar est importante, avec des différences entre les deux plantes.

- **Concentration initiale du Ni des deux substrats** : à l'issue des quatre semaines d'incubation, elle est de 0,24 mg L⁻¹ pour U et 72 mg L⁻¹ pour M. Elle diminue lorsque la concentration en biochar augmente (20% plus faible entre 0 et 5% de biochar sur U (Figure 83A), 50% pour M (Figure 83B)).

- **Évolution sur les substrats nus** : sur U après dix semaines d'arrosage supplémentaire, l'écart de concentration entre les différentes modalités de biochar s'intensifie. En l'absence de biochar, le Ni dans la solution a augmenté sous l'effet des cycles humectation-dessiccation ; et au contraire, sa concentration a diminué d'autant plus que la dose de biochar est élevée. Sur M, après 10 semaines d'arrosage, elle a diminué avec 0 et 1 % de biochar, et augmenté avec 3 et 5%.

- **Évolution en présence de plantes** : sur U, avec 0 et 1% de biochar, la concentration en Ni évolue comme sur sol nu (Figure 83C et E). Avec 3 et 5%, elle augmente après cinq semaines et diminue après dix semaines ; elle reste supérieure à t₀ avec le ray-grass et est divisée par deux avec *A. murale*. Sur M (Figure 83D et F), sans biochar, elle diminue au cours du temps, comme sur le substrat nu. Avec 1%, elle n'évolue pas avec *A. murale* alors qu'elle diminue drastiquement sous le ray-grass. Enfin avec 3 et 5%, dans le cas d'*A. murale*, elle augmente puis rejoint celle du premier prélèvement. Sous le ray-grass, avec 3 et 5%, elle diminue et est inférieure à 10 mg L⁻¹ lors du dernier prélèvement.

➤ **Concentration du Zn (Figure 84)**

Le comportement au cours du temps du Zn sur le sol nu est similaire à celui décrit pour le Ni.

- **Concentrations initiales du Zn des deux substrats** : elle est de l'ordre de 0,5 mg L⁻¹ sur U et de 5 à 15 mg L⁻¹ sur M et diminue d'autant plus que le taux de biochar augmente.

- **Évolution sur les substrats nus** : sur U, la concentration en Zn augmente légèrement au cours du temps, principalement avec 0 et 1% de biochar. Sur M la tendance initiale s'inverse : elle augmente lorsque la dose de biochar augmente (Figure 84A et B).

- **Évolution en présence d'un couvert** : sur U, en présence de plante et sans biochar, la concentration en Zn reste similaire ou diminue légèrement quelle que soit la plante. En présence de biochar, elle augmente pour les deux espèces. Sur M, les mêmes tendances sont observées avec *A. murale*. Cependant, sous RG, elle diminue au cours du temps pour toutes les modalités sauf celle avec 5% de biochar où elle reste constante (Figure 84F).

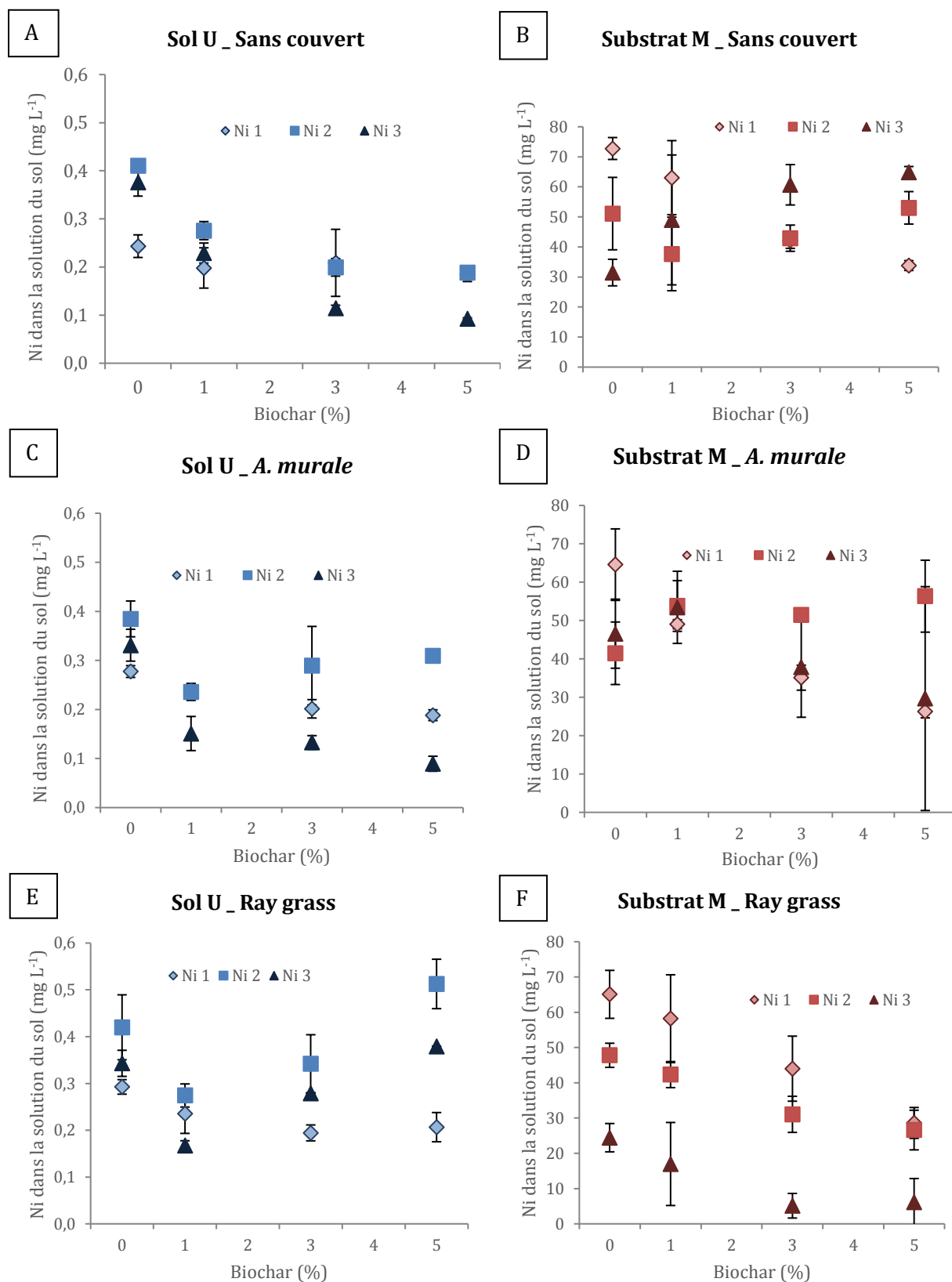


Figure 83 _ Concentration du Ni dans la solution du sol ultramafique (A, C et E) et du substrat élaboré (B, D et F) en fonction d'une dose croissante de biochar (0, 1, 3 ou 5% (m)), sur le sol sans plante (A et B), semé avec *A. murale* (C et D), semé avec le ray-grass (E et F) lors de trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun (n^{os} 1, 2 et 3). Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3).

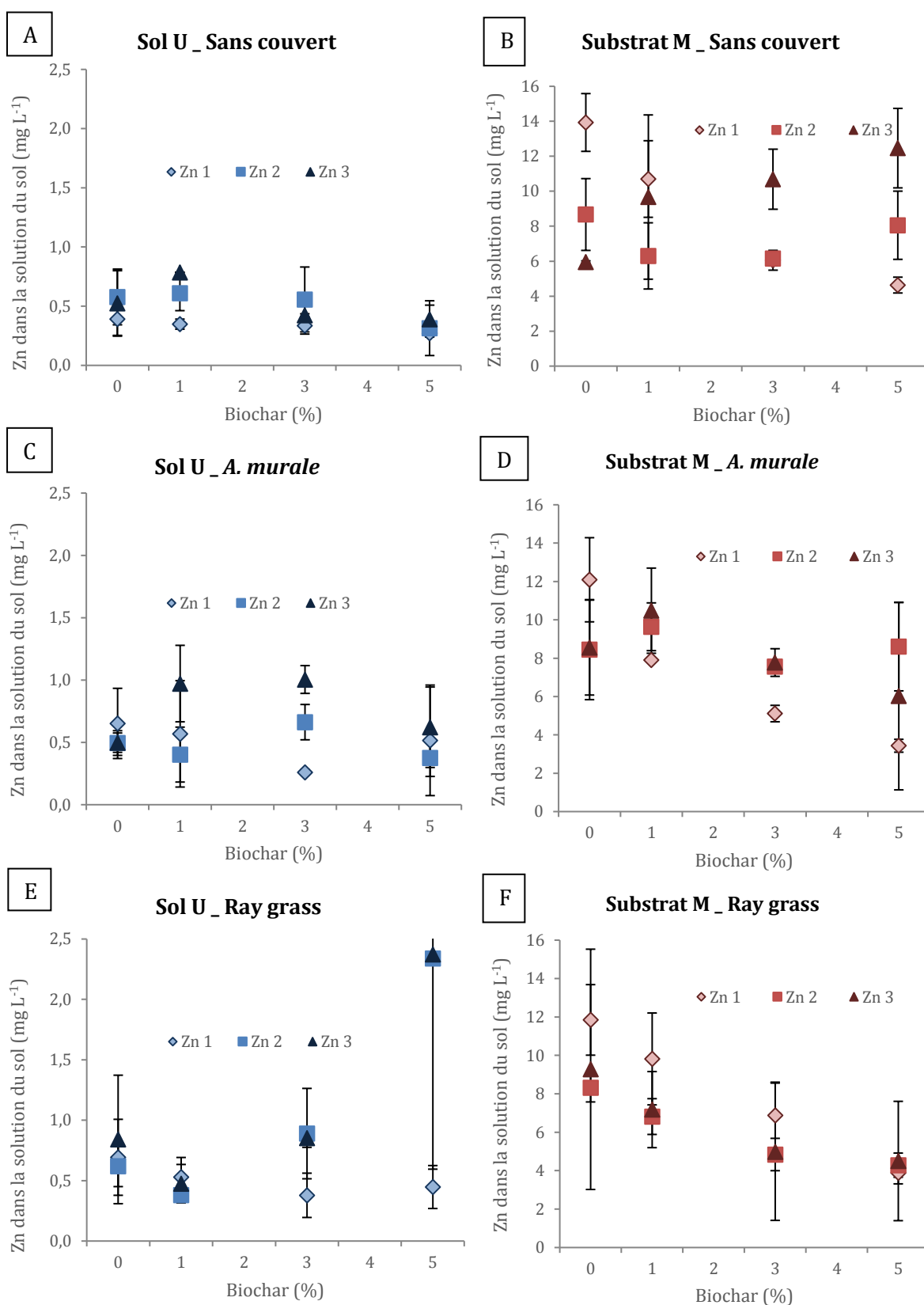


Figure 84_ Concentration du Zn dans la solution du sol ultramafique (A, C et E) et du substrat élaboré (B, D et F) en fonction d'une dose croissante de biochar (0, 1, 3 ou 5% (m)), sur le sol sans plante (A et B), semé avec *A. murale* (C et D), semé avec le ray-grass (E et F) lors de trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun (n^{os} 1, 2 et 3). Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3).

c) Les éléments majeurs dans la solution du sol

➤ **Concentration du Ca dans la solution du sol (Figure 85)**

La concentration en Ca est largement plus élevée avec M qu'avec U. En l'absence de plantes, elle augmente avec U lorsque la dose de biochar augmente. Avec M, c'est l'inverse : en début d'expérience elle diminue avec l'augmentation du biochar, puis lors du troisième prélèvement, elle augmente. En présence de plantes, elle diminue principalement avec des apports de 3 et 5% sur U. Sur M, elle augmente avec *A. murale* mais diminue avec le ray-grass, de manière similaire aux concentrations du Ni et Zn. De plus, les évolutions de la concentration du Ca sur M pour les trois couverts suivent les évolutions de la conductivité (Figure 85B, D et F).

- **Concentrations initiales du Ca des deux substrats :** elle est très élevée sur M ($1\ 700\ \text{mg L}^{-1}$) comparée à U ($<10\ \text{mg L}^{-1}$). Sur U, elle augmente avec la dose de biochar. Sur M, c'est la tendance inverse.

- **Évolution sur les substrats nus :** après 14 semaines d'incubation, la concentration en Ca sur U augmente pour toutes les modalités (Figure 85C). Sur M, elle diminue en l'absence de biochar et augmente en présence de biochar, d'autant plus que la dose biochar est élevée.

- **Évolution en présence de plantes :** sur les modalités plantées sur le sol U, elle augmente en l'absence de biochar et diminue avec 3 et 5% de biochar. Avec 1%, elle diminue avec *A. murale* et augmente avec le ray-grass. Sur M, l'évolution dépend de la plante : avec *A. murale*, elle augmente (sauf pour la modalité sans biochar) puis diminue entre le deuxième et le troisième prélèvement, restant supérieure à la concentration initiale (Figure 85D). Pour le ray-grass, elle diminue pour toutes les modalités et est très faible avec 3 et 5% de biochar après neuf semaines de culture (Figure 85F).

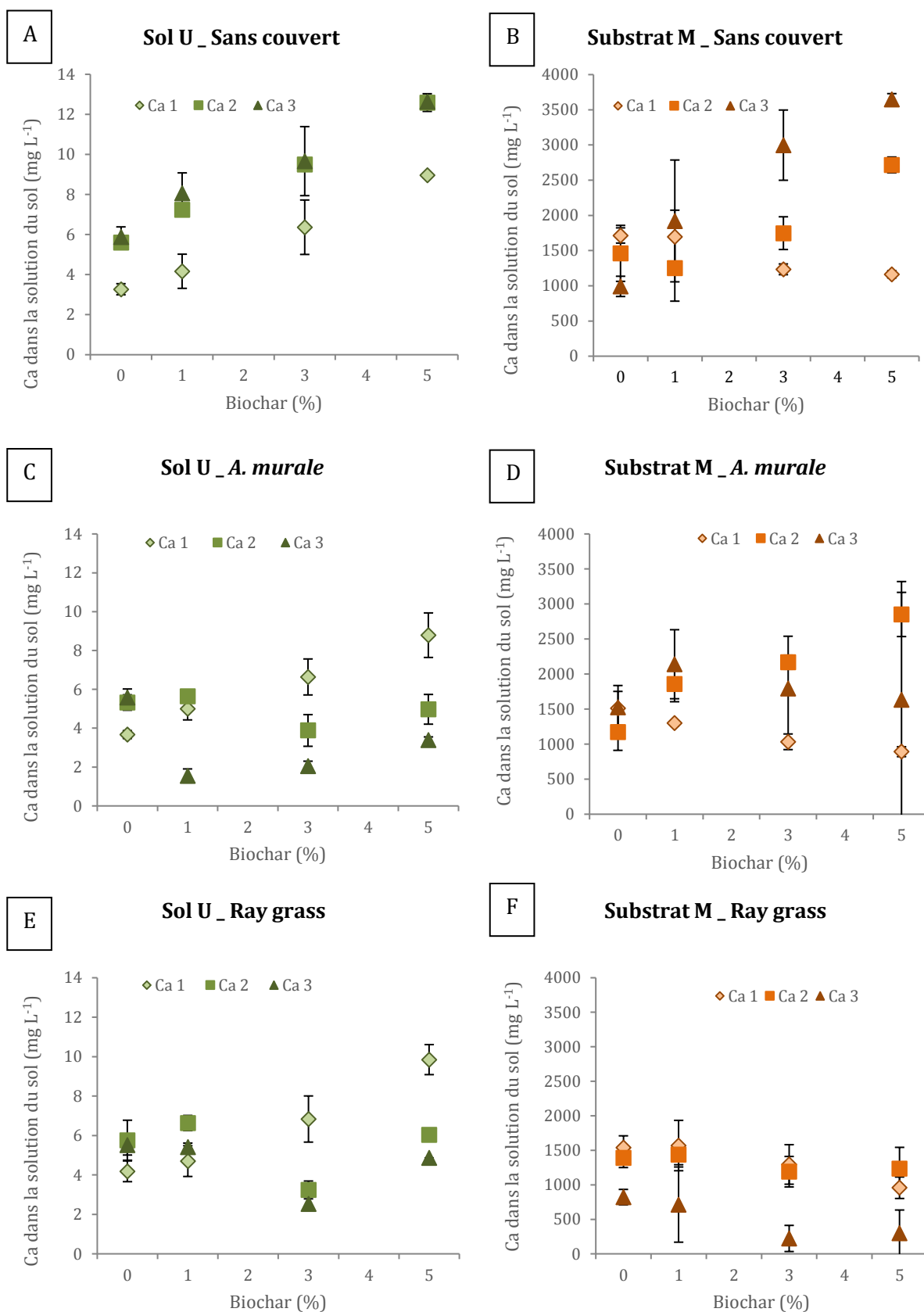


Figure 85_ Concentration du Ca dans la solution du sol ultramafique (A, C et E) et du substrat élaboré (B, D et F) en fonction d'une dose croissante de biochar (0, 1, 3 ou 5% (m)), sur le sol sans plante (A et B), semé avec *A. murale* (C et D), semé avec le ray-grass (E et F) lors de trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun (nos 1, 2 et 3). Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3).

➤ **Concentration du Mg dans la solution du sol**

Après les quatre semaines d'incubation, la concentration du Mg est deux fois plus élevée avec M qu'avec U et diminue légèrement avec l'augmentation de la dose de biochar. Cependant, à l'issue des 14 semaines, elle augmente avec l'augmentation du biochar sur M alors qu'elle diminue fortement sur U. Elle diminue en présence de plantes sur les deux sols sauf sur U avec pas ou peu de biochar. Sur M avec *A. murale*, les résultats sont plus mitigés. L'évolution globale des concentrations du Mg sur M rappelle l'évolution des concentrations du Ca (Figure 85 B, D et F).

- **Concentrations initiales des deux substrats :** elle est plus élevée sur M (220 mg L⁻¹) que sur U (70 mg L⁻¹). Pour les deux sols, elle est plus faible avec 5% de biochar que sans ; avec 1 et 3%, elle est plus variable.

- **Évolution sur les substrats nus :** après 14 semaines d'incubation sur U, elle a plus que doublé avec 0 et 1% de biochar et augmenté dans une moindre mesure avec 3 et 5%. Sur M, elle a diminué en l'absence de biochar, est restée sensiblement identique avec 1% et a très fortement augmenté avec 3 et 5%. À la fin, avec les deux substrats sans biochar, elle est de 150 mg L⁻¹.

- **Évolution en présence de plantes :** avec U, la concentration du Mg évolue comme celle du Ca : elle augmente en l'absence de biochar et sur la modalité avec 1% planté avec le ray-grass ; elle diminue beaucoup et tend vers 0 avec 3 et 5% de biochar (ainsi que *A. murale* avec 1%). Sur M, elle diminue beaucoup en présence de ray-grass. Avec *A. murale* l'évolution est différente pour chaque dose de biochar. En l'absence de biochar, elle reste constante ; avec 1%, elle augmente ; avec 3%, elle diminue et avec 5%, elle augmente puis revient à la concentration initiale.

➤ **Concentration du K dans la solution du sol**

Après les quatre semaines d'incubation, la concentration du K est similaire sur les deux substrats. Sur U, elle augmente de 10 à 40 mg L⁻¹ avec l'augmentation de la dose de biochar de 0 à 5%. Sur M, le biochar n'a pas d'effet sur la concentration du K dans la solution du sol qui varie entre 15 et 30 mg L⁻¹ selon la dose. En présence d'un couvert végétal et pour des doses de biochar de 3 et 5%, la concentration de K dans la solution a tendance à diminuer.

- **Concentrations initiales des deux substrats :** avec U, la concentration initiale en K va de 10 à 40 mg L⁻¹ en augmentant avec la dose de biochar. Sur M, elle varie de 15 à 30 mg L⁻¹ indépendamment de la dose de biochar.

- **Évolution sur les substrats nus :** sur U, elle diminue dans un premier temps, puis augmente pour être finalement identique ou supérieure à celle du premier prélèvement. Excepté pour la modalité sans biochar où elle diminue. Sur M, elle varie légèrement : faible diminution avec 1 et 5% de biochar, faible augmentation sans biochar et forte augmentation avec 3%.

- **Évolution en présence de plantes :** avec U, elle augmente avec 0 et 1% de biochar et diminue avec 3 et 5% pour les deux espèces. Sur M, avec le ray-grass, elle diminue (1 et 5%) ou reste stable (0 et 3%). Avec *A. murale*, elle reste proche de la première mesure avec 0 et 5% de biochar, augmente avec 1% et diminue avec 3%.

➤ Concentration du P dans la solution du sol

La concentration du P dans la solution du sol est 30 fois plus élevée avec M qu'avec U. La dose de biochar ne joue pas avec U, mais avec M, le P diminue lorsque la dose de biochar augmente. En présence d'un couvert végétal, la concentration diminue sur les deux sols quelle que soit la dose de biochar. Lors du dernier prélèvement, la concentration est nulle pour U et atteint la moitié de la concentration initiale pour M.

- **Concentrations initiales des deux substrats :** inférieure à 1 mg L⁻¹ pour U, elle est de l'ordre de 16 mg L⁻¹ pour M. L'apport de biochar n'a pas d'influence pour U, mais diminue la concentration du P pour M.
- **Évolution sur les substrats nus :** après 14 semaines, elle a diminué pour toutes les modalités.
- **Évolution en présence de plantes :** sur le sol U, la présence de ray-grass augmente P dans le sol puis épuise le stock. Pour *A. murale*, la concentration reste stable lors du deuxième prélèvement puis devient nulle à la fin. Sur le substrat M, la concentration P ne cesse de diminuer au cours des prélèvements. Finalement les concentrations en P sont divisées par deux par rapport au début de l'expérience et il ne semble pas y avoir de relation entre la dose de biochar et la concentration en P.

d) Composés azotés dans la solution du sol

Concentration des nitrates dans les solutions de sol : initialement de 8,5 g L⁻¹ avec M et de 0,35 g L⁻¹ avec U, elle diminue avec l'augmentation de la dose en biochar. Sur U, elle augmente au cours du temps sur les modalités sans plantes et plantées avec 0 et 1% de biochar. Pour les autres, elle tend vers 0 dès le deuxième prélèvement (Annexe 39).

Sur M, l'évolution est plus mitigée selon les modalités (Figure 86). Il y a une interaction couvert*dose de biochar*date de prélèvement (Anova à trois facteurs, p<0,05). Sur les sols nus, elle reste stable avec 0 et 1% de biochar alors qu'elle augmente en présence de 3 et 5%. Elle diminue fortement en présence de RG et augmente ou reste stable en présence d'*A. murale*.

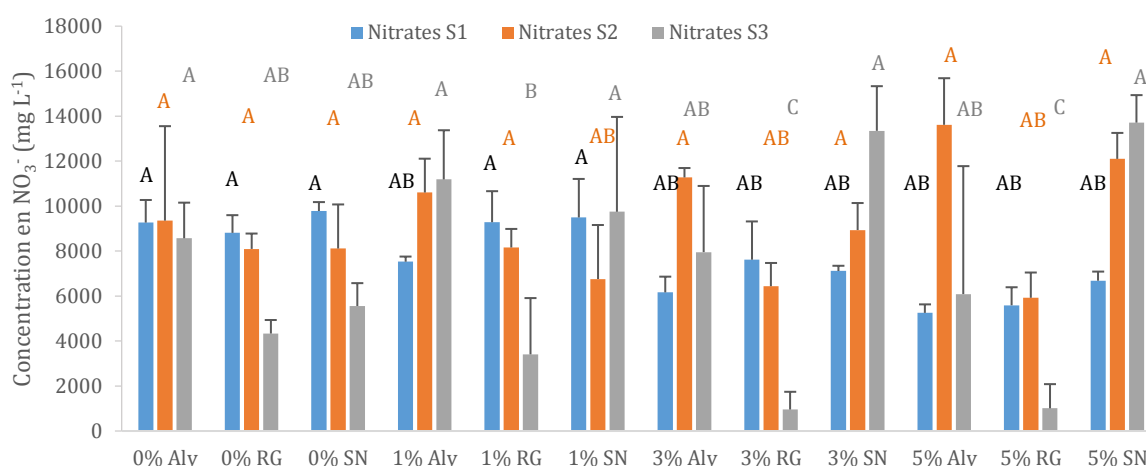


Figure 86 _ Concentration des nitrates dans la solution du substrat M selon quatre doses de biochar (0, 1, 3 et 5%) et trois couverts (Aly : *A. murale*, RG : ray-grass, SN : sol nu) lors de trois prélèvements espacés de cinq semaines chacun (S1, S2 et S3). Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3). Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls sur l'ensemble des données, p<0,05), en noir : série 1, en orange : série 2 et en gris : série 3.

Les concentrations en ammonium dans la solution du sol U sont très faibles (de 2 à 6 mg L⁻¹). En revanche, dans le substrat M, elles sont de l'ordre de 100 mg L⁻¹ à l'issue de la période d'incubation (Annexe 40) et ont tendance à diminuer avec l'augmentation de la dose de biochar (80 mg L⁻¹). Lors du deuxième prélèvement, les concentrations en NH₄⁺ ont augmenté. En fin de culture, les concentrations sont globalement plus élevées sur les modalités sol nus ou avec *A. murale* que sur les modalités RG.

e) Anions dans la solution du sol

Concentration en chlorure dans les solutions de sol : elle augmente avec la dose de biochar, de 40 à 90 mg L⁻¹ sur U et de 35 à 70 mg L⁻¹ sur M entre 0 et 5% de biochar. Au cours du temps, elle diminue sur U et diminue ou reste stable sur M. En présence d'un couvert végétal, elle tend vers 0 à l'issue de la culture, principalement avec le RG.

Concentration des sulfates dans les solutions de sol : avec U, elle augmente de 10 mg L⁻¹ sans biochar à 20 mg L⁻¹ avec 5%. Avec M, elle est de l'ordre de 600 mg L⁻¹, quelle que soit la dose de biochar. Au cours du temps sur U, elle diminue surtout sur les modalités plantées et avec de 3 et 5% de biochar, tandis qu'elle augmente sur les sols nus avec 3 et 5% de biochar. Sur M, elle diminue sur toutes les modalités et est divisée par deux sur les sols nus. Elle diminue fortement sur les modalités plantées avec 3 et 5% de biochar.

f) Carbone dissous dans la solution du sol

➤ **État des substrats à l'issue de la période d'incubation :** la concentration initiale en C_{org} est supérieure dans la solution du sol M. Elle est de 20 mg L⁻¹ et de 85 mg L⁻¹ dans la solution du sol U et M non amendés, respectivement. Les concentrations en C inorganique sont très faibles, 2,83 et 0,14 mg L⁻¹ sur U et M, respectivement. Lorsque la dose de biochar augmente, la concentration en C_{org} augmente sur U. Elle est significativement plus élevée à 5% qu'à 0% (Anova à deux facteurs, p<0,05) (Annexe 41). En revanche, il n'y a pas d'effet significatif du couvert. Avec **M**, C_{org} diminue lorsque la dose de biochar augmente, surtout pour 3 et 5% (Annexe 42). Cette différence est significative pour un apport de 1 % et est significativement inférieure pour un apport de 3 et 5% qui ne sont pas différents (Anova à deux facteurs, p<0,05). Sur les modalités avec *A. murale*, la concentration en C_{org} est plus faible que sur les mêmes modalités avec SN ou RG (Anova à deux facteurs, p<0,05).

➤ **Evolution du substrat U :** cinq semaines après le premier prélèvement, la concentration en C_{org} a diminué sauf pour les mésocosmes végétalisés et uniquement avec 3 et 5% de biochar. Le couvert a un effet significatif (Anova deux facteurs, p<0,05), tout comme la dose de biochar (Anova deux facteurs, p<0,05). Les concentrations dans les couverts U5 Aly, U3 RG et U3 Aly sont significativement supérieures aux autres couverts et différentes significativement entre elles. Lors du troisième prélèvement, elles sont similaires à celles du prélèvement précédent ou légèrement inférieures excepté pour la U1 Aly pour laquelle elle a triplé. Ainsi, les concentrations en C_{org} sont les plus élevées dans les couverts U5 RG, U5 Aly et U3 RG. Aussi les couverts U1 Aly et U3 Aly ont des concentrations inférieures mais non différentes (Anova, p<0,05).

➤ **Evolution du substrat M :** lors du deuxième prélèvement, la concentration en C_{org} a diminué de moitié sauf pour les modalités avec *A. murale* et 1, 3 et 5% de biochar pour lesquelles la diminution est plus faible. Ainsi, la concentration diminue toujours avec l'augmentation du

biochar (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$). Elle est supérieure dans les mésocosmes avec *A. murale* par rapport aux sols nus (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$). Lors du troisième prélèvement, elle a globalement diminué sur les modalités SN et Aly, mais elle est plus élevée pour les modalités RG avec 0 et 1% de biochar. L'effet couvert n'existe plus (Anova à deux facteurs, $p = 0,08$). En revanche, la diminution du C_{org} dans la solution du sol avec l'augmentation de la quantité de biochar perdure (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$).

Lors du premier prélèvement, le biochar influence la concentration de C_{org} dans la solution du sol mais pas le couvert. En effet, les plantes ne sont pas encore développées.

g) Pré conclusion sur les analyses des solutions de sol

Le biochar diminue les concentrations du Ni et Zn dans la solution dans les deux sols, ainsi que les concentrations en nitrate, ammonium, sulfate et chlorure. Dans le cas des éléments majeurs, la concentration du Mg diminue pour les deux substrats avec l'augmentation de la dose de biochar alors que celle du Ca diminue sur M mais augmente sur U.

2.5. Caractérisation des substrats après culture

a) pH et conductivité des substrats après 120 jours d'expérience

Sur M, le pH varie peu selon la dose de biochar. Cependant, il est significativement supérieur pour la modalité avec 5% et cultivée en ray-grass (Newman Keuls, $p < 0,05$). Sur U, le pH augmente avec la dose de biochar. Cependant, il y a peu de variation pour une dose donnée entre les différents couverts (Aly, RG et SN) (Annexe 43).

La conductivité après 120 jours est plus élevée sur M que sur U (Figure 87). Elle est plus élevée sur les substrats nus que sur les substrats végétalisés, surtout pour M. Sur ce substrat, elle est significativement plus faible pour les modalités RG qu'avec sol nu et *A. murale* (Figure 87) (Newman Keuls, $p < 0,05$). Sur le sol U, la dose de biochar et l'interaction avec le type de couvert ont un effet (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$). La conductivité diminue avec l'augmentation de la dose de biochar (Figure 87). Elle est la plus basse à 5% et en présence de plantes. La présence d'un couvert végétal diminue significativement la conductivité, sur les deux sols, et d'autant plus lorsque la dose de biochar est élevée.

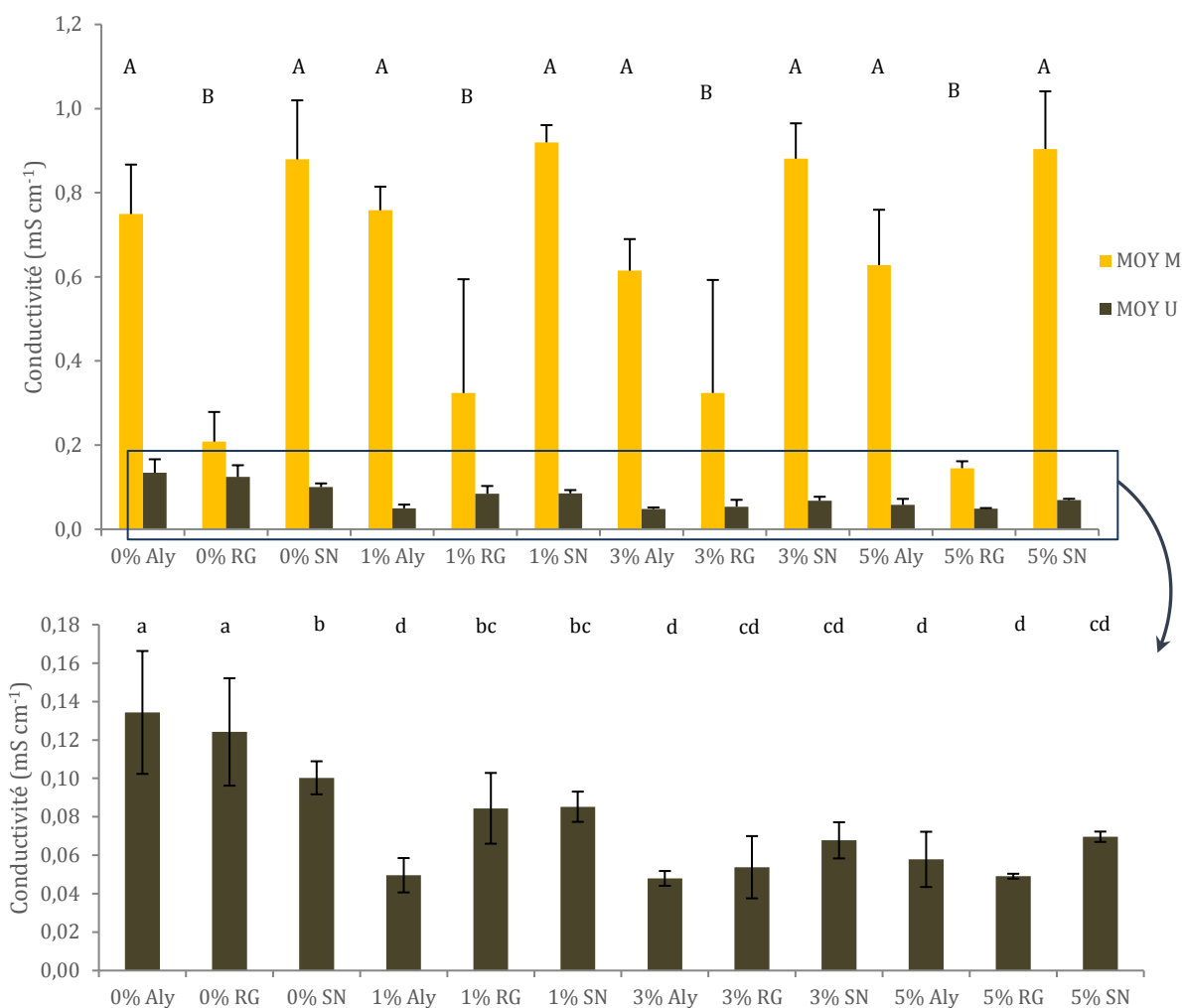


Figure 87 _ Conductivité des substrats après 120 jours d'expérimentation sur le substrat M et le sol U, selon trois couverts (Aly : *A. murale*, RG : ray-grass, SN : sol nu) et quatre amendements en biochar (0, 1, 3 et 5%). Pour le substrat M, les valeurs affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Pour le sol U : les valeurs affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts-types (N varie de 3 à 5).

b) Éléments disponibles (extraction au DTPA) après 120 jours de culture

Au début de l'expérience, l'augmentation de la quantité de biochar diminue significativement la biodisponibilité du Ni et augmente significativement celle du Zn pour les deux substrats (extraction au DTPA) (Annexe 45). Par ailleurs, le Ni extractible au DTPA est inférieur au Zn sur M et largement supérieur sur U. Après 120 jours, sur M, le Ni extractible au DTPA varie en fonction de la dose de biochar et du couvert (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$). En revanche, pour le Zn, seul le type de couvert influence la concentration mesurée (Anova à deux facteurs, $p < 0,05$) (Figure 88). Pour chaque modalité, le sol nu est le couvert avec la concentration la plus élevée en Ni et Zn. La concentration du Ni est plus faible pour les substrats végétalisés avec le ray-grass et celles mesurées dans les modalités avec *A. murale* est intermédiaire. De façon globale, le Ni extractible au DTPA diminue avec l'augmentation de la dose de biochar. Dans le cas du Zn l'effet du couvert est similaire à celui du Ni mais la concentration reste stable quelle que soit la dose de biochar.

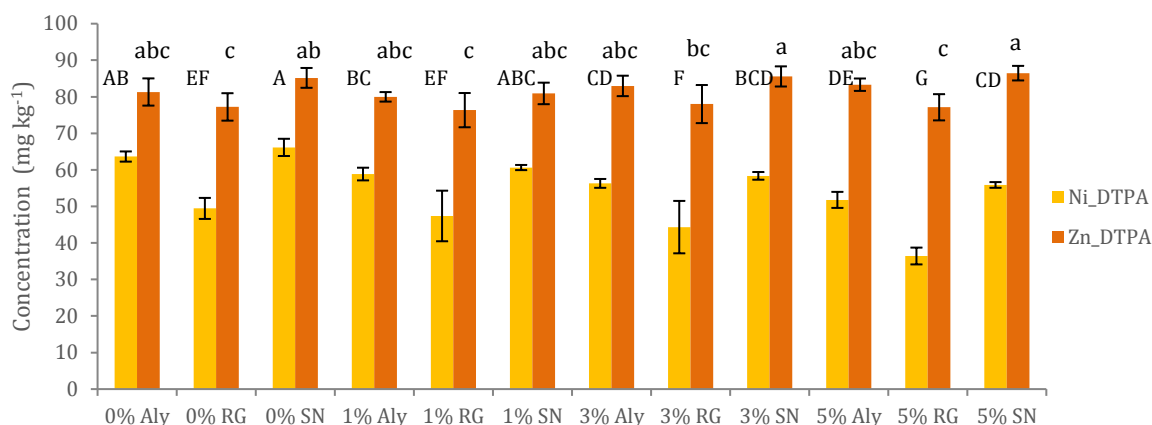


Figure 88 _ Concentration en Ni et Zn extractible au DTPA dans le substrat M après 120 jours d'expérimentation avec trois couverts (Aly : *A. murale*, RG : ray-grass, SN : sol nu) et quatre doses de biochar (0, 1, 3 et 5%). Les concentrations du Ni affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les concentrations du Zn affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts-types (N varie de 3 à 5).

Sur le sol U après 120 jours, le Ni extractible au DTPA diminue avec l'augmentation de la dose de biochar quel que soit le type de couvert. La concentration en Zn diminue aussi mais de manière plus sensible. Ainsi, il y a une différence significative entre U0 et U5. Les modalités avec *A. murale* sont celles avec les plus faibles concentrations de Ni et Zn extractible au DTPA (Figure 89).

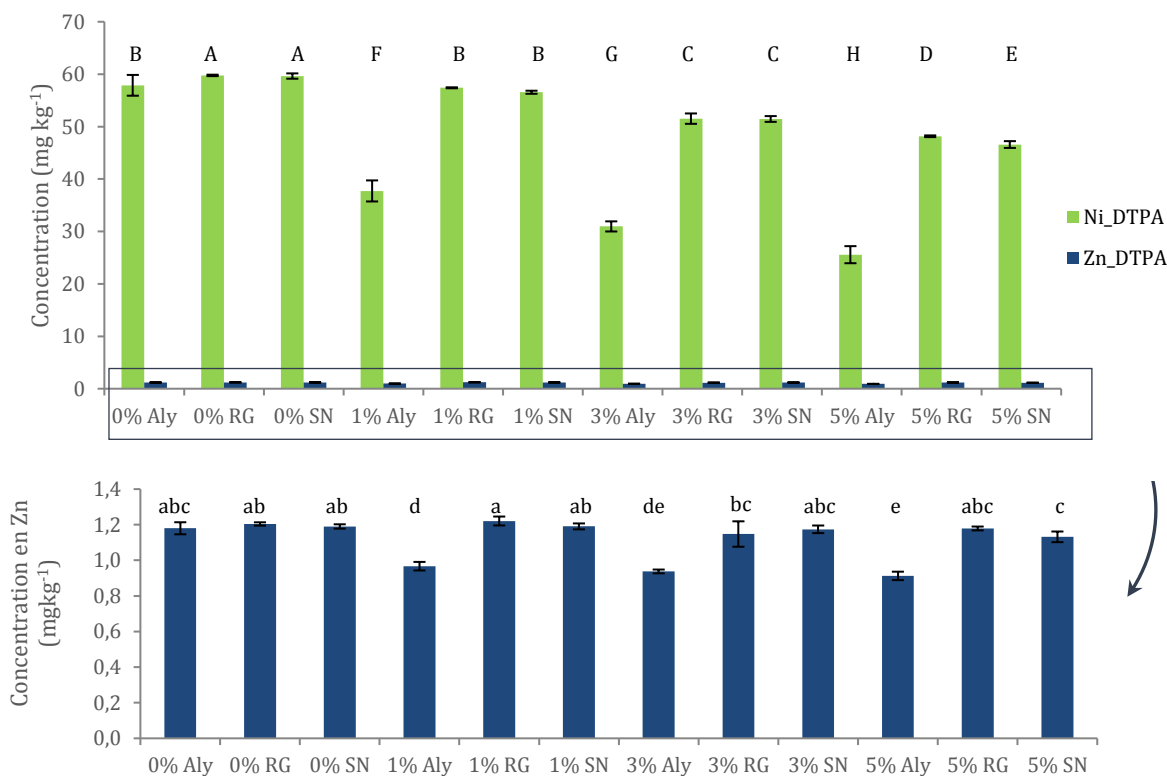


Figure 89 _ Concentration en Ni et Zn extractible au DTPA dans le sol U après 120 jours d'expérimentation sur le sol U selon trois couverts (Aly : *A. murale*, RG : ray-grass, SN : sol nu) et quatre doses de biochar (0, 1, 3 et 5%). Les concentrations affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts-types (N varie de 3 à 5).

2.6. Corrélations entre paramètres mesurés

a) Analyse multivariée des paramètres

Afin d'observer les relations entre les différents paramètres mesurés, une analyse en composantes principales est réalisée. Une ACP intégrant l'ensemble des paramètres est présentée (Figure 90) avec les modalités plantées avec *A. murale* et le ray-grass (sauf U0 RG et U1 RG pour lesquels les biomasses étaient insuffisantes pour réaliser les analyses). La composante 1 explique 48% de la variabilité et discrimine le type de substrat : sol U en abscisse positive et le substrat M en négative (Figure 90a). La deuxième composante explique 23% de la variabilité et discrimine l'espèce cultivée : *A. murale* (ordonnées négatives) et le ray-grass (ordonnées positives), la Figure 90b représentant la distribution des variables dans le plan. La superposition des deux plans permet de relier les variables aux modalités. Ainsi, les variables à droite caractérisent le sol U alors que celles de gauche caractérisent le substrat M (forte concentration en Zn, Na, Fe, Mn).

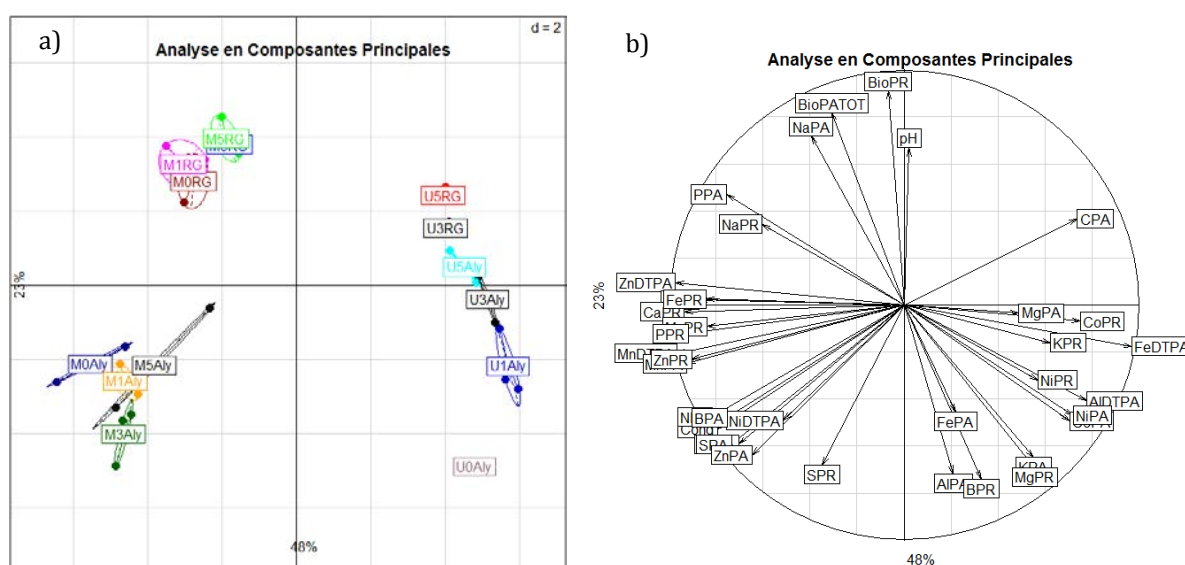


Figure 90 _ Analyse en composantes principales des paramètres mesurés sur les sols et les plantes à l'issue de l'expérience. a) Représentation des individus dans le plan (N=3). M : substrat élaboré, U : sol ultramafique, 0, 1, 3, 5 : fraction massique de biochar, Aly : *A. murale* et RG : ray-grass. **b) Représentation des variables dans le plan.** Variables du sol après culture : pH, Cond : conductivité, XDTPA : élément extrait au DTPA, XPA et XPR : élément dans les parties aériennes et racinaires, BioPATOT et BioPR : biomasses aériennes et racinaires, CPA et NPA : les teneurs en carbone et azote dans les parties aériennes.

La matrice de corrélation en Annexe 46 de cette ACP montre une corrélation positive entre la biomasse des PA et le pH, ainsi qu'avec la concentration en P des PA et celle en Na. En revanche, la biomasse des PA est corrélée négativement avec les concentrations aériennes en Ni, Co, Al et K et les concentrations racinaires en Ni, B, Mg. La concentration aérienne du Ni est corrélée positivement avec les concentrations aériennes en Fe, K, Al, Co et la teneur en C. De plus, avec les concentrations racinaires en K, Co, Ni, B, Mg et les concentrations du sol en Al et Fe biodisponible (DTPA). En revanche, il y a une corrélation négative entre la concentration du Ni des PA et la biomasse (PA et PR), le pH du sol, et les concentrations en Ca, Al, Fe, Mn, Na dans les PR.

Afin de décrire les relations plus finement, nous allons regarder les corrélations pour chacune des plantes sol par sol.

b) Corrélations entre variables selon l'espèce et le substrat

➤ Corrélations avec la biomasse aérienne

Quelle que soit l'espèce, la biomasse aérienne est corrélée positivement avec la biomasse racinaire. Dans *A. murale* sur U, la production de biomasse est aussi corrélée positivement avec le pH du sol, les concentrations racinaires en K, P, Zn et les concentrations aériennes en P ainsi que la teneur en C (Tableau 28). En revanche, elle est corrélée négativement avec les éléments dosés dans les PA (Ni, Mn, Mg), PR (Na, Al) et les concentrations biodisponibles au DTPA du Mn et Ni et la conductivité pour les 2 substrats (Annexe 46 et Annexe 47). Dans le **ray-grass**, les corrélations positives des biomasses des PA sont différentes selon le substrat : sur U biomasse corrélée avec les concentrations des PA en Ca et Mn alors que sur M, la biomasse est corrélée avec le pH et la concentration racinaire en Ca (Annexe 47 et Annexe 48). Notons que dans le ray-grass, quel que soit le substrat, la biomasse des PA est corrélée négativement avec Les teneurs en S et N dans les PA ainsi que le contenu en Ni et S des racines.

Tableau 28 _ Éléments corrélés avec la biomasse des PA ou la concentration en Ni des PA, selon l'espèce et le substrat. + : corrélations positives, - : corrélations négatives, BioPA : biomasse des parties aériennes, BioPR : biomasse des parties racinaires, PA : parties aériennes, PR : parties racinaires, DTPA (éléments extraits du substrat après culture au DTPA, Cond : conductivité). Les coefficients sont calculés d'après Spearman, seuls les corrélations significatives sont renseignées, $p < 0,05$. D'après les matrices de corrélation Annexe 47 à Annexe 50.

	<i>A. murale</i>				Ray-grass			
	Sol U		Substrat M		Sol U		Substrat M	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Biomasse PA	BioPR, pH, PA (P, C), PR (K, P, Zn)	DTPA (Fe, Mn, Ni, Zn, Al), PA (Ni, Mn, Mg, Al, Fe, Na, N, S, Co, Zn), PR (S, Mg, Al, Fe, Na, B), Cond	BioPR	DTPA (Mn, Ni), PA (Ni, Mn, Mg), PR (Na, Al), Cond	BioPR, PA (Ca, Mn)	DTPA (Fe, Al), PA (P, S, N), PR (P, Ni, S)	BioPR, pH, PR (Ca)	DTPA (Zn, Al, Ni, Mn), PA (S, N), PR (S, Na, Ni, Mg), Cond
Concentration Ni PA	DTPA (Fe, Mn, Ni, Zn, Al), PA (K, Mn, Mg, Al, Fe, Na, N, Co, Zn), PR (Co, Al)	BioPA, BioPR, pH, PA (C)	Cond, DTPA (Mn), PA (S, Mg, Mn, Ca)	BioPA, BioPR, DTPA (Fe), PA (C)	∅	∅	DTPA (Zn), PA (Zn, Co, Fe, Na, P, S, N)	∅

➤ Corrélations avec la concentration en Ni dans les PA

Dans *A. murale* la concentration en Ni dans les PA est corrélée positivement avec les éléments présents dans les Mn et Mg des parties aériennes ainsi que la concentration en Mn biodisponibles quel que soit le substrat (Tableau 28). Elle est corrélée négativement la biomasse (PA et PR) et le C dans les PA. Sur U, la concentration en Ni des PA est corrélée positivement avec beaucoup d'autres éléments des PA tels que Z, N, Zn ou Co et du biodisponible dans le sol (Fe, Ni, Zn et Al).

Dans le **ray-grass** très peu de corrélations sont significatives, excepté sur le substrat M, où la concentration en Ni est positivement corrélée avec le Zn biodisponible et les concentrations en Zn, Co, Fe, Na, P, S, N dans les PA.

3. Discussion

L'introduction de **biochar augmente la biomasse et diminue les métaux en solution** et leur transfert vers la plante non hyperaccumulatrice. Ces résultats corroborent ceux de Rees *et al.* (2015) dans le cas de *L. perenne* sur sol acide et Herath *et al.* (2015) dans le cas de la tomate. Le biochar augmente significativement le développement des végétaux sur les deux substrats. Sur le substrat élaboré avec la boue métallique et amendé en biochar la concentration du Zn dans les racines diminue tandis que celle du Ni augmente. Sur le sol ultramafique, l'apport de biochar augmente le C organique dans le sol. En revanche, sur le substrat élaboré, l'augmentation de biochar entraîne la diminution du C organique dans la solution du sol. Les concentrations des éléments en solution avec 3 et 5% de biochar sont faibles en présence de plantes alors qu'elles sont élevées dans le cas du sol nu (Ni, Zn, Ca, Mg), indiquant le fort prélèvement par la plante. Les plantes diminuent aussi la conductivité et augmentent le pH. Les résultats peuvent varier selon le biochar utilisé. En effet, la matière première ainsi que les conditions de pyrolyse modifient les propriétés finales du biochar et l'influence sur les rendements (Annexe 51A). L'utilisation d'autres amendements peut être envisagée afin d'améliorer les propriétés du substrat et finalement le rendement. Le marc de café permet d'obtenir les mêmes rendements qu'avec le biochar dans *L. emarginata* et l'utilisation simultanée des deux amendements augmente les biomasses racinaires et aériennes et finalement la quantité de Ni extrait (Annexe 51B).

Le substrat élaboré permet de produire plus de biomasse que le sol ultramafique et ceci pour les deux espèces testées, *L. multiflorum* et *A. murale*. L'analyse des solutions indique que le substrat élaboré est plus concentré en éléments nutritifs que le sol ultramafique, expliquant la plus faible production de biomasse sur ce dernier. *A. murale* produit plus de biomasse racinaire sur le sol ultramafique que sur le substrat élaboré alors que c'est l'inverse pour la biomasse aérienne. Deux hypothèses sont envisageables : la faible fertilité intrinsèque des sols ultramafiques et la toxicité induite par les métaux présents dans la boue métallique. Des tests de croissance ont été menés avec *L. emarginata* sur le substrat élaboré avec la boue de phosphatation et un autre substrat formulé avec une boue métallique alcaline (Annexe 51C). La boue alcaline permet la même production de biomasse qu'elle soit amendée ou non en biochar et n'est pas différente de celle avec la boue de phosphatation amendée en biochar. Ainsi, la formulation de substrat peut être envisagée avec d'autres boues que celle de phosphatation et ne nécessite pas forcément l'utilisation d'amendement, dépendant de sa composition.

Le choix de l'espèce peut modifier les rendements même si toutes les espèces testées se sont développées sur le substrat. Ainsi, *A. murale* et *L. emarginata* présentent des rendements similaires en terme de quantité de Ni extrait par vase de végétation. *B. tymphaea* produit moins de biomasse mais a une concentration de Ni supérieure aux 2 autres espèces (Annexe 51D).

La concentration du Ni dans les parties aériennes et les racines d'*A. murale* est corrélée négativement avec celle du Zn confirmant l'interaction forte entre les deux éléments vis-à-vis de l'absorption par les hyperaccumulateurs (Deng *et al.* 2016). L'extraction du Ni au DTPA est similaire dans les deux sols, ce qui pourrait indiquer que le pool de Ni biodisponible pour les

plantes serait identique sur les deux sols. Or, il s'avère, d'une part, que les HA concentrent le Ni dans des ordres de grandeur très différents d'un sol à l'autre. D'autre part, la solution du substrat élaboré présente une concentration en Ni 300 fois supérieure à celle du sol ultramafique. Ainsi, deux informations principales sont à retirer. Premièrement, le dosage au DTPA ne permet pas d'estimer correctement le Ni biodisponible sur des matrices complexes élaborées avec un matériau métallique acide. Par ailleurs, le dosage du Ni dans la solution du sol ne permet pas non plus de prévoir le prélèvement car il n'est pas corrélé avec la concentration dans les PA.

Le sol ultramafique contient 0,50 % Ca et 13% Mg alors que le substrat élaboré 6,0% Ca et 0,59% Mg. Avec 3,4% Ca et 0,27% Mg, le biochar introduit du Ca au sol ultramafique et du Mg au substrat élaboré. L'augmentation de la dose de biochar sur le sol ultramafique entraîne une diminution du Mg et Ni en solution et donc diminue leur toxicité connue sur ces sols (Proctor et Woodell 1975 ; Proctor et Cottam 1982). Les analyses au cours du temps des solutions de sol sans couvert montrent des variations des paramètres mesurés entre les trois prélèvements sur le substrat élaboré alors que sur le sol ultramafique, après les deux premiers prélèvements, les valeurs se stabilisent. Ainsi, une phase de maturation du substrat apparaît nécessaire, principalement dans le cas d'un substrat élaboré pour l'expérimentation. Ces observations sont confirmées par les différences entre t0 et à l'issue de quatre semaines d'incubation et aussi par la nécessité de réaliser plusieurs semis au cours du temps.

4. Conclusion

Ainsi, le biochar semble être un amendement très prometteur pour la végétalisation de délaissés industriels métalliques toxiques. Il permet la germination et la croissance des plantes hyperaccumulatrices et l'accumulation du Ni, ouvrant des perspectives larges pour l'application de l'agromine à des substrats non traditionnels tels que les boues et déchets industriels. Mais après ces essais en conditions contrôlées, il est nécessaire d'opérer un changement d'échelle afin de tester la faisabilité de l'agromine de délaissés industriels en conditions proches de la vraie grandeur et donc de la parcelle.

PARTIE 5

Mise en œuvre et optimisation de l'agromine sur des substrats élaborés avec une boue métallique industrielle

Dans la Partie 4, nous avons élaboré un substrat à partir de délaissés qui permet la croissance et le développement de plantes hyperaccumulatrices. Il est maintenant nécessaire d'opérer un changement d'échelle afin d'améliorer ses propriétés physico-chimiques pour augmenter la phytoextraction du Ni (biomasse produite et Ni extrait) en améliorant sa fertilité et diminuant sa toxicité. Il a été montré que l'utilisation de biochar comme amendement permet d'augmenter le pH et de diminuer la toxicité métallique. L'augmentation du pH du substrat permet aussi d'augmenter la biomasse et la quantité de Ni extraite. Cette élévation du pH pourrait encore permettre de palier l'excès de Zn néfaste pour l'hyperaccumulation du Ni. Plusieurs voies d'amélioration sont envisagées : prétraiter la boue pour augmenter son pH, intervenir sur la disposition des matériaux au sein du profil pour diminuer le contact des racines et de la boue, ou encore améliorer la composition de la terre mélangée à la boue en apportant un matériau drainant et de la matière organique.

Dans cette cinquième partie, deux formulations sont testées : la première consiste à chauler la boue avec du Ca(OH)_2 ; la seconde consiste à ne pas mélanger les matériaux mais à les agencer verticalement en étalant la boue en couche sur la terre. Le chaulage élève le pH du sol. Cette augmentation diminue la mobilité des métaux et leur transfert vers les plantes hyperaccumulatrices, telles que *B. coddii* (Robinson *et al.* 1999) ou non hyperaccumulatrices : *Avena sativa*, *Beta vulgaris* ou *Triticum aestivum* (Kukier et Chaney 2001). Cependant, plusieurs travaux ont montré que l'élévation du pH après chaulage pouvait entraîner une augmentation de l'extraction de Ni par *A. murale* (Li *et al.* 2003a; Kukier *et al.* 2004; Everhart *et al.* 2006).

Par ailleurs, la fertilité du substrat est améliorée par ajout de deux types d'amendements : du compost de déchets verts et des stériles de carrière. Le **compost** améliore les propriétés physiques et chimiques du sol (Gallardo-Lara et Nogales 1987; Hernando *et al.* 1989; Giusquiani *et al.* 1995) et son utilisation permet le recyclage de déchets organiques et diminue l'emploi de produits dérivés du pétrole (Parr *et al.* 1986), répondant ainsi aux objectifs du projet LORVER d'utilisation de sous-produits. De par son contenu en éléments traces et autres résidus toxiques, l'utilisation de compost ou de déchets organiques peut induire des limitations/prescriptions pour son utilisation en agriculture (Westerman et Bicudo 2005; Hargreaves *et al.* 2008; Rio *et al.* 2011), mais dans le cadre de l'agromine, cela ne devrait pas perturber le fonctionnement des hyperaccumulateurs. Enfin, la matière organique du compost peut jouer un rôle de rétention des

métaux qui pourraient être présents à forte concentration dans la solution du substrat. Le **stérile de carrière**, matériau minéral de texture grossière est destiné à augmenter l'aération du substrat.

Le Chapitre 1 rapporte une première expérience conduite en conditions contrôlées pour évaluer les deux nouveaux substrats vis-à-vis du témoin (substrat de la Partie 4). Dans un second temps, les substrats sont testés à l'échelle du pilote dans un dispositif *in situ* sur la station expérimentale du GISFI (Homécourt, 55) présenté dans le Chapitre 2.

Chapitre 1 :

Modalités d'application de la boue

1. Objectifs

Outre la fertilité du substrat, la principale limite au transfert du Ni dans la plante est due à la forte concentration de Zn dans la boue. Aussi, afin de lever ce verrou, deux modalités sont testées en comparaison du substrat témoin (Partie 4). La terre de biopile est mélangée avec du compost pour améliorer ces propriétés physico-chimiques (20% de compost et 80% de terre de biopile (v/v)).

- Dans la première modalité, la boue est **prétraitée** par ajout de chaux Ca(OH)_2 avant son incorporation à la terre.
- Dans la seconde, la boue est **disposée en couche** et en surface. Ce mode d'agencement présente plusieurs avantages comme la lixiviation progressive des éléments de la boue au fur et à mesure des arrosages. Il laisse aussi la possibilité de remplacer ultérieurement la couche de boue.

Deux cultures en conditions contrôlées sont menées. La **première** est conduite en vases de végétation afin de mesurer l'hyperaccumulation avec i) la boue pure mélangée à la terre (MBP), ii) la boue préalablement chaulée puis mélangée à la terre (MBCh) et iii) la boue pure placée en couche sur la terre (CBP). La **seconde** utilise des rhizotrons afin d'observer l'hyperaccumulation du Ni, le développement racinaire et la lixiviation des métaux dans un système en couches.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériaux

Trois matériaux sont utilisés : la boue de phosphatation (Lot 2) de pH acide (4) avec 0,6% de Ni_{ER} et 6 % de Zn_{ER} , la terre de biopile (Lot 3) et un compost (mélange de déchets verts et de boue de STEP) (Lot 1) (Partie 2). Les matériaux sont séchés à l'air ambiant, broyés et tamisés à 2 mm. La boue est séparée en deux lots : l'un est gardé en l'état, à l'autre sont ajoutés 2,5% (m) de Ca(OH)_2 . Chacun des lots est ensuite séché, tamisé à 2 mm. Les mélanges sont effectués pour les modalités concernées (Annexe 52).

2.2. Espèce végétale

L. emarginata est sélectionnée pour ses aptitudes à se développer sur les mélanges élaborés avec la boue de phosphatation (Partie 4). La population S VIII (2014) est choisie car elle présente le meilleur taux de germination (85% après 10 j). Les graines sont mises à germer sur du papier humidifié. Les individus germés sont installés dans des tubes cylindriques en polyéthylène transparent (ouverts aux deux extrémités), contenant 20 g de substrat frais composé de $\frac{1}{3}$ de biopile et $\frac{2}{3}$ de terre végétale (v/v). Après 60 j de croissance, les tubes sont prêts pour les expérimentations.

2.3. Essai en vases de végétation

Les substrats MBP, MBCh et CBP qui contiennent 10% de boue et 90% de terre (m/m) sont préparés en deux temps : i) mélange de la terre de biopile/compost dans des proportions volumiques de 80/20, ii) incorporation de la boue à cette terre ou disposition en surface. Les substrats ainsi préparés sont introduits dans les vases de végétation. Pour le substrat en mélange terre/boue, les vases de végétation sont remplis aux $\frac{2}{3}$ avec le mélange. Les tubes avec plante sont alors mis sur cette surface et le reste du mélange est déposé autour des tubes. Pour la boue en couche, les vases de végétation sont d'abord remplis avec le mélange. Les tubes sont mis en place. Enfin, la boue est répartie autour des tubes en veillant à ce qu'elle ne passe pas sous les tubes pour éviter le contact direct avec les racines. Dans chaque vase de 1L, contenant 340 g de boue et 3 060 g de mélange terre de biopile/compost, sont placées trois plantules. Trois répétitions sont préparées par modalité. L'ensemble des neuf vases de végétation est placé en chambre de culture et répartis en trois blocs, avec 25°C jour et 16°C nuit, une photopériode de 16 h jour et 8 h nuit et une humidité moyenne de 60%. Les vases font l'objet d'une rotation hebdomadaire. L'humidité est maintenue à 80% de la capacité au champ du substrat.

Après 92 j de culture, les plantes sont récoltées. Elles sont alors âgées de 152 jours (60+92 j). Chaque vase contient « une motte » de substrat de 9 cm de hauteur. Elle est découpée en trois strates de 3 cm nommées : A pour la strate supérieure (boue seule dans la modalité en couche), B pour l'intermédiaire et C pour la plus profonde (Figure 91). Les racines se développent dans ces deux dernières. Au niveau de la strate A, les racines se développent dans le tube et n'interagissent donc pas avec le substrat de la strate A.

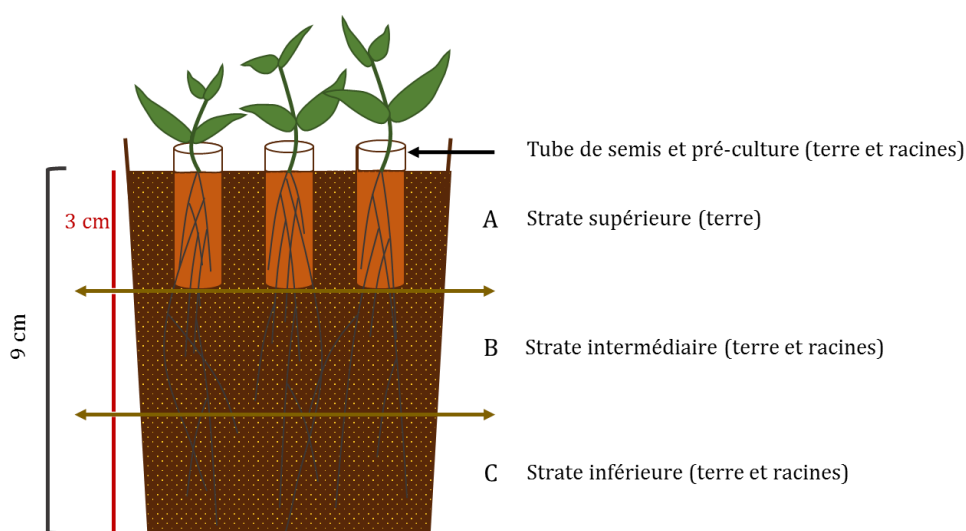


Figure 91 _ Dispositif en vases de végétation

Pour chaque vase, quatre échantillons de terre sont prélevés (strates A, B, C et dans le tube) ainsi que trois échantillons de racines (strates B et C et tube) (Tableau 29)

Tableau 29 _ Répartition des échantillons collectés à la récolte

Nom de la strate	Composition de l'échantillon de terre	Présence de racines	Autre échantillon
A	Substrat mélangé (MBP et MBCh), boue pure (CBP)	non	+ 1 échantillon de sol dans tube de culture de la plantule + 1 échantillon de racines (présentes dans le tube à la fin de la culture)
B	Substrat mélangé (MBP et MBCh), substrat terreux (CBP)	oui	∅
C	Substrat mélangé (MBP et MBCh), substrat terreux (CBP)	oui	∅

Les biomasses aériennes et racinaires sont récoltées et pesées (Partie 2). La composition élémentaire des parties aériennes et racinaires est dosée par ICP-OES. Le pH, la conductivité et les métaux extractibles au DTPA sont mesurés sur les différentes strates de sol et sur le substrat présent dans les tubes contenant les plantes.

2.4. Essai en rhizotrons

Dans cette seconde expérience, seul le dispositif en couche avec boue pure ou boue chaulée est testé. Des rhizotrons de 3,3 L sont utilisés. Il s'agit de boîtes rectangulaires, (L*h : 24*6,8*20 cm), munies d'une face vitrée pour observer le développement racinaire. Durant la culture, elles sont inclinées à 45° afin d'amener les racines à se développer contre la face vitrée plaquée contre un support opaque. Dans chaque rhizotron, le mélange terre de biopile/compost est introduit, puis les tubes avec plantule sont installés et autour, sont déposés 6% (m) de boue pure ou chaulée. Ainsi, chaque rhizotron contient l'équivalent sec de 3 330 g de terre et 213 g de boue. Un rhizotron est mis en place pour chaque modalité. L'ensemble est placé en chambre de culture avec les mêmes conditions que pour l'essai en vases de végétation.

Dans les rhizotrons, la hauteur totale de substrat est de 20 cm. La « motte » est divisée en six strates (Figure 92). Les deux strates supérieures (A et B) hautes de 2 cm sont composées uniquement de boue. Les quatre strates inférieures mesurent 4 cm. Pour chaque rhizotron, sept échantillons de terre sont prélevés (strates A à F et substrat des tubes) et cinq échantillons de racines (strates C à F et tubes). Comme dans l'expérience précédente, les biomasses aériennes et racinaires récoltées sont pesées et leur composition élémentaire dosée par ICP-OES. Le pH, la conductivité et les métaux extractibles au DTPA sont mesurés sur les différentes strates de sol et sur le substrat présent dans les tubes contenant les plantes.

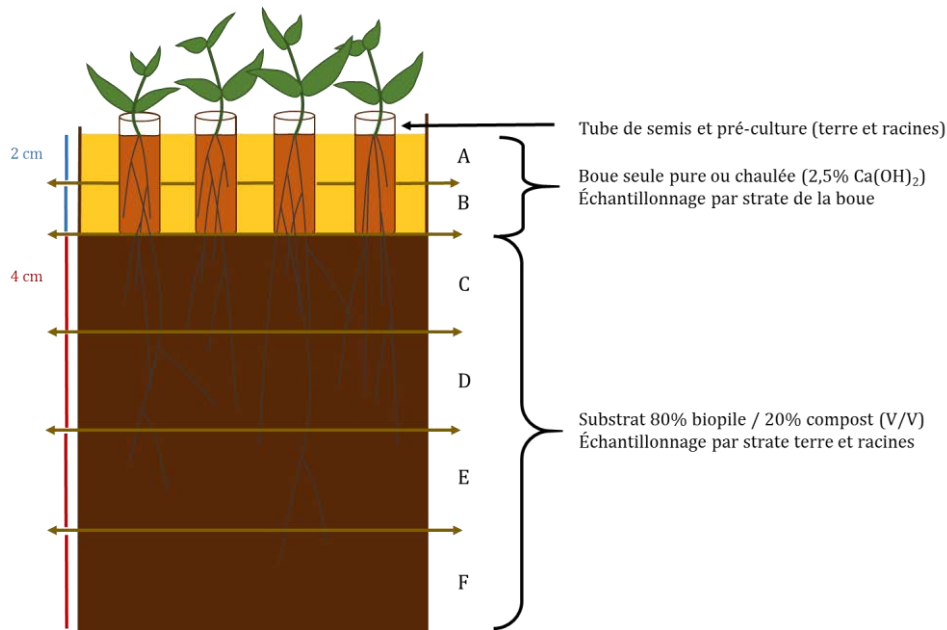


Figure 92 _ Dispositif en « rhizotron »

3. Résultats

3.1. Essai en vases de végétation

a) *Survie des individus et biomasses*

Le taux de survie des individus est de $\frac{2}{3}$ sur le mélange avec la boue chaulée, $\frac{1}{3}$ sur le mélange avec la boue pure, et intermédiaire pour le substrat avec la boue pure en couche. Les individus morts ont une masse moyenne plus élevée sur le substrat avec la boue en couche, laissant penser qu'ils ont atteint un état de développement plus avancé que pour ceux des substrats en mélange.

En tendance, la biomasse totale est supérieure sur la modalité en couches par rapport aux mélanges (différences non significatives). Elle est la plus faible avec la boue pure en mélange. Cet ordre est conservé pour les parties aériennes et racinaires prises séparément (Figure 93). La répartition de la biomasse en trois catégories (parties aériennes vivantes, parties aériennes mortes et parties racinaires) révèle que la biomasse morte n'est pas négligeable, notamment pour CBP (Annexe 53). La répartition de la biomasse racinaire dans les différentes strates du vase varie selon la modalité (Figure 94). Elle a tendance à augmenter en s'éloignant de la graine dans le cas de MBP alors qu'elle diminue dans MBCh. Pour la modalité CBP, la biomasse est significativement inférieure au fond du vase (strate C) par rapport aux strates supérieures (A et B) (Newman Keuls, $p < 0,05$).

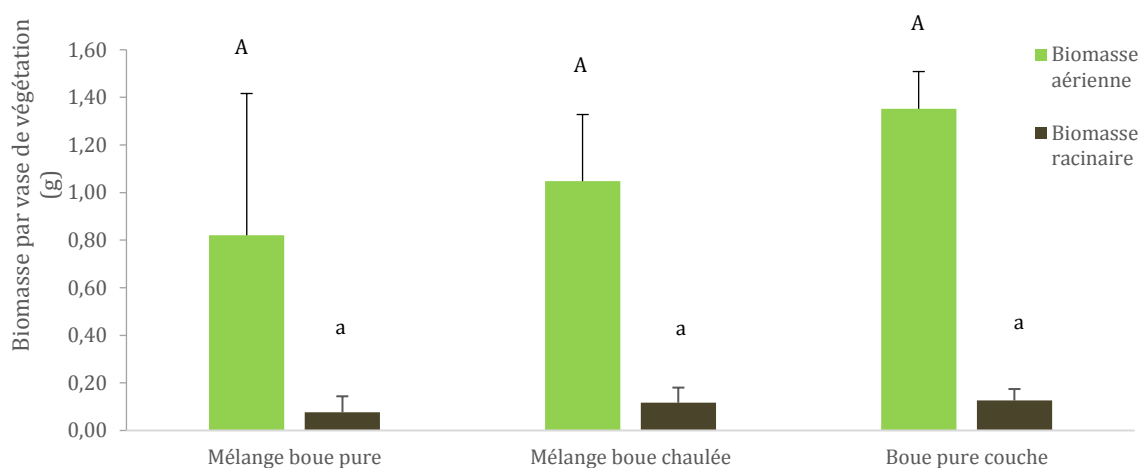


Figure 93 _ Biomasse de *L. emarginata* par vase de végétation. Les barres verticales indiquent les écarts-types ; les valeurs affectées de la même lettre majuscule ou minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$).

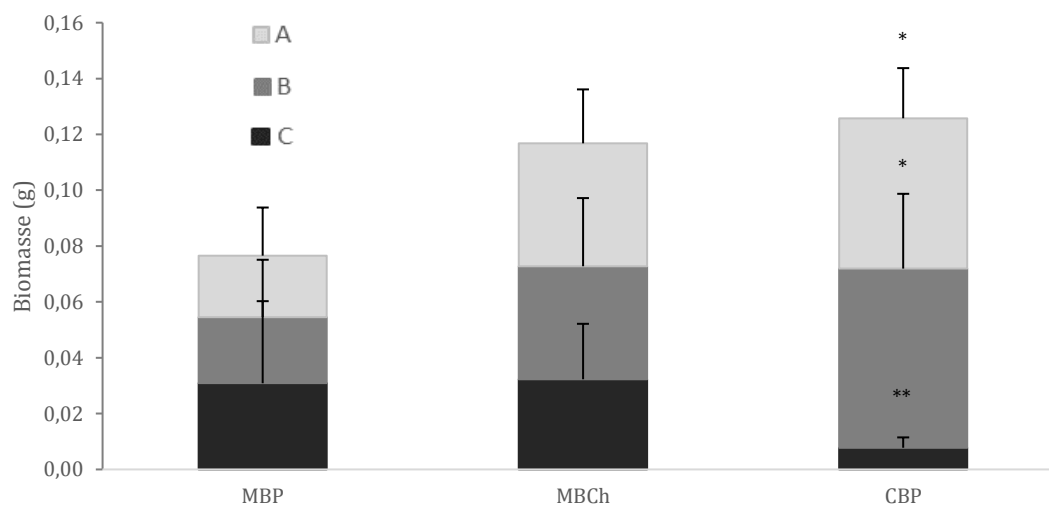


Figure 94 _ Biomasse racinaire de *L. emarginata* en fonction de la profondeur. Les barres verticales indiquent les écarts-types. * différence significative au sein d'une même modalité entre les différentes strates (Newman Keuls, $p < 0,05$), $N=3$.

b) Concentration des métaux dans la biomasse

La concentration du Ni dans les parties aériennes est significativement plus élevée sur le substrat en couche que lorsque la boue est mélangée avec la terre, la concentration la plus faible étant obtenue sur le mélange avec la boue chaulée (Figure 95). La concentration du Zn est 2,5 à 3,4 fois plus élevée que celle du Ni sur les substrats où les matériaux sont mélangés. En revanche, dans le dispositif en couche, elle est quatre fois inférieure à celle du Ni. De plus, c'est la seule modalité où la concentration du Ni dépasse le seuil d'hyperaccumulation. La concentration du Ni et du Zn est similaire entre les individus vivants et morts ayant poussé sur le même substrat (Annexe 54).

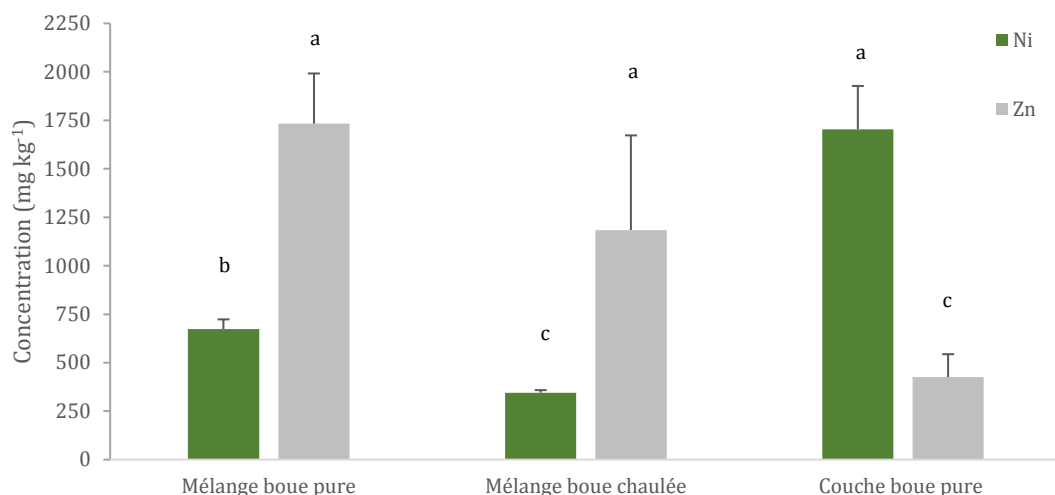


Figure 95 _ Concentration du Ni et du Zn dans les parties aériennes de *L. emarginata* après 3 mois de culture en conditions contrôlées sur les substrats élaborés. Les barres verticales indiquent les écarts-types, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log), $N=3$.

La concentration du Zn dans les racines est supérieure à celle du Ni dans les trois strates des modalités « mélangées ». Ainsi le rapport des concentrations Ni/Zn est largement inférieur à 1 (Figure 96). Par ailleurs, dans les modalités en mélange, plus les racines sont profondes dans le vase, donc éloignées de la graine, plus les concentrations du Ni et du Zn sont élevées. Cependant, dans le cas de CBP, l'écart de concentrations des deux éléments dans les racines est réduit. La concentration racinaire du Ni est similaire entre le tube et la strate B, et quasiment nulle dans les racines de la strate C (Annexe 55). Le rapport Ni/Zn est proche de 0,5 dans les strates B et C et de 1 dans la strate A.

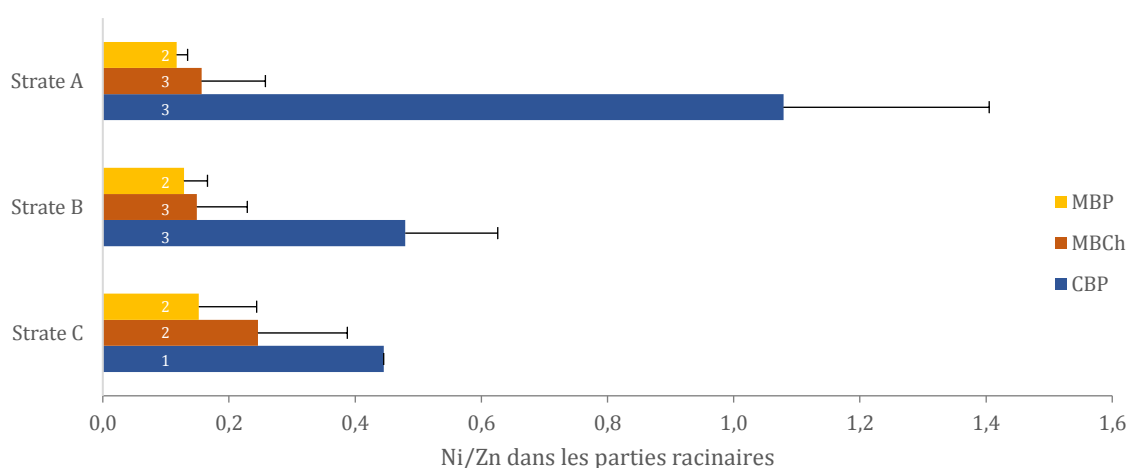


Figure 96 _ Rapport Ni/Zn des concentrations dans les racines de *L. emarginata* sur les substrats élaborés (MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure) en fonction de la profondeur (A : strate supérieure, B : strate intermédiaire, C : strate inférieure). Les barres verticales indiquent les écarts-types ; les chiffres indiquent le nombre de répétitions pour les analyses par modalité ($N=1, 2$ ou 3) ; les faibles quantités d'échantillon ont parfois nécessité de regrouper les répétitions pour l'analyse.

La concentration du Ni dans les parties aériennes est corrélée positivement avec les concentrations en Co ($R^2=0,96$), en Na ($R^2=0,56$), K ($R^2=0,50$) et P ($R^2=0,72$) (Annexe 56). La production de biomasse aérienne est corrélée positivement avec le K ($R^2=0,56$). La concentration du Ni dans les parties aériennes est corrélée négativement avec les concentrations en Zn ($R^2=0,47$) et Ca ($R^2=0,73$).

c) Propriétés des substrats après culture

La concentration du **Ni extractible au DTPA** à l'issue de la culture est plus élevée dans le substrat MBP que MBCh. Les valeurs observées correspondent à une très forte disponibilité du Ni (125 mg kg^{-1} pour MBP et 84 mg kg^{-1} pour MBCh) (Annexe 57). Il n'existe pas de différence selon la strate considérée. En revanche, avec la boue en couche (CBP), les strates supérieures (A : boue seule et B) contiennent significativement plus de Ni que les strates des deux modalités en mélange. Dans la strate C de CBP, la concentration du Ni est inférieure aux concentrations du Ni de toutes les autres strates (toutes modalités confondues). Dans le cas du Zn, si la concentration est homogène et supérieure à celle du Ni dans les modalités mélangées, le dispositif en couches réduit drastiquement la présence du Zn dans la strate intermédiaire, où le rapport Ni/Zn est proche de 1 (Figure 97).

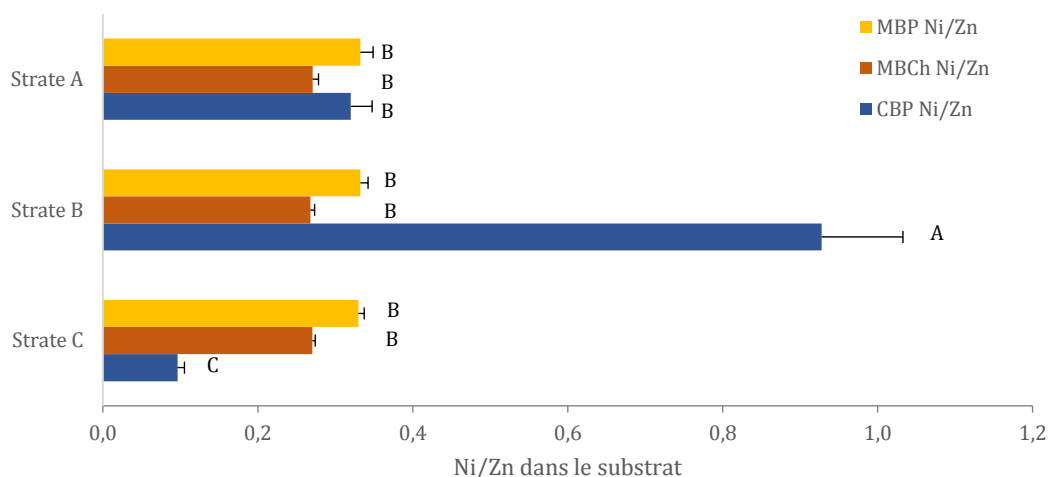


Figure 97 _ Rapport Ni/Zn des concentrations massiques phytodisponibles (après extraction DTPA) des substrats selon la profondeur dans le vase de végétation. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure, A : strate supérieure, B : strate intermédiaire, C : strate inférieure. Les barres verticales indiquent les écarts-types, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p<0,05$), $N=3$.

Le **pH** augmente avec la profondeur dans le vase quel que soit le substrat considéré (Figure 98). Il varie selon la strate et le substrat (Anova à deux facteurs, $p<0,001$). Il est significativement inférieur sur le substrat en mélange avec la boue pure par rapport à celui avec la boue chaulée, excepté dans la strate C où il n'est pas différent. Dans le dispositif en couches, la strate A, qui correspond à la boue seule, a un pH très acide. Il est au contraire très alcalin dans la strate C (mélange terreux), et intermédiaire dans la strate B. La **conductivité** dans la strate A de CBP est supérieure à celle de MBCh, elle-même supérieure à MBP (Figure 99). Elle varie en fonction du substrat et de la strate (Anova à deux facteurs, $p<0,05$). Dans les strates B et C, elle n'est pas différente entre les trois modalités et elle est strictement inférieure à celle mesurée dans la strate A, quelle que soit la modalité considérée.

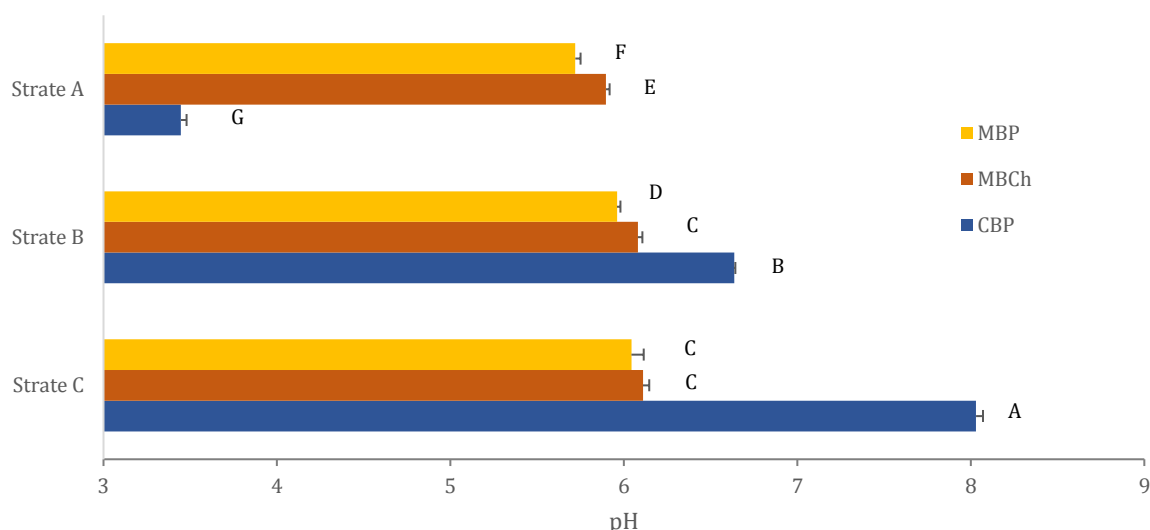


Figure 98 _ pH des substrats après culture selon la profondeur dans le vase de végétation. A : strate supérieure, B : strate intermédiaire, C : strate inférieure. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure. Les barres verticales indiquent les écarts-types ; les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), $N=3$.

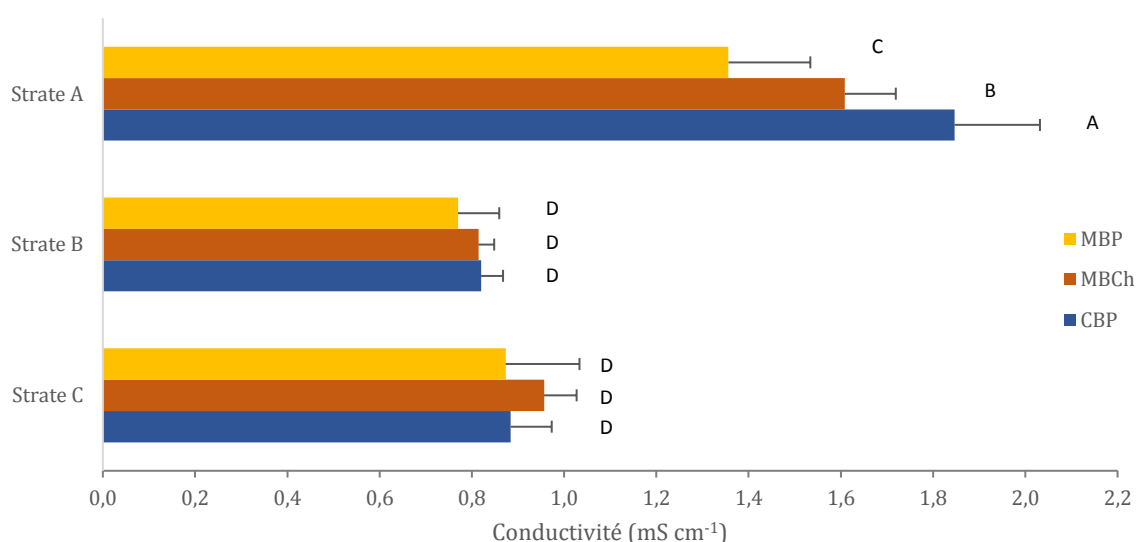


Figure 99 _ Conductivité des substrats après culture selon les substrats et la profondeur. A : strate supérieure, B : strate intermédiaire, C : strate inférieure. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure. Les barres verticales indiquent les écarts-types, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), $N=3$.

3.2. Essai en rhizotron

À l'issue de trois mois de culture avec 6% (m) de boue pure ou chaulée disposées en couche supérieure sur un mélange terre de biopile et compost, 75% des individus sont vivants sur la modalité boue pure et 50% sur la boue chaulée. La biomasse aérienne est supérieure dans le cas de la boue pure (0,97 g par individu avec la boue pure contre 0,68 g avec la boue chaulée). La biomasse racinaire est supérieure dans le cas de la boue pure quelle que soit la strate de substrat considérée (Figure 100a). La biomasse racinaire dans les couches A et B représente la biomasse racinaire dans les quatre tubes à l'issue de la culture. Elle est la plus élevée dans la strate C (sous-

jacente à la couche de boue) puis elle diminue avec la profondeur. Dans les parties aériennes, la concentration du Ni est de 3 350 mg kg⁻¹ sur boue pure et 940 mg kg⁻¹ sur boue chaulée. Celle du Zn est de 940 et 460 mg kg⁻¹, respectivement. Dans les racines, la concentration du Ni est 6 fois plus élevée lorsque les plantes se sont développées sur la modalité boue pure dans les strates A à C (Figure 100b). Dans les strates inférieures la concentration est proche entre les deux modalités.

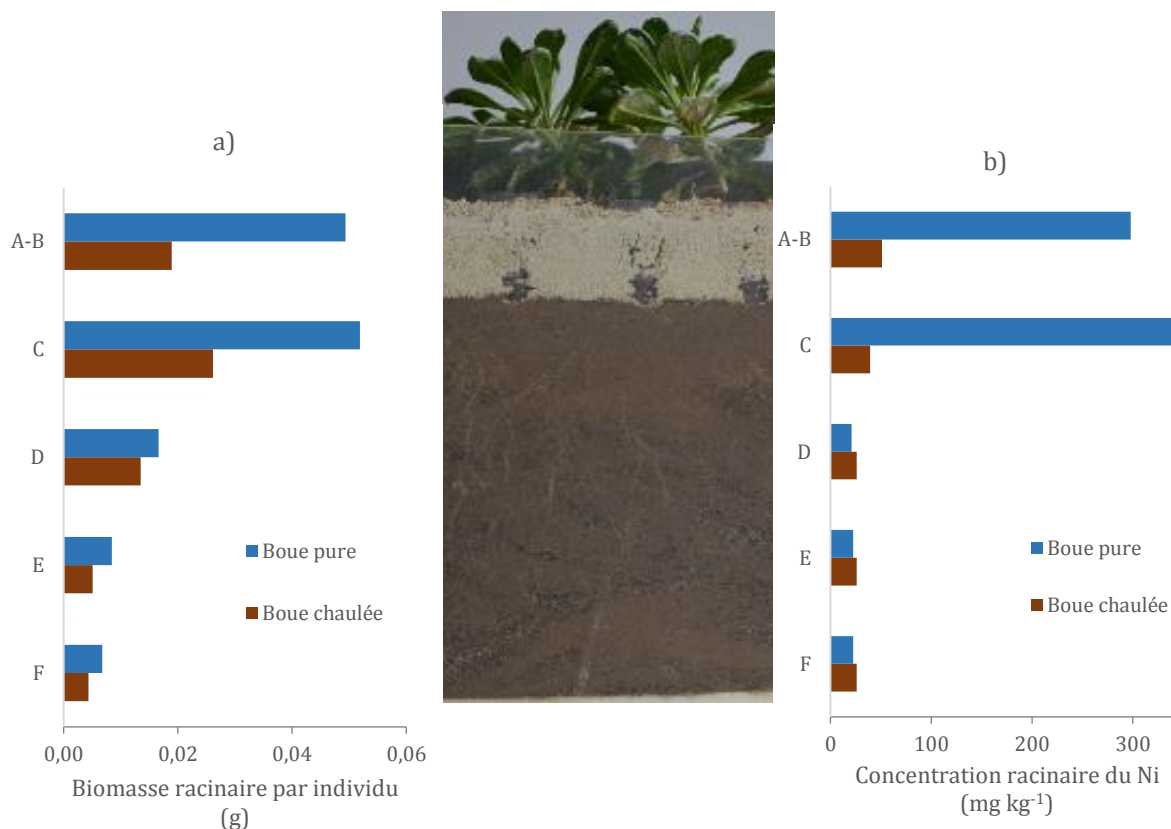


Figure 100 _ a) Biomasse racinaire par individu ; b) concentration du Ni dans les parties racinaires pour la modalité avec 6% de boue pure et la modalité avec 6% de boue chaulée, selon la profondeur. A-B : strate de boue seule, C, D, E et F : strates de mélange terreux avec F la plus inférieure.

Dans le rhizotron « boue pure », la concentration du Ni extractible au DTPA augmente de la strate A à la strate C, cette dernière est constituée initialement de terre et compost (Figure 101). En revanche, la concentration du Zn_{DTPA} décroît de A à C. Dans les trois strates inférieures (D, E, F), les deux éléments sont faiblement présents avec des concentrations de 10 mg kg⁻¹ pour Zn et 1 mg kg⁻¹ pour Ni. Dans le rhizotron « boue chaulée » (barres avec pointillés sur la Figure 101), le Zn et le Ni ont le même comportement. Ils restent principalement dans la boue (couches A et B), ne se déplaçant que faiblement dans la couche inférieure (C). La concentration du Ni_{DTPA} est supérieure à celle du Zn_{DTPA} dans la modalité boue chaulée.

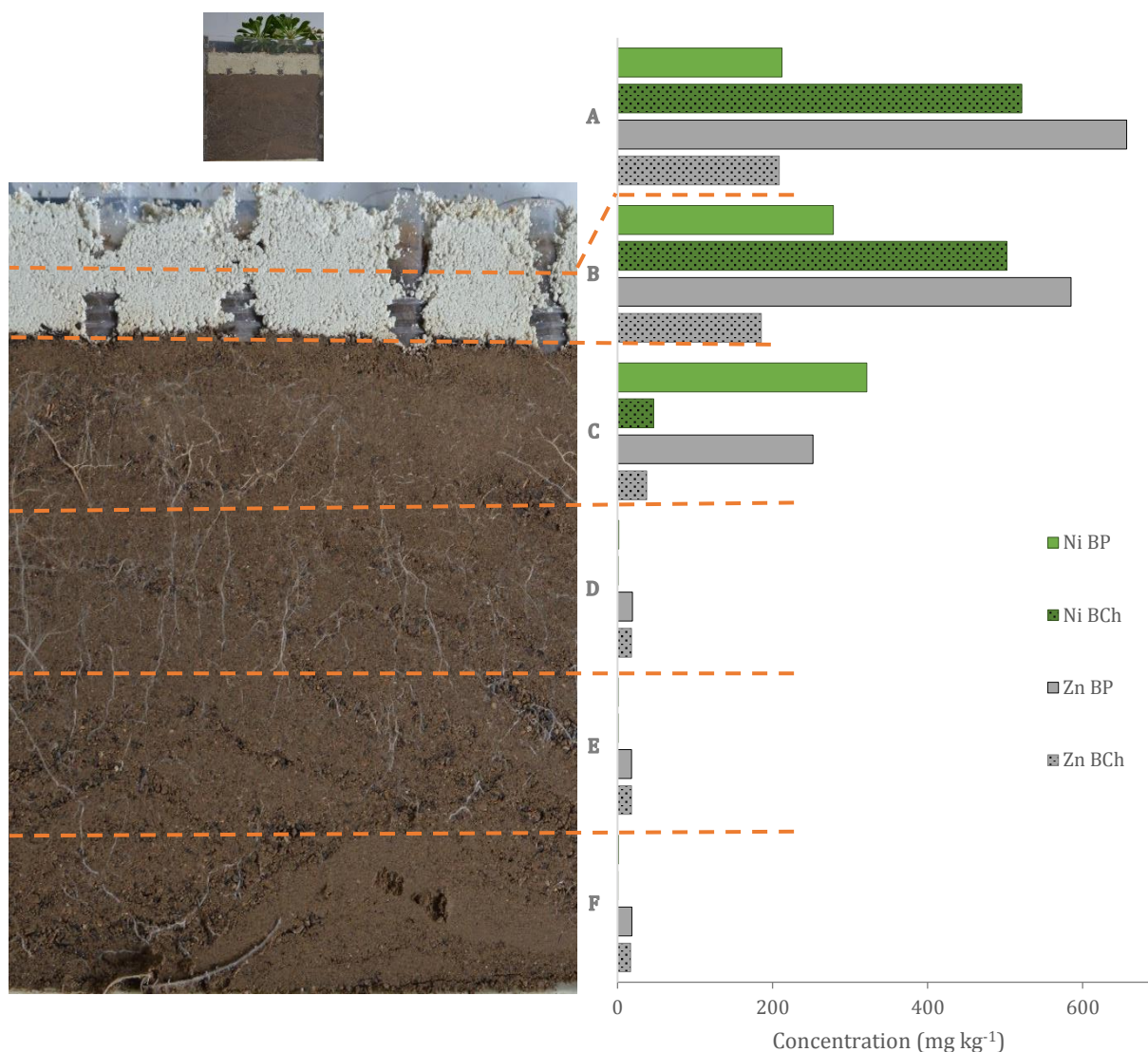


Figure 101 _ Concentration du Ni et du Zn extractible au DTPA pour la modalité avec 6% de boue pure (BP) et la modalité avec 6% de boue chaulée (BCh), selon la profondeur. A-B : strate avec boue seule, C, D, E et F : strates avec mélange terreux, F étant la plus inférieure.

4. Discussion

La mise en œuvre de l'agromine sur des matériaux industriels, comme les boues de phosphatation, nécessite de s'assurer que les hyperaccumulateurs sont capables de s'installer et de croître, de produire de la biomasse et d'accumuler les métaux d'intérêt. Par deux expériences, nous démontrons que l'hyperaccumulateur de Ni *L. emarginata* peut se développer en présence de boues métalliques. La pré-culture en tubes a permis à la plante de se développer normalement et de produire une masse importante de racines préalablement à son transfert sur un milieu contenant des boues. Mise en contact avec un substrat amendé avec des boues industrielles contenant des concentrations très élevées de métaux tels que Zn et Ni, elle survit, se développe et accumule du Ni. En fonction du mode d'agencement des matériaux pour élaborer le substrat de culture contenant des boues et de la présence ou non de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, la réponse de la plante varie, tant par la quantité de biomasse produite que celle du Ni accumulé. C'est avec un système en

couches, dans lequel la boue est répandue à la surface du sol sous la forme d'une couche avec laquelle les racines n'entrent pas en contact direct, que les performances sont les plus élevées. Lorsque la boue est mélangée aux matériaux de remplissage (terre de biopile amendée en compost), la production est plus faible. La boue disposée en couche crée donc des conditions plus favorables pour le développement de la plante que lorsque la boue est mélangée à la terre et que les racines entrent en contact direct avec les métaux.

Avec le système en tube préconisé, le développement des racines est forcé vers la couche immédiatement sous la boue. Si elles se développent mieux lorsque la boue est apportée en couche, c'est parce que les racines ne sont pas à son contact direct. Dans ce cas, les eaux de lixiviation transportent les métaux de la surface vers la zone sous-jacente où se développent les racines, amenant à des concentrations en métaux dans la solution du sol probablement non toxiques. Le Ni est plus facilement transporté que le Zn, comme l'atteste le rapport Ni/Zn dans la couche sous-jacente, plus élevé dans le système en couches que dans celui en mélange. Cette percolation sélective est due à une immobilisation supérieure du Zn que du Ni, qui est ainsi plus mobile et devient accessible aux racines. Ainsi, la compétition Ni/Zn mise en évidence par Deng *et al.* (2014) est partiellement levée au bénéfice du Ni qui est plus facilement absorbé que lorsque le Zn est présent en abondance, comme dans les systèmes en mélange.

Lorsque la boue est préalablement chaulée puis mélangée à la terre, les biomasses aériennes et racinaires sont légèrement augmentées en comparaison du même substrat non chaulé. Les extractions au DTPA mettent en évidence une diminution des concentrations disponibles du Ni et du Zn dans le mélange avec la boue chaulée par rapport au mélange non chaulé. L'ajout de chaux entraîne une augmentation du pH, ce qui peut induire une précipitation des métaux sous forme hydroxyde, et donc diminuer leur mobilité et, par conséquent, leur transfert vers la plante. Il a été démontré que le pH régissait la biodisponibilité du Ni (Echevarria *et al.* 2006). Ce comportement avait été observé aussi par Kukier et Chaney (2000), avec une diminution du transfert du Ni vers le blé et la betterave et une diminution du transfert de Zn vers l'avoine et la betterave lors de l'ajout de CaCO_3 et MgCO_3 sur des sols acides, augmentant le pH de 5,7 à 7,9. En l'absence de Ca(OH)_2 , les espèces chimiques sont transférées dans les strates inférieures par l'eau. Elles peuvent être ralenties ou arrêtées par précipitation ou adsorption à la surface des particules de terre. En effet, les faibles concentrations de Ni et Zn dans les couches inférieures du mélange terreux dans le dispositif en couches indiquent la rétention ou précipitation de ces éléments dans les premiers cm du mélange terreux.

Cependant, les concentrations du Ni et Zn mesurées, après extraction au DTPA sur la boue seule chaulée et la boue seule non chaulée, conduisent à des valeurs non cohérentes : augmentation de la concentration de Ni extrait et forte diminution de celle en Zn lors de l'ajout de chaux (alors que les concentrations pseudo totales sont stables) (Annexe 52). L'extraction DTPA est préconisée sur sol neutre à alcalin (Lindsay et Norvell 1978). Or, l'extraction sur la boue à pH 3,8 peut expliquer en partie ces résultats. Le DTPA est en sous-stœchiométrie du fait des concentrations de Ni et Zn très élevées. Donc le passage des deux éléments en solution se fait de par leur mobilité, dû au pH acide, et peu sous l'action de l'extractant. Par ailleurs, des modélisations réalisées sous JChess (version 4.0.5) indiquent que l'augmentation du pH de la suspension boue + extractant, sous l'effet de la solution de DTPA tamponnée à 7,3, peut précipiter le Zn sous forme d'hydroxyde à partir de pH 6,1, alors que le Ni précipite près d'un pH de 7,4 (dans une solution de DTPA 0,005 M) (Annexe 58). Lors d'une extraction sur la boue pure, les deux éléments sont extraits en solution. Cependant, avec la boue chaulée, le pH plus élevé dans la suspension entraîne une précipitation sélective du

Zn et pas du Ni, ce qui explique la diminution de la concentration du Zn mesurée. Cependant, sur le dispositif en couches, le pH dans la première strate sous la boue est similaire à celui de la solution d'extractant DTPA et les concentrations similaires obtenues entre le Ni et le Zn reflètent certainement la fraction phytodisponible de ces éléments. Il est nécessaire de réévaluer le choix de l'extractant pour pouvoir évaluer la disponibilité des éléments sur les différentes couches du substrat non mélangés : les différents matériaux (*e.g.* terre, compost, boue) rassemblant une très large gamme de pH. Le choix pourrait s'orienter vers une solution saline non tamponnée (Lebourg *et al.* 1996). Le dinitrate de strontium, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ (0,01 M), pourrait être envisagé. La concentration de Ni extraite est fortement corrélée avec la concentration en Ni dans les parties aériennes, lors de l'extraction sur des matrices acides et fortement concentrées en Ni, alors que ce n'est pas le cas pour le DTPA (Siebielec *et al.* 2006, 2007).

À la suite de l'installation des tubes avec plantules sur le substrat en présence de boue, des individus sont morts. Cela sous-tend l'hypothèse que parmi les individus s'étant développés sur ces matrices, il existe des génotypes différents, et certains ne survivent pas aux concentrations métalliques présentes dans le substrat. Cette observation confirme la nécessité de **sélectionner des individus** tolérants aux teneurs métalliques particulièrement élevée de ces substrats anthropiques. Ainsi, une culture sur ces matrices jusqu'au stade de maturation des graines pourrait permettre de sélectionner des individus performants pour l'agromine sur des substrats extrêmes.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, étaient étudiés deux substrats élaborés à partir d'une boue de phosphatation afin de lever le verrou lié à la toxicité et à la présence de Zn dans la matrice. Le prétraitement de la boue avec de la chaux (2,5% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (m)) a permis d'augmenter la biomasse produite et la survie des individus mais, en immobilisant les éléments dans la matrice, leur transfert est réduit et l'hyperaccumulation diminue. Dans le cas d'une disposition en surface de la boue, les racines se développent préférentiellement dans l'horizon sous-jacent à la boue où le pH est plus élevé que lorsque les matériaux sont mélangés. Les éléments de la boue sont apportés dans cet horizon par lixiviation progressive et sélective, favorisant le transport du Ni au cours des arrosages depuis la couche supérieure composée de boue seule. Dans ce dispositif, la biomasse et l'hyperaccumulation sont supérieures et le Zn est peu présent dans la plante car plus faiblement lixivié par rapport au Ni.

La disposition de la boue sous forme d'horizon supérieur présente plusieurs avantages : i) elle diminue le contact direct des racines avec la boue et donc la toxicité, ii) elle maintient les éléments d'intérêt en surface et empêche leur sortie rapide de la zone d'activité des racines par lixiviation, iii) elle est similaire à un paillage, protégeant le sol de la compaction pendant les pluies et réduisant l'évaporation. Enfin, dans un objectif d'agromine, la couche supérieure peut être apportée en plusieurs fois puis retirée pour être remplacée par de la boue « neuve » lorsque l'ensemble des éléments nutritifs et métalliques d'intérêt ont été extraits ou lixiviés, sans démanteler l'ensemble du système.

Il s'agit à présent de tester ces substrats jusqu'à la fin du cycle des plantes, la floraison, stade au cours duquel sont récoltés les individus dans le cadre des filières de l'agromine. Par ailleurs, il est nécessaire de suivre l'évolution de la biodisponibilité du Ni au cours de l'évolution du substrat

pour assurer un transfert continu vers la biomasse. Enfin, une expérimentation à l'échelle du pilote en extérieur permettrait de suivre la mobilité du Ni dans un système en couche soumis à une pluviométrie supérieure de celles des arrosages contrôlés de l'expérience précédente. Elle veillerait aussi à ce que la lixiviation des éléments de la boue n'atteigne pas de seuil toxique par l'intermédiaire de la rétention des éléments métallique sur les particules de terres lors de leur lixiviation.

Chapitre 2 :

Mise en œuvre de l'agromine à l'échelle du pilote en conditions climatiques réelles

1. Objectifs

Dans le chapitre précédent, plusieurs modalités d'agencement de matériaux ont été testées afin de déterminer les meilleures conditions pour la mise en œuvre de l'agromine sur des boues industrielles. La formule choisie consiste à disposer les matériaux en strates superposées. Avant d'envisager l'application du procédé à l'échelle de la vraie grandeur, il est nécessaire de tester l'agromine dans ces conditions à l'échelle du pilote, c'est-à-dire dans un dispositif intermédiaire entre les vases de végétation et la parcelle. Ainsi, dans le présent chapitre, il s'agit de tester, dans un dispositif pilote en bacs où les substrats sont soumis aux conditions météorologiques, le comportement de deux espèces végétales (une Brassicacée et une Astéracée) tout en contrôlant la qualité des eaux de lixiviation sortant du dispositif. Les trois substrats testés dans le chapitre précédent en conditions contrôlées sont étudiés dans les conditions du dispositif pilote. Ainsi, la boue industrielle de phosphatation, chaulée ou non chaulée, est apportée soit en mélange soit en couche de surface sur la terre. L'expérience est menée à l'aide de quantités importantes de matériaux nécessitant l'utilisation de nouveaux lots choisis pour leur proximité avec le lieu de l'expérience. De plus, un stérile de carrière sableux est apporté au mélange terre de biopile/compost afin d'améliorer les propriétés physiques du substrat.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériaux pour le remplissage des bacs

Quatre matériaux sont utilisés (cf Partie 2) :

- Terre de biopile (TB_Lot 4) (<2 cm)
- Compost de déchets verts/ boues de STEP (Lot 2) (<2 cm)
- Stérile minier (sable polypier de Jaumont) (<2 cm)
- Boue de phosphatation (Boue A_Lot 3)

Afin de se rapprocher des conditions d'une utilisation en grandeur réelle, les matériaux sont utilisés en l'état, sans séchage. La terre traitée par biopile est criblée à 2 cm. La boue est « émietlée » grossièrement à la main et séparée en deux lots, dont l'un reçoit 2,5% (m) de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. La préparation des substrats se fait en deux étapes : i) préparation du mélange terreux : 50% de stérile, 30% de biopile et 20% de compost (v) avec un mélangeur à pales, ii) pour les modalités en mélange, incorporation de la boue (pré-chaulée ou non) à la pelle dans un rapport boue/terre de 10/90 (m/m). Les bacs sont remplis avec les matériaux terreux mélangés avec la boue chaulée ou

non chaulée. Pour la modalité en couches, ils sont remplis d'abord avec le mélange terreux puis la boue est ajoutée en couche de surface.

2.2. Espèces végétales

Deux espèces d'hyperaccumulatrices sont choisies : *L. emarginata*, pour son aptitude à pousser sur le substrat élaboré avec la boue de phosphatation (Partie 5, Chapitre 1) et sa production de biomasse élevée, et *B. coddii* pour sa croissance rapide et sa floraison dès la première année après le semis (Partie 3, Chapitre 2). Les plantes sont cultivées en co-culture. *B. coddii* est récoltée à l'automne de l'année n et *L. emarginata* à l'année n+1 lors de sa floraison. Les deux populations sont retenues pour leur taux de germination élevé et pour la disponibilité de leurs graines : *L. emarginata* (Brassicacées bisannuelles, qui nécessite une vernalisation), population du Site VIII (Grèce), graines récoltées en août 2014 et *B. coddii* (Astéracées pérennes, floraison annuelle dès 6 mois) population « *Agnes mine* » (Afrique du Sud, cf Partie 2).

Les graines sont germées en boîte de Pétri puis repiquées au fur et à mesure dans des tubes en PVC de 10 cm de hauteur et de 5 cm de diamètre. Le substrat des tubes est préparé avec un mélange volumique constitué de 4/6 de terreau universel (<5 mm), 1/6 de terre de biopile (Lot 3) (2 mm) et 1/6 de terre ultramafique (2 mm). La terre de biopile est le matériau commun avec le substrat mis dans les bacs et la terre ultramafique apporte du Ni nécessaire au développement de *B. coddii*. Les plantules sont âgées de 14 semaines lors de la mise en bac.

2.3. Mélanges et remplissage des bacs

Les essais sont conduits dans des bacs de 80*60*30 cm installés sur un châssis afin d'assurer une inclinaison de 3 % pour récolter les eaux de percolation (Annexe 59). Ils sont munis à leur base d'une évacuation (maille à 2 mm). Dans chacun des bacs, sont disposés 20 L de gravier en couche drainante. Pour chacune des deux modalités en mélange, un volume de 100 L de matériaux, correspondant à 90 kg de terre et 10 kg de boue (MS) est ajoutés. Les matériaux sont apportés en trois fois et tassés légèrement. Les tubes avec les plantes sont ensuite introduits et partiellement enterrés. Pour la modalité en couches, le mélange terreux est apporté dans le bac en deux fois, de la même manière que précédemment, puis les plantes sont installées et la boue est répartie autour des tubes. Trois plants de *B. coddii* et trois plants de *L. emarginata* sont introduits par bac, en alternant les espèces au sein du bac. Après l'installation des plantes, 8,25 kg (MS) de terre de biopile sont répartis à la surface de chacun des bacs afin de recouvrir le substrat en affleurant la surface des tubes (Figure 102). Cette couverture permet d'empêcher l'envol des particules de boue et d'assurer un albédo homogène pour tous les bacs.



Figure 102 _ Photographies des étapes de remplissage des bacs lysimétriques. a) Remplissage avec le mélange terre/boue, b) Installation des plantes sur la terre, c) Répartition de la boue autour des plantules et d) Installation de la couverture de terre de biopile

Les analyses de sol sur la fraction inférieure à 2 mm indiquent un pH_{eau} de 6,6 sur le substrat élaboré avec la boue pure en mélange et 6,7 sur le mélange élaboré avec la boue chaulée, alors que le mélange sans boue (stérile/biopile/compost) a un pH de 8. La concentration de P_2O_5 (Olsen) est proche de 1 g kg^{-1} dans les mélanges avec la boue. La concentration de K_2O est de $0,15 \text{ g kg}^{-1}$ dans le mélange avec boue. Pour MgO , les concentrations sont proches de $0,4 \text{ g kg}^{-1}$. La concentration du Ni_{DTPA} est comprise entre 125 et 140 mg kg^{-1} et pour le Zn entre 175 et 210 mg kg^{-1} en présence de boue, avec des concentrations plus élevées dans le mélange avec la boue chaulée, certainement dû à l'hétérogénéité du matériau (Annexe 60).

B. coddii est récoltée après 90 j de culture, les parties aériennes sont coupées au collet, pesées, séchées et analysées. *L. emarginata* sera récoltée au printemps de l'année n+1. Après chaque épisode pluvieux, s'il y a au moins 200 mm de liquide dans les bonbonnes de récupération, ce volume est prélevé et analysé (masse de liquide, pH, conductivité, potentiel redox, absorbance à 254 nm, matière en suspension, anions (chromatographie ionique), éléments majeurs et éléments traces (ICP-OES) ainsi que carbone et azote dissous (COT-N mètre)). À chaque date de prélèvement, un code sous forme de lettre (à partir de « a ») est attribué à la série de lixiviats obtenue.

3. Résultats

3.1. Développement des végétaux

L. emarginata a un taux de survie supérieure à *B. coddii* (en pointillés sur Figure 103). L'espèce montre un développement plus élevé sur le substrat avec la boue pure en mélange (MBP). Dans le cas de *B. coddii*, le substrat qui permet le meilleur taux de survie est celui avec la boue pure en couche (CBP). En moyenne, ce substrat en couche donne le meilleur taux de survie, toutes espèces confondues.

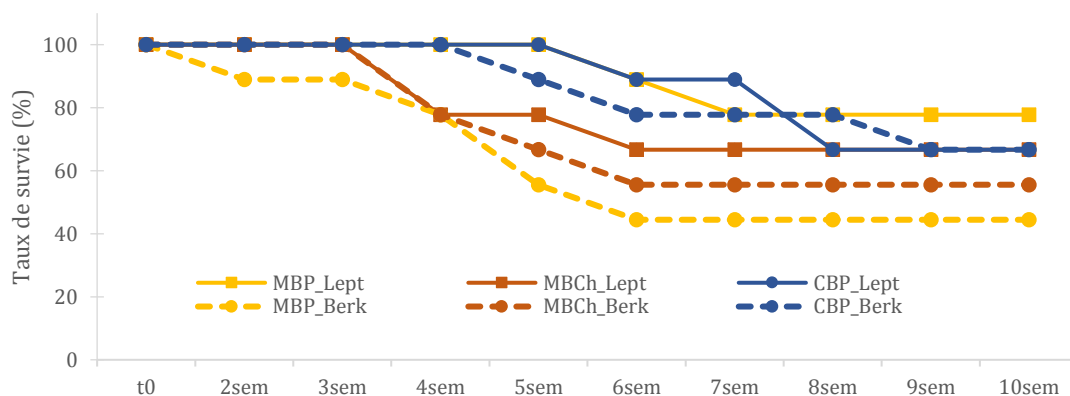


Figure 103_ Survie de *L. emarginata* et *B. coddii* sur les substrats élaborés N=3, MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure, Lept : *L. emarginata* et Berk : *B. coddii*

3.2. Concentration dans les parties aériennes de *B. coddii*

La concentration du Ni dans les parties aériennes est significativement supérieure sur CBP (Figure 104) que sur les systèmes en mélange (six fois plus élevée que le témoin MBP et cinq fois plus que la modalité chaulée, MBCh). La concentration du Zn n'est pas différente entre les trois modalités : la concentration tend à être plus élevée sur MBP et plus faible sur CBP, respectivement 420 et 260 mg kg^{-1} . Ainsi, le rapport Ni/Zn est de 0,56 sur MBP, 0,89 sur MBCh et 5,5 sur CBP.

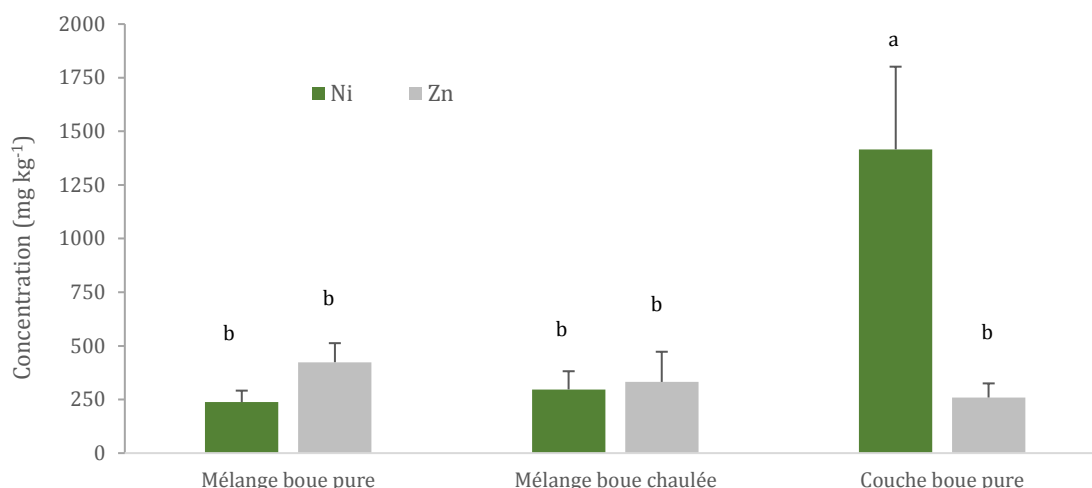


Figure 104 _ Concentration en Zn et Ni dans les parties aériennes de *B. coddii* après trois mois de culture sur les substrats élaborés MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure. Les barres verticales indiquent les écarts-types, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), $N=3$.

Des plantes, issues de tubes non installés dans les bacs et dont la croissance a duré le même temps (90 j) que dans les bacs, sont analysées pour s'assurer que le Ni transféré dans les parties aériennes des plantes en bac provient du substrat élaboré et non du mélange terreux utilisé pour le semis (contenant de la terre ultramafique) (Annexe 61). La concentration du Ca est de 4,5% dans les PA de *B. coddii* sur MBP et MBCh alors qu'elle est de 3,5% sur CBP (Figure 105). *B. coddii* contient moins de 1% de K sur MBP et MBCh mais 1,6% sur CBP. La concentration du P est de 1% mais est plus élevée sur MBP. Les concentrations en Na sont faibles sauf sur CBP où les plantes ont 0,6% de Na. Les concentrations en Mg et S sont de 0,4%. Enfin, les concentrations en Al, Fe et Mn sont inférieures à 0,3% mais plus élevées sur MBP et plus faibles sur CBP.

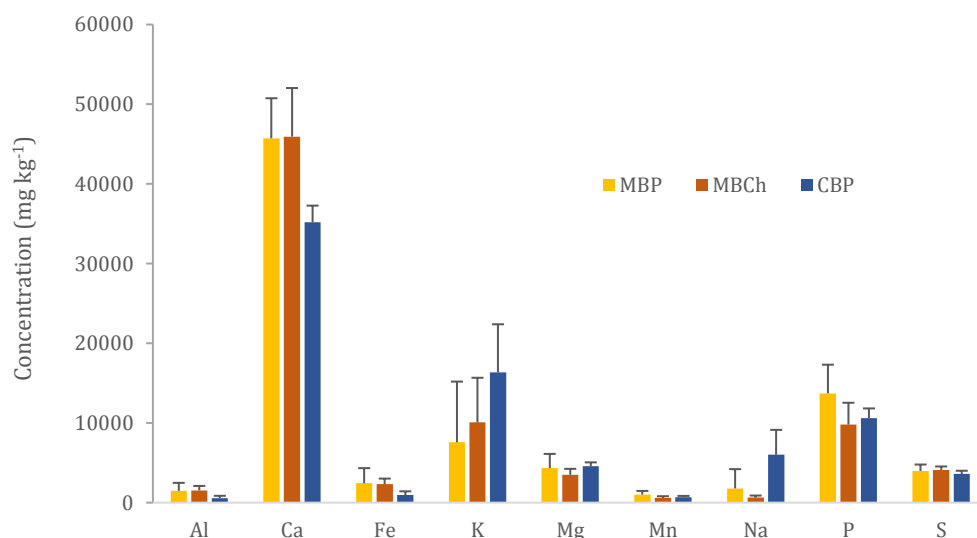


Figure 105 _ Composition des parties aériennes de *B. coddii* selon le substrat de culture MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure, $N=3$

3.3. Analyses des lixiviats

Le pH des lixiviats est le plus acide pour MBP et le plus alcalin pour CBP (Figure 106). Au cours du premier mois, il augmente pour ces deux modalités avant de se stabiliser et diminuer légèrement. Sur la modalité MBCh, il reste intermédiaire entre les deux autres et évolue peu. La conductivité des lixiviats a tendance à diminuer, surtout le premier mois (Figure 107). Elle est plus élevée généralement sur MBCh. Elle est la plus faible sur MBP ou CBP selon le prélèvement considéré. La concentration en Ni est très élevée sur MBP et, dans une moindre mesure, sur MBCh lors du premier prélèvement. Puis, elle diminue très rapidement pour être sept fois inférieure au premier prélèvement après 1 mois de culture (Figure 108). Sur CBP, la concentration est quasiment nulle pour tous les prélèvements. La concentration du Zn est très élevée sur MBP et diminue rapidement lors des premiers prélèvements, comme le Ni (Figure 109). Cependant, pour la modalité MBCh, le Zn se comporte différemment du Ni : sa concentration est très faible au cours du premier mois puis augmente dans les prélèvements suivants et devient supérieure à celle dosée pour les mêmes prélèvements dans MBP. Dans le cas de CBP, les concentrations du Zn et du Ni sont quasiment nulles.

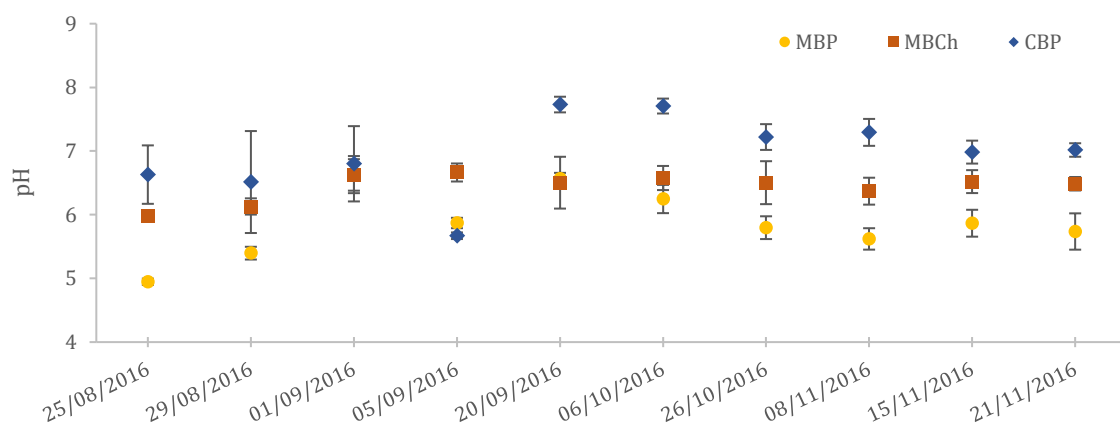


Figure 106 _ pH des lixiviats des trois substrats au cours des trois premiers mois. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure

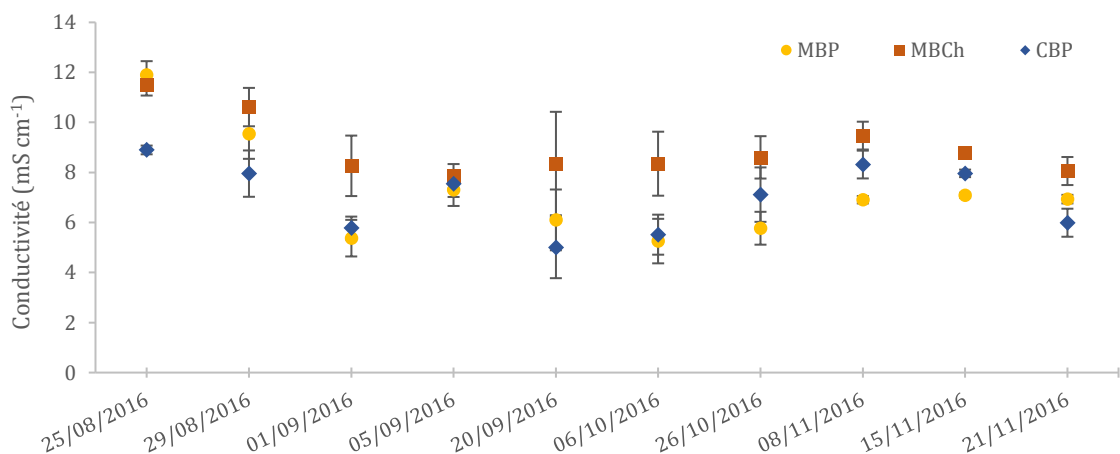


Figure 107 _ Évolution de la conductivité électrique des lixiviats des trois substrats au cours des trois premiers mois. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure

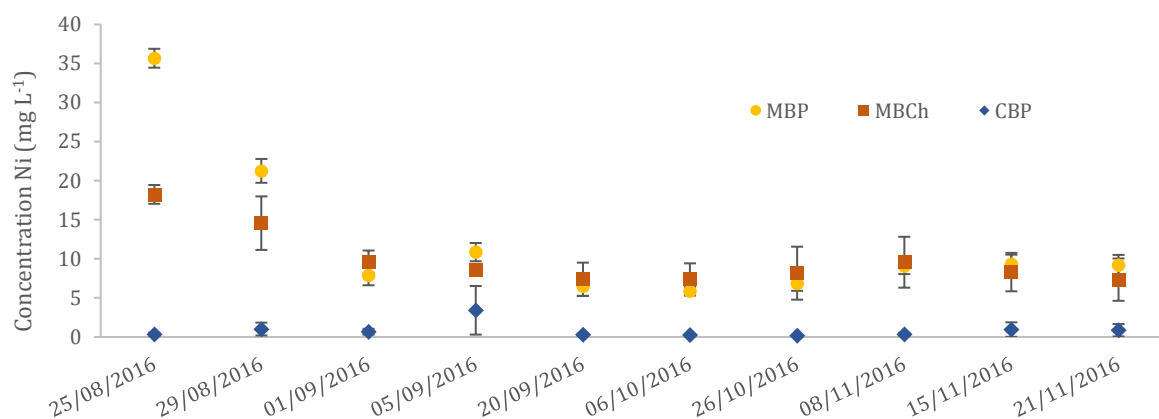


Figure 108_ Concentration du Ni dans les lixiviats sur les trois substrats au cours des trois premiers mois. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure

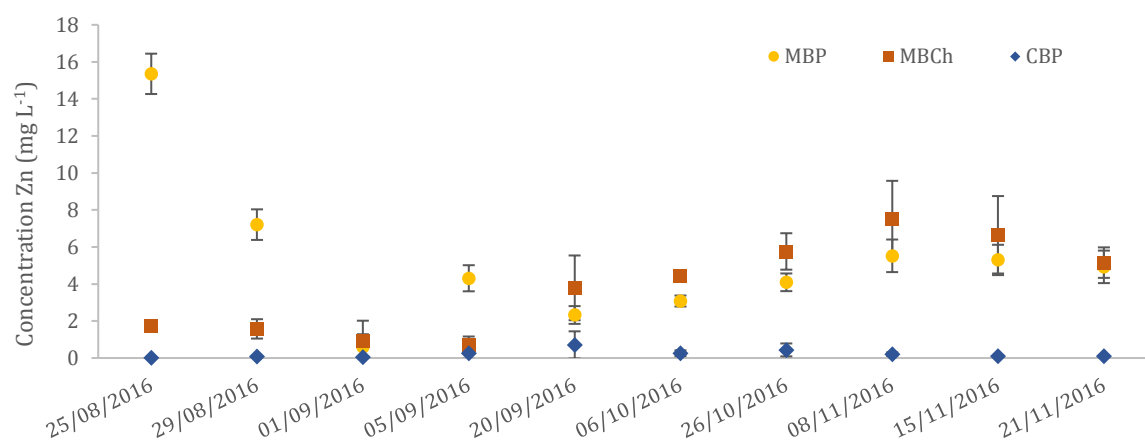


Figure 109_ Concentration du Zn dans les lixiviats sur les trois substrats au cours des trois premiers mois. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure

Une analyse en composantes principales des paramètres mesurés au cours des prélèvements successifs a été effectuée. MBP est caractérisé par des lixiviats concentrés en Ni, Mn, Zn et P et un pH faible (corrélation négative) (Figure 110). En revanche, MBCh est caractérisé par des concentrations élevées en Mg, Ca et N dans les lixiviats ainsi que par une conductivité supérieure à celle des autres substrats. CBP présente les teneurs les plus élevées en Na, S, K, Cl⁻ et C organique. Les corrélations entre paramètres sont présentées dans la matrice de corrélation (Annexe 62a). En détaillant les prélèvements selon leur date (Annexe 62b), il s'avère que les valeurs au cours du temps se déplacent vers les abscisses positives, indiquant que la composition des lixiviats de CBP se rapprochent de ceux de MBP et que, par ailleurs, ceux de MBP et MBCh convergent. Ainsi, la divergence de composition entre les trois modalités s'estompe.

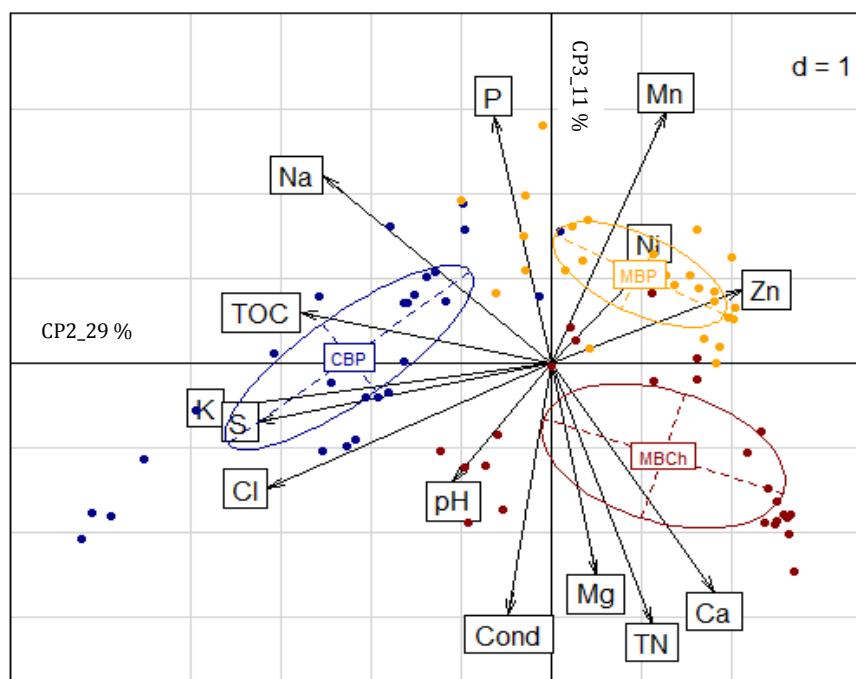


Figure 110 _ Analyse en composantes principales des paramètres mesurés dans les lixiviats sur les trois substrats dans le plan 2-3. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure, CP2 et CP3 : respectivement 29 et 11% de la variabilité totale, éléments mesurés en solution : Na, P, Mn, Ni, Zn, Ca, Mg, S, K, ainsi que Cl, pH, conductivité (Cond), azote totale (TN) et carbone organique total (TOC), pour les séries a, b, d, e, f, g, h, i, j.

3.4. Flux d'éléments dans les eaux de percolation

Le Ca est l'élément dominant dans les lixiviats. Sa concentration est plus élevée sur MBCh que MBP. Sur CBP, elle est divisée par deux par rapport à MBCh (Figure 111). La substrat CBP libère plus de K, Na et S que les autres modalités. Les quatre éléments prédominants dans la boue : Ni, Zn, Mn et P sont retrouvés principalement dans la modalité MBP (Figure 112). Sur MBCh, ces éléments sont dans des concentrations moindres que MBP. Enfin, sur CBP, seulement du P est mesuré. Les quantités de Fe sont extrêmement faibles dans les eaux, de l'ordre de la centaine de µg à l'issue des trois premiers mois. Cependant, sa concentration est six fois plus élevée sur CBP que MBCh.

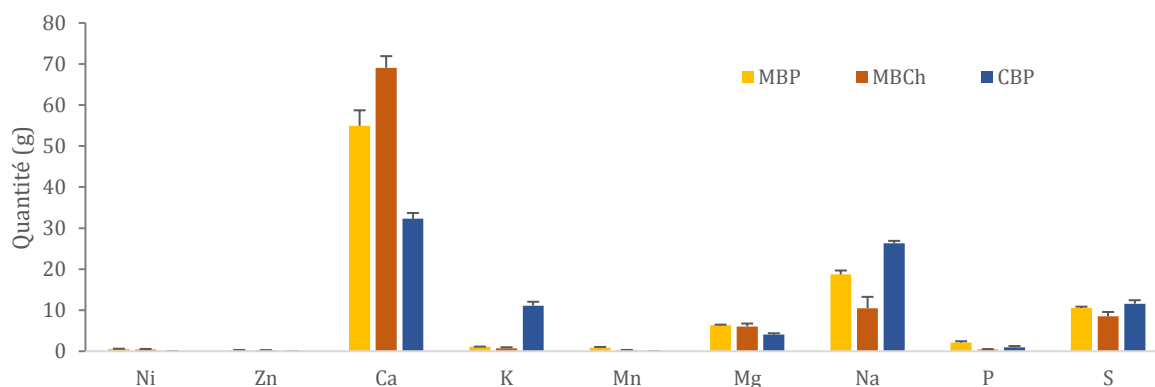


Figure 111 _ Masse cumulée d'éléments dans les lixiviats à l'issue des trois premiers mois de culture sur les trois substrats. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure

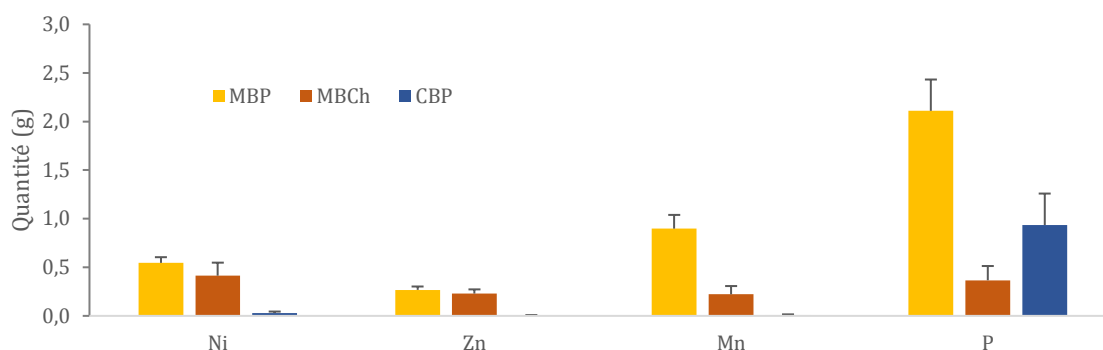


Figure 112 _ Masse cumulée du Ni, Zn, Mn et P dans les lixiviats à l'issue des trois premiers mois de culture sur les trois substrats. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure

3.5. Relations entre la composition des plantes et celle des eaux

Une analyse en composantes principales est effectuée à partir des quantités totales d'éléments retrouvés dans les lixiviats (élément suivi de la lettre « Q ») et de leurs concentrations élémentaires dans les parties aériennes de *B. coddii* (élément suivi des lettres « PA ») (Figure 113). La modalité en couche, CBP, montre les plus fortes concentrations de Na et Ni dans les PA et la quantité la plus élevée de K dans les eaux. La modalité MBP conduit à des concentrations aériennes élevées de Mn, Zn et P ainsi que des quantités élevées de Mn et P dans les eaux. La modalité MBCh est caractérisée par une grande quantité de Ca dans les eaux. Les concentrations de Ca et Fe dans les PA sont élevées dans les individus développés sur les modalités en mélange. Avec ces modalités, les lixiviats présentent des quantités élevées de Ni et Mg en comparaison à CBP. Par ailleurs, ces paramètres sont négativement corrélés avec ceux de CBP. De même, SQ et NaQ caractérisent MBP et CBP. Enfin, K dans les parties aériennes, est inférieur sur MBP par rapport aux deux autres substrats. La matrice de corrélation est présentée en Annexe 63.

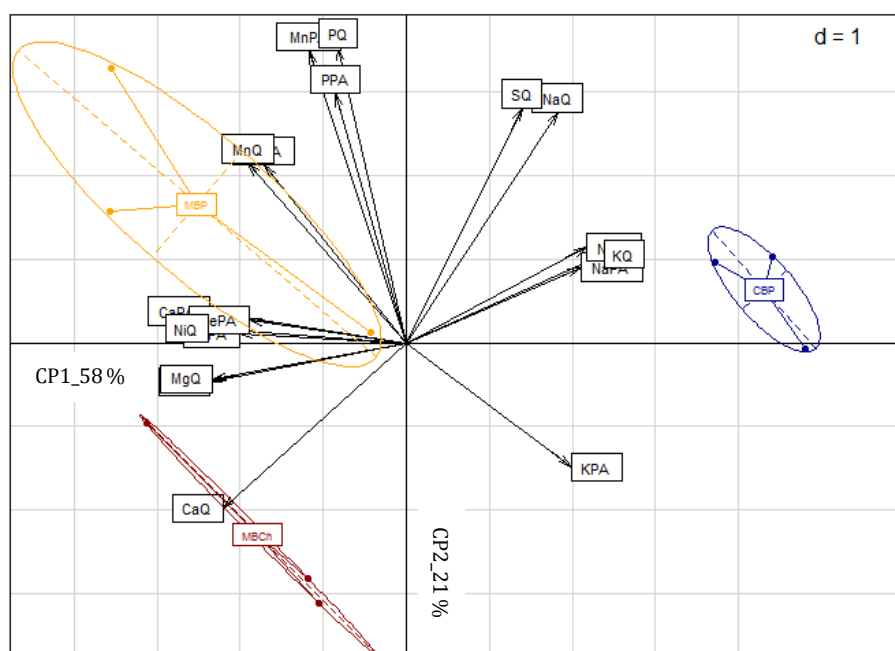


Figure 113 _ Analyse en composantes principales à partir des quantités d'éléments cumulées dans les lixiviats (QX) au cours des prélèvements sur trois mois et les concentrations dosées dans les parties aériennes (XPA), dans le plan 1-2.

3.6. Bilan de matière

Après trois mois d'expérience, les masses d'éléments collectées dans les lixiviats sont supérieures à celles prélevées par les plantes (Figure 114). Les plantes extraient dix fois plus de Ni sur CBP, et c'est par ailleurs la modalité sur laquelle la lixiviation du Ni dans les eaux est vingt fois inférieures à la modalité MBP. Cependant, les données sont insuffisantes pour évaluer le rendement de Ni qui peut être extrait par les plantes sur un cycle de développement complet.

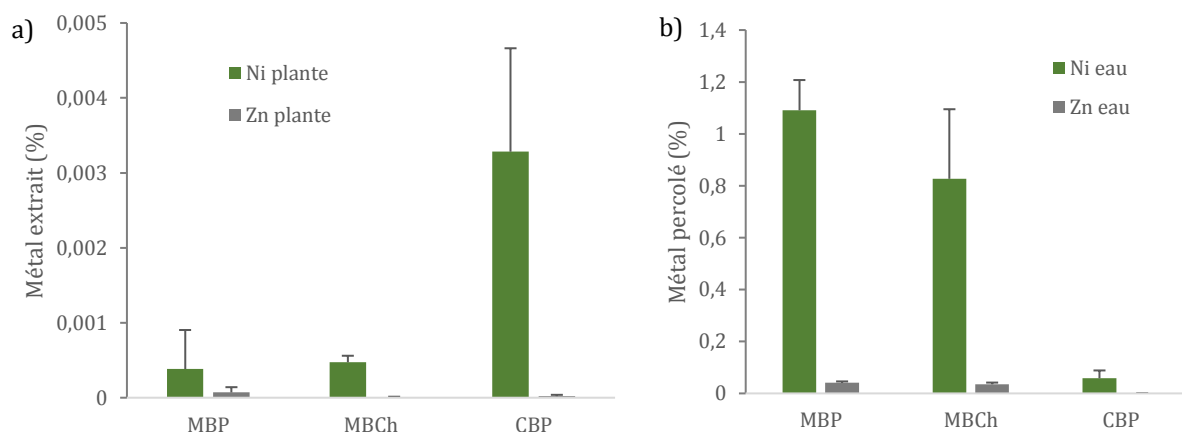


Figure 114 _ Ni et Zn a) extraits par *B. coddii* et b) cumulés dans les lixiviats après trois mois de culture. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Au cours des trois premiers mois, les bacs ont reçu chacun 102 L d'eau, 50 L d'eau du robinet et 52 L par la pluie (cf leur composition en Annexe 3). Les éléments apportés par l'eau de pluie sont négligeables (inférieures à 0,05 g par bac pour trois mois, sauf le Ca : 0,11 g) et 50 L d'eau du robinet apportent 4,6 g Ca, 1 g Mg, 0,95 g Na et 2,2 g de S. Au début de l'expérimentation, les matériaux apportés étaient humides, apportant ainsi 25 kg d'eau dans chaque bac. Donc, au cours des trois premiers mois d'expérimentation, 127 L d'eau ont été apportés sur chacun des bacs et 46, 45 et 40 L ont été collectés en moyenne pour les modalités respectivement MBP, MBCh et CBP. Les données d'évaporation ne sont pas disponibles.

L'apport de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ par bac est de 2,5% (m) de la masse de boue (10 kg MS par bac) donc 0,25 kg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, soit $(250 \times 40,1) / 74,1 = 135$ g de Ca par bac pour les trois répétitions de la modalité MBCh. Cet apport de Ca est négligeable au vu de la quantité totale de Ca par bac, près de 10 à 15 kg. Cependant, les lixiviats de cette modalité sont plus chargés en Ca que les autres car le Ca apporté sous forme de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ est plus lixiviable que celui présent dans les matériaux. MBCh libère 70 g de Ca au cours des trois premiers mois, soit la moitié du Ca ajouté.

Il est possible d'estimer le nombre d'années nécessaire à l'épuisement du Ni contenu dans le substrat en utilisant le rendement de phytoextraction obtenu sur site ultramafique (120 kg de Ni par ha par récolte ; Bani *et al.* (2009), en faisant l'hypothèse que l'optimisation en bacs permet d'atteindre ce rendement. Ainsi, avec un bac de 0,48 m² de surface (60*80 cm), une récolte extrait $120\,000 \times 0,48 / 10\,000 = 5,76$ g de Ni. Comme chaque bac contient 50 g de Ni, il faudrait $50 / 5,76 = 8,68$ récoltes, soit environ neuf années pour épuiser le Ni d'un bac. Pour cela, les plantes devraient extraire 10 % du Ni total par an. Or, elles ont extrait 0,003 % dans le meilleur des cas, avec la modalité CBP. Aussi, cela démontre que les conditions optimales sont loin d'être établies. En particulier, il est nécessaire de conduire la culture jusqu'à la floraison des plantes pour

augmenter le rendement de Ni de ce substrat. D'autres facteurs sont aussi à prendre en compte, comme la densité de plantation, la fertilisation, et la sélection d'individus plus performants.

4. Conclusion

La modalité en couches se distingue des modalités en mélange par le fait que la boue est en surface, et donc la couche de terre sous-jacente retient les éléments lixiviés, du fait d'un pH proche de la neutralité. Dans les substrats en mélange, dans les premières semaines, les relargages des éléments apportés par la boue (Ni, Zn) étaient élevés avec la boue pure et dans une moindre mesure avec la boue chaulée. Néanmoins, dans ces substrats, la concentration des métaux dans la solution diminue au cours du temps, pour se stabiliser, deux mois après la mise en place, dans un ordre de grandeur similaire à celui de la modalité en couches. Cette diminution conduit à confirmer la nécessité d'une stabilisation chimique nécessaire lors de la mise en place d'un mélange de matériaux, car un important lessivage se produit les premiers temps (Séré *et al.* 2010; Huot *et al.* 2014; Almendro-Candel *et al.* 2014; Kansa 2016).

La difficulté de *B. coddii* à s'installer sur ce substrat extrême peut être liée aux conditions climatiques. Elles ont été exposées à des températures basses à un stade précoce de développement, même si elles peuvent supporter des températures de -4°C (Robinson *et al.* 1997a). Elle peut aussi souffrir d'être cultivée dans un environnement qui n'est pas son habitat natif.

L'utilisation de Ca(OH)_2 dans la modalité en mélange ne permet pas d'améliorer la phytoextraction du Ni car la chaux contribue à diminuer la mobilité de Zn et Ni. Le rapport Ni/Zn au contact des racines reste constant. En revanche, dans la modalité en couches, le rapport Ni/Zn est en faveur du Ni dans la couche de croissance des racines, sous-jacente à la boue. Ainsi, avec cette modalité, le développement des plantes et la phytoextraction du Ni sont plus élevés. Le substrat inférieur à la couche de boue fournit alors les nutriments à la plante, par la présence de compost et une structure drainante due au stérile. La compétition entre le Ni et le Zn est réduite. Cette formulation améliore donc les propriétés de la terre traitée qui ne permet pas seule de remplir toutes les fonctions attendues.

En résumé, dans ce chapitre, nous avons démontré la faisabilité de la culture d'hyperaccumulateur de Ni à une échelle intermédiaire entre les expériences en conditions contrôlées (présentées dans les chapitres précédents) et la parcelle (objectif *in fine*). L'optimisation de la formulation du substrat semble satisfaire les exigences de culture des plantes en l'absence de symptôme de carence.

Conclusion générale

L'application de l'agromine à des matériaux industriels repose sur notre capacité à créer des conditions favorables à la croissance et au développement des plantes hyperaccumulatrices. Dans le contexte de l'économie circulaire, ces matériaux, souvent délaissés et confinés, constituent une source d'éléments métalliques qui pourraient être récupérés par des plantes hyperaccumulatrices et réintroduits dans les chaînes de production. Mais ils sont très particuliers du point de vue de leur fertilité : fortes concentrations en métaux (*e.g.* Ni, Zn, Fe, Mn), pH très bas ou, au contraire, très élevé, forte salinité et quasi absence de matière organique et offrent des propriétés physico-chimiques qui s'opposent à l'installation de végétaux et de la vie en général. Si un premier défi a été relevé, qui a permis de mettre en place l'agromine du Ni sur les sols ultramafiques, pourtant peu propices à l'installation des végétaux (Bani *et al.* 2007), le défi d'étendre l'agromine à des matériaux industriels est d'une autre dimension. Pour créer les conditions de croissance des hyperaccumulateurs et d'extraction des métaux il est nécessaire de lever plusieurs verrous importants. De par leurs caractéristiques, les matériaux industriels exercent généralement une forte toxicité vis-à-vis des plantes. La composition en éléments nutritifs ne répond pas nécessairement aux besoins des plantes. Les propriétés physiques du matériau peuvent aussi s'opposer au développement des racines et à la fourniture de l'eau. De plus, la multi-contamination peut limiter l'hyperaccumulation du fait d'une compétition entre éléments (*e.g.* Ni et Zn) pour l'absorption par la plante. L'enjeu est donc d'imaginer puis d'élaborer des substrats à partir des matériaux industriels qui rendent possible la croissance et le développement d'hyperaccumulateurs tout en assurant un rendement optimum de l'agromine. Un défi supplémentaire est de construire des substrats de croissance à partir de matériaux industriels en combinaison avec d'autres matériaux délaissés, choisis pour leur capacité à améliorer les conditions d'installation et de développement des plantes (*e.g.* terre industrielle traitée, déchets urbains).

Dans le but de démontrer la faisabilité de l'agromine à des matériaux, qui pourraient être qualifiés d'extrêmes du point de vue de la croissance et du développement des végétaux, y compris des végétaux tolérants comme les hyperaccumulateurs, nous avons choisi une boue de phosphatation acide et polymétallique contenant du Ni. Elle a été associée à plusieurs matériaux terreux et organiques afin d'élaborer un substrat favorable pour la culture d'hyperaccumulateurs. La thèse a été construite afin de tester une gamme de procédés pour lever les verrous liés à la toxicité de la matrice et aux propriétés physico-chimiques défavorables. Tout d'abord, nous avons procédé à la sélection d'hyperaccumulateurs, en s'appuyant sur la variabilité existant entre les populations d'une même espèce, puis par l'application du génie pédologique, nous avons recherché les meilleures conditions de croissance des plantes et d'extraction des métaux par l'assemblage d'amendements et par l'agencement des matériaux au sein du profil ainsi construit.

1. Comportement des hyperaccumulateurs en culture sur des boues industrielles métalliques

L'agromine sur des matrices extrêmes, modifiées par l'élaboration de substrats à partir de matériaux délaissés, a posé plusieurs questions auxquelles nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse. Elles concernent, d'une part, le comportement des plantes hyperaccumulatrices vis-à-vis de ces substrats très stressants et, d'autre part, les mécanismes régissant le prélèvement des métaux sur ces milieux particuliers.

La culture de plantes hyperaccumulatrices sur des sous-produits métalliques industriels est-elle envisageable ? Nos essais ont montré que la croissance d'hyperaccumulateurs de Ni, *A. murale*, *L. emarginata* et *B. coddii*, directement sur la boue métallique de phosphatation seule n'est pas possible. Cependant, nous avons démontré que les plantes peuvent se développer dès lors que les boues sont mises en mélange avec d'autres matériaux. Des substrats élaborés à partir d'un mélange boue/terre dans un rapport 10/90 (m/m), dans lequel la terre est constituée de plusieurs matériaux (terre traitée par biopile, stérile de carrière et compost), a permis de constituer un substrat fertile où les hyperaccumulateurs se développent et produisent une biomasse supérieure en comparaison de cultures conduites sur de la terre ultramafique. La présence de 10% de boue métallique assure le développement du plus grand nombre de plantes. Un rapport supérieur provoque une toxicité élevée avec de nombreuses chloroses et nécroses. À noter que 10% de boue en masse représentent environ 30% en volume dans le mélange, ce qui donne à la boue une place importante dans le mélange.

Les plantes hyperaccumulatrices peuvent-elle absorber et accumuler les métaux contenus dans des sous-produits métalliques industriels ? Nos essais conduits en vases de végétation ont montré que les concentrations du Ni retrouvées dans les parties aériennes des espèces hyperaccumulatrices cultivées sur les substrats oscillent entre 1 400 et 2 700 mg Ni kg⁻¹ (MS) selon l'espèce et l'expérience. Ces concentrations sont inférieures à celle trouvées dans la littérature pour ces mêmes espèces, qui peuvent contenir 2% de Ni. Mais, menées sur une période trois mois, alors que les plantes sont toujours au stade végétatif, nos expériences ne reflètent pas totalement le potentiel des plantes et de la matrice, qui s'exprime en particulier lors de la floraison. Nous avons aussi confirmé l'intérêt de l'utilisation du biochar en tant qu'amendement sur matériaux contenant de fortes concentrations en métaux. Pour un même temps de culture, en présence de 3 et 5% de biochar, l'extraction du Ni est supérieure au sol ultramafique non amendé.

Quelle(s) stratégie(s) mettre en place pour limiter la compétition d'autres éléments métalliques avec le Ni ? Nous avons émis l'hypothèse que la capacité limitée de la matrice élaborée pourrait être due à la présence de co-contaminant, *e.g.* Zn, qui interagit fortement avec le Ni pour l'absorption par les racines et limite la translocation du Ni dans la plante (Deng *et al.* 2014). Le pH acide de la boue (pH 3,8) induit une forte disponibilité des éléments métalliques dans le substrat élaboré avec la terre de biopile (pH 6,5). La compétition avec le Zn (6% dans la boue) est un obstacle à l'hyperaccumulation du Ni dans les hyperaccumulateurs testés : *A. murale*, *L. emarginata* et *B. coddii*. Cette compétition a aussi été observée pour le Ni et le Co dans *C. thracica* et *B. coddii* sur un sol (pH 6,0) amendé en sels de Ni et Co. Dans la mesure où ces éléments, Co ou Zn, sont présents à des concentrations proches de celles du Ni, le potentiel de phytoextraction du Ni est alors fortement diminué. Cette compétition est due aux similarités chimiques de ces éléments, qui peuvent être absorbés par les mêmes voies par les racines. Cette compétition peut

néanmoins être levée en partie par l'augmentation du pH. Le Zn et le Co précipitent à un pH inférieur (de moins d'une unité) à celui du Ni. Nous avons alors agi sur le mode d'agencement des matériaux au sein du substrat, par la constitution de couches au sein du substrat. Dans le **cas du Zn**, la disposition en surface de la boue plutôt qu'en mélange a permis d'augmenter de 2,7 à 6 fois les rendements en Ni selon l'espèce. Cet arrangement a conduit les racines à se développer dans un substrat à pH plus élevé dans lequel, lors de la lixiviation progressive depuis la couche de boue, le Zn est d'avantage immobilisé que le Ni et donc moins transféré dans la plante. Dans le **cas du Co**, en présence de concentrations élevées de Ni et Co, nous avons observé que le transfert du Ni est perturbé, mais que le Co est transféré dans les parties aériennes de la même façon en présence ou en absence de Ni. Si l'objectif est l'agromine du Ni, afin d'optimiser son hyperaccumulation, il est donc souhaitable d'éviter la présence de Co dans la matrice ; ou alors il est nécessaire d'identifier des hyperaccumulateurs de Ni non sensibles à la présence de Co. Il est indispensable d'étudier les mécanismes de prélèvement et de transport du Co dans les hyperaccumulateurs pour mieux comprendre son interaction avec le Ni. Co est un métal stratégique et des recherches doivent être faites pour mettre au point des méthodes de sa récupération. Par ailleurs, des études menées avec une gamme de pH variant de 6 à 7, en présence de Ni, Co et Zn, sont nécessaires pour permettre d'identifier les conditions favorables à la récupération de ces métaux séparément sur des matrices multicontaminées.

2. Potentiel de l'agromine sur des boues industrielles métalliques

La modification des boues industrielles métalliques par l'apport d'amendements choisis pour leur action sur l'état chimique des métaux, la fertilité physique et chimique du milieu et la croissance et le développement des hyperaccumulateurs a permis d'apporter les éclairages suivants, dans l'optique de développer l'agromine sur des matériaux non conventionnels d'un point de vue agricole, comme des boues industrielles métalliques.

Effet des amendements sur la disponibilité des métaux dans le substrat. La présence de **biochar** lève partiellement l'inhibition de la germination engendrée par la boue métallique. L'apport de biochar permet aussi d'augmenter la biomasse produite par *A. murale* sur le substrat élaboré ainsi que sur le sol ultramafique. Introduit à raison de 3 et 5%, le biochar provoque une diminution de la concentration du Ni dans *A. murale* sur le sol ultramafique. Par contre, sur le substrat élaboré, il n'engendre pas de modification de la concentration du Ni mais la quantité de Ni extraite est significativement supérieure par son effet sur la biomasse produite. L'effet améliorant du biochar vis-à-vis de l'accumulation du Ni est dû i) à l'augmentation du pH qui s'accompagne d'une légère immobilisation du Zn, dont l'effet phytotoxique est diminué et l'entrée dans les racines est réduite alors qu'elle est peu modifiée pour le Ni (un apport de 3% (m) est suffisant pour augmenter significativement l'extraction) et ii) à l'augmentation de la surface racinaire, qui a été observée dans le cas du sol ultramafique (non testée sur le substrat élaboré) en présence de biochar. Ainsi, le biochar améliore drastiquement les rendements sur sol ultramafique dès 1% (m) d'application. En ce qui concerne l'utilisation de **Ca(OH)₂**, si nous avons noté une augmentation légère du pH, cet amendement ne permet pas d'améliorer l'extraction du Ni. Celle-ci est même diminuée significativement dans *L. emarginata*. Aux doses testées, l'utilisation de chaux ne lève pas la compétition Ni-Zn. Ainsi, avec un apport de 3% (m) le biochar est plus favorable que l'ajout de 2,5% de Ca(OH)₂.

Avec un apport de 5% de biochar la longueur et la biomasse racinaire d'*A. murale* augmentent, probablement en raison de la diminution de la toxicité due aux métaux (Rees *et al.* 2016). La surface d'échange entre le sol et les racines, donc le prélèvement des éléments nutritifs, augmente. En conséquence, la biomasse et la phytoextraction du Ni s'accroissent. Sur le sol ultramafique la forte prospection peut être due à la nécessité de prélever des nutriments peu disponibles et il en résulte un prélèvement du Ni élevé. Sur le substrat élaboré, la croissance racinaire limitée peut s'expliquer par l'abondance de nutriments et par la toxicité induite par les concentrations métalliques élevées.

Évolution de la matrice et de la disponibilité des métaux. Les technosols sont des sols marqués par une hétérogénéité élevée et une évolution rapide (Séré 2007; Huot 2013). Ici, le substrat élaboré est assimilé à un technosol. Même s'il n'est constitué que d'un seul horizon de croissance, le mélange des matériaux présente cependant une forte hétérogénéité. Celle-ci est mise en évidence par la difficulté d'obtenir une analyse représentative. Elle est due en partie aux différentes granulométries des matériaux. La caractérisation du substrat à l'échelle de l'agrégat pourrait permettre de suivre l'évolution de la boue dans le mélange et son association aux autres matériaux et de prévoir l'évolution de la disponibilité. Il faut souligner que les expériences ont été conduites sur quelques mois, en-deçà du cycle complet de développement des plantes. Il est envisageable que la disponibilité du Ni diminue au cours du temps, par suite du prélèvement par les plantes et de l'adsorption des métaux sur la phase solide. Il est indispensable de tester la croissance des plantes jusqu'au stade de floraison pour connaître leur réel potentiel d'extraction dans ce substrat. Par ailleurs, dans le dispositif en couches, la couche de prélèvement, sous-jacente à la boue, où se développent préférentiellement les racines et où le rapport Ni/Zn est plus favorable au Ni que dans les autres couches, devrait voir sa composition évoluer sous l'effet de la lixiviation des métaux depuis la couche supérieure. Les quantités susceptibles d'être lixiviées, de même que la durée de lixiviation, devraient être mesurées. Donc, l'évolution de la disponibilité du métal dans le substrat doit être suivie pour évaluer le temps d'exploitation de ce substrat, sa durée de vie et le nombre de cultures nécessaires pour épuiser le métal disponible.

Application à d'autres matériaux. Les travaux se sont intéressés principalement à une boue de phosphatation acide issue du procédé de cataphorèse. Cependant, l'utilisation d'autres boues, telle qu'une boue alcaline (boue B) est envisageable. L'extraction du Ni est analogue à celle observée avec la boue acide. Ainsi, le potentiel des boues alcalines n'est pas à négliger, d'autant que la toxicité est moindre du fait d'une mobilité inférieure des métaux. Ces boues alcalines ne nécessitent pas forcément l'emploi de biochar, en présence duquel les résultats sont similaires à ceux obtenus sans amendement. Néanmoins le choix de la boue implique de rechercher la présence d'autres éléments.

Perspectives méthodologiques. Il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse pour caractériser les matrices métalliques analogues à des milieux extrêmes et la disponibilité pour prédire le prélèvement par les végétaux. Les mesures effectuées après extraction DTPA sur le substrat élaboré et sur le sol ultramafique donnent des valeurs comparables. Cependant le prélèvement des plantes est très largement inférieur sur le substrat élaboré. Ainsi l'acquisition de données complémentaires pourrait permettre d'évaluer le réactif chimique le plus à même de prédire le pool disponible pour les plantes. Ainsi, ces données pourraient permettre de modéliser le prélèvement par la plante en tenant compte des autres métaux présents.

Potentiel des plantes hyperaccumulatrices. Outre les métaux, tels que le Ni, nous avons aussi testé l'intérêt des hyperaccumulateurs en tant que source de composés organiques à potentiel industriel. Nous avons ciblé les molécules de type coumarines dont les applications en pharmacologie et cosmétiques sont nombreuses. Nous avons mis en évidence la présence de quantités importantes de scopolétine dans les parties aériennes de *B. tymphaea* (280 mg kg⁻¹) et de *L. emarginata* (190 mg kg⁻¹). Ces composés ont-ils un rôle dans la translocation et la séquestration du métal dans la plante par complexation par substitution de leur groupement hydroxyle ? Et dans ce cas, interviennent-ils dans le transport ou la chélation des métaux ? Par ailleurs, les similarités mises en évidence chez ces deux espèces : production de coumarines, synergie lors de la co-culture, efficacité d'extraction du Ni proches peuvent avoir pour origine une similitude génétique de ces deux espèces placées dans le même clade par Flynn (2013).

Sélection et conservation des individus performants. Le taux de germination des hyperaccumulateurs est inférieur sur les substrats élaborés en comparaison au sol ultramafique. Cependant les individus développés sur le substrat élaboré ont une biomasse supérieure. Ainsi, l'exposition de graines à des matrices extrêmes permet de sélectionner des individus tolérants qu'il est nécessaire de conserver et propager facilement. Nous avons alors testé certaines voies de la multiplication végétative et montré que les Brassicacées hyperaccumulatrices de Ni ont répondu positivement au bouturage. Par ailleurs, les tubercules d'Astéracées développées pendant 12 à 14 mois après le semis ont été replantés avec succès après la récolte. À présent, il est nécessaire de tester les conditions de la réussite du bouturage chez les Brassicacées afin d'obtenir rapidement de nouveaux individus : à quelle maturité de la plante faut-il prélever des tissus ? Quelle taille de tissu faut-il prélever ? Quel doit être le substrat de repiquage ? Quel traitement hormonal est nécessaire pour favoriser la reprise ?

3. Applications de l'agromine sur des boues industrielles métalliques

La mise en place de tests de germination et de croissance permet d'attester de la fertilité du substrat mais pas du prélèvement du Ni par la plante. Or, si la présence d'éléments métalliques, *e.g.* Zn, Co, dans les substrats de culture peut ne pas gêner le développement des plantes, elle apparaît comme le verrou principal au prélèvement du Ni. Afin de lever ces verrous technologiques l'utilisation d'amendements ou d'agencements particuliers des matériaux a été proposée. Ces leviers interviennent principalement sur le pH. La disposition de la boue en surface est la meilleure alternative sur le laps de temps testé. D'autres pistes peuvent être envisagées, telles que la co-culture avec un hyperaccumulateur du métal compétiteur (Zn ou Co) afin de diminuer sa présence en solution, en veillant que ce deuxième hyperaccumulateur ne soit pas sujet à prélever le Ni. L'étude de la biomasse microbienne spontanée ainsi que son évolution au cours du temps peut aussi être une voie pour le suivi et l'amélioration des substrats. L'inoculation de souches de microorganismes PGPR pour favoriser la disponibilité et le transfert du Ni vers la plante est aussi une voie à explorer.

Recommandations dans le choix des matériaux pour l'élaboration du substrat : i) La première étape est la sélection d'un matériau contenant du Ni. Il est alors indispensable de connaître la composition complète du matériau en éléments (*e.g.* métaux, éléments nutritifs) ainsi qu'en composés organiques pouvant perturber la croissance des plantes. La mesure de la disponibilité est aussi nécessaire. Le matériau idéal ne contiendrait pas de métaux toxiques (*e.g.*

Cd, As, Bi, Hg), ni de métaux concurrents en concentration proche de celle du Ni (e.g. Zn, Co, Mn), ce qui est loin d'être le cas avec la plupart des matériaux industriels. Il est préférable de disposer d'un matériau à pH acide ou neutre, car il est plus facile d'augmenter le pH que de le diminuer ; l'extraction du Ni par les hyperaccumulateurs étant efficace jusqu'à pH 8 ; ii) il est ensuite nécessaire de faire des tests de germination avec une espèce quelconque, sur le matériau afin d'évaluer son éventuelle toxicité. En cas de phytotoxicité, il faut sélectionner des matériaux qui améliorent les propriétés du substrat. En parallèle, des essais de lixiviation en colonne peuvent permettre d'observer les éléments libérés par la matrice et, par conséquent, de prévoir le recyclage éventuel des lixiviats ou leur traitement direct pour en extraire les métaux ; iii) La faible quantité de matière organique et les propriétés physiques peu propices au développement de végétaux (faible porosité) peuvent nécessiter l'apport d'un structurant. Nous avons montré qu'une terre contaminée traitée (e.g. biopile) peut être utilisée. En complément, l'apport d'amendements est indispensable. Ils diminuent aussi la toxicité (immobilisation métaux) et enrichissent le substrat en matière organique (e.g. compost), augmentent le pH et la porosité (e.g. biochar), et favorisent une structure aérée (e.g. stérile de carrière, briques). L'ajustement de la formulation peut s'appuyer alors sur la démarche décrite en Figure 115, qui se fonde sur la réponse des plantes en germination et en croissance sur le substrat. Elle pourrait aussi intégrer des essais en conditions contrôlées (batch et/ou colonne) pour analyser la fraction lixiviable du matériau métallique ou du substrat (Rees *et al.* 2014).

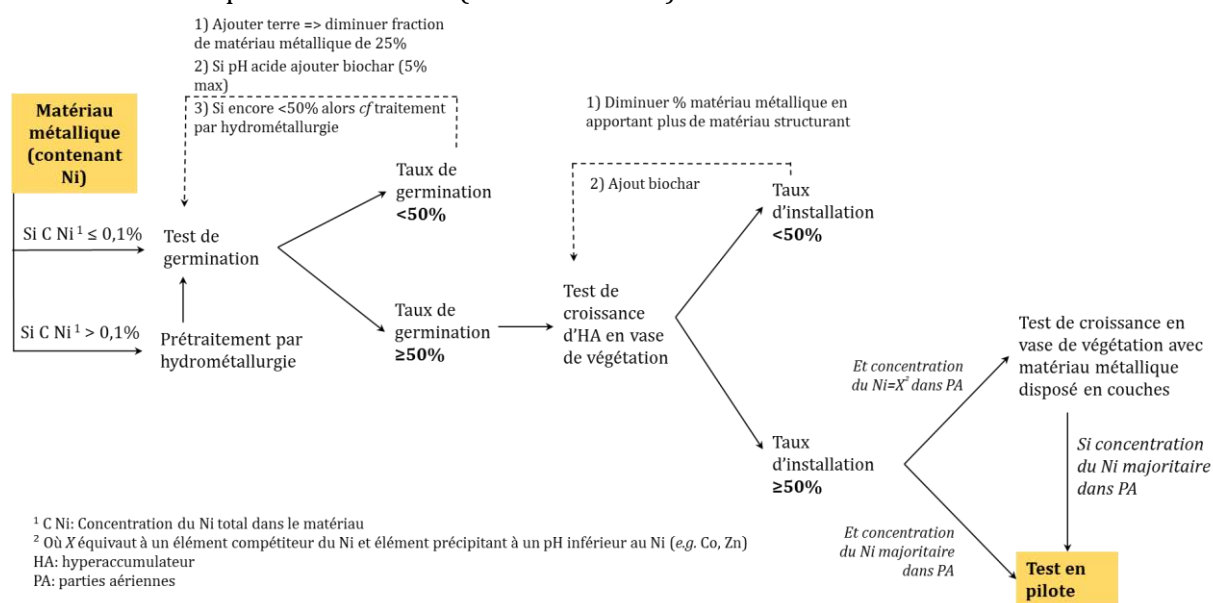


Figure 115 _ Démarche de l'élaboration d'un substrat pour l'agromine

Précautions lors de la mise en place du substrat. Des difficultés peuvent apparaître en lien avec les propriétés du matériau tel que le caractère thixotrope des boues. Le séchage est possible en petites quantités au laboratoire mais, dans un dispositif de terrain, il est problématique car la boue doit être manipulée *a minima*. Sa liquéfaction diminue la porosité et peut créer des conditions initiales encore plus délétères pour l'installation des plantes. Par ailleurs, le dispositif en couches nécessite lors de la mise en place d'éviter le contact entre les racines des plantes et la boue. À l'échelle de la parcelle, il faut donc anticiper la manière i) d'épandre la boue et ii) d'installer les plantes sans perturber le substrat en place.

Exploitation et entretien des parcelles. La culture des plantes à grande échelle repose sur la mise en œuvre de pratiques agricoles (**agromine**). Mais, compte tenu du caractère confiné des

dispositifs de culture (*i.e.* parcelles lysimétriques) imposées par les risques potentiels pour l'environnement, il est nécessaire d'adapter ces pratiques. En particulier, il faut pouvoir mécaniser le semis, l'entretien et les récoltes. La portance du substrat est alors une propriété importante afin d'éviter tout risque de déformation du substrat ou déchirement des membranes. L'agromine des matériaux industriels s'apparente alors plus aux pratiques de maraîchage que de grande culture. Les parcelles pourraient être de forme rectangulaire, équivalentes à « des planches » au fond desquelles seraient déposés des géomembranes afin d'éviter toute perte de contaminants. La largeur de la planche serait déterminée selon les dimensions du matériel d'entretien de sorte à ce que les passages de roues s'effectuent de part et d'autre de la planche.

Par ailleurs, nous avons observé que le substrat élaboré évolue rapidement au regard des concentrations d'éléments lixiviés au cours des premières semaines suivant la mise en place des bacs. Les solutions de sols issues du substrat élaboré ont montré une stabilisation des valeurs plus tardive que sur la terre ultramafique et le taux d'installation des plantes était supérieur lors des repiquages effectués tardivement. Aussi, il est essentiel de ne pas procéder à l'installation immédiate des plantes lors de l'élaboration du substrat mais de laisser un temps (quelques semaines) de stabilisation sous l'effet des cycles humectation/dessiccation afin d'assurer la meilleure reprise des végétaux après repiquage.

Modalités d'installation du couvert et gestion de la culture. L'installation du couvert végétal peut utiliser le **semis en place ou l'installation de plantules en motte**. Avec des individus sélectionnés il pourrait être envisageable d'obtenir un taux satisfaisant d'installation après semis direct. Dans le cas de régions climatiques comme la Lorraine, le choix de la (ou des) espèce(s) peut s'orienter vers des Brassicacées ou vers *C. thracica*. Ces espèces ont besoin d'une vernalisation mais elles peuvent supporter des températures basses. *B. coddii* n'a pas été testé dans ces conditions mais elle peut fleurir dès la première année après le semis. La **densité** des plantes est aussi un critère à prendre en compte. Dans l'objectif d'épuiser le contenu en Ni le plus rapidement possible, la densité employée peut être largement supérieure aux recommandations faites sur les sols ultramafiques : quatre individus d'*A. murale* par m² en Albanie. Cependant, sur un substrat élaboré, non limitant en nutriments contenus dans la boue (N et P), la densité peut être doublée ou triplée. Il est nécessaire, afin d'affiner ces estimations, de conduire les plantes à la floraison pour observer la taille des individus adultes et les densités envisageables. Le **nombre de récoltes annuelles** peut aussi être un levier d'action pour augmenter les rendements. Actuellement, *A. murale* est récolté une fois par an avec un nouveau semis chaque fin d'été. Cependant, après une coupe au-dessus des deux premières feuilles la plante redémarre sa croissance. Plusieurs récoltes seraient alors possibles. L'utilisation d'individus pérennes pourrait considérablement faciliter l'exploitation de parcelle avec des substrats construits, qui réduirait le nombre d'interventions de mise en place (un seul semis) et augmenterait les rendements par la repousse successive à la coupe, pouvant même augmenter la concentration du Ni dans la repousse (Robinson *et al.* 1997a). Il est donc nécessaire, d'une part, de sélectionner des individus pour leur production de biomasse et leur capacité d'extraction du Ni et, d'autre part, de privilégier les espèces pérennes. Il faut aussi définir la période favorable pour les coupes. Dans les cas d'individus bisannuels, faut-il couper une fois à l'automne de la première année et effectuer une récolte finale l'été suivant ou alors effectuer deux récoltes l'été suivant le semis, ou alors trois récoltes en combinant les deux propositions précédentes ?

La **sélection d'individus performants présenterait donc quatre étapes** : i) semis des individus sur le substrat pour sélectionner les individus tolérants, ii) suivi de la phénologie des individus

afin de repérer les individus précoces pour obtenir le meilleur rendement dès la première coupe, iii) fauchage des individus au-dessus des deux premières feuilles à deux mois pour sélectionner les individus capables de repousser, iv) exposition des individus à une stratification/vernalisation pour provoquer la floraison. Les individus survivants seraient alors criblés selon quatre critères : résistance à la toxicité de la matrice, pérennité, capacité à croître après la coupe et enfin aptitude à la multiplication végétative.

L'agromine est-elle envisageable directement sur des boues industrielles métalliques ? Le substrat a été élaboré en combinant plusieurs matériaux avec la boue métallique testée, du fait de sa très forte toxicité. Cependant, afin de limiter le recours à d'autres matériaux et de traiter de plus grande quantité de boue métallique, il serait nécessaire de diminuer d'abord sa toxicité. Différentes pistes peuvent alors être envisagées ; le **prétraitement du matériau par lixiviation puis récupération des métaux par hydrométallurgie** ; le traitement du résidu serait alors effectué par une agromine de « finition ». Le prétraitement par hydrométallurgique de la boue permettrait une première valorisation des métaux facilement extractibles et diminuerait les concentrations en métal et rendrait possible la culture des plantes. La boue chargée en Bi, testée durant ce travail, est un exemple où la récupération préalable de l'élément permettrait ensuite l'application de l'agromine. Un **pressage de la boue** pourrait être effectué pour récupérer la phase liquide, acide et chargée en métaux, qui serait alors traitée par hydrométallurgie. La récupération du Ni par culture hydroponique dans le jus de pressage ou dans l'eau de lavage est aussi envisageable. L'hydroponie, malgré la consommation d'énergie que peut engendrer le dispositif de culture, génère peu de déchet du fait de la possibilité de concentrer les éléments en solution *in fine* par évaporation. Il est nécessaire de tester la faisabilité de ces pistes par des essais en laboratoire.

4. Conclusions et recommandations

L'agromine sur des substrats élaborés est une solution prometteuse de récupération des métaux d'intérêt. Elle nécessite au préalable de constituer des substrats adaptés qui offrent des conditions de milieu faiblement à modérément contaminées. Elle peut donc constituer une solution de traitement des déchets et résidus métalliques. La possibilité de coupler le prétraitement des boues, dans le cas de concentration métallique élevée (>0,1%) par des voies plus conventionnelles, telle que l'hydrométallurgie, et l'agromine constitue probablement une voie rationnelle pour la récupération des éléments d'intérêt. Sa faisabilité technique et économique doit être établie.

En résumé, nous avons démontré que par la sélection de plantes et l'association de matériaux secondaires pour l'élaboration d'un substrat fertile, il est possible de créer les conditions favorables à la croissance d'hyperaccumulateurs et la récupération de métaux, tels que le Ni. Afin de développer cette voie de récupération des métaux à partir de délaissés industriels, il est nécessaire de s'attacher à trois axes:

✓ mise au point d'un outil d'aide à la décision (OAD) pour l'élaboration du substrat, par adaptation de la démarche SITERRE à des déchets industriels métalliques. Cet OAD permettra de définir, à partir du matériau métallique sélectionné, les matériaux complémentaires à utiliser ainsi que leur quantité pour parvenir à un substrat répondant aux critères de fertilité et disponibilité pour l'agromine. Il est alors nécessaire d'affiner les critères de composition d'un substrat pour l'agromine ;

- ✓ modélisation du fonctionnement du système pour prédire l'évolution de la disponibilité et la durée d'exploitation du substrat ;
- ✓ optimisation des itinéraires techniques en s'attachant à des options comme la faisabilité de la co-culture d'espèces hyperaccumulatrices de différents éléments et de faire plusieurs récoltes la même année. Bien entendu, il est nécessaire de pouvoir généraliser les résultats du travail à différents matériaux métalliques, aux objectifs d'extraction et à la zone climatique concernée.

Pour répondre à ces perspectives, il est alors nécessaire:

- ✓ d'acquérir des données supplémentaires sur des systèmes en place (sol ultramafique) mais aussi sur de nouveaux agrosystèmes construits et leur évolution (propriétés physiques, biodisponibilité des métaux) ;
- ✓ de recenser les gisements de matériaux secondaires métalliques et leur composition et les quantités produites ;
- ✓ d'engager la sélection d'individus aptes à l'extraction du métal ciblé sur ces matériaux extrêmes.

Références

- Abou-Shanab, R., Angle, J. et Chaney, R. (2006) Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 2882-2889.
- Abou-Shanab, R., Angle, J., Delorme, T., Chaney, R., van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K. et Ghazlan, H. (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist*, **158**, 219-224.
- Adamidis, G.C., Aloupi, M., Kazakou, E. et Dimitrakopoulos, P.G. (2014) Intra-specific variation in Ni tolerance, accumulation and translocation patterns in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum lesbiacum*. *Chemosphere*, **95**, 496-502.
- Adams, E., Miyazaki, T., Hayaishi-Satoh, A., Han, M., Kusano, M., Khandelia, H., Saito, K. et Shin, R. (2017) A novel role for methyl cysteinylserine, a cysteine derivative, in cesium accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, **7**, 43170.
- Ahn, Y.O., Shimizu, B., Sakata, K., Gantulga, D., Zhou, Z., Bevan, D.R. et Esen, A. (2010) Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **51**, 132-143.
- Akhtar, S.S., Andersen, M.N. et Liu, F. (2015a) Residual effects of biochar on improving growth, physiology and yield of wheat under salt stress. *Agricultural Water Management*, **158**, 61-68.
- Akhtar, S.S., Andersen, M.N. et Liu, F. (2015b) Biochar mitigates salinity stress in potato. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **201**, 368-378.
- Alekseeva-Popova, N.V., Drozdova, I.V. et Kalimova, I.B. (2015) Accumulation of heavy metals by North Caucasian plant species of the Cruciferae family in regards to phytoremediation. *Geochemistry International*, **53**, 456-463.
- Alexander, E.B., Coleman, R.G., Keeler-Wolfe, T. et Harrison, S.P. (2006) *Serpentine Geoecology of Western North America: Geology, Soils, and Vegetation*. Oxford University Press.
- Almendro-Candel, M.B., Navarro-Pedreño, J., Jordán, M.M., Gómez, I. et Meléndez-Pastor, I. (2014) Use of municipal solid waste compost to reclaim limestone quarries mine spoils as soil amendments: Effects on Cd and Ni. *Journal of Geochemical Exploration*, **144**, 363-366.
- Alvarenga, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E. et Cunha-Queda, A.C. (2009) Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. *Chemosphere*, **74**, 1292-1300.
- Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, Á., Cabello-Conejo, M.I. et Kidd, P.S. (2016) Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. *Science of The Total Environment*, **548-549**, 370-379.
- Angle, J.S., Chaney, R.L., Baker, A.J.M., Li, Y., Reeves, R., Volk, V., Roseberg, R., Brewer, E., Burke, S. et Nelkin, J. (2001) Developing commercial phytoextraction technologies: Practical considerations. *South African Journal of Science*, **97**, 619-623.
- Asemaneh, T., Ghaderian, S.M. et Baker, A.J.M. (2007) Responses to Mg/Ca balance in an Iranian serpentine endemic plant, *Cleome heratensis* (Capparaceae) and a related non-serpentine species, *C. foliolosa*. *Plant and Soil*, **293**, 49-59.
- Assunção, A.G.L., Bleeker, P., Bookum, W.M., Vooijs, R. et Schat, H. (2008) Intraspecific variation of metal preference patterns for hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*: Evidence from binary metal exposures. *Plant and Soil*, **303**, 289-299.
- Assunção, A.G.L., Bookum, W.M., Nelissen, H.J.M., Vooijs, R., Schat, H. et Ernst, W.H.O. (2003) Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi*

- caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist*, **159**, 411-419.
- Ba, R., Alfa, T., Gbaguidi, F., Novidzro, K.M., Dotse, K., Koudouvo, K., Houngue, U., Donou Hounsode, M.T., Koumaglo, K.H., Ameyapoh, Y. et Baba-Moussa, L. (2017) Maize fungal growth control with scopoletin of cassava roots produced in Benin. *International Journal of Microbiology*, **2017**, DOI: 10.1155/2017/5671942.
- Baize, D. (2000) Teneurs totales en « métaux lourds » dans les sols français résultats généraux du programme ASPITET. URL <http://www7.inra.fr/dpenv/baizec39.htm#prop> [accessed 2 avril 2017]
- Baker, A.J.M. (1981) Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 643-654.
- Baker, A.J.M. et Brooks, R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, **1**, 81-126.
- Baker, A.J.M., Brooks, R. et Reeves, R. (1988) Growing for gold...and copper...and zinc. *New scientist*, **117**, 44-48.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D. et Reeves, R.D. (1994) The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, **11**, 41-49.
- Bakkaus, E., Gouget, B., Gallien, J.-P., Khodja, H., Carrot, F., Morel, J.L. et Collins, R. (2005) Concentration and distribution of cobalt in higher plants: The use of micro-PIXE spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **231**, 350-356.
- Bani, A., Echevarria, G., Mullaj, A., Reeves, R., Morel, J.L. et Sulçe, S. (2009) Nickel hyperaccumulation by Brassicaceae in serpentine soils of Albania and Northwestern Greece. *Northeastern Naturalist*, **16**, 385-404.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S. et Morel, J.L. (2015a) Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. *International Journal of Phytoremediation*, **17**, 117-127.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L. et Mullai, A. (2007) *In-situ* phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil*, **293**, 79-89.
- Bani, A., Echevarria, G., Zhang, X., Benizri, E., Laubie, B., Morel, J.L. et Simonnot, M.-O. (2015b) The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with *Alyssum murale* in Albania. *Australian Journal of Botany*, **63**, 72-77.
- Bani, A., Imeri, A., Echevarria, G., Pavlova, D., Reeves, R.D., Morel, J.L. et Sulçe, S. (2013) Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. *Fresenius Environmental Bulletin*, **22**, 1792-1801.
- Bani, A., Pavlova, D., Echevarria, G., Mullai, A., Reeves, R.D., Morel, J.L. et Sulçe, S. (2010) Nickel hyperaccumulation by the species of *Alyssum* and *Thlaspi* (Brassicaceae) from the ultramafic soils of the Balkans. *Botanica Serbica*, **34**, 3-14.
- Bañuelos, G.S., Arroyo, I., Pickering, I.J., Yang, S.I. et Freeman, J.L. (2015) Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched hyperaccumulator *Stanleya pinnata*. *Food Chemistry*, **166**, 603-608.
- Barbaroux, R., Mercier, G., Blais, J.F., Morel, J.L. et Simonnot, M.O. (2011) A new method for obtaining nickel metal from the hyperaccumulator plant *Alyssum murale*. *Separation and Purification Technology*, **83**, 57-65.

- Barbaroux, R., Plasari, E., Mercier, G., Simonnot, M.O., Morel, J.L. et Blais, J.F. (2012) A new process for nickel ammonium disulfate production from ash of the hyperaccumulating plant *Alyssum murale*. *Science of The Total Environment*, **423**, 111-119.
- Barillot, C. (2012) *Étude des potentialités rhizoremédiatrices et de la diversité des bactéries rhizosphériques d'Arabidopsis halleri, plante hyperaccumulatrice de Zn et Cd*. Thèse, Université de Technologie de Compiègne, France.
- Baumert, A., Mock, H.-P., Schmidt, J., Herbers, K., Sonnewald, U. et Strack, D. (2001) Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry*, **56**, 535-541.
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatoš, A., Oldham, N.J. et Hahlbrock, K. (2005) Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, **138**, 1058-1070.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E. et Gomez-Eyles, J.L. (2010) Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental Pollution*, **158**, 2282-2287.
- Bernal, M.P. et McGrath, S.P. (1994a) Effects of pH and heavy metal concentrations in solution culture on the proton release, growth and elemental composition of *Alyssum murale* and *Raphanus sativus* L. *Plant and Soil*, **166**, 83-92.
- Bernal, M.P., McGrath, S.P., Miller, A.J. et Baker, A.J.M. (1994b) Comparison of the chemical changes in the rhizosphere of the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* with the non-accumulator *Raphanus sativus*. *Plant and Soil*, **164**, 251-259.
- Bertrand, D. et DeWolff, A. (1973) Importance du nickel, comme oligo-élément, pour les *Rhizobium* des nodosités des légumineuses. *Compte rendu de l'académie des Sciences, Paris*, 1855-1858.
- Bhatia, N.P., Baker, A.J.M., Walsh, K.B. et Midmore, D.J. (2005) A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta*, **223**, 134-139.
- Bhatia, P., Bhatia, N.P. et Ashwath, N. (2002a) *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): A rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biodiversity & Conservation*, **11**, 1469-1477.
- Bhatia, N.P., Bhatia, P. et Ashwath, N. (2002b) *Ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *Stackhousia Tryonii*. *Biologia Plantarum*, **45**, 441-444.
- Bhatia, N.P., Bhatia, P. et Ashwath, N. (2002c) Asexual propagation of *Stackhousia tryonii*: A step towards restoration of a rare metallophyte. *Australian Journal of Botany*, **50**, 577-582.
- Bidwell, S.D. (2000) *Hyperaccumulation of Metals in Australian Native Plants*. Thèse, Université de Melbourne, Australie.
- Boukhris, A., Laffont-Schwob, I., Mezghani, I., Kadri, L.E., Prudent, P., Pricop, A., Tatoni, T. et Chaieb, M. (2015) Screening biological traits and fluoride contents of native vegetations in arid environments to select efficiently fluoride-tolerant native plant species for *in-situ* phytoremediation. *Chemosphere*, **119**, 217-223.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S. et Matern, U. (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, **5**, 293-308.
- Bourgaud, F., Poutaraud, A. et Guckert, A. (1994) Extraction of coumarins from plant material (Leguminosae). *Phytochemical Analysis*, **5**, 127-132.
- Bourrelier, P.-H. et Berthelin, J. (1998) *Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris.
- Boyd, R.S. (2007) The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil*, **293**, 153-176.

- Boyd, R.S. et Jaffré, T. (2009) Elemental concentrations of eleven New Caledonian plant species from serpentine soils: Elemental correlations and leaf-age effects. *Northeastern Naturalist*, **16**, 93–110.
- Boyd, R.S. et Martens, N.S. (1990) The « raison d'être » for metal hyperaccumulation by plants. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils, Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology*, Intercept Ltd (éd Baker A.J.M., Proctor J., and Reeves R.D.), p. 279–289. Andover, Hampshire, UK.
- Boyd, R. et Martens, S. (1998) Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): A constitutive trait. *American journal of botany*, **85**, 259–259.
- Broadhurst, C.L. et Chaney, R.L. (2016) Growth and metal accumulation of an *Alyssum murale* nickel hyperaccumulator ecotype co-cropped with *Alyssum montanum* and perennial ryegrass in serpentine soil. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 9 p.
- Broadhurst, C.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Erbe, E.F. et Maugel, T.K. (2004) Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant and soil*, **265**, 225–242.
- Broadhurst, C.L., Tappero, R.V., Maugel, T.K., Erbe, E.F., Sparks, D.L. et Chaney, R.L. (2009) Interaction of nickel and manganese in accumulation and localization in leaves of the Ni hyperaccumulators *Alyssum murale* and *Alyssum corsicum*. *Plant and Soil*, **314**, 35–48.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. et Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist*, **173**, 677–702.
- Brooks, R.R. (1977) Copper and cobalt uptake by *Haumaniastrum* species. *Plant and Soil*, **48**, 541–544.
- Brooks, R.R. (1987) Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary approach. *Ecology, phytogeography and physiology series (USA)*.
- Brooks, R.R. (1998) *Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. Wallingford, England : CAB International.
- Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J. et Robinson, B.H. (1998) Phytomining. *Trends in Plant Science*, **3**, 359–362.
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D. et Jaffre, T. (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, **7**, 49–57.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S. et Baker, A.J.M. (1994) Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, **23**, 1151–1157.
- Brown, P.H., Welch, R.M. et Cary, E.E. (1987) Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology*, **85**, 801–803.
- Cabello-Conejo, M.I., Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Saavedra-Ferro, A., Mench, M. et Kidd, P.S. (2014) Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. *Plant and Soil*, **379**, 35–50.
- Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D. et Wedd, A.G. (2005) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11**, 2–12.
- Cantrell, K.B., Hunt, P.G., Uchimiya, M., Novak, J.M. et Ro, K.S. (2012) Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresource Technology*, **107**, 419–428.
- Cappa, J.J. et Pilon-Smits, E.A.H. (2014) Evolutionary aspects of elemental hyperaccumulation. *Planta*, **239**, 267–275.
- Cataldo, D.A., Garland, T.R. et Wildung, R.E. (1978a) Nickel in plants I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiology*, **62**, 563–565.

- Cataldo, D.A., Garland, T.R., Wildung, R.E. et Drucker, H. (1978b) Nickel in plants II. Distribution and chemical form in soybean plants. *Plant Physiology*, **62**, 566-570.
- Centofanti, T., Sayers, Z., Cabello-Conejo, M.I., Kidd, P., Nishizawa, N.K., Kakei, Y., Davis, A.P., Sicher, R.C. et Chaney, R.L. (2013) Xylem exudate composition and root-to-shoot nickel translocation in *Alyssum* species. *Plant and Soil*, **373**, 59-75.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M. et Li, Y.-M. (1998) Method for phytomining of nickel, cobalt and other metals from soil. U.S. Patent No. 5,711,784.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V. et Sparks, D.L. (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality*, **36**, 1429.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., McIntosh, M.S., Reeves, R.D., Li, Y.-M., Brewer, E.P., Chen, K.-Y., Roseberg, R.J., Perner, H. et Synkowski, E.C. (2005) Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Z Naturforsch C*, **60**, 190-198.
- Chardot, V. (2007) *Réponse de Brassicacées hyperaccumulatrices à la disponibilité du nickel des sols ultramafiques*. Thèse, Université de Lorraine, France.
- Chardot, V., Massoura, S.T., Echevarria, G., Reeves, R.D. et Morel, J.-L. (2005) Phytoextraction potential of the nickel hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. *International Journal of Phytoremediation*, **7**, 323-335.
- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Barkla, B.J., Shigaki, T. et Hirschi, K.D. (2003) The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell*, **15**, 347-364.
- Chintala, R., Mollinedo, J., Schumacher, T.E., Malo, D.D. et Julson, J.L. (2014) Effect of biochar on chemical properties of acidic soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **60**, 393-404.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B. et Saindrenan, P. (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *The Plant Cell online*, **14**, 1093-1107.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, **212**, 475-486.
- Cobbett, C. et Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**, 159-182.
- Coleman, R.G. et Jove, C. (1992) Geological origin of serpentinites. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils, Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology*, Intercept, Andover (éd Baker A.J.M., Proctor J., and Reeves R.D.), p. 1-17. Hampshire.
- Colin, V. et Guimont, S. (2013) Projet LORVER _ Sous-tâche 1.1.1 : Liste des gisements de sous-produits disponibles en Lorraine.
- Cooke, S.S. (1994) *The edaphic ecology of two western North American composite species*. Thèse, Université de Washington, États-Unis.
- Córdova, S., Neaman, A., González, I., Ginocchio, R. et Fine, P. (2011) The effect of lime and compost amendments on the potential for the revegetation of metal-polluted, acidic soils. *Geoderma*, **166**, 135-144.
- Corso, G.D., Borgato, L. et Furini, A. (2005) In vitro plant regeneration of the heavy metal tolerant and hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **82**, 267-270.
- Crooke, W.M. et Inkson, R.H.E. (1955) The relationship between nickel toxicity and major nutrient supply. *Plant and soil*, **6**, 1-15.
- Cruz, R., Baptista, P., Cunha, S., Pereira, J.A. et Casal, S. (2012) Carotenoids of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown on soil enriched with spent coffee grounds. *Molecules*, **17**, 1535-1547.

- Cruz, R., Mendes, E., Torrinha, Á., Morais, S., Pereira, J.A., Baptista, P. et Casal, S. (2015) Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *Food Research International*, **73**, 190-196.
- Damas, O. et Coulon, A. (2016) *Créer des sols fertiles_Du déchet à la végétalisation urbaine*, Le Moniteur. France.
- Davranche, M. et Bollinger, J.-C. (2000) Heavy metals desorption from synthesized and natural iron and manganese oxyhydroxides: Effect of reductive conditions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **227**, 531-539.
- De Rauglaudre, J. et Louchez, G. (2013) Projet LORVER _ Sous-tâche 1.1.2 : Inventaire des gisements de terres traitées disponibles.
- Deng, T.-H.-B., Cloquet, C., Tang, Y.-T., Sterckeman, T., Echevarria, G., Estrade, N., Morel, J.L. et Qiu, R.-L. (2014) Nickel and zinc isotope fractionation in hyperaccumulating and nonaccumulating plants. *Environmental Science & Technology*, **48**, 11926-11933.
- Deng, T.-H.-B., Tang, Y.-T., Van der Ent, A., Sterckeman, T., Echevarria, G., Morel, J.L. et Qiu, R.-L. (2016) Nickel translocation via the phloem in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* (Brassicaceae). *Plant and Soil*, **404**, 35-45.
- Didierlaurent, L. (2012) *UGT76E12, UGT73B3 et UGT73B5, trois glycosyltransférases du métabolisme secondaire d'Arabidopsis thaliana impliquées dans les réponses de défense aux microorganismes pathogènes*. Thèse, Université Paris Sud - Paris XI, France.
- Doksoopulo, E.P. (1961) *Nickel in rocks, soils, waters and plants adjacent to the Chorchanskaya Group (in Russia)*. Thèse, University of Tbilisi, Géorgie.
- Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. et Bourgaud, F. (2013) Coumarin and furanocoumarin quantitation in *Citrus* peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 10677-10684.
- Durand, A., Piutti, S., Rue, M., Morel, J.L., Echevarria, G. et Benizri, E. (2016) Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, **399**, 179-192.
- Echevarria, G., Klein, S., Fardeau, J.-C. et Morel, J.-L. (1997) Mesure de la fraction assimilable des éléments en traces du sol par la méthode des cinétiques d'échange isotopique : cas du nickel. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2. Sciences de la terre et des planètes*, **324**, 221-227.
- Echevarria, G., Massoura, S.T., Sterckeman, T., Becquer, T., Schwartz, C. et Morel, J.L. (2006) Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 643-651.
- Echevarria, G., Morel, J.L., Fardeau, J.C. et Leclerc-Cessac, E. (1998) Assessment of phytoavailability of nickel in soils. *Journal of Environmental Quality*, **27**, 1064-1070.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Blanco, F., Kowalchuk, G.A. et Garbisu, C. (2012) Links between pseudometallophytes and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Pedobiologia*, **55**, 219-225.
- Ernst, W. (1972) Ecophysiological studies on heavy metal plants in South Central Africa. *Kirkia*, **8**, 125-145.
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Frérot, H., Mahieu, S. et Noret, N. (2013) Metal concentration and metal mass of metallicolous, non metallicolous and serpentine *Noccaea caerulescens* populations, cultivated in different growth media. *Plant and Soil*, **370**, 197-221.
- Eskew, D.L., Welch, R.M. et Cary, E.E. (1983) Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science*, **222**, 621-623.

- Estrade, N., Cloquet, C., Echevarria, G., Sterckeman, T., Deng, T., Tang, Y. et Morel, J.L. (2015) Weathering and vegetation controls on nickel isotope fractionation in surface ultramafic environments (Albania). *Earth and Planetary Science Letters*, **423**, 24-35.
- Everhart, J.L., McNear, D., Peltier, E., van der Lelie, D., Chaney, R.L. et Sparks, D.L. (2006) Assessing nickel bioavailability in smelter-contaminated soils. *Science of The Total Environment*, **367**, 732-744.
- Fellet, G., Centofanti, T., Chaney, R.L. et Green, C.E. (2009) NiO(s) (bunsenite) is not available to *Alyssum* species. *Plant and Soil*, **319**, 219-223.
- Fellet, G., Marmiroli, M. et Marchiol, L. (2014) Elements uptake by metal accumulator species grown on mine tailings amended with three types of biochar. *Science of The Total Environment*, **468-469**, 598-608.
- Flynn, T.A. (2013) *Evolution of Nickel Hyperaccumulation in Alyssum L.* Thèse, Université d'Oxford, Royaume-Uni.
- Frossard, E., Sinaj, S., Zhang, L.-M. et Morel, J.L. (1996) The fate of sludge phosphorus in soil-plant systems. *Soil Science Society of America Journal*, **60**, 1248-1253.
- Fuksová, Z., Száková, J. et Tlustoš, P. (2009) Effects of co-cropping on bioaccumulation of trace elements in *Thlaspi caerulescens* and *Salix dasyclados*. *Plant, Soil and Environment*, **55**, 461-467.
- Gabbrielli, R. et Pandolfini, T. (1984) Effect of Mg²⁺ and Ca²⁺ on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species. *Physiologia Plantarum*, **62**, 540-544.
- Galardi, F., Corrales, I., Mengoni, A., Pucci, S., Barletti, L., Barzanti, R., Arnetoli, M., Gabbrielli, R. et Gonnelli, C. (2007a) Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 377-384.
- Galardi, F., Mengoni, A., Pucci, S., Barletti, L., Massi, L., Barzanti, R., Gabbrielli, R. et Gonnelli, C. (2007b) Intra-specific differences in mineral element composition in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*: A survey of populations in nature. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 50-56.
- Gallardo-Lara, F. et Nogales, R. (1987) Effect of the application of town refuse compost on the soil-plant system: A review. *Biological Wastes*, **19**, 35-62.
- Gambi, O.V., Pancaro, L. et Formica, C. (1977) Investigations on a nickel accumulating plant: *Alyssum bertolonii* Desv. I. Nickel, calcium and magnesium content and distribution during growth. *Webbia*, **32**, 175-188.
- Gao, Y., Miao, C., Mao, L., Zhou, P., Jin, Z. et Shi, W. (2010a) Improvement of phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. under cadmium stress by application of cadmium-resistant strain and citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, **181**, 771-777.
- Gao, Y., Miao, C., Xia, J., Mao, L., Wang, Y. et Zhou, P. (2012) Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, **6**, 213-223.
- Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C. et Shi, W. (2010b) Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *Journal of Environmental Sciences*, **22**, 1040-1048.
- Garabeth, F., Bouaoun, D. et Elyafi-Elzahri, G. (2007) Étude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie*, **5**, 259-263.
- Gérard, E., Echevarria, G., Sterckeman, T. et Morel, J.L. (2000) Cadmium availability to three plant species varying in cadmium accumulation pattern. *Journal of Environmental Quality*, **29**, 1117-1123.

- Ghaderian, S.M., Ghasemi, R. et Hajihashemi, F. (2015) Interaction of nickel and manganese in uptake, translocation and accumulation by the nickel-hyperaccumulator plant, *Alyssum bracteatum* (Brassicaceae). *Australian Journal of Botany*, **63**, 47-55.
- Ghasemi, R. et Ghaderian, S.M. (2009) Responses of two populations of an Iranian nickel-hyperaccumulating serpentine plant, *Alyssum inflatum* Nyar., to substrate Ca/Mg quotient and nickel. *Environmental and Experimental Botany*, **67**, 260-268.
- Ghosh, M. et Singh, S.P. (2005) A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environmental Pollution*, **133**, 365-371.
- Giusquiani, P.L., Pagliai, M., Gigliotti, G., Businelli, D. et Benetti, A. (1995) Urban waste compost: Effects on physical, chemical, and biochemical soil properties. *Journal of Environmental Quality*, **24**, 175-182.
- Glick, B.R. et Stearns, J.C. (2011) Making phytoremediation work better: Maximizing a plant's growth potential in the midst of adversity. *International Journal of Phytoremediation*, **13**, 4-16.
- Gnonlonfin, G.J.B., Sanni, A. et Brimer, L. (2012) Review scopoletin - A coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **31**, 47-56.
- Gonneau, C., Genevois, N., Frérot, H., Sirguez, C. et Sterckeman, T. (2014) Variation of trace metal accumulation, major nutrient uptake and growth parameters and their correlations in 22 populations of *Noccaea caerulescens*. *Plant and Soil*, **384**, 271-287.
- Grisson, C., Escande, V., Petit, E., Garoux, L., Boulanger, C. et Grison, C. (2013) *Psychotria douarrei* and *Geissois pruinosa*, novel resources for the plant-based catalytic chemistry. *RSC Advances*, **3**, 22340-22345.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M. et Gantet, P. (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 341-346.
- Guittonny-Philippe, A., Petit, M.-E., Masotti, V., Monnier, Y., Malleret, L., Coulomb, B., Combroux, I., Baumberger, T., Viglione, J. et Laffont-Schwob, I. (2015) Selection of wild macrophytes for use in constructed wetlands for phytoremediation of contaminant mixtures. *Journal of Environmental Management*, **147**, 108-123.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1-11.
- Halstead, R.L. (1968) Effect of different amendments on yield and composition of oats grown on a soil derived from serpentine material. *Canadian Journal of Soil Science*, **48**, 301-305.
- Halstead, R.L., Finn, B.J. et MacLean, A.J. (1969) Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants. *Canadian Journal of Soil Science*, **49**, 335-342.
- Hammer, D. et Keller, C. (2003) Phytoextraction of Cd and Zn with *Thlaspi caerulescens* in field trials. *Soil Use and Management*, **19**, 144-149.
- Hargreaves, J.C., Adl, M.S. et Warman, P.R. (2008) A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **123**, 1-14.
- Harris, A.T., Naidoo, K., Nokes, J., Walker, T. et Orton, F. (2009) Indicative assessment of the feasibility of Ni and Au phytomining in Australia. *Journal of Cleaner Production*, **17**, 194-200.
- Haydon, M.J. et Cobbett, C.S. (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, **174**, 499-506.
- Heckenroth, A., Rabier, J., Dutoit, T., Torre, F., Prudent, P. et Laffont-Schwob, I. (2016) Selection of native plants with phytoremediation potential for highly contaminated Mediterranean soil restoration: Tools for a non-destructive and integrative approach. *Journal of Environmental Management*, **183**, 850-863.

- Herath, I., Kumarathilaka, P., Navaratne, A., Rajakaruna, N. et Vithanage, M. (2015) Immobilization and phytotoxicity reduction of heavy metals in serpentine soil using biochar. *Journal of Soils and Sediments*, **15**, 126-138.
- Hernando, S., Lobo, M.C. et Polo, A. (1989) Effect of the application of a municipal refuse compost on the physical and chemical properties of a soil. *Science of The Total Environment*, **81**, 589-596.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. et Jaillard, B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, **248**, 43-59.
- Homer, F.A., Morrison, R.S., Brooks, R.R., Clemens, J. et Reeves, R.D. (1991) Comparative studies of nickel, cobalt, and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. *Plant and Soil*, **138**, 195-205.
- Houzelot, V., Laubie, B., Pontvianne, S. et Simonnot, M.-O. (2017) Effect of up-scaling on the quality of ashes obtained from hyperaccumulator biomass to recover Ni by agromining. *Chemical Engineering Research and Design*, **120**, 26-33.
- Hu, Y., Wang, N.S., Hu, X.J., Lin, X.Y., Feng, Y. et Jin, C.W. (2013) Nitrate nutrition enhances nickel accumulation and toxicity in *Arabidopsis* plants. *Plant and Soil*, **371**, 105-115.
- Huot, H. (2013) *Formation, fonctionnement et évolution d'un Technosol sur des boues sidérurgiques*. Thèse, Université de Lorraine, France.
- Huot, H., Séré, G., Charbonnier, P., Simonnot, M.-O. et Morel, J.L. (2015a) Lysimeter monitoring as assessment of the potential for revegetation to manage former iron industry settling ponds. *Science of The Total Environment*, **526**, 29-40.
- Huot, H., Simonnot, M.-O., Marion, P., Yvon, J., Donato, P.D. et Morel, J.-L. (2013) Characteristics and potential pedogenetic processes of a Technosol developing on iron industry deposits. *Journal of Soils and Sediments*, **13**, 555-568.
- Huot, H., Simonnot, M.-O. et Morel, J.-L. (2015b) Pedogenetic trends in soils formed in technogenic parent materials. *Soil Science*, **180**, 182-192.
- Huot, H., Simonnot, M.O., Watteau, F., Marion, P., Yvon, J., De Donato, P. et Morel, J.L. (2014) Early transformation and transfer processes in a Technosol developing on iron industry deposits. *European Journal of Soil Science*, **65**, 470-484.
- Jaffré, T. (1980) *Etude écologique du peuplement végétal des sols dérivés de roches ultrabasiqes en Nouvelle Calédonie*. ORSTOM, Paris.
- Jaffré, T., Brooks, R.R., Lee, J. et Reeves, R.D. (1976) *Sebertia acuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science*, **193**, 579-580.
- Jean, L. (2007) *Mobilisation du chrome et du nickel à partir de sols contaminés, en présence de complexants: transfert et accumulation de ces métaux chez Datura innoxia*. Thèse, Université de Limoges, France.
- Jhee, E.M., Boyd, R.S. et Eubanks, M.D. (2006) Effectiveness of metal-metal and metal-organic compound combinations against *Plutella xylostella*: Implications for plant elemental defense. *Journal of Chemical Ecology*, **32**, 239-259.
- Jiang, C., Wu, Q.-T., Sterckeman, T., Schwartz, C., Sirguy, C., Ouvrard, S., Perriguy, J. et Morel, J.L. (2010) Co-planting can phytoextract similar amounts of cadmium and zinc to monocropping from contaminated soils. *Ecological Engineering*, **36**, 391-395.
- Kai, K., Mizutani, M., Kawamura, N., Yamamoto, R., Tamai, M., Yamaguchi, H., Sakata, K. et Shimizu, B. (2008) Scopoletin is biosynthesized via *ortho*-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **55**, 989-999.
- Kai, K., Shimizu, B., Mizutani, M., Watanabe, K. et Sakata, K. (2006) Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **67**, 379-386.

- Kanso, A. (2016) *Optimisation des cultures d'agromine du Cd et du Zn sur des Technosols construits*. Thèse, Université de Lorraine et Université Libanaise, France-Liban.
- Karami, N., Clemente, R., Moreno-Jiménez, E., Lepp, N.W. et Beesley, L. (2011) Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. *Journal of Hazardous Materials*, **191**, 41-48.
- Karar, J., Wawra, A., Zehetner, F., Dunst, G., Wagner, M., Pavel, P.-B., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W. et Soja, G. (2015) Effects of biochars and compost mixtures and inorganic additives on immobilisation of heavy metals in contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, **226**.
- Keeling, S.M., Stewart, R.B., Anderson, C.W.N. et Robinson, B.H. (2003) Nickel and cobalt phytoextraction by the hyperaccumulator *Berkheya coddii*: Implications for polymetallic phytomining and phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, **5**, 235-244.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M. et Sennhauser, M. (2003) Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: Comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil*, **249**, 67-81.
- Keller, C., Ludwig, C., Davoli, F. et Wochele, J. (2005) Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy metal phytoextraction. *Environmental Science & Technology*, **39**, 3359-3367.
- Kerkeb, L. et Krämer, U. (2003) The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, **131**, 716-724.
- Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Erlikh, N.T., Shevyreva, T.A., Andreev, I.M., Verweij, R. et Schat, H. (2014) Histidine-mediated xylem loading of zinc is a species-wide character in *Noccaea caerulescens*. *New Phytologist*, **203**, 508-519.
- Krämer, U. (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 517-534.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M. et Smith, J.A.C. (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, **379**, 635-638.
- Kukier, U. et Chaney, R.L. (2000) Remediating Ni-phytotoxicity of contaminated Quarry muck soil using limestone and hydrous iron oxide. *Canadian Journal of Soil Science*, **80**, 581-593.
- Kukier, U. et Chaney, R.L. (2001) Amelioration of nickel phytotoxicity in muck and mineral soils. *Journal of Environmental Quality*, **30**, 1949-1960.
- Kukier, U., Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S. et Roseberg, R.J. (2004) The effect of pH on metal accumulation in two *Alyssum* species. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 2090-2102.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., Wieshammer, G. et McGrath, S.P. (2001) Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 2291-2300.
- Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D. et Barois, I. (1995) Mutualism and biodiversity in soils. *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity* Developments in Plant and Soil Sciences. (éd H.P. Collins, G.P. Robertson, M.J. Klug), p. 23-33. Springer Netherlands.
- Lebeau, T., Braud, A. et Jézéquel, K. (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, **153**, 497-522.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H. et Proix, N. (1996) Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux. *Agronomie, EDP Sciences*, **16**, 201-215.
- Lee, J., Reeves, R.D., Brooks, R.R. et Jaffré, T. (1978) The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, **17**, 1033-1035.

- Lehto, N.J., Davison, W., Zhang, H. et Tych, W. (2006) Theoretical comparison of how soil processes affect uptake of metals by diffusive gradients in thinfilms and plants. *Journal of Environmental Quality*, **35**, 1903-1913.
- Leitenmaier, B. et Küpper, H. (2013) Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in Plant Science*, **4**, DOI: 10.3389/fpls.2013.00374.
- Li, Y.-M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. et Nelkin, J. (2003a) Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel contaminated soils. *Environmental Science & Technology*, **37**, 1463-1468.
- Li, Y.-M., Chaney, R., Brewer, E., Roseberg, R., Angle, J.S., Baker, A., Reeves, R. et Nelkin, J. (2003b) Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: Economic and technical considerations. *Plant and Soil*, **249**, 107-115.
- Li, N.Y., Li, Z.A., Zhuang, P., Zou, B. et McBride, M. (2008) Cadmium uptake from soil by maize with intercrops. *Water, Air, and Soil Pollution*, **199**, 45-56.
- Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J.O., Thies, J., Luizao, F.J., Petersen, J. et Neves, E.G. (2006) Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society of America Journal*, **70**, 1719-1730.
- Lindsay, W.L. et Norvell, W.A. (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, **42**, 421-428.
- Liu, L., Li, Y., Tang, J., Hu, L. et Chen, X. (2011) Plant coexistence can enhance phytoextraction of cadmium by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, **23**, 453-460.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J. et McGrath, S.P. (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of environmental quality*, **30**, 1919-1926.
- Losfeld, G., Escande, V., Jaffré, T., L'Huillier, L. et Grison, C. (2012a) The chemical exploitation of nickel phytoextraction: An environmental, ecologic and economic opportunity for New Caledonia. *Chemosphere*, **89**, 907-910.
- Losfeld, G., Escande, V., Vidal de La Blache, P., L'Huillier, L. et Grison, C. (2012b) Design and performance of supported Lewis acid catalysts derived from metal contaminated biomass for Friedel - Crafts alkylation and acylation. *Catalysis Today*, **189**, 111-116.
- Losfeld, G., Mathieu, R., L'Huillier, L., Fogliani, B., Jaffré, T. et Grison, C. (2015) Phytoextraction from mine spoils: Insights from New Caledonia. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 5608-5619.
- Lu, H., Li, Z., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G. et Paz-Ferreiro, J. (2014) Can biochar and phytoextractors be jointly used for cadmium remediation? *PLoS One*, **9**, DOI: 10.1371/journal.pone.0095218.
- Ma, Y., Rajkumar, M. et Freitas, H. (2009) Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere*, **75**, 719-725.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005) *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- Madden, M.S. (1988) *Adapting the Sr(NO₃)₂ Method for Determining Available Cations to a Routine Soil Testing Procedure*. University of Wisconsin - Madison.
- Malaisse, F., Grégoire, J., Morrison, R.S., Brooks, R.R. et Reeves, R.D. (1979) Copper and cobalt in vegetation of Fungurume, Shaba Province, Zaïre. *Oikos*, **33**, 472-478.
- Malik, M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Li, Y.-M. et Angle, J.S. (2000) Phytoextraction of soil cobalt using hyperaccumulator plants. *International Journal of Phytoremediation*, **2**, 319-329.

- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Elsevier Ltd. Academic Press, London.
- Massoura, S.T., Echevarria, G., Becquer, T., Ghanbaja, J., Leclerc-Cessac, E. et Morel, J.-L. (2006) Control of nickel availability by nickel bearing minerals in natural and anthropogenic soils. *Geoderma*, **136**, 28-37.
- McGrath, S.P., Lombi, E., Gray, C.W., Caille, N., Dunham, S.J. et Zhao, F.J. (2006) Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution*, **141**, 115-125.
- McGrath, S.P. et Zhao, F.-J. (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 277-282.
- McIlveen, W.D. et Negusanti, J.J. (1994) Nickel in the terrestrial environment. *Science of the total environment*, **148**, 109-138.
- Mellis, E.V., Cruz, M.C.P. da et Casagrande, J.C. (2004) Nickel adsorption by soils in relation to pH, organic matter, and iron oxides. *Scientia Agricola*, **61**, 190-195.
- Mesjasz-Przybylowicz, J., Balkwill, K., Przybylowicz, W.J. et Annegarn, H.J. (1994) Proton microprobe and X-ray fluorescence investigations of nickel distribution in serpentine flora from South Africa. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **89**, 208-212.
- Mesjasz-Przybylowicz, J., Przybylowicz, W.J. et Pineda, C.A. (2001a) Nuclear microprobe studies of elemental distribution in apical leaves of the Ni hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *South African Journal of Science*, **97**, 591-593.
- Mesjasz-Przybylowicz, J., Przybylowicz, W.J., Rama, D.B.K. et Pineda, C.A. (2001b) Elemental distribution in *Senecio anomalochrous*, a Ni hyperaccumulator from South Africa. *South African Journal of Science*, **97**, 593-595.
- Minguzzi, C. et Vergnano, O. (1948) Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii* Desv. *Memorie, Societa Toscana di Scienze Naturali*, **55**, 49-74.
- Mishra, D. et Kar, M. (1974) Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review*, **40**, 395-452.
- Mnasri, M., Ghabriche, R., Fourati, E., Zaier, H., Sabally, K., Barrington, S., Lutts, S., Abdelly, C. et Ghnaya, T. (2015) Cd and Ni transport and accumulation in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*: implication of organic acids in these processes. *Frontiers in Plant Science*, **6**, DOI: 10.3389/fpls.2015.00156.
- Montargès-Pelletier, E., Chardot, V., Echevarria, G., Michot, L.J., Bauer, A. et Morel, J.-L. (2008) Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study. *Phytochemistry*, **69**, 1695-1709.
- Morel, J.L. (1996) Bioavailability of trace elements to terrestrial plants _ Chapitre 6. *Soil Ecotoxicology* (éd J. Tarradellas, G. Bitton, D. Rossel), p. 141-176. Lewis Publishers, CRC Press.
- Morel, J.L. (2013) Using plants to "micro-mine" metals. URL <http://www.inra.fr/en/en/Scientists-Students/Biomass/All-the-news/Using-plants-to-micro-mine-metals> [accessed 2 avril 2017]
- Morel, J.L., Chenu, C. et Lorenz, K. (2014) Ecosystem services provided by soils of urban, industrial, traffic, mining, and military areas (SUITMAs). *Journal of Soils and Sediments*.
- Morel, J.-L., Guckert, A., Claude, A.-M. et Jeanbille, A. (1984) Évolution en plein champ de la solubilité dans DTPA des métaux lourds du sol introduits par des épandages de boues urbaines chaulées. *Agronomie*, **4**, 377-386.
- Morrey, D.R., Balkwill, K. et Balkwill, M.-J. (1989) Studies on serpentine flora: Preliminary analyses of soils and vegetation associated with serpentinite rock formations in the South-Eastern Transvaal. *South African Journal of Botany*, **55**, 171-177.

- Murray, R.D.H., Méndez, J. et Brown, S.A. (1982) *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry, and Biochemistry*. Wiley, New-York.
- Nascimento, C.W.A. do et Xing, B. (2006) Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia agricola*, **63**, 299-311.
- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: Mechanisms and controls. *Agronomie*, **23**, 375-396.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. et Mizuno, T. (2011) AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 1433-1442.
- Nkrumah, P.N., Baker, A.J.M., Chaney, R.L., Erskine, P.D., Echevarria, G., Morel, J.L. et Ent, A. van der. (2016) Current status and challenges in developing nickel phytomining: An agronomic perspective. *Plant and Soil*, **406**, 55-69.
- Oleszczuk, P., Joško, I. et Kuśmierz, M. (2013) Biochar properties regarding to contaminants content and ecotoxicological assessment. *Journal of Hazardous Materials*, **260**, 375-382.
- Orłowska, E., Przybyłowicz, W., Orłowski, D., Turnau, K. et Mesjasz-Przybyłowicz, J. (2011) The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environmental Pollution*, **159**, 3730-3738.
- Pakdaman, N., Ghaderian, S.M., Ghasemi, R. et Asemaneh, T. (2013) Effects of calcium/magnesium quotients and nickel in the growth medium on growth and nickel accumulation in *Pistacia atlantica*. *Journal of Plant Nutrition*, **36**, 1708-1718.
- Palmer, J.P. (1990) Reclamation and decontamination of metalliferous mining tailings. *International journal of mine water*, **9**, 223-235.
- Pancaró, L., Dekock, P.C., Gabbrielli, R. et Vergnano, O. (1988) The composition of *Alyssum bertolonii* Desv. (Cruciferae): Further contribution. *Atti Societa Toscana di Scienze Naturali*, **95**, 125-135.
- Parr, J.F., Papendick, R.I. et Colacicco, D. (1986) Recycling of organic wastes for a sustainable agriculture. *Biological Agriculture & Horticulture*, **3**, 115-130.
- Pavlova, D., Karadjova, I. et Ganeva, A. (2013) Nickel accumulation screening of the ultramafic flora of Bulgaria. *OT Sistematič Botanik Dergisi*, **20**, 41-52.
- Paxton, J.D. (1981) Phytoalexins - A working redefinition. *Journal of Phytopathology*, **101**, 106-109.
- Paz-Ferreiro, J., Lu, H., Fu, S., Méndez, A. et Gascó, G. (2014) Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review. *Solid Earth*, **5**, 65-75.
- Peer, W.A., Mahmoudian, M., Freeman, J.L., Lahner, B., Richards, E.L., Reeves, R.D., Murphy, A.S. et Salt, D.E. (2006) Assessment of plants from the Brassicaceae family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytologist*, **172**, 248-260.
- Peer, W.A., Mamoudian, M., Lahner, B., Reeves, R.D., Murphy, A.S. et Salt, D.E. (2003) Identifying model metal hyperaccumulating plants: Germplasm analysis of 20 Brassicaceae accessions from a wide geographical area. *New Phytologist*, **159**, 421-430.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. et van der Putten, W.H. (2013) Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 789-799.
- Pons, M.-N., Rodrigues, J. et Simonnot, M.O. (Sous presse) Life cycle assessment and ecosystem services of agromining. *Agromining: Farming for metals*, Springer Inc. p. .
- Proctor, J. (1999) Toxins, nutrient shortages and droughts: The serpentine challenge. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 334-335.
- Proctor, J. et Cottam, D.A. (1982) Growth of oats, beet and rape in four serpentine soils. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, **44**, 19-25.

- Proctor, J., Johnston, W.R., Cottam, D.A. et Wilson, A.B. (1981) Field-capacity water extracts from serpentine soils. *Nature*, **294**, 245-246.
- Proctor, J. et Woodell, S.R.J. (1975) The ecology of serpentine soils. *Advances in Ecological Research* (éd A. MacFadyen), p. 255-366. Academic Press.
- Psaras, G. (2000) Relative abundance of nickel in the leaf epidermis of eight hyperaccumulators: Evidence that the metal is excluded from both guard cells and trichomes. *Annals of Botany*, **86**, 73-78.
- Psaras, G.K. et Constantinidis, T. (2009) Two new nickel hyperaccumulators from the Greek serpentine flora. *Fresenius Environmental Bulletin*, **18**, 798-803.
- Puschenreiter, M., Stöger, G., Lombi, E., Horak, O. et Wenzel, W.W. (2001) Phytoextraction of heavy metal contaminated soils with *Thlaspi goesingense* and *Amaranthus hybridus*: Rhizosphere manipulation using EDTA and ammonium sulfate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **164**, 615-621.
- Rajkumar, M. et Freitas, H. (2008) Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by *Indian mustard*. *Bioresource Technology*, **99**, 3491-3498.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V. et Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, **30**, 1562-1574.
- Raous, S., Becquer, T., Garnier, J., de Souza Martins, É., Echevarria, G. et Sterckeman, T. (2010) Mobility of metals in nickel mine spoil materials. *Applied Geochemistry*, **25**, 1746-1755.
- Rascio, N. et Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, **180**, 169-181.
- Rees, F., Germain, C., Sterckeman, T. et Morel, J.-L. (2015) Plant growth and metal uptake by a non-hyperaccumulating species (*Lolium perenne*) and a Cd-Zn hyperaccumulator (*Noccaea caerulescens*) in contaminated soils amended with biochar. *Plant and Soil*, **395**, 57-73.
- Rees, F., Simonnot, M.O. et Morel, J.L. (2014) Short-term effects of biochar on soil heavy metal mobility are controlled by intra-particle diffusion and soil pH increase: Heavy metal mobility in biochar-amended soils. *European Journal of Soil Science*, **65**, 149-161.
- Rees, F., Sterckeman, T. et Morel, J.L. (2016) Root development of non-accumulating and hyperaccumulating plants in metal-contaminated soils amended with biochar. *Chemosphere*, **142**, 48-55.
- Reeves, R.D. (1992) Hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*, Intercept, Anodver UK (éd A.J.M. Baker, J. Proctor, R.D. Reeves), p. 253-277.
- Reeves, R.D. et Adigüzel, N. (2008) The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of Turkey and adjacent areas: A review with new data. *Turkish Journal of Biology*, **32**, 143-153.
- Reeves, R.D. et Baker, A.J.M. (1984) Studies on metal uptake by plants from serpentine and non-serpentine populations of *Thlaspi goesingense* Hálácsy (Cruciferae). *New Phytologist*, **98**, 191-204.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Borhidi, A. et Berazaín, R. (1999) Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany*, **83**, 29-38.
- Reeves, R.D., Brooks, R.R. et Dudley, T.R. (1983) Uptake of nickel by species of *Alyssum*, *Bornmuellera*, and other genera of old world tribus *Alysseae*. *Taxon*, **32**, 184-192.
- Reeves, R.D., Brooks, R.R. et Press, J.R. (1980) Nickel accumulation by species of *Peltaria* Jacq. (Cruciferae). *Taxon*, **29**, 629-633.
- Ressources secondaires | Minéralinfo. URL <http://www.mineralinfo.fr/page/ressources-secondaires> [accessed 28 février 2017]

- Rio, M., Franco-Uría, A., Abad, E. et Roca, E. (2011) A risk-based decision tool for the management of organic waste in agriculture and farming activities (FARMERS). *Journal of Hazardous Materials*, **185**, 792-800.
- Robinson, B.H., Brooks, R.R. et Clothier, B.E. (1999) Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: Potential use for phytomining and phytoremediation. *Annals of Botany*, **84**, 689-694.
- Robinson, B.H., Brooks, R.R., Howes, A.W., Kirkman, J.H. et Gregg, P.E.H. (1997a) The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *Journal of Geochemical Exploration*, **60**, 115-126.
- Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.-H., Gregg, P.E.H. et De Dominicis, V. (1997b) The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration*, **59**, 75-86.
- Robinson, B.H., Lombi, E., Zhao, F.J. et McGrath, S.P. (2003) Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytologist*, **158**, 279-285.
- Rodrigues, J., Houzelot, V., Ferrari, F., Echevarria, G., Laubie, B., Morel, J.-L., Simonnot, M.-O. et Pons, M.-N. (2016) Life cycle assessment of agromining chain highlights role of erosion control and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, **139**, 770-778.
- Rodríguez-Vila, A., Covelo, E.F., Forján, R. et Asensio, V. (2014) Phytoremediating a copper mine soil with *Brassica juncea* L., compost and biochar. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**, 11293-11304.
- Rodríguez-Vila, A., Covelo, E.F., Forján, R. et Asensio, V. (2015) Recovering a copper mine soil using organic amendments and phytomanagement with *Brassica juncea* L. *Journal of Environmental Management*, **147**, 73-80.
- Rohde, A. (2004) Molecular phenotyping of the pal1 and pal2 mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *The Plant Cell online*, **16**, 2749-2771.
- Rokia, S. (2014) *Contribution à la modélisation des processus d'agrégation et de transfert d'éléments nutritifs dans les Technosols construits à partir de déchets*. Thèse, Université de Lorraine, France.
- Rokia, S., Séré, G., Schwartz, C., Deeb, M., Fournier, F., Nehls, T., Damas, O. et Vidal-Beaudet, L. (2014) Modelling agronomic properties of Technosols constructed with urban wastes. *Waste Management*, **34**, 2155-2162.
- Roosens, N., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximenez-Embun, P. et Smith, J.A.C. (2003) Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from Western Europe. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 1657-1672.
- Rosenkranz, T., Kisser, J., Wenzel, W.W. et Puschenreiter, M. (2017) Waste or substrate for metal hyperaccumulating plants - The potential of phytomining on waste incineration bottom ash. *Science of The Total Environment*, **575**, 910-918.
- Rue, M., Vallance, J., Echevarria, G., Rey, P. et Benizri, E. (2015) Phytoextraction of nickel and rhizosphere microbial communities under mono- or multispecies hyperaccumulator plant cover in a serpentine soil. *Australian Journal of Botany*, **63**, 92-102.
- Salt, D.E., Smith, R.D. et Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 643-668.
- Samake, M., Wu, Q.-T., Mo, C. et Morel, J.-L. (2003) Plants grown on sewage sludge in South China and its relevance to sludge stabilization and metal removal. *Journal of Environmental Sciences*, **15**, 622-627.

- Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Małkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J.M. et Kryński, K. (2004) Phytoextraction crop disposal - An unsolved problem. *Environmental Pollution*, **128**, 373-379.
- Schmid, N.B., Giehl, R.F.H., Doll, S., Mock, H.-P., Strehmel, N., Scheel, D., Kong, X., Hider, R.C. et von Wiren, N. (2014) Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **164**, 160-172.
- Schwartz, C., Sirguy, C., Peronny, S., Reeves, R.D., Bourgaud, F. et Morel, J.L. (2006) Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation*, **8**, 339-357.
- Séré, G. (2007) *Fonctionnement et évolution pédogénétiques de Technosols issus d'un procédé de construction de sol*. Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Séré, G., Schwartz, C., Ouvrard, S., Renat, J.-C., Watteau, F., Villemin, G. et Morel, J.L. (2010) Early pedogenic evolution of constructed Technosols. *Journal of Soils and Sediments*, **10**, 1246-1254.
- Séré, G., Schwartz, C., Ouvrard, S., Sauvage, C., Renat, J.-C. et Morel, J.L. (2008) Soil construction: A step for ecological reclamation of derelict lands. *Journal of Soils and Sediments*, **8**, 130-136.
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K. et Puschenreiter, M. (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **60**, 182-194.
- Shabala, S. et Hariadi, Y. (2005) Effects of magnesium availability on the activity of plasma membrane ion transporters and light-induced responses from broad bean leaf mesophyll. *Planta*, **221**, 56-65.
- Sharma, S.S. et Dietz, K.-J. (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, **57**.
- Siebielec, G. et Chaney, R.L. (2006) Manganese fertilizer requirement to prevent manganese deficiency when liming to remediate Ni-phytotoxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **37**, 163-179.
- Siebielec, G., Chaney, R.L. et Kukier, U. (2007) Liming to remediate Ni contaminated soils with diverse properties and a wide range of Ni concentration. *Plant and Soil*, **299**, 117-130.
- Silva, W.P.K., Deraniyagala, S.A., Wijesundera, R.L.C., Karunanayake, E.H. et Priyanka, U.M.S. (2002) Isolation of scopoletin from leaves of *Hevea brasiliensis* and the effect of scopoletin on pathogens of *H. brasiliensis*. *Mycopathologia*, **153**, 199-202.
- Simonnot, M.O., Laubie, B., Mocellin, J., Mercier, G. et Blais, J.F. (2017) Recovery of strategic metals from urban soils. *Soils within cities*, IUSS Working Group SUITMA, Catena-Schweizerbart (éd Levin M.J., Kim K.H.J., Morel J.L., Burghardt W., Charzynski P., Shaw R.K.), p. 189-196. Levin M.J., Kim K.H.J., Morel J.L., Burghardt W., Charzynski P., Shaw R.K., Stuttgart.
- Simonnot, M.O., Vaughan, J. et Laubie, B. (Sous presse) Processing of bio-ore and products. *Agromining: Farming for metals*, Springer Inc p. .
- Siwinska, J., Kadzinski, L., Banasiuk, R., Gwizdek-Wisniewska, A., Olry, A., Banecki, B., Lojkowska, E. et Ichnatowicz, A. (2014) Identification of QTLs affecting scopolin and scopoletin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, **14**, 280.
- Smart, K.E., Kilburn, M.R., Salter, C.J., Smith, J.A.C. et Grovenor, C.R.M. (2007) NanoSIMS and EPMA analysis of nickel localisation in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *International Journal of Mass Spectrometry*, **260**, 107-114.
- Streubel, J.D., Collins, H.P., Garcia-Perez, M., Tarara, J., Granatstein, D. et Kruger, C.E. (2011) Influence of contrasting biochar types on five soils at increasing rates of application. *Soil Science Society of America Journal*, **75**, 1402-1413.

- Tamm, O. (1922) Eine methode zur bestimmung der anorganischen komponente des gelkplexes im boden. *Meddelanden fran Statens Skogsförsöksanstalt*, **19**, 385-404.
- Tang, Y.-T., Deng, T.-H.-B., Wu, Q.-H., Wang, S.-Z., Qiu, R.-L., Wei, Z.-B., Guo, X.-F., Wu, Q.-T., Lei, M., Chen, T.-B., Echevarria, G., Sterckeman, T., Simonnot, M.-O. et Morel, J.L. (2012) Designing cropping systems for metal-contaminated sites: A review. *Pedosphere*, **22**, 470-488.
- Tappero, R., Peltier, E., Gräfe, M., Heidel, K., Ginder-Vogel, M., Livi, K.J.T., Rivers, M.L., Marcus, M.A., Chaney, R.L. et Sparks, D.L. (2007) Hyperaccumulator *Alyssum murale* relies on a different metal storage mechanism for cobalt than for nickel. *New Phytologist*, **175**, 641-654.
- Taylor, M.D. (1997) Accumulation of cadmium derived from fertilisers in New Zealand soils. *Science of The Total Environment*, **208**, 123-126.
- Testiati, E., Parinet, J., Massiani, C., Laffont-Schwob, I., Rabier, J., Pfeifer, H.-R., Lenoble, V., Masotti, V. et Prudent, P. (2013) Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: Evaluation of the phytostabilization potential. *Journal of Hazardous Materials*, **248-249**, 131-141.
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M. et Willis, A.J. (2000) Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere*, **41**, 219-228.
- Tyndall, R. et Hull, J. (1999) Vegetation, flora, and plant physiological ecology of serpentine barrens of Eastern North America. *Savannas, barrens, and rock outcrop plant communities of North America* p. Cambridge, UK.
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W.N., Meech, J.A., Erskine, P.D., Simonnot, M.-O., Vaughan, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q. et Mulligan, D.R. (2015a) Agromining: Farming for metals in the future? *Environmental Science & Technology*, **49**, 4773-4780.
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J. et Schat, H. (2012) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*, **362**, 319-334.
- Van der Ent, A., Callahan, D.L., Noller, B.N., Mesjasz-Przybylowicz, J., Przybylowicz, W.J., Barnabas, A. et Harris, H.H. (2017) Nickel biopathways in tropical nickel hyperaccumulating trees from Sabah (Malaysia). *Scientific Reports*, **7**.
- Van der Ent, A., Echevarria, G. et Erskine, P. (2016) Recent advances in developing tropical nickel agromining. *Canadian Institute of Mining, Metallurgy and Petroleum*.
- Van der Ent, A., Erskine, P. et Sumail, S. (2015b) Ecology of nickel hyperaccumulator plants from ultramafic soils in Sabah (Malaysia). *Chemoecology*, **25**, 243-259.
- Van der Ent, A., Mulligan, D. et Erskine, P. (2013) Newly discovered nickel hyperaccumulators from Kinabalu Park, Sabah (Malaysia) with potential for phytomining. p. 213 - 221. Gecamin.
- Varenes, A. de, Torres, M.O., Coutinho, J.F., Rocha, M.M.G.S. et Neto, M.M.P.M. (1996) Effects of heavy metals on the growth and mineral composition of a nickel hyperaccumulator. *Journal of Plant Nutrition*, **19**, 669-676.
- Vaughan, J., Riggio, J., Chen, J., Peng, H., Harris, H.H. et Van der Ent, A. (2017) Characterisation and hydrometallurgical processing of nickel from tropical agromined bio-ore. *Hydrometallurgy*, **169**, 346-355.
- Vega, F.A., Covelo, E.F. et Andrade, M.L. (2005) Limiting factors for reforestation of mine spoils from Galicia (Spain). *Land Degradation & Development*, **16**, 27-36.
- Verbruggen, N., Hermans, C. et Schat, H. (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, **181**, 759-776.
- Vidal-Beaudet, L., Rokia, S., Nehls, T. et Schwartz, C. (2016) Aggregation and availability of phosphorus in a Technosol constructed from urban wastes. *Journal of Soils and Sediments*, **En ligne**, DOI: 10.1007/s11368-016-1469-3.

- Vinterhalter, B., Savić, J., Platiša, J., Raspor, M., Ninković, S., Mitić, N. et Vinterhalter, D. (2008) Nickel tolerance and hyperaccumulation in shoot cultures regenerated from hairy root cultures of *Alyssum murale* Waldst et Kit. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **94**, 299-303.
- Vinterhalter, B. et Vinterhalter, D. (2005) Nickel hyperaccumulation in shoot cultures of *Alyssum markgrafii*. *Biologia Plantarum*, **49**, 121-124.
- Walker, R.B., Walker, H.M. et Ashworth, P.R. (1955) Calcium-magnesium nutrition with special reference to serpentine soils. *Plant physiology*, **30**, 214-221.
- Wang, A.S., Angle, J.S., Chaney, R.L., Delorme, T.A. et Reeves, R.D. (2006) Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*, **281**, 325-337.
- Wei, W., Wang, Y., Wei, Z.-G., Zhao, H.-Y., Li, H.-X. et Hu, F. (2009) Roles of organic acids and nitrate in the long-distance transport of cobalt in xylem saps of *Alyssum murale* and *Trifolium subterraneum*. *Biological Trace Element Research*, **131**, 165-176.
- Welch, R.M. (1981) The biological significance of nickel. *Journal of Plant Nutrition*, **3**, 345-356.
- Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M. et Horak, O. (2003) Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*, **123**, 131-138.
- Westerman, P.W. et Bicudo, J.R. (2005) Management considerations for organic waste use in agriculture. *Bioresource Technology*, **96**, 215-221.
- Whiting, S.N., Leake, J.R., McGrath, S.P. et Baker, A.J.M. (2001a) Hyperaccumulation of Zn by *Thlaspi caerulescens* can ameliorate Zn toxicity in the rhizosphere of cocropped *Thlaspi arvense*. *Environmental Science & Technology*, **35**, 3237-3241.
- Whiting, S.N., de Souza, M.P. et Terry, N. (2001b) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science & Technology*, **35**, 3144-3150.
- Wieshammer, G., Unterbrunner, R., García, T.B., Zivkovic, M.F., Puschenreiter, M. et Wenzel, W.W. (2007) Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* ssp. and intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil*, **298**, 255-264.
- Wilding, L.P. (1985) Spatial variability: Its documentation, accommodation and implication to soil surveys. p. 166-194. Pudoc, Wageningen, Pays-Bas, Las Vegas.
- Wiltshire, G.H. (1972) Effect of nitrogen source on translocation of nickel in some crop plants and weeds. *Kirkia*, **8**, 103-123.
- Wiszniewska, A., Hanus-Fajerska, E., Muszynska, E. et Ciarkowska, K. (2016) Natural organic amendments for improved phytoremediation of polluted soils: A review of recent progress. *Pedosphere*, **26**, 1-12.
- Wood, B.W., Chaney, R. et Crawford, M. (2006) Correcting micronutrient deficiency using metal hyperaccumulators: *Alyssum* biomass as a natural product for nickel deficiency correction. *HortScience*, **41**, 1231-1234.
- Wu, Q.-T., Hei, L., Wong, J.W.C., Schwartz, C. et Morel, J.-L. (2007) Co-cropping for phyto-separation of zinc and potassium from sewage sludge. *Chemosphere*, **68**, 1954-1960.
- Wu, W., Yang, M., Feng, Q., McGrouther, K., Wang, H., Lu, H. et Chen, Y. (2012) Chemical characterization of rice straw-derived biochar for soil amendment. *Biomass and Bioenergy*, **47**, 268-276.
- Xiaomei, L., Qitang, W. et Banks, M.K. (2005) Effect of simultaneous establishment of *Sedum alfredii* and *Zea mays* on heavy metal accumulation in plants. *International Journal of Phytoremediation*, **7**, 43-53.
- Yang, S., Cao, J., Hu, W., Zhang, X. et Duan, C. (2013) An evaluation of the effectiveness of novel industrial by-products and organic wastes on heavy metal immobilization in Pb-Zn mine tailings. *Environmental Science: Processes & Impacts*, **15**, 2059.

- Yang, S., Cao, J., Li, F., Peng, X., Peng, Q., Yang, Z. et Chai, L. (2016a) Field evaluation of the effectiveness of three industrial by-products as organic amendments for phytostabilization of a Pb/Zn mine tailings. *Environmental Science: Processes & Impacts*, **18**, 95-103.
- Yang, S., Liao, B., Yang, Z., Chai, L. et Li, J. (2016b) Revegetation of extremely acid mine soils based on aided phytostabilization: A case study from Southern China. *Science of The Total Environment*, **562**, 427-434.
- Yang, S.-M., Shim, G.Y., Kim, B.-G. et Ahn, J.-H. (2015) Biological synthesis of coumarins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, **14**.
- Yilmaz, D., Cannavo, P., Séré, G., Vidal-Beaudet, L., Legret, M., Damas, O. et Peyneau, P.-E. (2016) Physical properties of structural soils containing waste materials to achieve urban greening. *Journal of Soils and Sediments*, **online**, DOI: 10.1007/s11368-016-1524-0.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q. et Ma, L.Q. (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment*, **368**, 456-464.
- Younis, U., Athar, M., Malik, S.A., Raza Shah, M.H. et Mahmood, S. (2015) Biochar impact on physiological and biochemical attributes of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) in nickel contaminated soil. *Global Journal of Environmental Science and Management*, **1**, 245-254.
- Zaccheo, P., Crippa, L. et Pasta, V.D.M. (2006) Ammonium nutrition as a strategy for cadmium mobilisation in the rhizosphere of sunflower. *Plant and Soil*, **283**, 43-56.
- Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D. et Tilman, D. (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology*, **84**, 2042-2050.
- Zevenbergen, C., Bradley, J.P., van Reeuwijk, L.P., Shyam, A.K., Hjelmar, O. et Comans, R.N.J. (1999) Clay formation and metal fixation during weathering of coal fly ash. *Environmental Science & Technology*, **33**, 3405-3409.
- Zhang, L., Angle, J.S. et Chaney, R.L. (2007) Do high-nickel leaves shed by the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* inhibit seed germination of competing plants? *New Phytologist*, **173**, 509-516.
- Zhang, X., Houzelot, V., Bani, A., Morel, J.L., Echevarria, G. et Simonnot, M.-O. (2014) Selection and combustion of Ni-hyperaccumulators for the phytomining process. *International Journal of Phytoremediation*, **16**, 1058-1072.
- Zhang, X., Laubie, B., Houzelot, V., Plasari, E., Echevarria, G. et Simonnot, M.-O. (2016) Increasing purity of ammonium nickel sulfate hexahydrate and production sustainability in a nickel phytomining process. *Chemical Engineering Research and Design*, **106**, 26-32.
- Zhao, F.J., Hamon, R.E. et McLaughlin, M.J. (2001) Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytologist*, **151**, 613-620.
- Zikeli, S., Kastler, M. et Jahn, R. (2004) Cation exchange properties of soils derived from lignite ashes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **167**, 439-448.
- Zwieten, L.V., Kimber, S., Morris, S., Chan, K.Y., Downie, A., Rust, J., Joseph, S. et Cowie, A. (2010) Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and Soil*, **327**, 235-246.

ANNEXES

Liste des annexes

Annexes de la Partie 2

Annexe 1 _ Photographie et description d'une boue de station d'épuration d'un atelier industriel (boue B)	226
Annexe 2 _ Matériaux utilisés : date de prélèvement, quantité et préparation.....	226
Annexe 3 _ Composition des eaux utilisées pour l'arrosage des expérimentations.....	227
Annexe 4 _ Photographie des tests de germination : a) semis de <i>L. emarginata</i> , b) radicule d' <i>A. murale</i> , c) radicule de <i>L. emarginata</i>	228

Annexes de la Partie 3

Annexe 5 _ Matrices de corrélation pour chacune des huit populations, selon les concentrations des parties aériennes après 70 jours de culture sur sol ultramafique.....	229
Annexe 6 _ Coefficient de Spearman (r_s) des concentrations dans les parties aériennes de Ni_Co, Ni_Zn, Ni_Ca	231
Annexe 7 _ Coefficients de variation pour chaque élément et par population	232
Annexe 8 _ Concentrations des molécules lors du criblage	233
Annexe 9 _ Relation du a) Ni ; b) Co mesurés à l'ICP-OES en fonction de la mesure effectuée par XRF sur des feuilles de <i>B. coddii</i>	234
Annexe 10 _ Répartition des individus récoltés selon le bloc de culture.....	234

Annexes de la Partie 4

Annexe 11 _ Siliques et graines de a) <i>B. tymphaea</i> (Site VI) et b) <i>L. emarginata</i> (Site VIII).....	235
Annexe 12 _ Mode opératoire pour la préparation des mélanges secs et en suspension pour le troisième test de germination.....	235
Annexe 13 _ Photographies des tests de germination avec 30% de boue et 5 % de biochar selon le mode de préparation.....	236
Annexe 14 _ Cinétique de germination de <i>L. emarginata</i> sur des substrats contenant 0 à 100% (m) de boue de phosphatation (MS) avec ou sans biochar	236
Annexe 15 _ Cinétique de germination de a) <i>L. emarginata</i> et b) <i>A. murale</i> sur six substrats élaborés avec des fractions massiques de boue de phosphatation variant de 0 à 30%.....	237
Annexe 16 _ Graines de <i>Zea mays</i> 17 jours après le semis.....	237
Annexe 17 _ Cinétique de germination de <i>Zea mays</i> de quatre à sept jours après le semis sur des matériaux a) mélangés en suspension dans de l'eau ou b) mélangés secs	238
Annexe 18 _ Taux de graines germées et de graines vivantes de <i>Zea mays</i> à onze jours.....	238
Annexe 19 _ Dispositif des mésocosmes dans la chambre de culture.....	238
Annexe 20 _ Photographies des plantes lors de la récolte	239
Annexe 21 _ Nombre de plantules d' <i>A. murale</i> et de <i>L. emarginata</i> présentes par modalité	239
Annexe 22 _ Biomasse aérienne cumulée par modalité.....	240
Annexe 23 _ Ni prélevé par <i>A. murale</i> et <i>L. emarginata</i> par vase par rapport au Ni total dans le substrat	240
Annexe 24 _ Concentration du Zn dans les parties aériennes et racinaires d' <i>A. murale</i> et <i>L. emarginata</i>	240

Annexe 25 _ pH des substrats selon une dose croissante de boue, avec et sans amendement en biochar.....	241
Annexe 26 _ a) Capacité de rétention en eau et point de flétrissement des substrats nus avant culture et après culture	241
Annexe 27 _ Humidité de la terre rhizosphérique selon une dose croissante de boue, avec et sans amendement en biochar	242
Annexe 28 _ Cinétique de germination de huit populations d' <i>A. murale</i> sur une matrice contenant un rapport de 90% de biopile et 10% de boue de phosphatation (m/m).....	242
Annexe 29 _ Capacité au champ des différents substrats.....	242
Annexe 30 _ Frise chronologique des principales interventions pendant l'expérimentation.....	243
Annexe 31 _ Suivi de la repousse du ray-grass après la première coupe	243
Annexe 32 _ Biomasses aériennes (coupe 1 et coupe 2) du ray-grass.....	244
Annexe 33 _ Surface racinaire d' <i>A. murale</i> selon le substrat et la dose de biochar (1, 3 ou 5%)	244
Annexe 34 _ a) Longueur totale et b) diamètre moyen des racines d' <i>A. murale</i> selon le substrat et la dose de biochar	244
Annexe 35 _ Teneurs de carbone dans les parties aériennes (coupe 1, à 6 sem et coupe 2, à 12 sem) et parties racinaires (PR) du ray-grass cultivé sur le substrat M.....	245
Annexe 36 _ Teneurs en azote dans les parties aériennes (coupe 1 à 6 sem et coupe 2 à 12 sem) et parties racinaires (PR) du ray-grass cultivé sur le substrat M.....	245
Annexe 37 _ pH de la solution du substrat M et du sol U après 4 semaines d'incubation, avec une fraction massique de biochar de 0, 1, 3 et 5%.....	245
Annexe 38 _ Conductivité de la solution des sols nus du substrat M et du sol U après 4 et 14 semaines d'incubation selon une dose croissante de biochar.....	246
Annexe 39 _ Concentration en nitrates dans la solution du substrat ultramafique (U) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement	247
Annexe 40 _ Concentration en ammonium dans la solution du substrat élaboré (M) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement	247
Annexe 41 _ Concentration en C organique dans les solutions du substrat ultramafique (U) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement.....	248
Annexe 42 _ Concentration en C organique dans les solutions du substrat élaboré (M) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement	248
Annexe 43 _ pH des substrats M et U après 120 jours d'expérimentation en fonction du couvert et de la dose de biochar	249
Annexe 44 _ Observations microscopiques ; photographie de a) M0 sol nu et b) U5 <i>A. murale</i> .	249
Annexe 45 _ Concentrations du Ni et du Zn extractibles au DTPA sur les sols M et U avant culture selon 4 amendements en biochar (0, 1, 3 et 5%).....	250
Annexe 46 _ Matrice de corrélation de l'analyse en composantes principales des variables mesurées sur U et M pour les deux espèces.....	250
Annexe 47 _ Matrice de corrélation pour <i>A. murale</i> sur le sol U.....	251
Annexe 48 _ Matrice de corrélation pour <i>A. murale</i> sur le substrat M.....	251
Annexe 49 _ Matrice de corrélation pour le ray-grass sur le substrat U.....	252
Annexe 50 _ Matrice de corrélation pour le ray-grass sur le substrat M.....	252
Annexe 51 _ Complément du Chapitre 2 de la Partie 4	253
Annexes de la Partie 5	
Annexe 52_ Composition pseudo totale des mélanges et des boues	262
Annexe 53 _ Répartition des biomasses végétales selon leur catégorie et le substrat.....	262

Annexe 54 _ Concentrations du Ni et du Zn dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> selon le substrat élaboré.....	263
Annexe 55 _ Concentrations du Ni et du Zn dans les parties racinaires de <i>L. emarginata</i> en fonction du substrat et de la profondeur dans le vase.....	263
Annexe 56 _ Matrice de corrélation des éléments dosés dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> ainsi que les biomasses aérienne (BioPA), racinaire (BioPR) et le taux de survie	264
Annexe 57 _ Concentrations du Ni et du Zn disponibles (extraction DTPA) dans le substrat à l'issue de la culture en fonction de la profondeur et du substrat.....	264
Annexe 58 _ Modélisation de la complexation du DTPA avec le Zn et le Ni lors d'une extraction sur la boue de phosphatation	265
Annexe 59 _ Dispositif de culture en bacs.....	266
Annexe 60 _ Caractéristiques des substrats.....	267
Annexe 61 _ Concentration en Zn et Ni dans les parties aériennes de <i>B. coddii</i> après 3 mois de culture sur les substrats élaborés et dans le témoin.....	268
Annexe 62 _ Matrice de corrélations et analyse en composantes principales basées sur les paramètres mesurés sur les lixiviats	269
Annexe 63 _ Matrice de corrélation des quantités d'éléments cumulées dans les lixiviats (QX) au cours des 3 premiers mois d'expérimentation et des concentrations dosées dans les parties aériennes (XPA).....	270

Annexes de la Partie 2 : Matériels et méthodes

Annexe 1 _ Photographie et description d'une boue de station d'épuration d'un atelier industriel (boue B)

Les effluents du procédé de cataphorèse, additionnés aux effluents d'autres procédés (bains de rinçage, peinture) sont mélangés et traités par une station d'épuration d'effluents (Annexe 1). En sortie, les effluents sont filtrés et le résidu solide peut contenir des éléments d'intérêts. Ce résidu est chargé en carbone car la première étape de la STEP consiste en un traitement bactérien. Il est chaulé afin d'immobiliser les métaux, il est appelé « boue B ». Au cours des expérimentations, un lot a été utilisé.



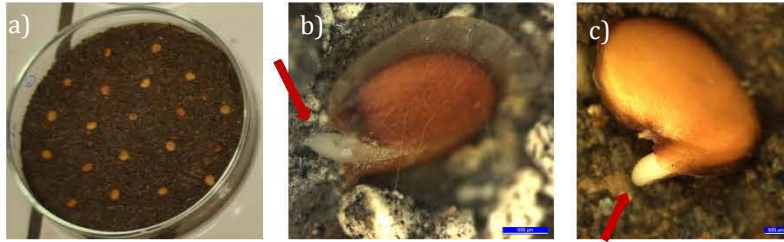
Annexe 2 _ Matériaux utilisés : date de prélèvement, quantité et préparation

Prélèvement	Date	Masse	Traitement	Numéro de lot	Utilisation Partie_Chapitre
Terre de biopile (SITA, France Déchets, Jeandelaincourt, 54)					
TB P1	08/04/2014	160 kg répartis en 2 fûts	<ul style="list-style-type: none"> • Séché à l'air • Fût n° 1 : broyeur à mâchoire • Fût n° 2 : émietté manuellement • Tamisage <2 mm 	Fût n° 1 = TB_Lot 1 Quarté	P4 Chap. 1
				Reliquats de TB_Lot 1 + Fût n° 2 = TB_Lot 2 Bétonnière	P4 Chap. 2
TB P2	08/04/2016	16 kg	<ul style="list-style-type: none"> • Sécher à l'air • Broyeur à mâchoire • Tamisage <2 mm • Quarté 	Reliquats de TB_Lot 2+TB P2 = TB_Lot 3	P5 Chap. 1
TB P3	Juin 2016	500 kg	Criblage (à 2 cm)	TB_Lot 4	P5 Chap. 2
Terre ultramafique (col des Bagenelles, 88, (07°06'42,2"E, 48°11'03,7"N))					
TU P1	18/03/2014	150 kg	<ul style="list-style-type: none"> • Sécher à l'air • Broyeur à mâchoire • Tamisage <2 mm • Quarté 	TU_Lot 1	P3 Chap. 1 et P4 Chap. 1
TU P2	29/01/2015	90 kg	<ul style="list-style-type: none"> • Sécher à l'air • Broyeur à mâchoire • Tamisage <2 mm • Bétonnière 	Reliquats TU_Lot 1 + TU P2 = TU_Lot 2	P4 Chap. 2
Terre agricole (Ferme expérimentale de La Bouzule, 54)					
TA P1	03/06/2015	370 kg	<ul style="list-style-type: none"> • Tamisage < 1 cm • Homogénéisation en sac 	1 seul lot	P3 Chap. 2
Stérile de carrière (0-20mm) (Montois la Montagne, 57)					
SC P1	14/06/2016	1 200 kg	Aucun	1 seul lot	P5 Chap. 2

Annexe 3 _ Composition des eaux utilisées pour l'arrosage des expérimentations. LQ : limite de quantification. Analyses effectuées sur la station expérimentale du GISFI, au LRGP et au LSE.

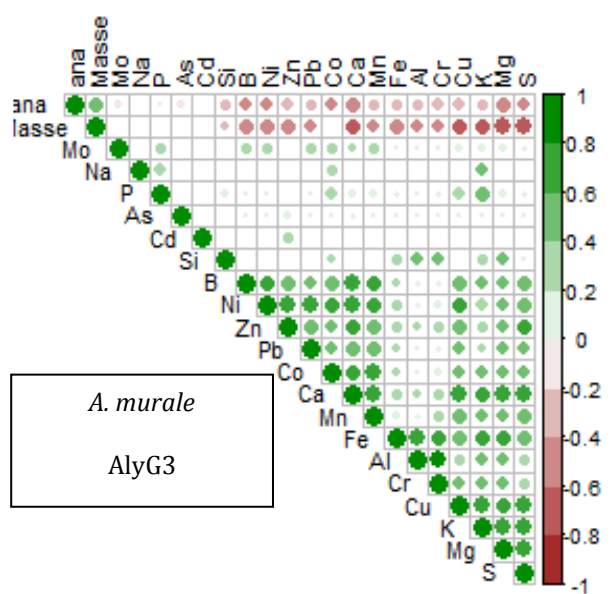
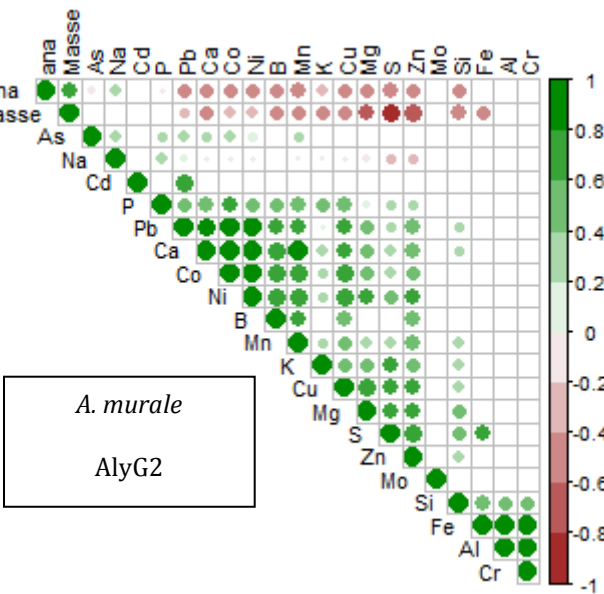
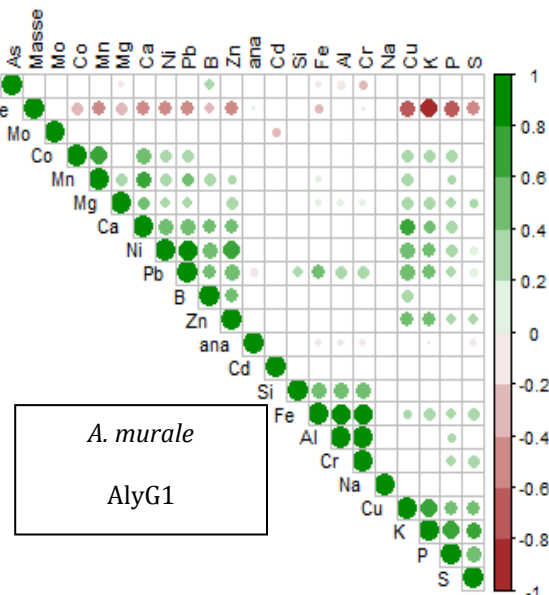
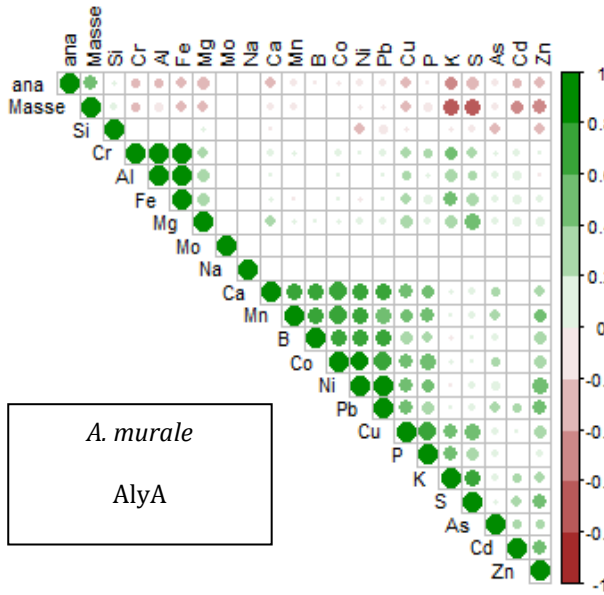
Paramètres	Eau ultra pure LSE	Eau robinet Brabois	Eau robinet Homécourt	Eau de pluie Homécourt	Unité
pH _{eau}	-	7,62 ± 0,10	7,87 ± 0,02	6,84 ± 0,16	-
Conductivité	9,38 ± 1,37	426 ± 6	642 ± 1	15,4 ± 9,9	µS cm ⁻¹
Anions (chromatographie ionique)					
NO ₃ ⁻	<LQ	6,28 ± 0,38	11,2 ± 0,1	1,40 ± 0,04	mg L ⁻¹
PO ₄ ³⁻	<LQ	<LQ	<LQ	0,17 ± 0,09	mg L ⁻¹
SO ₄ ²⁻	0,87 ± 0,30	63,6 ± 7,0	113 ± 1	1,38 ± 0,10	mg L ⁻¹
Cl ⁻	0,02 ± 0,00	12,3 ± 1,4	9,77 ± 0,05	0,71 ± 0,01	mg L ⁻¹
Carbone et azote dissous (COT mètre)					
TOC	0,48 ± 0,23	0,77 ± 0,21	<LQ	1,23 ± 0,10	mg L ⁻¹
IC	0,38 ± 0,10	17,7 ± 0,9	47,4 ± 1,8	1,59 ± 0,03	mg L ⁻¹
TC	0,86 ± 0,31	18,4 ± 1,0	47,2 ± 1,5	2,83 ± 0,13	mg L ⁻¹
TN	0,03 ± 0,03	1,62 ± 0,12	2,74 ± 0,02	0,47 ± 0,04	mg L ⁻¹
Éléments en solutions (ICP-OES)					
Al	<LQ	0,015 ± 0,001	0,067 ± 0,001	<LQ	mg L ⁻¹
As	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	mg L ⁻¹
Ca	<LQ	49,6 ± 2,7	92,2 ± 0,2	2,17 ± 0,01	mg L ⁻¹
Cd	<LQ	0,002 ± 0,000	<LQ	<LQ	mg L ⁻¹
Co	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	mg L ⁻¹
Cr	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	mg L ⁻¹
Cu	<LQ	0,37 ± 0,06	0,06 ± 0,00	<LQ	mg L ⁻¹
Fe	<LQ	0,007 ± 0,003	<LQ	0,003 ± 0,000	mg L ⁻¹
K	<LQ	2,14 ± 0,21	1,63 ± 0,002	0,21 ± 0,00	mg L ⁻¹
Mg	<LQ	6,05 ± 0,78	21,2 ± 0,1	0,35 ± 0,00	mg L ⁻¹
Mn	<LQ	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,03 ± 0,00	mg L ⁻¹
Mo	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	mg L ⁻¹
Na	0,05 ± 0,00	10,9 ± 1,6	19,3 ± 0,3	0,53 ± 0,01	mg L ⁻¹
Ni	<LQ	0,002 ± 0,000	<LQ	0,002 ± 0,000	mg L ⁻¹
P	<LQ	<LQ	<LQ	0,07 ± 0,00	mg L ⁻¹
Pb	<LQ	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,000	<LQ	mg L ⁻¹
S	0,10 ± 0,01	25,1 ± 2,8	44,89 ± 0,27	0,43 ± 0,017	mg L ⁻¹
Zn	<LQ	0,14 ± 0,13	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	mg L ⁻¹

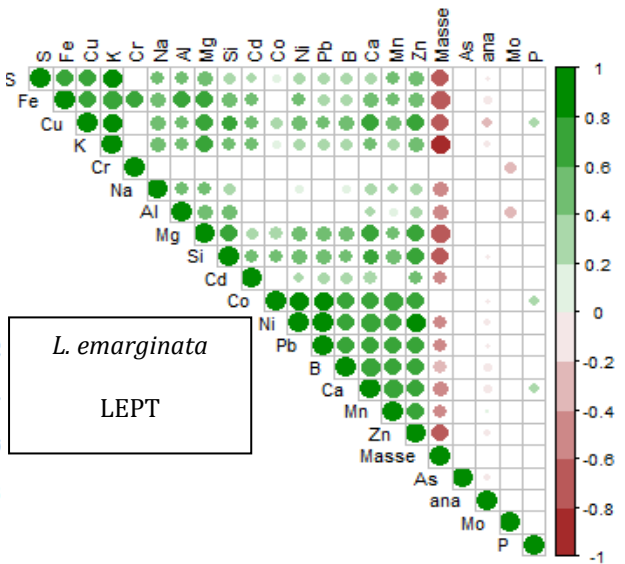
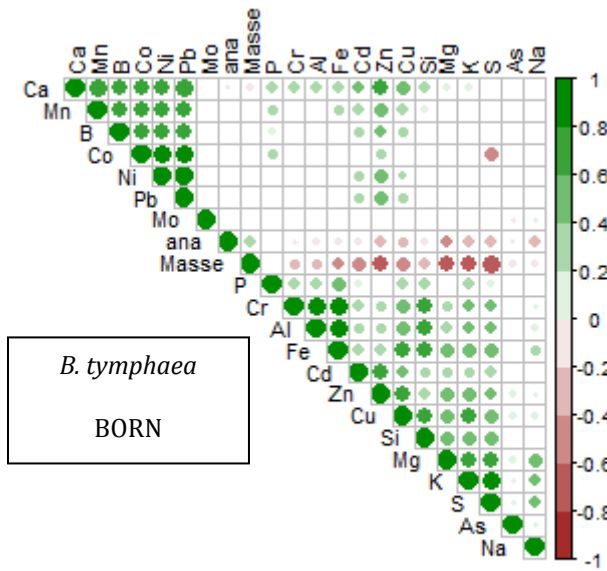
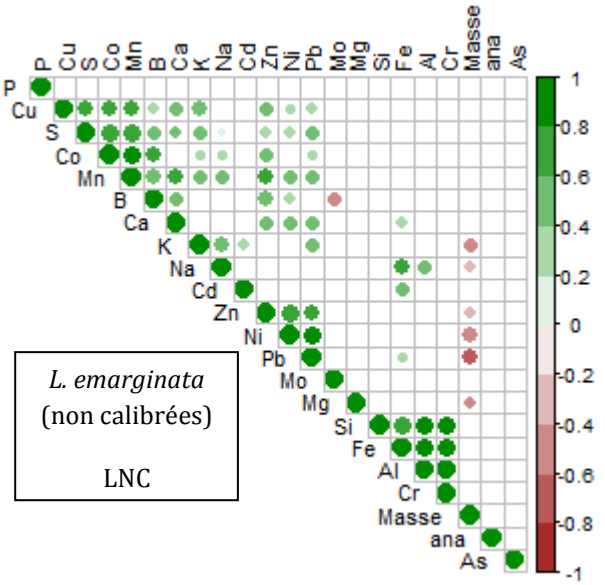
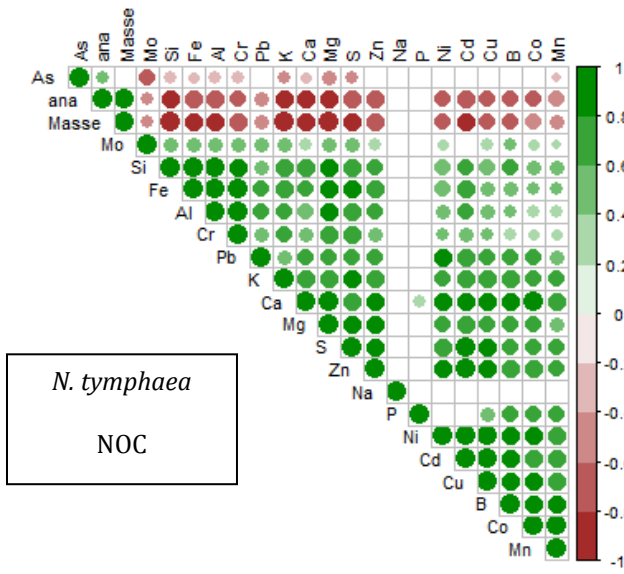
Annexe 4 _ Photographie des tests de germination : a) semis de *L. emarginata*, b) radicule d'*A. murale*, c) radicule de *L. emarginata*. Photos B et C effectuées à la loupe binoculaire



Annexes de la Partie 3 : Potentiel des hyperaccumulateurs pour l'agromine du Ni et Co

Annexe 5 _ Matrices de corrélation pour chacune des huit populations, selon les concentrations des parties aériennes après 70 jours de culture sur sol ultramafique. Éléments mesurés : B, Co, Ca, Cu, Cd, Al As, Mn, Mg, Fe, Ni, Zn, Mg, S, K, Na, Masse : biomasse sèche, ana : masse d'échantillon utilisée pour l'analyse en ICP. Coefficients de Spearman





Annexe 6 _ Coefficient de Spearman (r_s) des concentrations dans les parties aériennes de Ni_Co, Ni_Zn, Ni_Ca. *AlyA : A. murale Albanie SIX ; AlyG1 : A. murale Grèce SIV ; AlyG2 : A. murale Grèce SII, AlyG3 : A. murale Grèce SV ; BORN : B. tymphaea ; LEPT : L. emarginata, LNC : L. emarginata non calibrées, NOC : N. tymphaea*

	Ni_Co	Ni_Zn	Ni_Ca
AlyA	0,86	0,57	0,69
AlyG1	0,40	0,68	0,59
AlyG2	0,93	0,61	0,90
AlyG3	0,63	0,79	0,70
BORN	0,83	0,46	0,75
LEPT	0,88	0,81	0,78
LNC	0,27	0,77	0,42
NOC	0,86	0,81	0,81

Annexe 7 _ Coefficients de variation pour chaque élément et par population. Le CV est calculé suivant la formule σ/μ . AlyA : A. murale Albanie SIX ; AlyG1 : A. murale Grèce SIV ; AlyG2 : A. murale Grèce SII, AlyG3 : A. murale Grèce SV ; BORN : B. tymphaea ; LEPT : L. emarginata, LNC : L. emarginata non calibrées, NOC : N. tymphaea. N=nombre d'individu, BioF= biomasse fraîche, BioS= biomasse sèche, Hum= humidité. En gras les coefficients supérieurs à 0,35

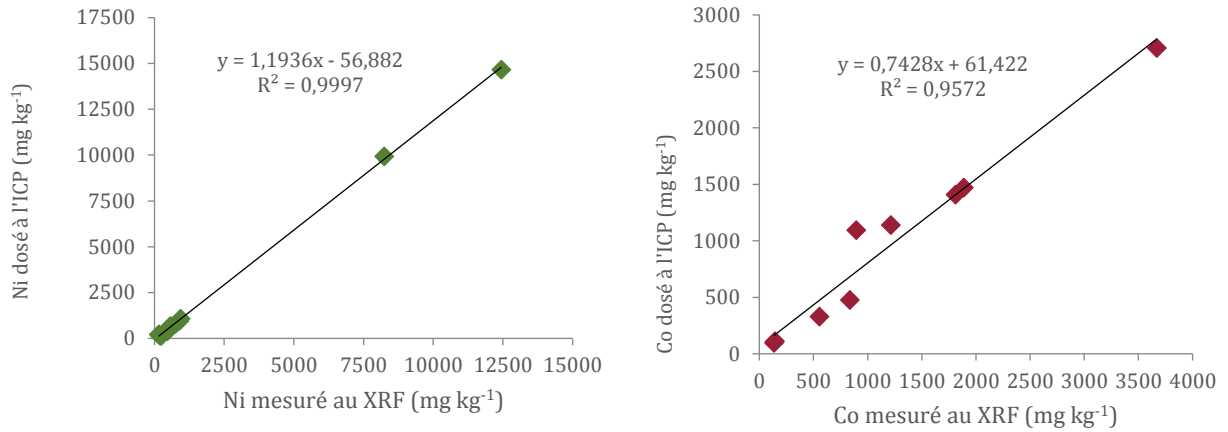
POP	N	BioF	BioS	Hum	Al	As	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu
AlyA	71	0,23	0,31	0,63	0,66	0,19	0,21	0,29	0,41	0,39	0,61	0,36
AlyG1	71	0,15	0,20	0,17	0,74	0,11	0,17	0,17	0,66	0,25	0,79	0,24
AlyG3	63	0,25	0,34	0,37	1,20	0,15	0,21	0,26	0,48	0,28	0,95	0,40
AlyG2	25	0,18	0,26	0,50	0,53	0,15	0,20	0,30	0,59	0,31	0,50	0,42
BORN	70	0,20	0,29	0,46	0,58	0,13	0,14	0,19	0,17	0,26	0,56	0,21
NOC	23	0,46	0,58	0,38	0,77	0,13	0,21	0,31	0,54	0,27	0,76	0,26
LEPT	72	0,14	0,24	0,22	0,45	0,10	0,17	0,19	0,34	0,22	1,22	0,25
LNC	24	0,08	0,11	0,11	0,47	0,11	0,17	0,14	0,40	0,33	0,46	0,18

POP	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P	Pb	S	Si	Zn
ALB	0,56	0,60	0,54	0,31	1,09	6,73	0,31	0,40	0,29	0,48	0,23	0,38
AlyG1	0,63	0,26	0,19	0,23	0,96	1,30	0,31	0,24	0,28	0,39	0,37	0,26
AlyG3	0,75	0,42	0,34	0,31	1,16	0,79	0,36	0,54	0,38	0,45	0,29	0,37
AlyG2	0,38	0,42	0,37	0,26	1,05	1,84	0,44	0,42	0,40	0,44	0,21	0,27
BORN	0,33	0,44	0,41	0,18	1,11	0,99	0,23	0,32	0,21	0,30	0,29	0,22
NOC	0,63	0,42	0,40	0,28	0,91	0,75	0,30	0,30	0,35	0,35	0,47	0,40
LEPT	0,31	0,21	0,24	0,25	0,86	0,38	0,33	0,26	0,34	0,24	0,17	0,30
LNC	0,23	0,13	0,14	0,24	1,15	1,28	0,27	0,13	0,29	0,17	0,16	0,19

Annexe 8 _ Concentrations des molécules lors du criblage (mg kg⁻¹). Moyenne ± écart-type. PA : partie aérienne : tige et feuille

Espèce	Organe	Angelicin	Umbelliferone	Esculetin	Scopoletine	Fraxetin	Limettin	Daphnetin	Daphnetin 8 methylether	6methoxy-coumarine	Scoparone	Daphnetyl Dimethylether
<i>Alyssum bertolonii</i>	PA avec fleurs	---	0,020	4,305	1,522	---	0,027	---	---	---	---	---
<i>Alyssum heldreichii</i>	PA avec siliques	---	0,014	6,142	6,644	---	0,008	---	---	---	---	0,018
<i>Alyssum heldreichii</i>	Racines (PR)	---	---	---	3,031	---	---	---	---	---	---	---
<i>Alyssum murale</i>	PA	---	---	0,862	5,756	---	---	---	0,240	---	0,048	---
<i>Alyssum murale</i>	PR	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Alyssum serpyllifolium</i>	PA	---	---	2,721	1,818	0,959	---	0,291	2,197	---	---	0,049
<i>Alyssum smolicanum</i>	PA (en fleurs)	---	---	7,660	3,714	---	---	---	---	---	---	0,033
<i>Alyssum smolicanum</i>	PR	---	0,063	1,928	4,234	---	---	---	---	---	0,021	---
<i>Bornmuellera baldacii</i>	PA	---	0,016	1,563	2,185	---	---	---	---	---	0,048	---
<i>Bornmuellera tymphaea</i>	PA	---	---	1,637	22,023	---	0,054	0,183	0,064	---	0,048	---
<i>Bornmuellera tymphaea</i>	PR	---	---	---	0,179	---	---	---	---	---	---	---
<i>Centaurea charrellii</i>	feuilles	---	---	---	---	---	---	0,054	---	0,333	0,426	0,100
<i>Centaurea charrellii</i>	tiges	0,114	---	---	---	---	---	---	---	---	0,225	---
<i>Centaurea thracica</i>	feuilles	---	---	0,651	---	---	---	0,439	---	---	---	0,064
<i>Centaurea thracica</i>	tiges	0,063	0,016	---	---	---	---	0,000	---	---	0,050	---
<i>Centaurea thracica</i>	Rhizome	---	0,016	---	---	---	---	0,034	---	---	---	---
<i>Leptoplax emarginata</i>	PA	0,080	---	3,581	41,222	---	0,026	---	---	0,491	---	---
<i>Leptoplax emarginata</i>	PR	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Noccaea caerulescens</i>	PA (en fleurs)	0,345	---	---	---	0,325	---	---	---	---	---	0,067
<i>Noccaea caerulescens</i>	PA (en fleurs)	0,147	---	---	---	---	---	---	---	0,580	---	0,059
<i>Noccaea caerulescens</i>	PA (en fleurs)	---	---	---	---	0,540	---	0,038	---	0,363	---	0,075
<i>Noccaea caerulescens</i>	PA (en fleurs)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,088
<i>Noccaea tymphaea</i>	PA	---	0,028	---	---	---	---	---	---	---	---	0,140
<i>Noccaea tymphaea</i>	PR	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Noccaea tymphaea</i>	PA	0,149	---	0,563	---	---	---	---	---	---	---	0,047
<i>Noccaea tymphaea</i>	PR	0,069	0,075	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Noccaea tymphaea</i>	PA	---	---	---	0,075	---	0,016	---	---	---	---	0,042
<i>Noccaea tymphaea</i>	PR	---	0,089	---	0,181	---	---	---	---	---	---	---
<i>Noccaea tymphaea</i>	PR	---	0,097	---	---	---	---	---	---	0,194	---	---
<i>Sedum alfreddii HA</i>	PA	---	---	---	---	---	---	0,025	---	---	0,031	0,044
<i>Sedum alfreddii HA</i>	PA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,127	---
<i>Sedum alfreddii non HA</i>	PA	---	---	0,648	---	---	0,034	---	---	0,095	---	0,044
<i>Sedum alfreddii non HA</i>	PA	---	---	0,669	---	---	---	---	---	---	0,040	0,065

Annexe 9 _ Relation du a) Ni ; b) Co mesurés à l'ICP-OES en fonction de la mesure effectuée par XRF sur des feuilles de *B. coddii* N=8, deux échantillons de chaque modalité



Annexe 10 _ Répartition des individus récoltés selon le bloc de culture

	10/10=FAI	100/10=NIC	10/100=COB	100/100=FOR
Nombre d'individus	6	6	3	3
Nombre de bacs différents (max=3) et donc de répétitions	2 (3*Rep 1 et 3*Rep 2)	3 (3*Rep 1, 1*Rep 2 et 2*Rep 3)	3 (1*Rep 1, 1*Rep2 et 1*Rep 3)	2 (2*Rep 1 et 1*Rep 2)

Annexes de la Partie 4 : Élaboration de substrats à partir de matériaux secondaires et réponse des hyperaccumulateurs : Cas du biochar

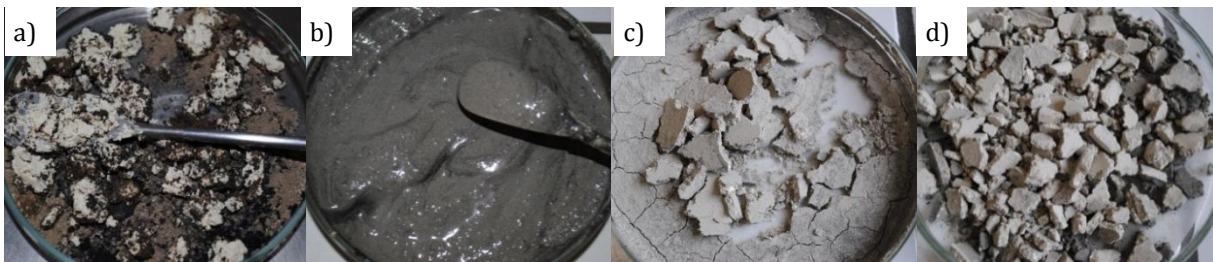
Annexe 11 _ Siliques et graines de a) *B. tymphaea* (Site VI) et b) *L. emarginata* (Site VIII)



Annexe 12 _ Mode opératoire pour la préparation des mélanges secs et en suspension pour le troisième test de germination

Pour chacune de ces modalités, les mélanges ont été préparés selon deux protocoles :

- Les matériaux sont mélangés en suspension. La boue de phosphatation fraîche (170% d'humidité) et ajoutée aux autres matériaux permet d'obtenir une suspension lors de l'ajout d'eau ultra pure. L'eau est évaporée pendant 2 h à 70°C, puis le solide est décollé à la spatule, fragmenté et placé sur un papier filtre imbibé d'eau dans une boîte de Petri (cf photographies ci-dessous).
- La boue de phosphatation est préalablement séchée et tamisée à 2 mm pour obtenir un matériau fin et homogène, et éviter la formation de gros agglomérats. Elle est mélangée aux autres matériaux (séché et tamisé à 2 mm) à l'aide d'une spatule puis le mélange obtenu est déposé sur papier filtre imbibé d'eau ultra pure.

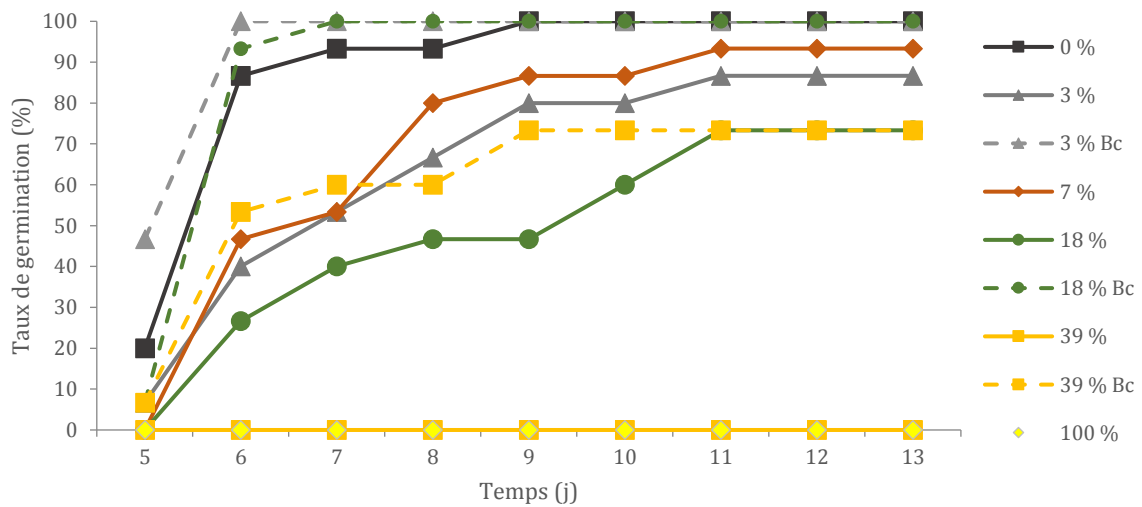


Photographies des étapes de la préparation du substrat avec une suspension. De gauche à droite : a) mélange des matériaux dans les proportions voulues, b) ajout d'eau et homogénéisation, c) après séchage et fragmentation du substrat et d) dépôt du substrat sur un papier filtre imbibé.

Annexe 13 _ Photographies des tests de germination avec 30% de boue et 5 % de biochar selon le mode de préparation. Mélange en suspension à gauche et mélange avec des matériaux secs à droite



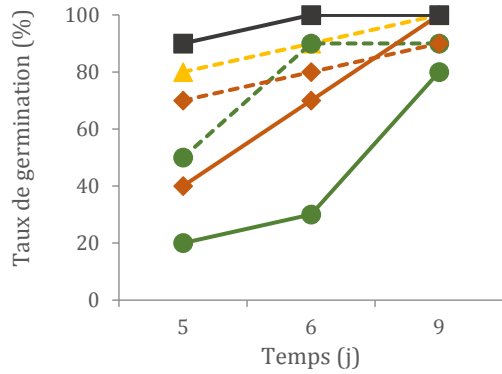
Annexe 14 _ Cinétique de germination de *L. emarginata* sur des substrats contenant 0 à 100% (m) de boue de phosphatation (MS) avec ou sans biochar. Bc : biochar



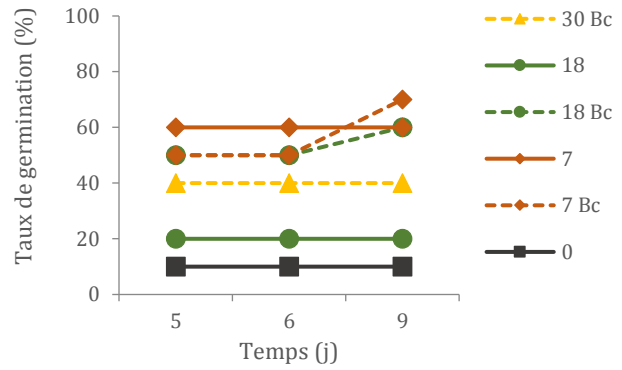
Au sixième jour, la modalité avec 3% de boue plus biochar atteint 100% de germination alors qu'en absence de biochar seulement 40% des graines ont germé. Pour la modalité avec 18 % de boue, au sixième jour il y a 93% de germination avec biochar et 26% sans biochar. Avec ces deux modalités le taux de germination atteint 100% au neuvième jour. Enfin, pour la modalité avec 39% de boue, 53% des graines ont germé au sixième jour, alors qu'aucune graine n'a germé sur la même modalité sans biochar.

Annexe 15 _ Cinétique de germination de a) *L. emarginata* et b) *A. murale* sur six substrats élaborés avec des fractions massiques de boue de phosphatation variant de 0 à 30%. Les modalités à 7 et 18% de boue sont testées avec un amendement de 5% de biochar (trait pointillé) ou sans (trait plein)

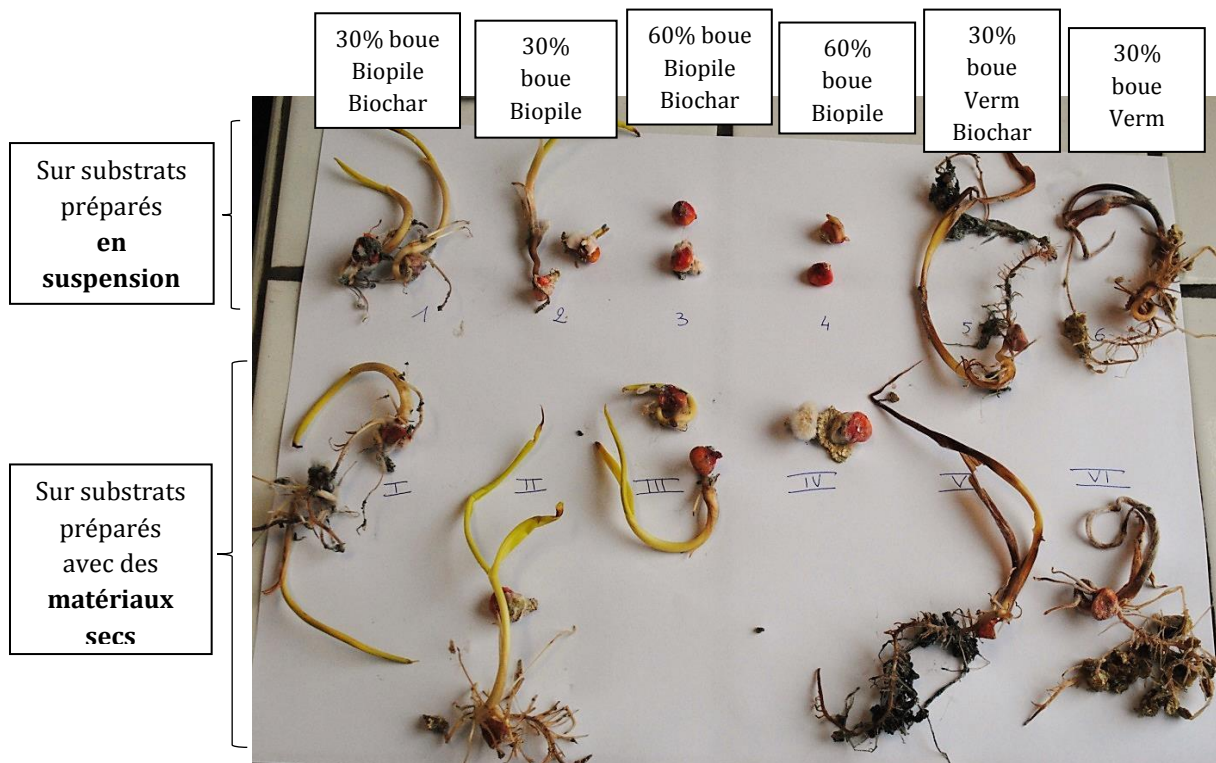
a) *L. emarginata*



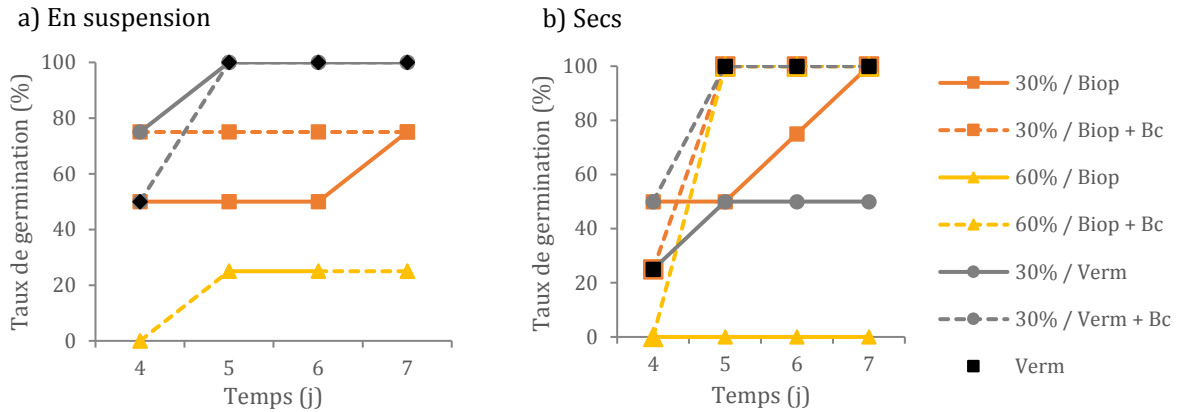
b) *A. murale*



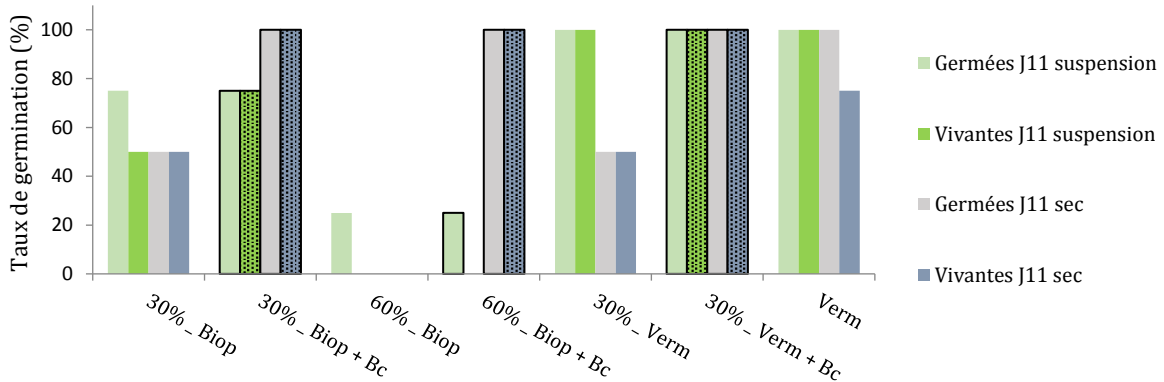
Annexe 16 _ Graines de *Zea mays* 17 jours après le semis. Pour chaque modalité, parmi les 4 graines du test, les deux graines les plus développées sont prélevées. En haut les mélanges préparés en suspension (chiffres arabes), en bas les mélanges préparés à partir de matériaux secs et tamisés à 2 mm (chiffres romains).



Annexe 17 _ Cinétique de germination de *Zea mays* de quatre à sept jours après le semis sur des matériaux a) mélangés en suspension dans de l'eau ou b) mélangés secs



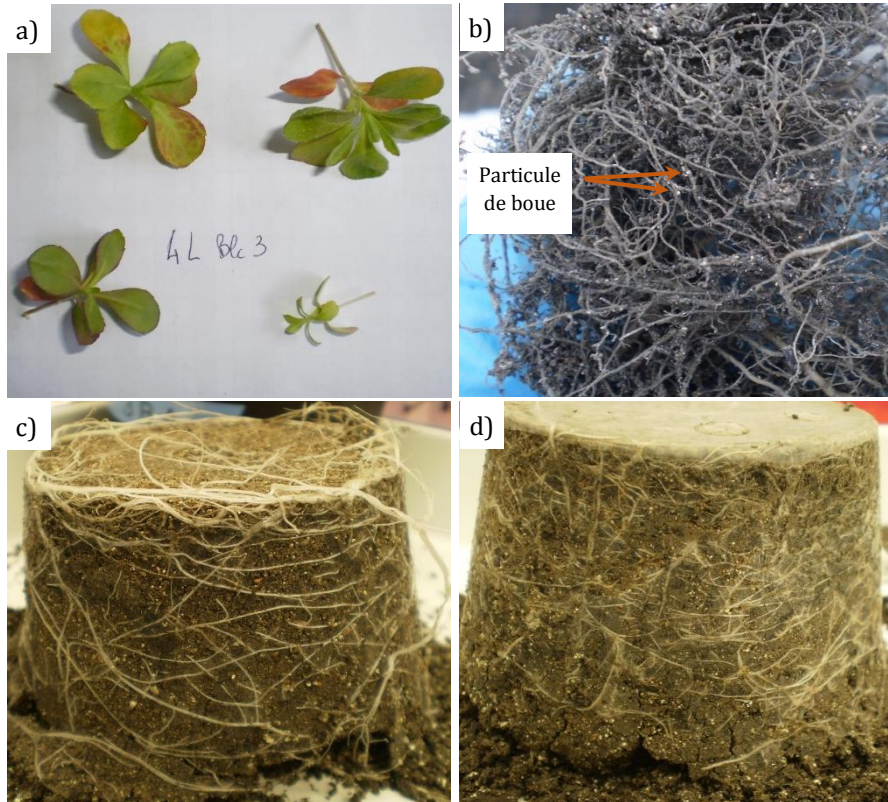
Annexe 18 _ Taux de graines germées et de graines vivantes de *Zea mays* à onze jours. Les mélanges effectués en suspension sont en vert, ceux effectués secs en gris. Les bâtons avec pointillés correspondent aux modalités amendées en biochar. % : pourcentage massique de boue dans le mélange, Biop : terre de biopile, Bc : biochar, Verm : vermiculite



Annexe 19 _ Dispositif des mésocosmes dans la chambre de culture. m : mélange, 1, 2, 3, 4 : n° de la modalité, B : biochar, SB : sans biochar, A : *A. murale*, L : *L. emarginata*, SN : sol nu, b1, b2, b3 : n° du bloc

M4	M2 SB	M3 SB	M3 B	M4	M2 SB	M3 B	M1	M2 B	M4	M1	M2 SB	M3 SB	M2 B	M1	M2 B	M3 B	M3 SB
A	SN	A	SN	L	L	L	A	A	SN	SN	A	L	L	L	SN	A	SN
b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3	b3
M3 SB	M3 B	M3 SB	M1	M4	M2 SB	M2 SB	M1	M4	M2 B	M2 B	M4	M1	M3 B	M3 B	M2 SB	M2 B	M3 SB
A	SN	L	SN	SN	L	SN	A	A	L	A	L	L	A	L	A	SN	SN
b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2
M2 SB	M3 SB	M3 B	M3 B	M2 SB	M2 B	M4	M2 SB	M3 SB	M4	M1	M2 B	M3B	M1	M3 SB	M2B	M1	M4
SN	L	L	A	A	L	SN	L	SN	L	A	SN	SN	L	A	A	SN	A
b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1

Annexe 20 _ Photographies des plantes lors de la récolte : a) Chloroses de *L. emarginata* sur la modalité 100% biopile, b) Chevelu racinaire de *L. emarginata* sur la modalité avec 7% de boue et 5% de biochar c) Colonisation racinaires par *A murale* sur la modalité avec 7% de boue et 5% de biochar d) Colonisation racinaires par *L. emarginata* sur la modalité avec 7% de boue et 5% de biochar

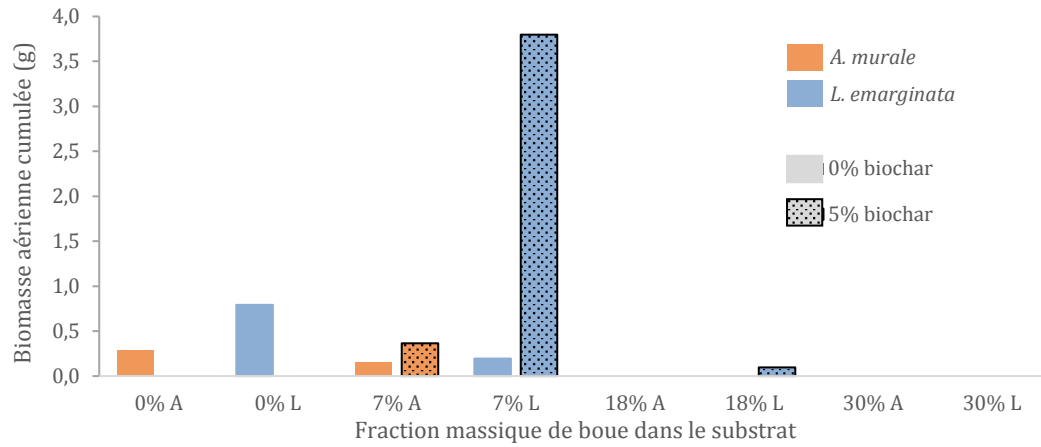


Annexe 21 _ Nombre de plantules d'*A. murale* et de *L. emarginata* présentes par modalité après 40 jours et 90 jours de culture, selon leur âge (grand ou petit) et le substrat (0, 7, 18, 30 : fraction massique de boue dans le substrat, SB : sans biochar, B : 5% de biochar)

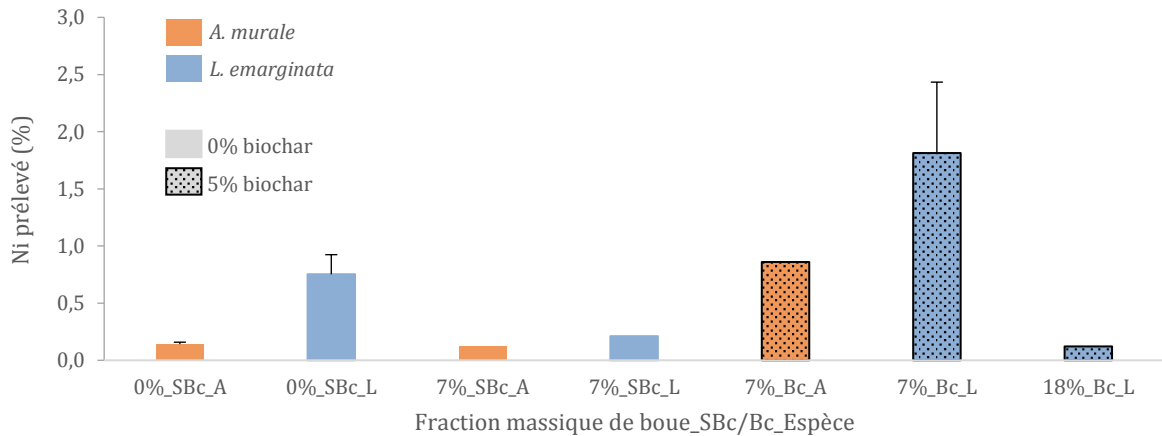
Substrat	<i>A. murale</i> à 40 jours		<i>A. murale</i> à 90 jours		<i>L. emarginata</i> à 40 jours		<i>L. emarginata</i> à 90 jours	
	Individu grand	Individu petit	Individu grand	Individu petit	Individu grand	Individu petit	Individu grand	Individu petit
0% SB	10	2	10	1	14	1	14	1
7% SB	7	3	1	-	2	1	1	-
7% B	5	2	1	-	9	2	9	1
18% SB	6	-	-	-	-	-	-	-
18% B	3	3	-	-	-	1	1	-
30% B	-	1	-	-	-	-	-	-

Après 40 jours de culture, toutes les modalités ont au moins une plantule d'*A. murale*. Par contre, pour *L. emarginata*, il n'y a plus de plante en présence de la plus grande proportion de boue et de celle immédiatement inférieure sans biochar. Au terme de la culture, soit 90 jours après le premier semis, le nombre de plantes a encore diminué sauf pour la modalité sans boue. En général, de nombreuses plantules sont mortes avec les modalités contenant de la boue dans le substrat malgré les semis successifs.

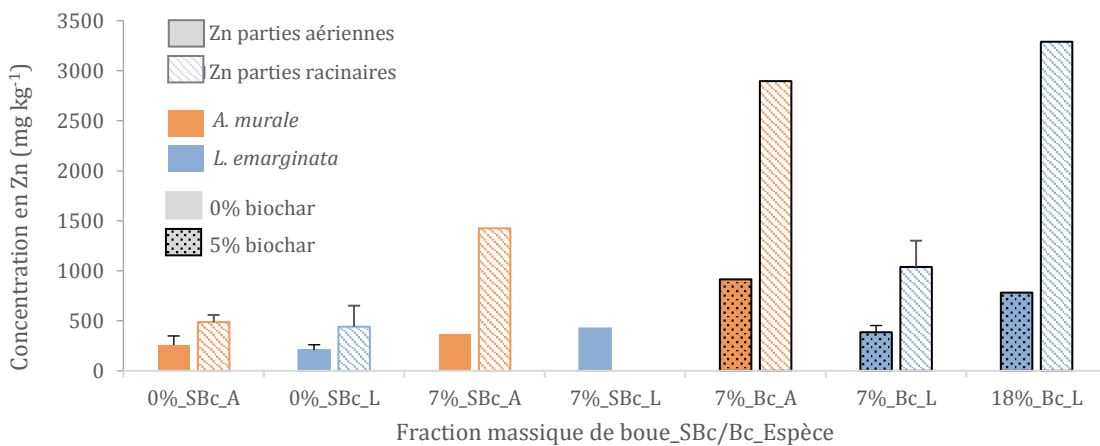
Annexe 22 _ Biomasse aérienne cumulée par modalité. A : *A. murale* et L : *L. emarginata*. Il n'y a pas de modalité 0%+Biochar et 30% sans biochar



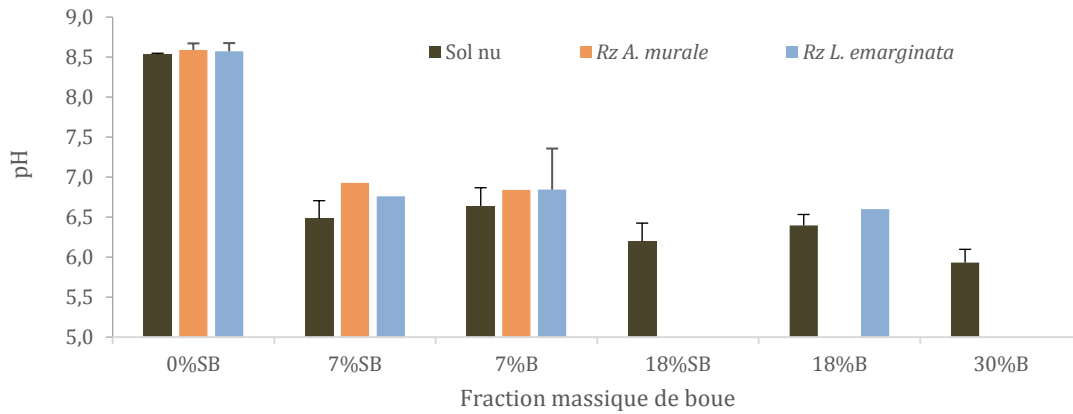
Annexe 23 _ Ni prélevé par *A. murale* et *L. emarginata* par vase par rapport au Ni total dans le substrat. A : *A. murale* et L : *L. emarginata*, les barres avec pointillés représentent les modalités avec biochar. Les barres verticales indiquent les écarts-types lorsque plusieurs vases de végétation étaient végétalisés (N=3)



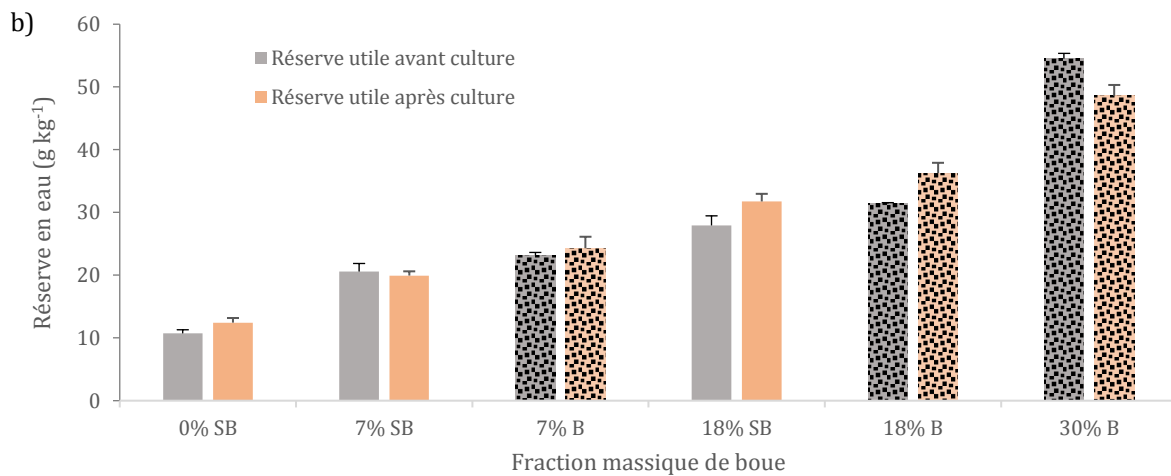
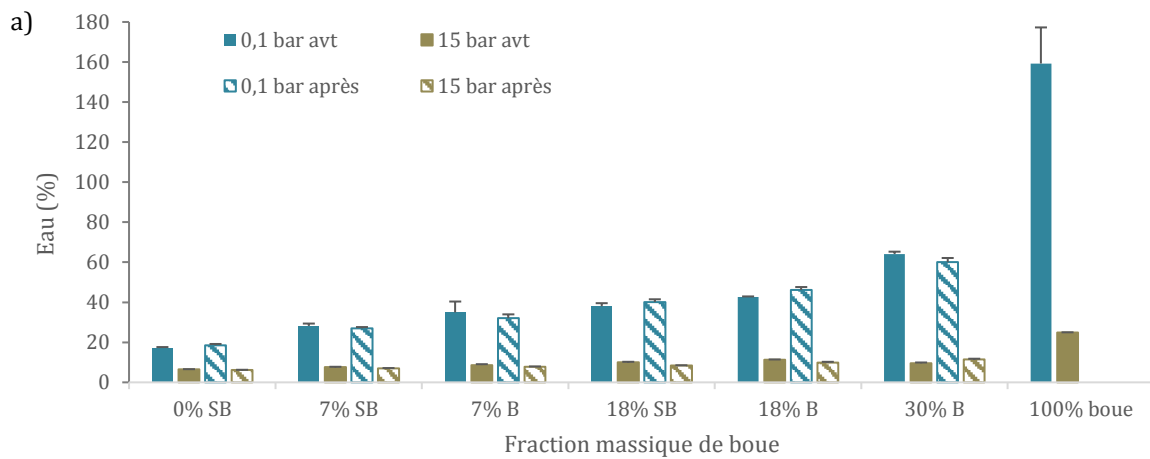
Annexe 24 _ Concentration du Zn dans les parties aériennes et racinaires d'*A. murale* et *L. emarginata*. A : *A. murale* et L : *L. emarginata*, % (m) de boue dans le substrat, SBC : sans biochar, Bc : 5% de biochar. Les barres verticales indiquent les écarts-types lorsque plusieurs vases de végétation étaient végétalisés (N=3)



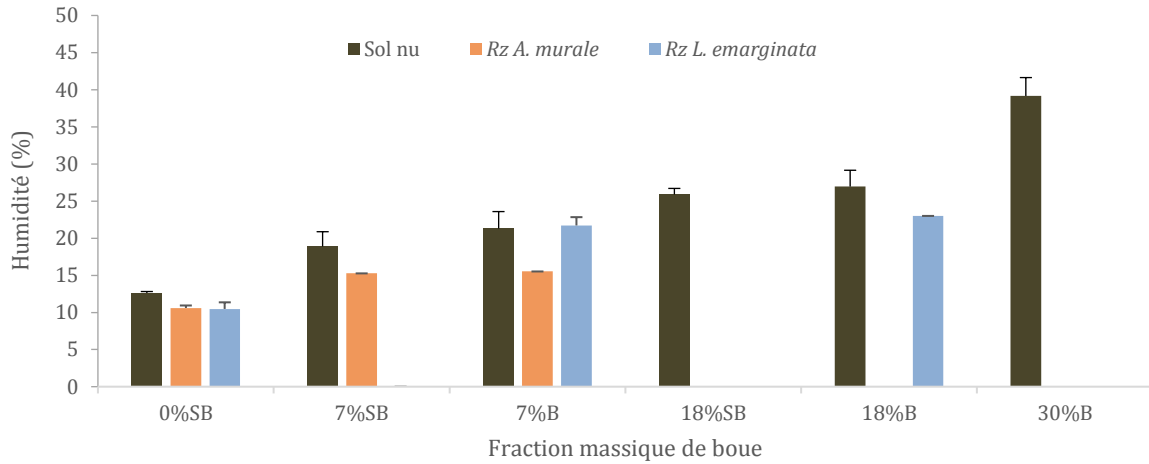
Annexe 25 _ pH des substrats selon une dose croissante de boue, avec et sans amendement en biochar. Rz : sol rhizosphérique, SB : sans biochar, B : avec 5% (m) de biochar



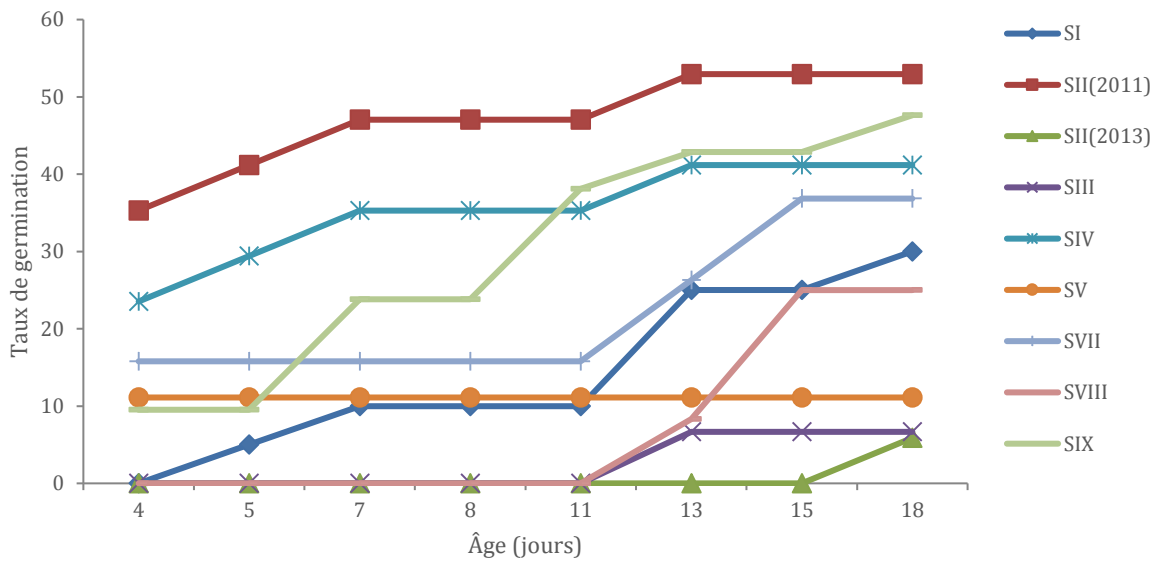
Annexe 26 _ a) Capacité de rétention en eau et point de flétrissement des substrats nus avant culture et après culture. 0,1 bar : capacité de rétention en eau, 15 bar : point de flétrissement b) Réserve utile des substrats avant et après culture. SB : sans biochar, B : avec 5% (m) de biochar



Annexe 27 _ Humidité de la terre rhizosphérique selon une dose croissante de boue, avec et sans amendement en biochar. Rz : sol rhizosphérique, SB : sans biochar, B : avec 5% (m) de biochar



Annexe 28 _ Cinétique de germination de huit populations d'*A. murale* sur une matrice contenant un rapport de 90% de biopile et 10% de boue de phosphatation (m/m). Tests sur 30 g de mélange constitué de 90% de terre de biopile et 10% de boue de phosphatation (m/m), à l'incubateur à 30°C pendant 25 jours.



Annexe 29 _ Capacité au champ des différents substrats. U : sol ultramafique, M : substrat élaboré, 0, 1, 3 et 5 : fraction massique de biochar amendée (%).

	U0	U1	U3	U5	M0	M1	M3	M5
Capacité au champ (pF2) en %	59,2	61,4	63,1	64,5	25,9	27,3	29,5	31,5

Annexe 30 _ Frise chronologique des principales interventions pendant l'expérimentation. *RG : ray-grass, Aly : A. murale SII, U : sol ultramafique, M : substrat élaboré*

Temps	T initial	+ 1 sem	+ 2 sem	+ 3 sem	+ 4 sem	+ 5 sem	+ 9 sem	+ 11 sem	+ 14 sem	+ 15 sem	+ 16 sem	+ 17 sem
	Remplissage des vases de végétation et premier arrosage	Vases couverts										
SEMIS			Aly sur U	Aly sur M		RG sur U et M						
Bougie poreuse					1 ^{er}		2 ^{ème}		3 ^{ème}			
Récolte plante et sol								RG coupe 1		Aly sur U	Aly sur M et les SN	RG sur U et M

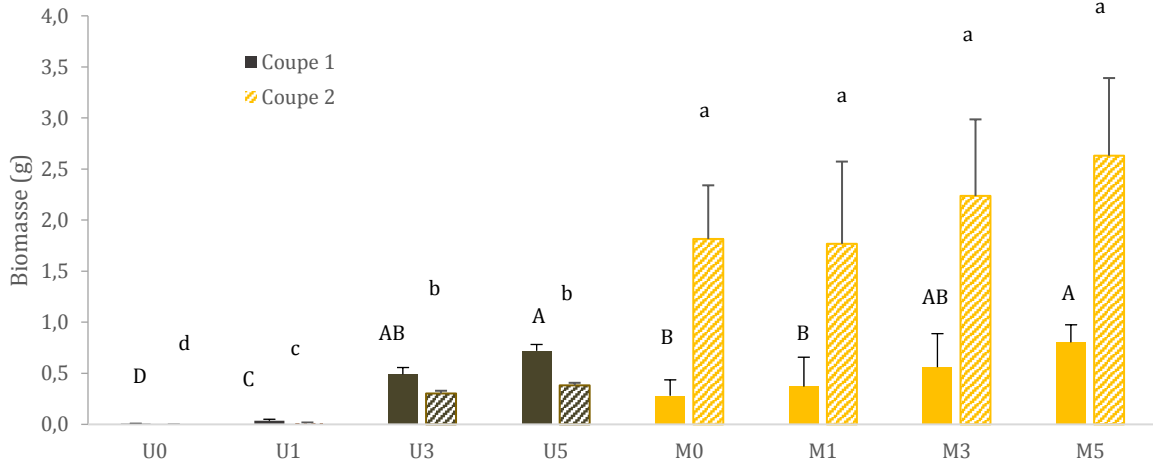
Annexe 31 _ Suivi de la repousse du ray-grass après la première coupe. *Coupe effectuée à 2 cm de hauteur. Sol U avec 5% de biochar (trois photos de gauche), substrat M avec 5% de biochar à droite*



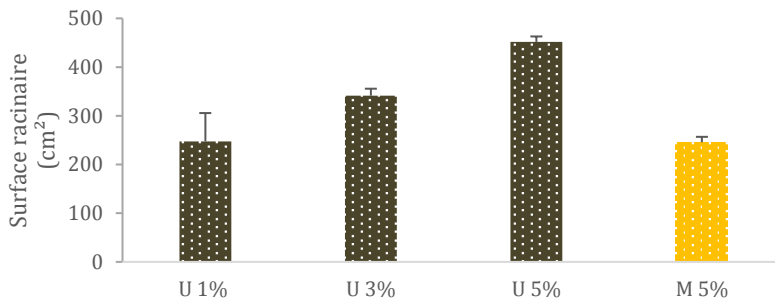
RG sur U
RG sur M

AVANT COUPE
COUPE
Sept jours après coupe
Quatre jours après coupe

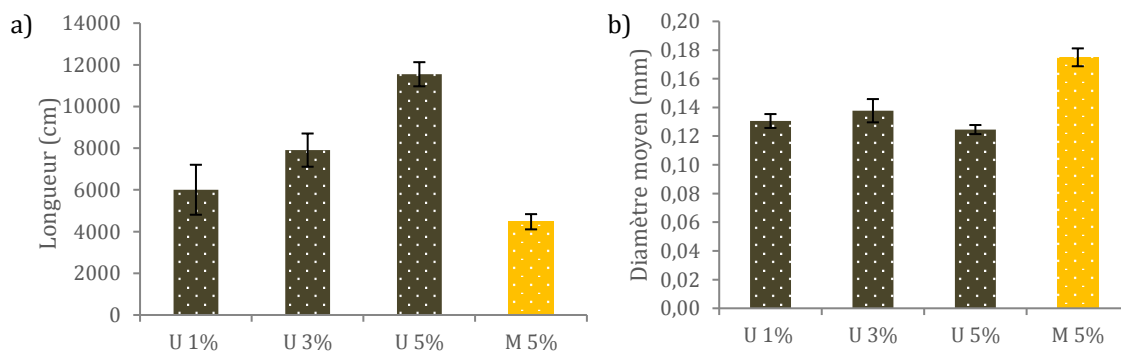
Annexe 32 _ Biomasses aériennes (coupe 1 et coupe 2) du ray-grass. *U* : sol ultramafique, *M* : substrat élaboré avec 10/90 (m/m) de boue A/biopile. Les barres verticales représentent les écarts-types. Les biomasses aériennes de la première coupe, affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les biomasses aériennes de la seconde coupe affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), après transformation des données en log.



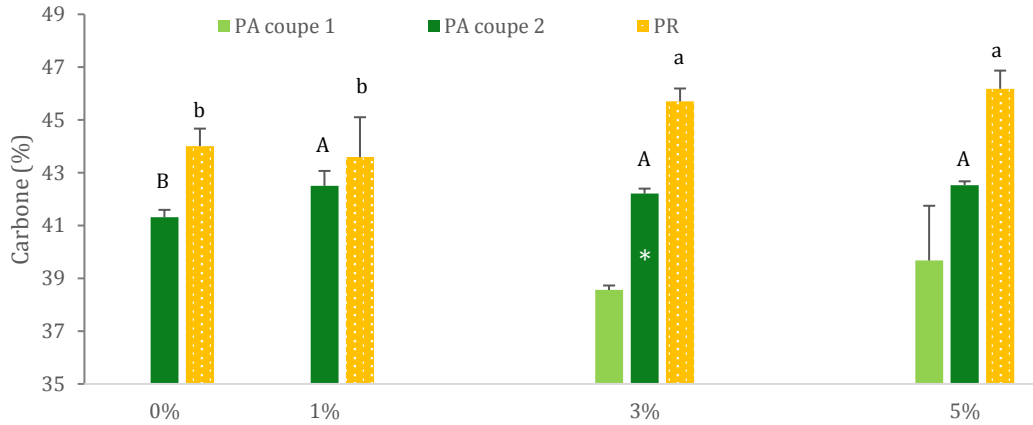
Annexe 33 _ Surface racinaire d'*A. murale* selon le substrat et la dose de biochar (1, 3 ou 5%). *N*=2. *U* : sol ultramafique, *M* : mélange avec boue, mesures effectuées au Win Rhizo



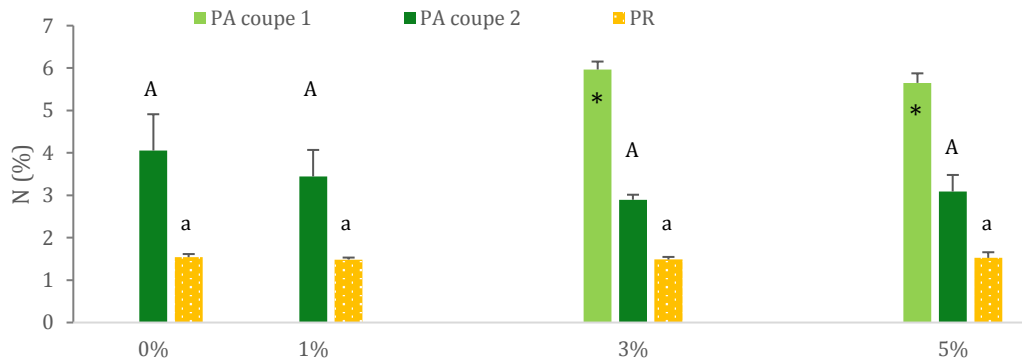
Annexe 34 _ a) Longueur totale et b) diamètre moyen des racines d'*A. murale* selon le substrat et la dose de biochar. Mesures effectuées au WinRhizo, *U* : sol ultramafique, *M* : mélange avec boue, et 1, 3 ou 5% (*m*) : dose de biochar. *N*=2.



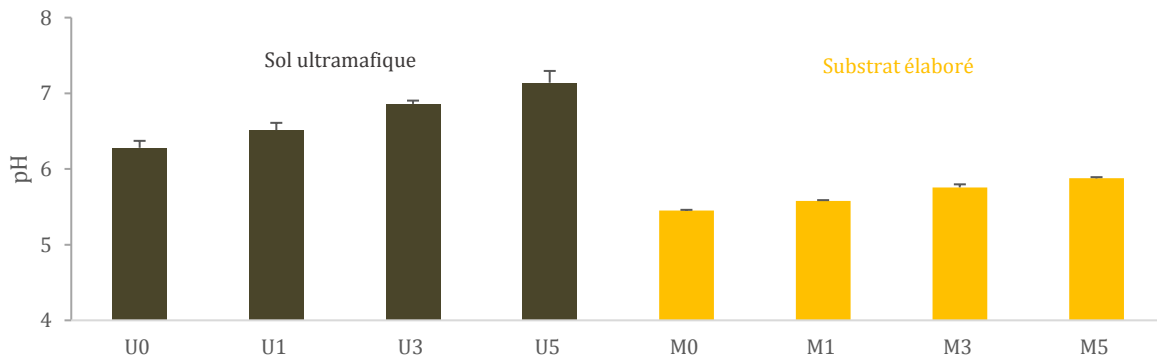
Annexe 35 _ Teneurs de carbone dans les parties aériennes (coupe 1, à 6 sem et coupe 2, à 12 sem) et parties racinaires (PR) du ray-grass cultivé sur le substrat M. Les barres verticales représentent les écarts-types. Les teneurs en C de la 2^{ème} coupe affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les teneurs en C des parties racinaires affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), * indique une différence significative au seuil de 5% entre les deux coupes pour la dose de biochar indiquée.



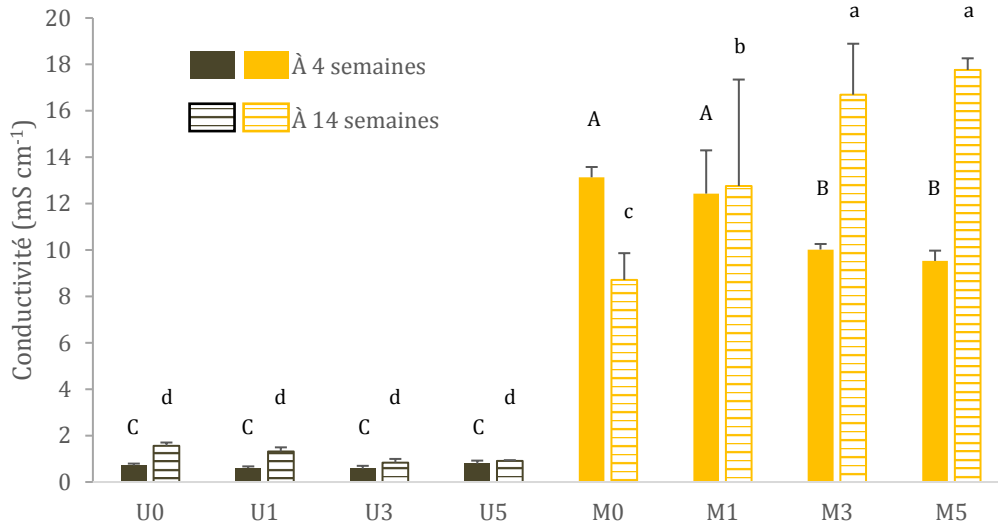
Annexe 36 _ Teneurs en azote dans les parties aériennes (coupe 1 à 6 sem et coupe 2 à 12 sem) et parties racinaires (PR) du ray-grass cultivé sur le substrat M. Les barres verticales représentent les écarts-types. Les teneurs en N, de la 2^{ème} coupe, affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les teneurs en N des parties racinaires affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$), le symbole * indique une différence significative au seuil de 5% entre les 2 coupes pour la dose de biochar indiquée (Anova).



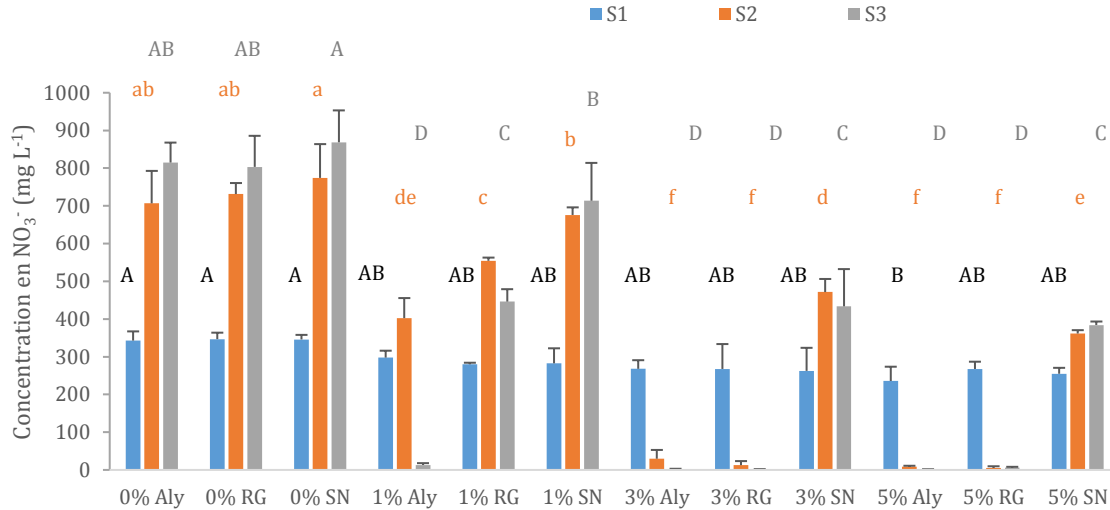
Annexe 37 _ pH de la solution du substrat M et du sol U après 4 semaines d'incubation, avec une fraction massique de biochar de 0, 1, 3 et 5%. Respectivement M0, M1, M3, M5 sur le substrat M et U0, U1, U3, U5 sur le sol U. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types (N=9).



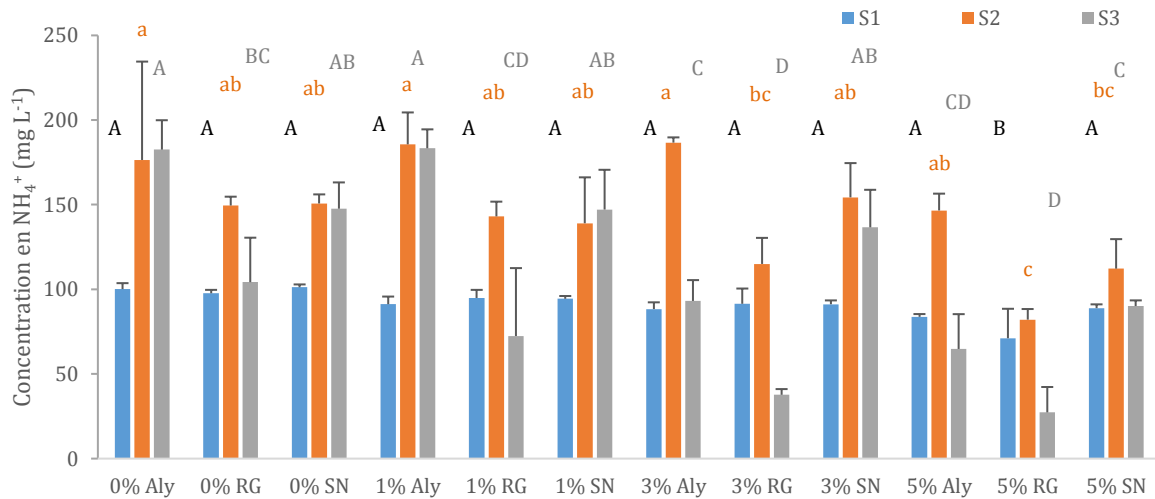
Annexe 38 _ Conductivité de la solution des sols nus du substrat M et du sol U après 4 et 14 semaines d'incubation selon une dose croissante de biochar. En jaune les substrats M avec une fraction massique de biochar de 0, 1, 3 et 5% (respectivement M0, M1, M3, M5). En marron les valeurs pour le sol U avec 0, 1, 3 et 5% de biochar (respectivement U0, U1, U3, U5). Les valeurs, mesurées à 4 semaines, affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$) ($N=3$). Les valeurs, mesurées à 14 semaines, affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$) ($N=3$).



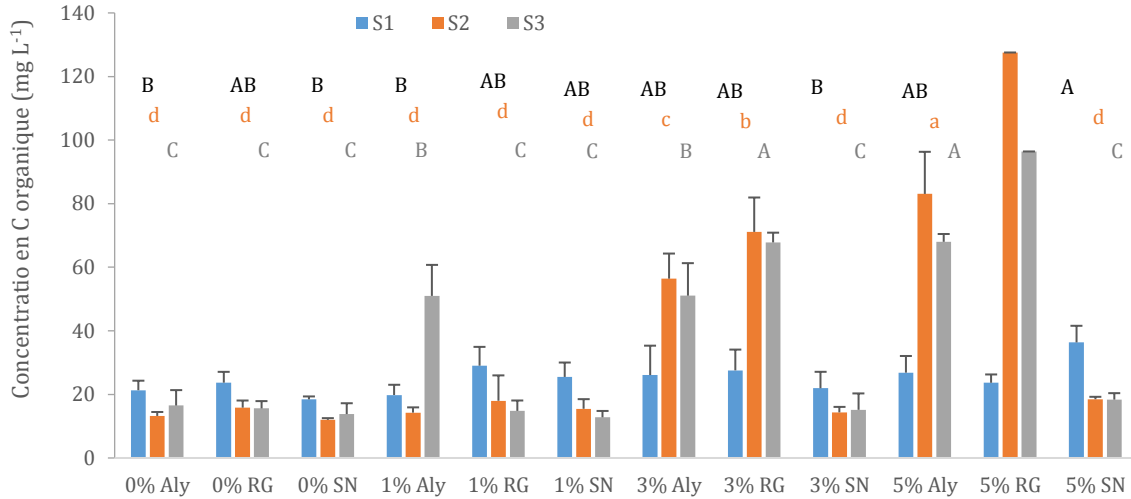
Annexe 39 _ Concentration en nitrates dans la solution du substrat ultramafique (U) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement. 0, 1, 3 et 5% (m) : doses de biochar, Aly : *A. murale*, RG : ray-grass, SN : sol nu, S1, S2 et S3 : séries de prélèvements espacées chacune de cinq semaines. Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3). Pour chaque prélèvement, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$).



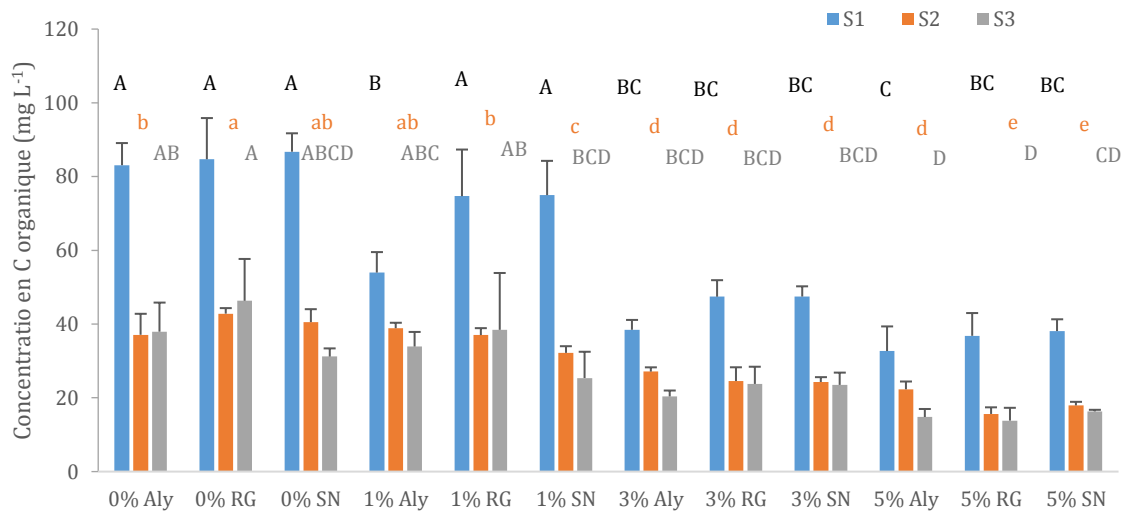
Annexe 40 _ Concentration en ammonium dans la solution du substrat élaboré (M) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement. 0, 1, 3 et 5% (m) : doses de biochar, Aly : *A. murale*, RG : ray-grass, SN : sol nu, S1, S2 et S3 : séries de prélèvements espacées chacune de cinq semaines. Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3). Pour chaque prélèvement, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$).



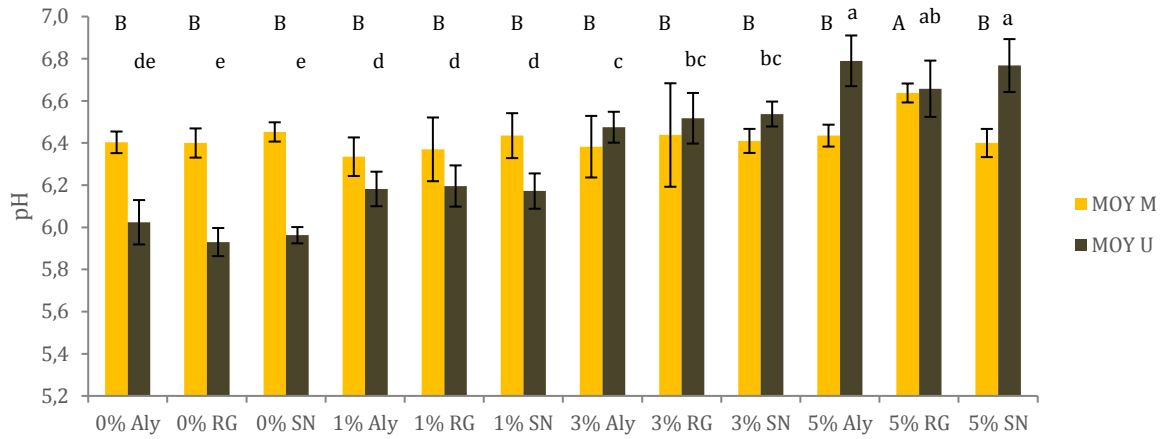
Annexe 41 _ Concentration en C organique dans les solutions du substrat ultramafique (U) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement. 0, 1, 3 et 5% (m) : doses de biochar, Aly : A. murale, RG : ray-grass, SN : sol nu, S1, S2 et S3 : séries de prélèvements espacées chacune de cinq semaines. Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3). Pour chaque prélèvement, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$).



Annexe 42 _ Concentration en C organique dans les solutions du substrat élaboré (M) en fonction de la dose de biochar, du couvert et du prélèvement. 0, 1, 3 et 5% (m) : doses de biochar, Aly : A. murale, RG : ray-grass, SN : sol nu, S1, S2 et S3 : séries de prélèvements espacées chacune de cinq semaines. Les barres verticales représentent les écarts-types (N=3). Pour chaque prélèvement, les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$).

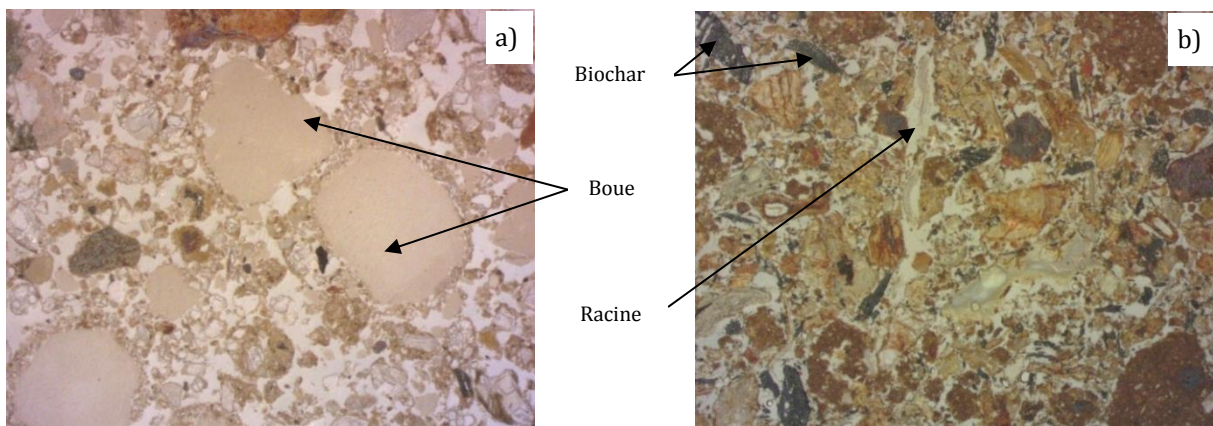


Annexe 43 _ pH des substrats M et U après 120 jours d'expérimentation en fonction du couvert et de la dose de biochar. *M* : substrat élaboré (en jaune), *U* : sol ultramafique (en marron), *Aly* : *A. murale*, *RG* : ray-grass, *SN* : sol nu, 0, 1, 3 et 5% (*m*) : dose de biochar. Pour le substrat *M*, les valeurs affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Pour le sol *U*, les valeurs affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts-types (*N* varie de 3 à 5).

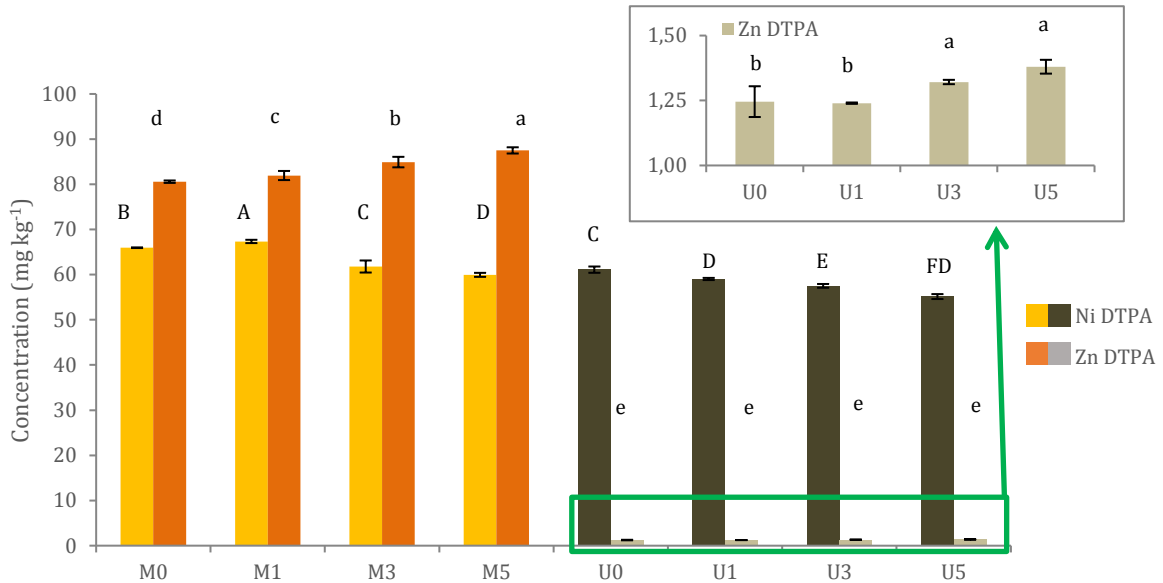


Annexe 44 _ Observations microscopiques ; photographie de a) M0 sol nu et b) U5 *A. murale*. À la loupe binoculaire

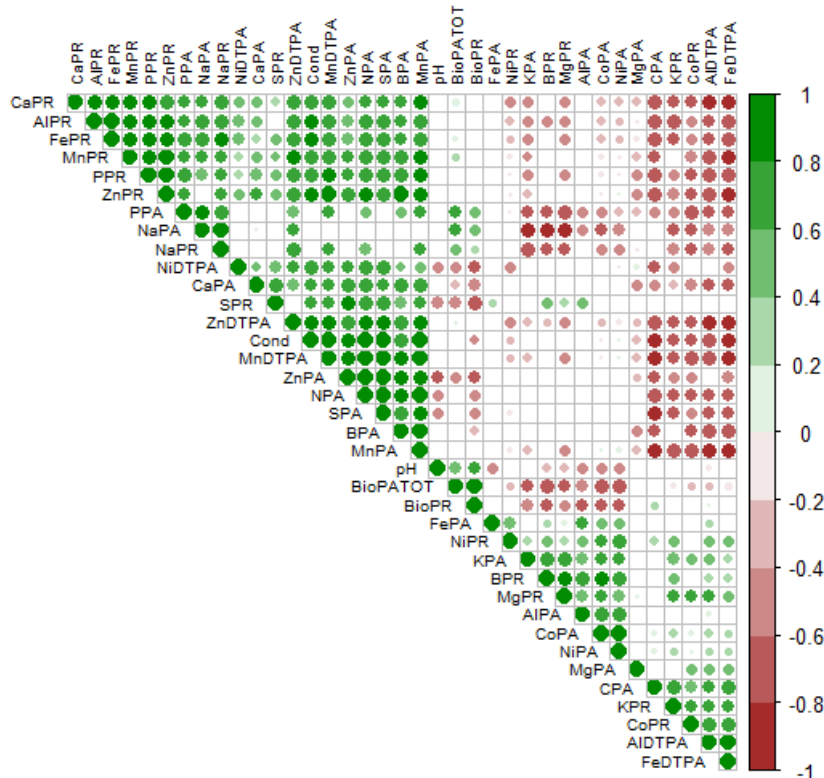
Des lames minces sont réalisées à partir de "bloc de sol" issus des vases de végétation. Le bloc subit une succession d'étapes : imprégnation, polymérisation puis découpage, collage sur une lame de verre et amincissement. Succinctement: lors de l'**imprégnation** le bloc de terre est placé dans un dessiccateur sous vide pendant 4h sous un flux constant de mélange résine-solvant de façon à ce que tous les pores et fissures soient remplis. Ensuite la **polymérisation** a lieu pendant quatre à cinq semaines à l'air, enfin une plaquette de 10 mm d'épaisseur est découpée dans le bloc et collée à une lame de verre. Enfin chaque plaquette est amincie pour obtenir une épaisseur de 20 à 25 μm . Les lames minces sont observées avec un stéréo microscope Leica MZ FLIII (grandissement $\times 8$ à $\times 100$). Suite à la réalisation de lames minces sur les substrats après culture, sur *M*, les particules de boue présentent de fines particules de sol sur leur pourtour, sur *U*, la porosité créée par les racines a pu être observée.



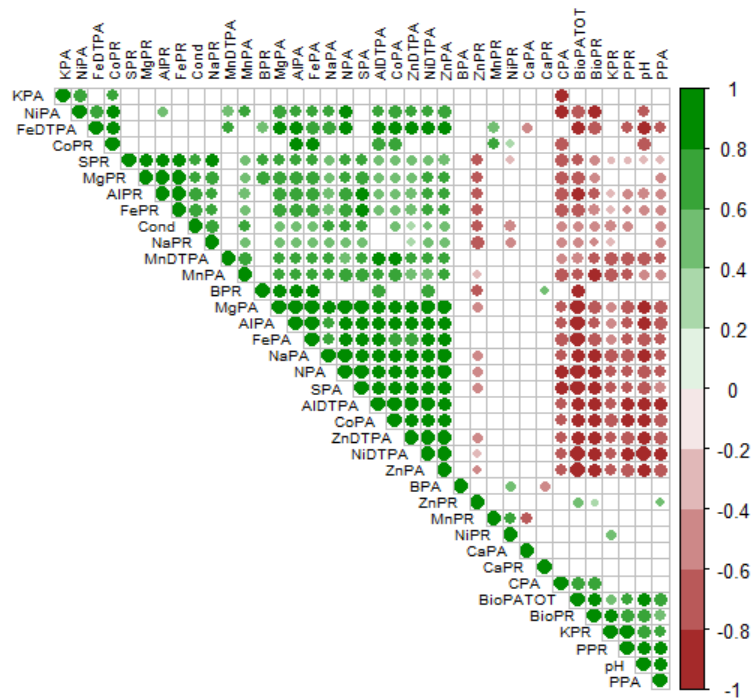
Annexe 45 _ Concentrations du Ni et du Zn extractibles au DTPA sur les sols M et U avant culture selon 4 amendements en biochar (0, 1, 3 et 5%). Les concentrations du Ni affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les concentrations du Zn affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts-types ($N=3$). Dans l'encadré, Zn DTPA sur le sol U (Newman-Keuls, $p < 0,05$)



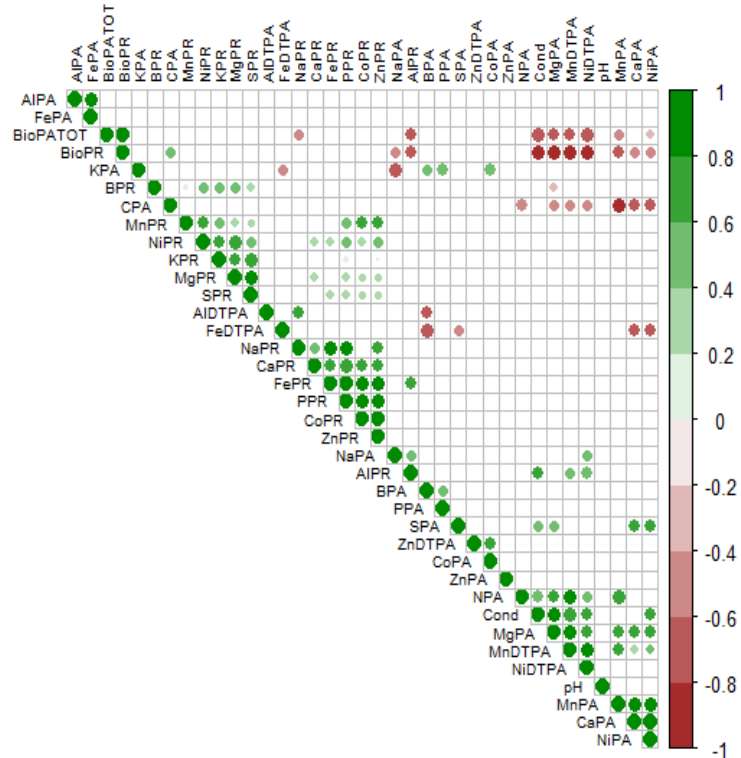
Annexe 46 _ Matrice de corrélation de l'analyse en composantes principales des variables mesurées sur U et M pour les deux espèces. Cf ACP Figure 90, $N=3$, coefficients de Spearman, variables du sol après culture : pH, Cond : conductivité, XDTPA : élément extrait au DTPA, XPA et XPR : élément dans les parties aériennes et racinaires, BioPATOT et BioPR : biomasses aériennes et racinaires, CPA et NPA : les teneurs en carbone et azote dans les parties aériennes. Les coefficients de corrélation négatifs sont en rouge et les coefficients positifs en vert. La présence de blanc sur les intersections des variables signifie que le coefficient n'est pas significatif ($p\text{-value} > 0,05$).



Annexe 47 _ Matrice de corrélation pour *A. murale* sur le sol U. *N=3*, coefficients de Spearman, variables du sol après culture : pH, Cond : conductivité, XDTPA : élément extrait au DTPA, XPA et XPR : élément dans les parties aériennes et racinaires, BioPATOT et BioPR : biomasses aériennes et racinaires, CPA et NPA : teneurs en carbone et azote dans les parties aériennes. Les coefficients de corrélation négatifs sont en rouge et les coefficients positifs en vert. La présence de blanc sur les intersections des variables signifie que le coefficient n'est pas significatif ($p\text{-value}>0,05$).

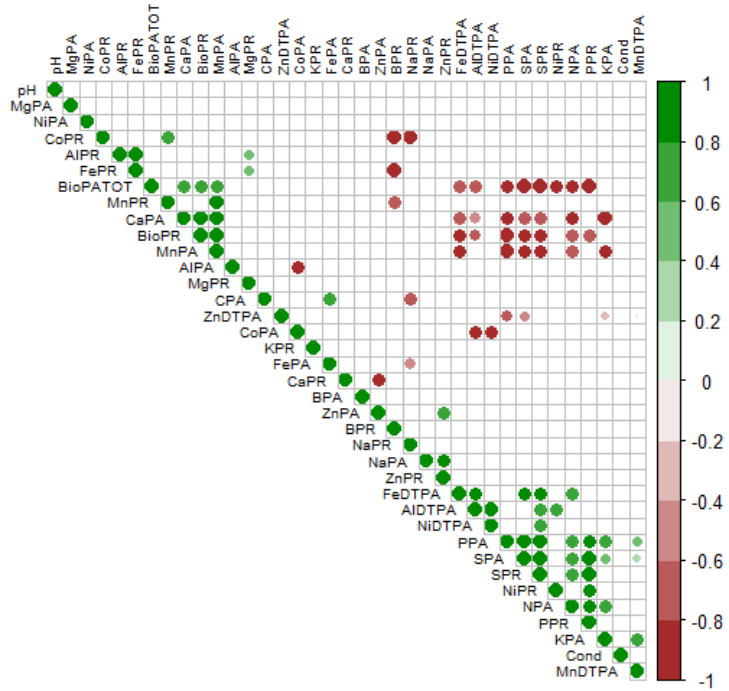


Annexe 48 _ Matrice de corrélation pour *A. murale* sur le substrat M. *N=3*. Variables du sol après culture : pH, Cond : conductivité, XDTPA : élément extrait au DTPA, XPA et XPR : élément dans les parties aériennes et racinaires, BioPATOT et BioPR : biomasses aériennes et racinaires, CPA et NPA : teneurs en carbone et azote dans les parties aériennes. Les coefficients de corrélation négatifs sont en rouge et les coefficients positifs en vert. La présence de blanc sur les intersections des variables signifie que le coefficient n'est pas significatif ($p\text{-value}>0,05$).



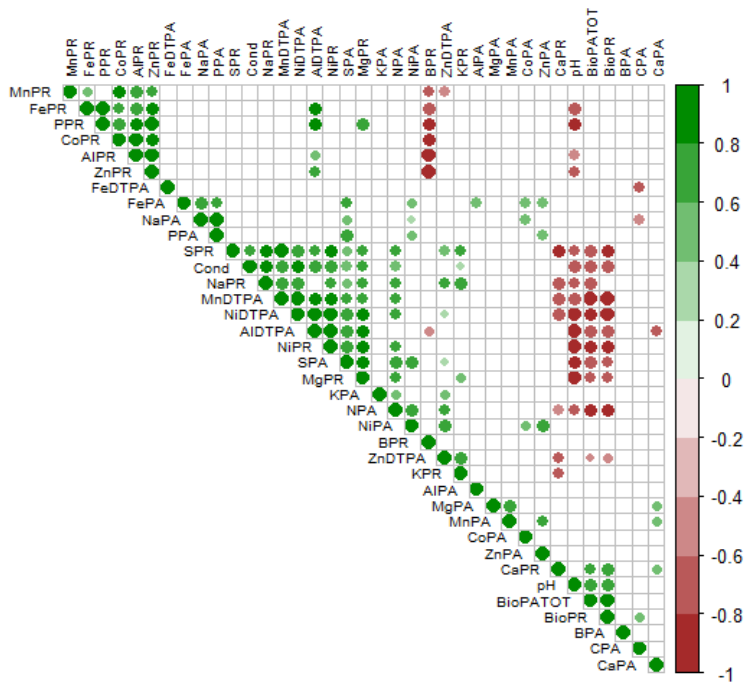
Annexe 49 _ Matrice de corrélation pour le ray-grass sur le substrat U.

N=3, ariables du sol après culture : pH, Cond : conductivité, XDTPA : élément extrait au DTPA, XPA et XPR : élément dans les parties aériennes et racinaires, BioPATOT et BioPR : biomasses aériennes et racinaires, CPA et NPA : teneurs en carbone et azote dans les parties aériennes. Les coefficients de corrélation négatifs sont en rouge et les coefficients positifs en vert. La présence de blanc sur les intersections des variables signifie que le coefficient n'est pas significatif (p-value>0,05).



Annexe 50 _ Matrice de corrélation pour le ray-grass sur le substrat M.

N=3, coefficients de Spearman, variables du sol après culture : pH, Cond : conductivité, XDTPA : élément extrait au DTPA, XPA et XPR : élément dans les parties aériennes et racinaires, BioPATOT et BioPR : biomasses aériennes et racinaires, CPA et NPA : teneurs en carbone et azote dans les parties aériennes. Les coefficients de corrélation négatifs sont en rouge et les coefficients positifs en vert. La présence de blanc sur les intersections des variables signifie que le coefficient n'est pas significatif (p-value>0,05).



Annexe 51 _ Complément du Chapitre 2 de la Partie 4

Pour les quatre expériences ci-dessous, les vases de végétation sont placés en chambre de culture au même moment, et donc dans les mêmes conditions, que l'expérimentation présentée dans la Partie 4 Chapitre 2. La culture est de 12 semaines dans des vases de végétation de 0,35 L avec une photopériode de 16h de jour / 8h de nuit (T°C 25°C / 18°C), hygrométrie à 70%, luminosité à 2000 Lux (soit 200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$). Les substrats sont maintenus à 80% de leur capacité de rétention en eau par un arrosage à l'eau ultra pure toutes les 48h. Les modalités sont réparties en trois blocs randomisés. Les hyperaccumulateurs sont au nombre de trois individus par vase, le ray-grass (*Lolium multiflorum*) est semé avec une densité de 0,5 g de graines pour 100 cm^2 .

Liste des figures de l'Annexe 51

Fig. a _ Biomasses aériennes du ray-grass à 6 et 12 semaines et biomasses racinaires à l'issue de la culture.....	254
Fig. b_ Concentrations du Ni dans les parties aériennes à 6 et 12 semaines et dans les parties racinaires à l'issue de la culture du ray-grass.....	255
Fig. c _ Biomasses sèches des parties aériennes et racinaires de <i>L. emarginata</i> après 12 semaines de culture sur le substrat élaboré selon différents amendements.....	256
Fig. d _ pH des substrats avant et après culture de <i>L. emarginata</i> en présence de marc de café et/ou biochar.....	256
Fig. e _ Conductivité des substrats avant et après culture pendant 120 jours de <i>L. emarginata</i> en présence de marc de café et/ou biochar.....	257
Fig. f _ Concentration de Ni dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> et quantité de Ni extrait par vase de végétation selon quatre substrats.....	257
Fig. g _ Biomasse des parties aériennes et racinaires de <i>L. emarginata</i> après 12 semaines de culture sur le substrat élaboré selon la boue employée dans la formulation du substrat et la dose de biochar amendée.....	258
Fig. h _ Concentration du Ni dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> sur un substrat contenant 10% de boue A ou de boue B amendée ou non avec 5% de biochar.....	259
Fig. i _ pH des substrats avant et après culture de <i>L. emarginata</i>	259
Fig. j _ Biomasses des parties aériennes et racinaires d' <i>A. murale</i> , <i>L. emarginata</i> et <i>B. tymphaea</i> sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré.....	260
Fig. k _ Concentration du Ni dans les parties aériennes et racinaires d' <i>A. murale</i> , <i>L. emarginata</i> et <i>B. tymphaea</i> sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré.....	260
Fig. l _ Quantité de Ni extrait par vase de végétation dans les parties aériennes et racinaires de <i>A. murale</i> , <i>L. emarginata</i> et <i>B. tymphaea</i> sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré....	260
Fig. m _ pH des substrats à l'issue de la culture d' <i>A. murale</i> , <i>L. emarginata</i> et <i>B. tymphaea</i> sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré.....	261

A/ Expérimentation 1 : effet du type de biochar sur la croissance du ray-grass sur un substrat élaboré avec une boue de phosphatation

Cette première expérience a pour objectif d'évaluer l'impact de différents biochars sur le transfert du Ni vers une plante tolérante le ray-grass en comparant deux doses d'amendement et trois biochars.

À partir d'un substrat élaboré avec 10/90 (m/m) de boue de phosphatation (Lot 1)/terre de biopile (Lot 2), trois biochars sont testés avec une fraction massique apportée de 1% (désigné par M1) et 5% (M5). Les trois biochars sont présentés dans la Partie 2, il s'agit de deux biochars de bois i) biochar 1 (Bc1) : issu de 50% de résineux et 50% de feuillus ii) biochar 2 (Bc2) : issu de 100% de résineux et iii) le biochar 3 (Bc3) : issu de *Miscanthus*. Ainsi les six modalités sont comparées à un témoin (sans biochar, nommé M0). Finalement, sept modalités sont cultivées avec du ray-grass (*L. multiflorum*). La durée de culture est de 12 semaines, deux coupes sont effectuées à 6 et 12 semaines, la solution du sol est analysée après prélèvement par bougie poreuse.

À l'issue de la première coupe, la production de biomasse est la plus élevée avec 5% de Bc1, la biomasse des autres modalités n'est pas différente du témoin non amendé (Fig. a). Après 12 semaines de culture la biomasse aérienne ne diffère pas selon le biochar et la dose amendée, cependant la biomasse est supérieure à la première coupe sur toutes les modalités. Les biomasses racinaires avec 5% de Bc1 est supérieure à celle de Bc3 quelle que soit la dose et à celle de Bc2 lors d'un amendement de 1%.

La concentration du Ni dans les feuilles de ray-grass lors de la première coupe diminue significativement avec 5% de biochar 1 et 2 par rapport au témoin (Fig. b). Lors de la seconde coupe, la concentration du Ni dans les parties aériennes n'est pas différente selon le biochar utilisé ou la dose amendée. La concentration racinaire du Ni ne varie pas en fonction du biochar utilisé mais elle diminue significativement entre 1 et 5% dans le cas du biochar 1.

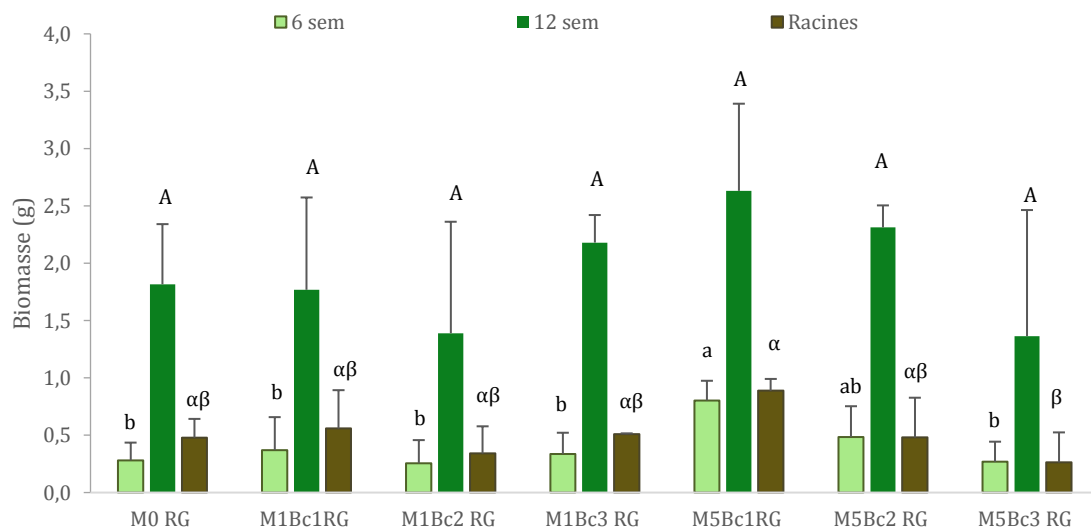


Fig. a _ Biomasses aériennes du ray-grass à 6 et 12 semaines et biomasses racinaires à l'issue de la culture. Anova, $p < 0,05$. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes. Lettres minuscules : comparaison des parties aériennes à la première coupe, lettres majuscules : comparaison des moyennes à la seconde coupe, lettres grecques : comparaison des moyennes des parties racinaires. Les barres verticales représentent les écarts-types.

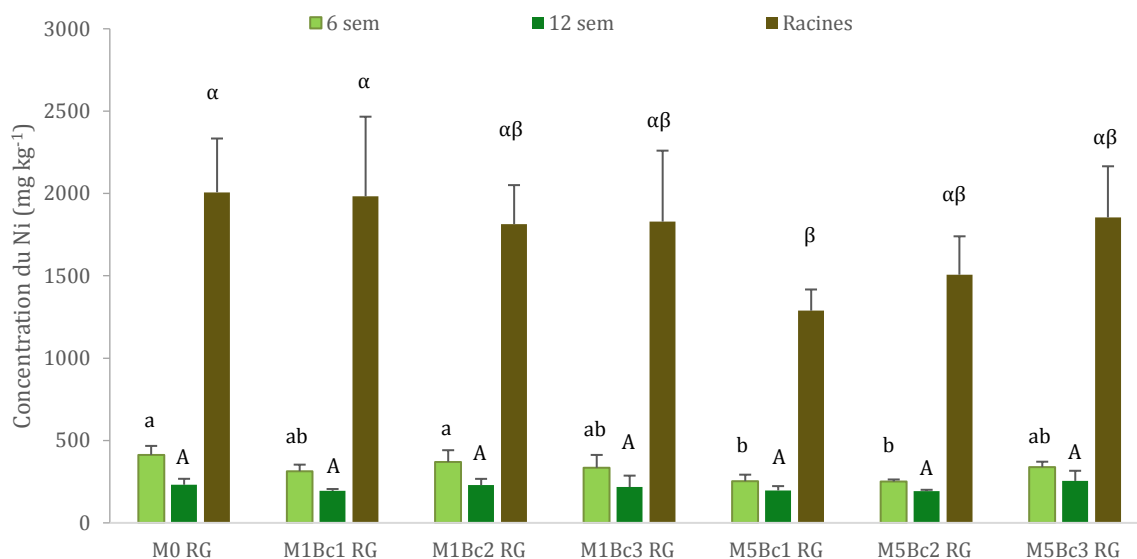


Fig. b_ Concentrations du Ni dans les parties aériennes à 6 et 12 semaines et dans les parties racinaires à l'issue de la culture du ray-grass. Anova, $p < 0,05$. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes. Lettres minuscules : comparaison des parties aériennes à la première coupe (test t, $p < 0,05$), lettres majuscules : comparaison des moyennes à la seconde coupe, lettres grecques : comparaison des moyennes des parties racinaires (test t, $p < 0,05$). Les barres verticales représentent les écarts types.

Un amendement de 1% de biochar n'augmente pas la production de biomasse et ne modifie pas la concentration du Ni que ce soit pour les parties aériennes ou racinaires. En revanche, un amendement de 5% de biochar, issu de 50% de résineux et 50% de feuillus, augmente la biomasse, par rapport au témoin, lors de la première coupe. La concentration du Ni pour ce même biochar diminue avec un amendement de 5%. Donc l'utilisation d'un biochar de bois (50%résineux et 50% feuillu), apporté à 5%, permet d'augmenter la production de biomasse et de diminuer le transfert du Ni vers les parties racinaires et aériennes. Ainsi, l'effet du biochar, sur la production de biomasse et le transfert de Ni, varie selon l'origine du biochar et la dose amendée.

B/ Expérimentation 2 : comparaison de différents amendements sur l'hyperaccumulation du Ni et le développement des hyperaccumulateurs sur des substrats élaborés avec une boue de phosphatation.

Cette deuxième expérience teste l'impact du biochar et du marc de café, seul ou ensemble sur l'hyperaccumulation du Ni.

Le substrat est élaboré avec un rapport 10/90 (m/m) de boue de phosphatation/terre de biopile. Quatre modalités sont préparées : i) sans amendement, ii) avec 5% (m) de biochar 1, iii) avec 5% (m) de marc de café, iii) avec 5% de biochar 1 et 5% de marc de café. L'ensemble des amendements sont présentés dans la Partie 2, le biochar est caractérisé par un pH basique alors que le marc de café est acide.

La biomasse augmente significativement en présence d'amendement. Elle est la plus élevée lors de la présence du biochar et du marc de café (Fig. c).

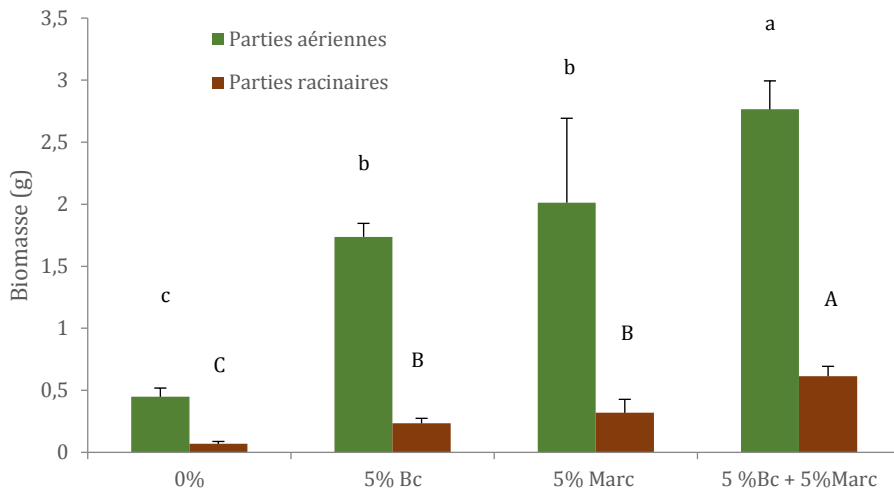


Fig. c _ Biomasses sèches des parties aériennes et racinaires de *L. emarginata* après 12 semaines de culture sur le substrat élaboré selon différents amendements. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes : les lettres minuscules correspondent aux parties aériennes ($p < 0,05$, Newman Keuls), les lettres majuscules correspondent aux parties racinaires ($p < 0,05$, Newman Keuls).

Le pH varie selon l'amendement et selon le temps (initial versus après la culture). Le biochar ne modifie pas le pH du substrat alors que le marc de café acidifie le substrat (Fig. d). Cependant, à l'issue de la culture le pH augmente en présence de marc de café. La conductivité diminue en présence d'amendement, elle diminue d'autant plus avec le marc de café et est plus faible à l'issue de la culture (Fig. e).

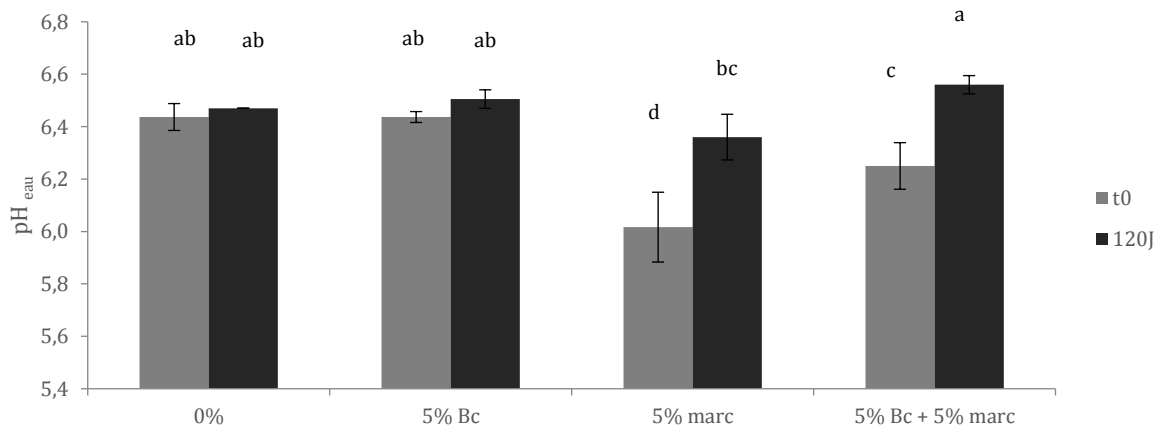


Fig. d _ pH des substrats avant et après culture de *L. emarginata* en présence de marc de café et/ou biochar. t0 : début d'expérience, 120J : après 120 jours de culture. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%, Newman Keuls.

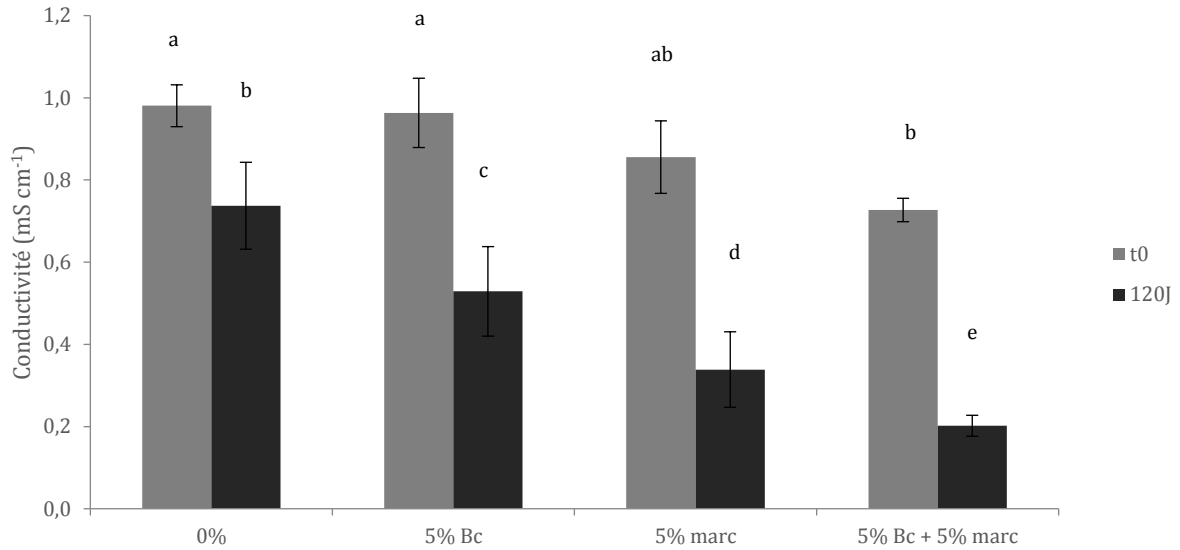


Fig. e _ Conductivité des substrats avant et après culture pendant 120 jours de *L. emarginata* en présence de marc de café et/ou biochar. t0 : début d'expérience, 120J : après 120 jours de culture. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$, Newman Keuls).

La concentration du Ni dans les PA de *L. emarginata* diminue avec l'apport d'amendement : marc de café ou biochar seul (Fig. f). Cependant, lors de l'ajout simultané des deux amendements la concentration du Ni n'est pas différente de celle du témoin non amendé. L'utilisation d'un amendement (biochar de bois ou marc de café) multiplie par trois la quantité de Ni extraite par vase. L'utilisation des deux amendements simultanément, soit 10% d'amendement (½ marc et ½ biochar) multiplie encore par trois le rendement de Ni par vase. Donc l'utilisation combinée d'amendements est une stratégie prometteuse.

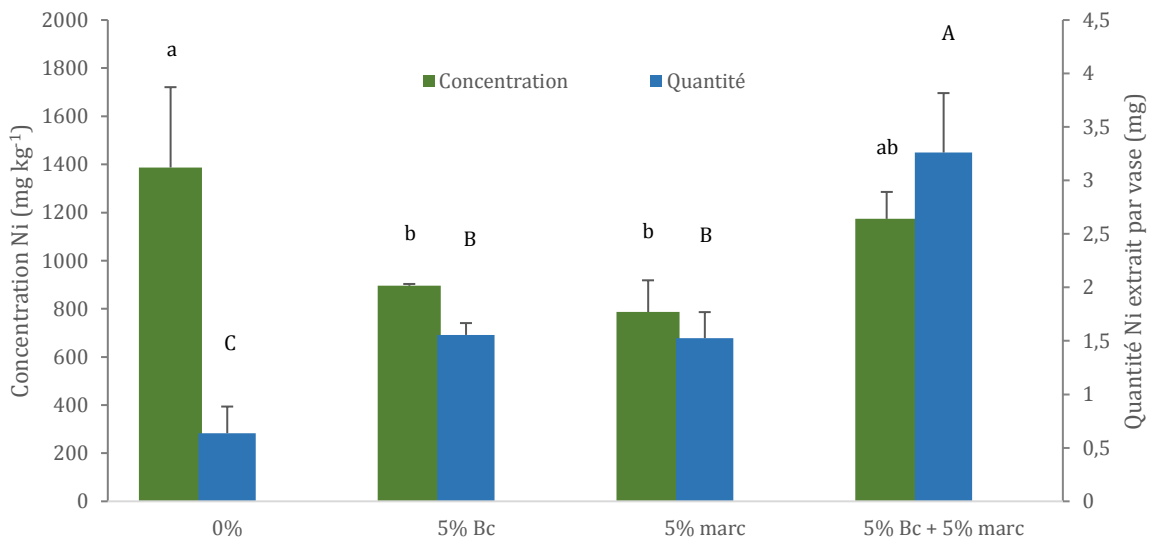


Fig. f _ Concentration de Ni dans les parties aériennes de *L. emarginata* et quantité de Ni extrait par vase de végétation selon quatre substrats. 0% : substrat non amendé constitué de 10% de boue de phosphatation et 90% de terre de biopile, 5%Bc : substrat amendé avec 5% (m) de biochar 1, 5% marc : substrat amendé avec 5% de marc de café, 5%Bc+5%marc : substrat amendé avec 5% de chacun des amendements. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes : les lettres minuscules comparent les concentrations ($p < 0,05$, Newman Keuls), les lettres majuscules comparent les quantités ($p < 0,05$, Newman Keuls).

C/ Expérimentation 3 : potentiel de *L. emarginata* à végétaliser trois délaissés métalliques

Cette troisième expérience évalue la capacité de trois boues métalliques contenant du Ni pour la croissance et le transfert du Ni vers une plante hyperaccumulatrice.

Trois boues métalliques sont utilisées, elles sont présentées dans la Partie 2 et en Annexe 1. La boue A est acide et contient 0,57% de Ni et 6,7% de Zn, les 2 autres boues sont basiques, la boue B contient 1,18% de Ni et 19% de Ca, la boue C contient 3,5% de Ni, 3,4% de Zn et 18% de Bi. À partir de ces 3 boues métalliques sont préparés des substrats en mélangeant 10% de boue et 90% de terre de biopile (m/m). Pour les boues A et B, une modalité avec un amendement de 5 % de biochar 1 est préparée. Dans le cas de la boue C, la toxicité élevée observée lors des tests de germination indique la nécessité de la présence de biochar pour la germination. Les vases sont semés avec *L. emarginata* S II. Trois répétitions sont faites et trois plantules sont conservées par vase, la culture dure 12 semaines.

La biomasse augmente sur la boue A en présence de biochar. Avec 5% de biochar, les deux boues présentent la même production de biomasse que la boue B sans biochar (Fig. g). Aucune germination n'a été observée sur la boue C, donc aucune plante n'a été récoltée.

Sur la boue B, la concentration du Ni et la quantité de Ni extrait sont supérieurs aux valeurs obtenues sur la boue A (Fig. h). La concentration du Ni dans les parties racinaires est supérieure sur la boue A.

Le pH est supérieur sur les substrats élaborés avec la boue B (Fig. i). La présence de biochar diminue la conductivité du substrat. Cette diminution est immédiate sur le substrat avec la boue B, elle est visible seulement à l'issue de la culture sur la boue A. La conductivité de tous les substrats est inférieure à l'issue de la culture comparée au t_0 .

Finalement, le substrat élaboré avec la boue B et 5% de biochar a le meilleur potentiel pour l'agromine du Ni avec *L. emarginata* dans les conditions de l'expérimentation.

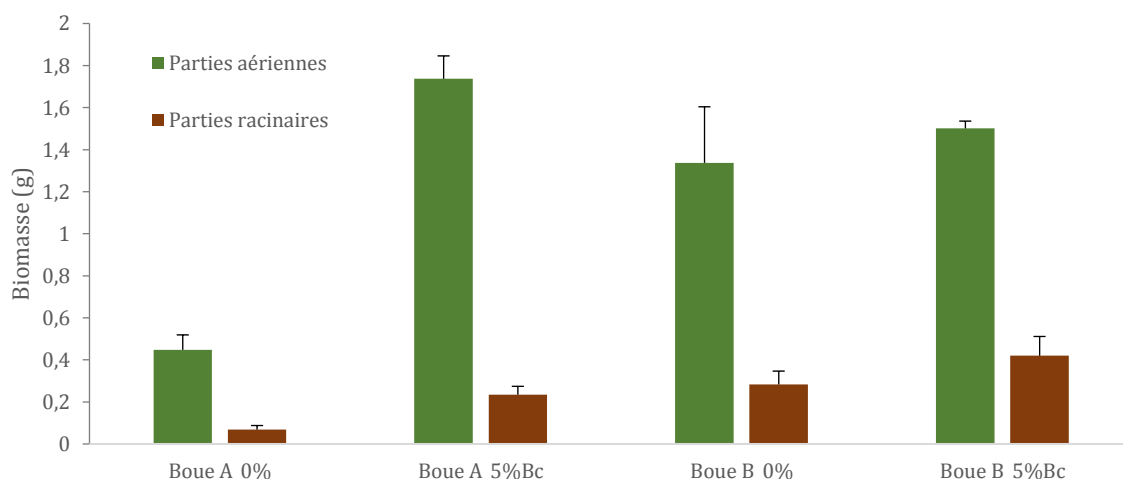


Fig. g _ Biomasse des parties aériennes et racinaires de *L. emarginata* après 12 semaines de culture sur le substrat élaboré selon la boue employée dans la formulation du substrat et la dose de biochar amendée. Boue A : boue de phosphatation, Boue B : boue de sorite d'une STEP industrielle. Les barres verticales indiquent les écarts-types.

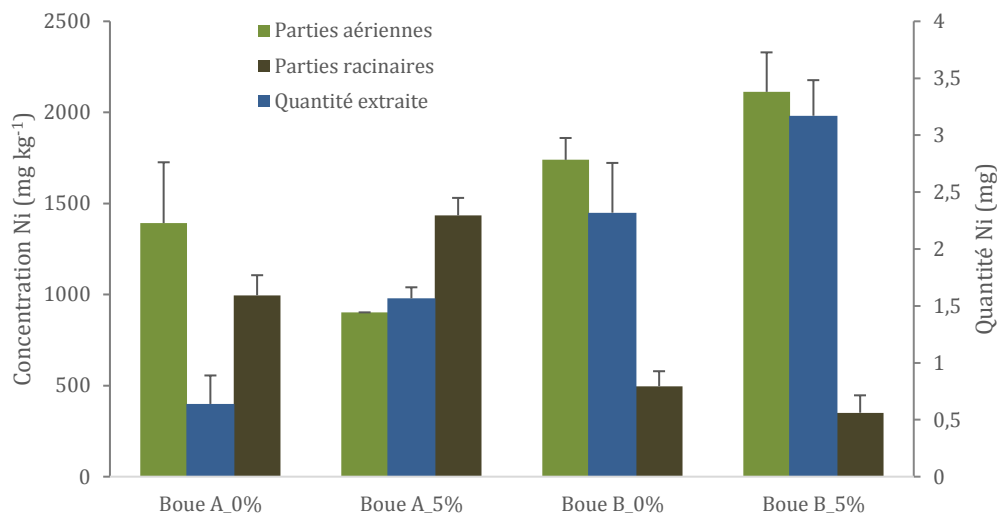


Fig. h _ Concentration du Ni dans les parties aériennes de *L. emarginata* sur un substrat contenant 10% de boue A ou de boue B amendée ou non avec 5% de biochar. Boue A : boue de phosphatation, Boue B : boue de sortie d'une STEP industrielle. Les barres verticales indiquent les écarts-types.

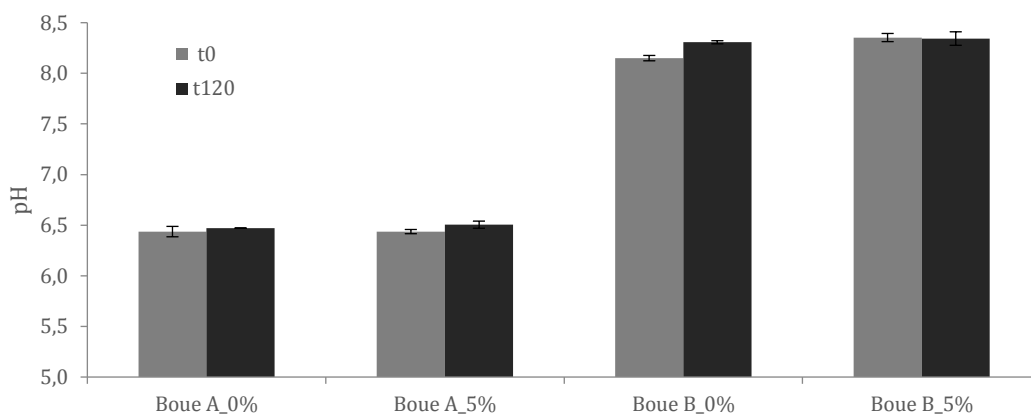


Fig. i _ pH des substrats avant et après culture de *L. emarginata*. t0 : début d'expérience, 120J : après 120 jours de culture.

D/ Expérimentation 4 : potentiel de trois espèces hyperaccumulatrices de Ni sur un substrat élaboré à partir d'une boue de phosphatation

Cette quatrième expérience vise à comparer l'efficacité d'extraction du Ni, sur un substrat élaboré avec une boue de phosphatation, de trois espèces hyperaccumulatrices de Ni : *B. typhaea*, *L. emarginata* et *A. murale* en absence ou en présence de biochar.

Les populations utilisées sont *B. typhaea* S III, *L. emarginata* S VIII et *A. murale* S II (cf Partie 2). Elles sont cultivées sur un substrat élaboré avec un rapport 10/90 (m/m) de boue de phosphatation/terre de biopile et un amendement de 5% (m) de biochar 1. Dans le cas d'*A. murale* et de *L. emarginata* des modalités sans biochar sont effectuées (cf composition dans la Partie 2).

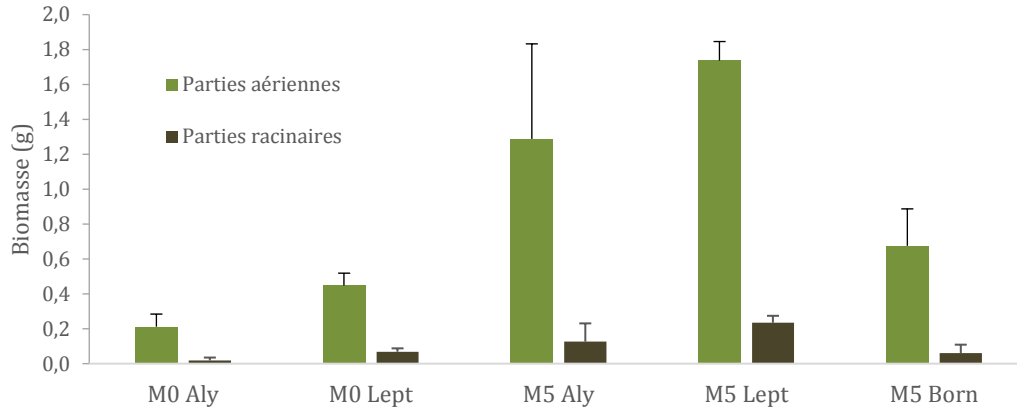


Fig. j _ Biomasses des parties aériennes et racinaires d'*A. murale*, *L. emarginata* et *B. typhalea* sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré. Aly : *A. murale*, Lept : *L. emarginata*, Born : *B. typhalea*, M0 : 0% de biochar, M5 : 5% (m) de biochar 1. Les barres verticales indiquent les écarts-types.

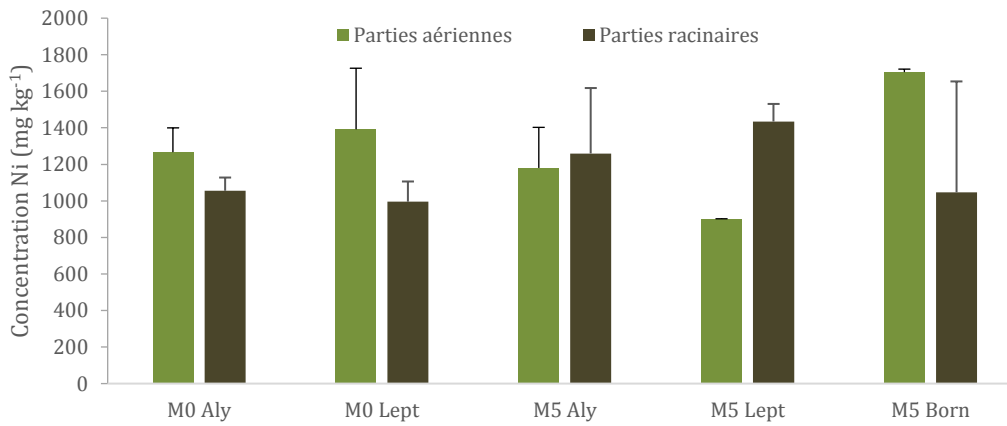


Fig. k _ Concentration du Ni dans les parties aériennes et racinaires d'*A. murale*, *L. emarginata* et *B. typhalea* sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré. Aly : *A. murale*, Lept : *L. emarginata*, Born : *B. typhalea*, M0 : 0% de biochar, M5 : 5% (m) de biochar 1. Les barres verticales indiquent les écarts-types.

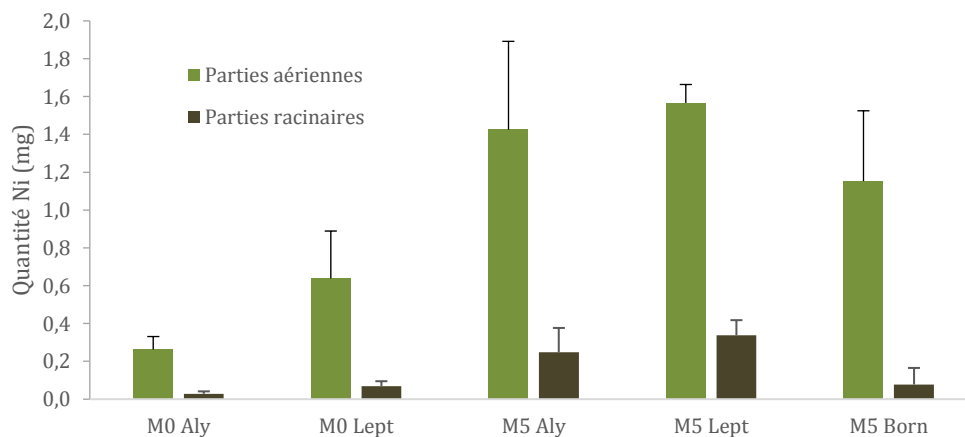


Fig. l _ Quantité de Ni extrait par vase de végétation dans les parties aériennes et racinaires de *A. murale*, *L. emarginata* et *B. typhalea* sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré. Aly : *A. murale*, Lept : *L. emarginata*, Born : *B. typhalea*, M0 : 0% de biochar, M5 : 5% (m) de biochar 1. Les barres verticales indiquent les écarts-types.

Les pH initiaux des substrats ne sont pas différents selon l'absence ou la présence de biochar. À l'issue de la culture, le pH n'évolue pas dans le cas d'*A. murale* et *B. tymphaea*, mais augmente en présence de *L. emarginata* (Fig. m).

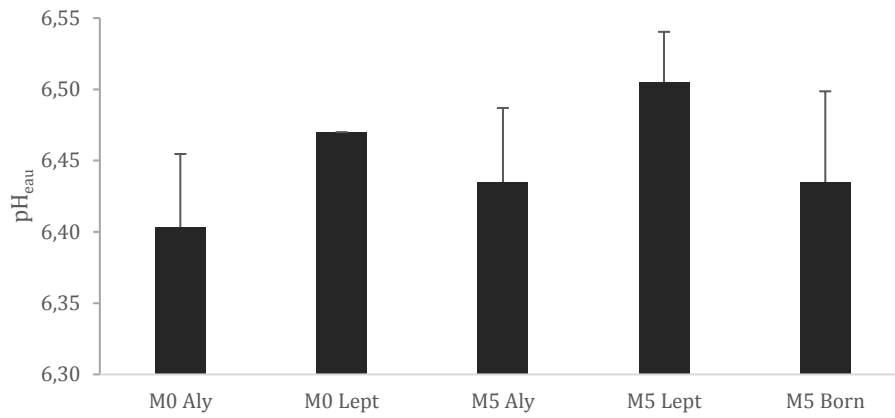


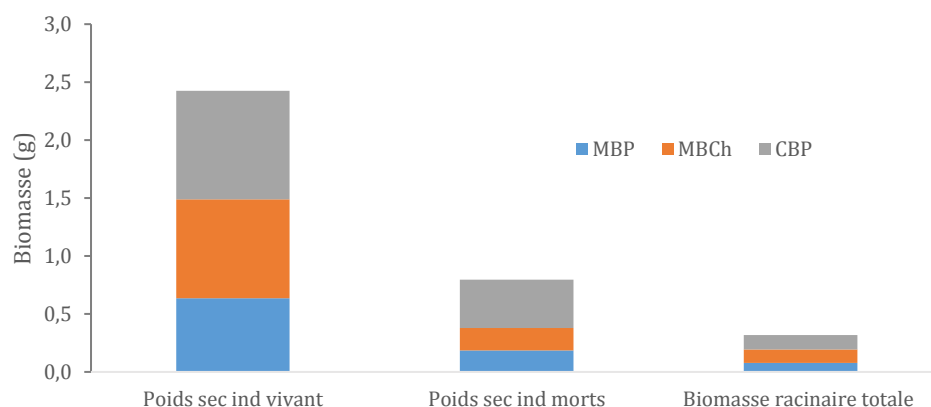
Fig. m _ pH des substrats à l'issue de la culture d'*A. murale*, *L. emarginata* et *B. tymphaea* sans ou avec 5% de biochar sur le substrat élaboré. Aly : *A. murale*, Lept : *L. emarginata*, Born : *B. tymphaea*, M0 : 0% de biochar, M5 : 5% (m) de biochar 1. Les barres verticales indiquent les écarts-types.

Annexes de la Partie 5 : Mise en œuvre et optimisation de l'agromine sur des substrats élaborés avec une boue métallique industrielles

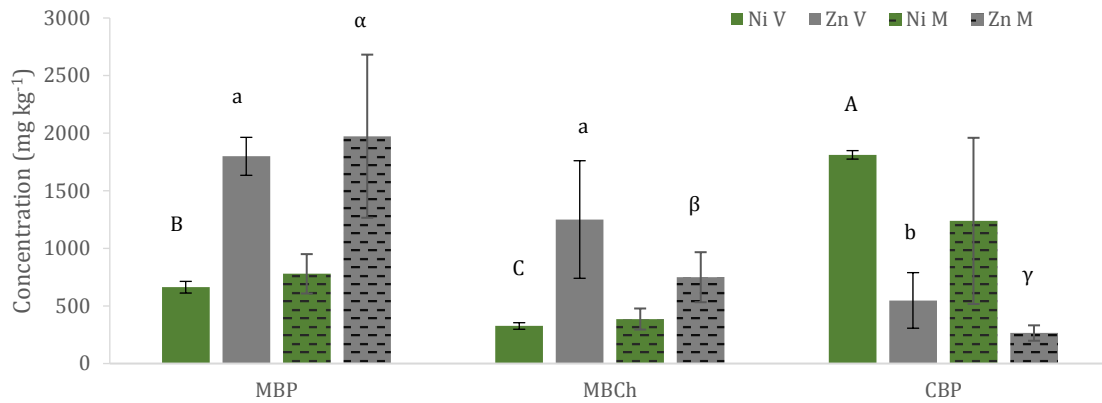
Annexe 52_ Composition pseudo totale des mélanges et des boues. Dosage à l'ICP-OES après extraction eau régale. Mél 80/20 ; mélange (v/v) de 80% de terre de biopile et 20% de compost, Boue5Ch : boue 5 chaulée avec 2,5% (m) de Ca(OH)₂, MBP : mélange avec 10% (m) de boue pure, MBCh : mélange avec 10% (m) de boue chaulée.

Éléments	Mél 80/20	Boue5	Boue5Ch	MBP	MBCh	Unité
Al	14 958 ± 702	37,8 ± 11,2	68,7 ± 6,9	17 367 ± 653	17 089 ± 483	mg kg ⁻¹
As	13,7 ± 0,5	2,30 ± 0,10	2,23 ± 0,10	13,3 ± 0,1	12,6 ± 0,8	mg kg ⁻¹
B	16,8 ± 1,1	2,61 ± 0,09	2,54 ± 0,08	18,5 ± 0,8	18,8 ± 1,6	mg kg ⁻¹
Ca	49 623 ± 1 817	1 186 ± 50	20 553 ± 174	47 606 ± 1 515	52 789 ± 3 106	mg kg ⁻¹
Cd	4,46 ± 0,64	<LD	<LD	3,61 ± 0,11	3,57 ± 0,25	mg kg ⁻¹
Co	8,17 ± 0,29	5,29 ± 0,10	5,03 ± 0,02	7,62 ± 0,35	7,62 ± 0,42	mg kg ⁻¹
Cr	43,7 ± 1,0	51,6 ± 0,5	48,7 ± 0,02	45,7 ± 3,4	45,1 ± 2,1	mg kg ⁻¹
Cu	33,1 ± 2,0	10,3 ± 0,1	10,0 ± 2,0	30,6 ± 0,4	28,4 ± 1,0	mg kg ⁻¹
Fe	20 593 ± 1 647	214 130 ± 3716	208 878 ± 638	38 361 ± 1 179	38 692 ± 1 707	mg kg ⁻¹
K	2 530 ± 125	1 825 ± 38	1 811 ± 48	3 059 ± 168	3 052 ± 91	mg kg ⁻¹
Mg	5159 ± 261	<LD	114 ± 9	4954 ± 232	4950 ± 176	mg kg ⁻¹
Mn	495 ± 27	9 828 ± 235	9 618 ± 32	1 420 ± 111	1 385 ± 42	mg kg ⁻¹
Na	187 ± 45	18 790 ± 424	18 276 ± 127	1 946 ± 144	1 864 ± 25	mg kg ⁻¹
Ni	29,9 ± 1,1	5 790 ± 132	5 625 ± 11	544 ± 39	529 ± 7	mg kg ⁻¹
P	1 072 ± 67	191 075 ± 4 153	185 566 ± 205	18 522 ± 1 175	18 291 ± 423	mg kg ⁻¹
Pb	52,6 ± 6,8	7,08 ± 0,20	7,14 ± 0,15	39,3 ± 1,8	38,8 ± 2,9	mg kg ⁻¹
S	570 ± 75	<LD	<LD	598 ± 80	497 ± 37	mg kg ⁻¹
Zn	166 ± 3	63 846 ± 1 441	62 176 ± 350	5 852 ± 393	5 747 ± 113	mg kg ⁻¹

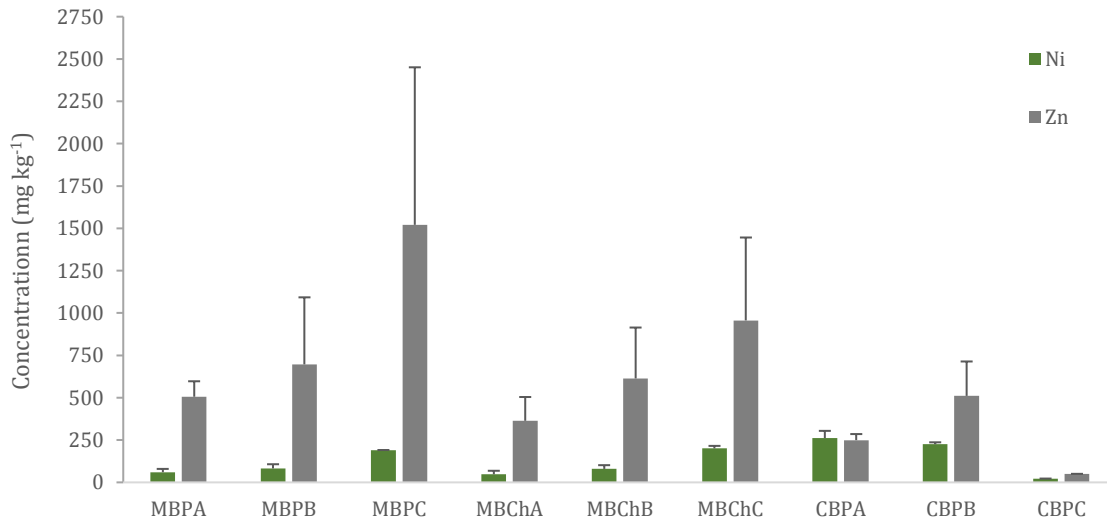
Annexe 53 _ Répartition des biomasses végétales selon leur catégorie et le substrat. Poids sec ind vivant : biomasse des individus vivants à l'issue de la culture, Poids sec ind morts : biomasse des individus morts à l'issue de la culture, MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche de boue pure.



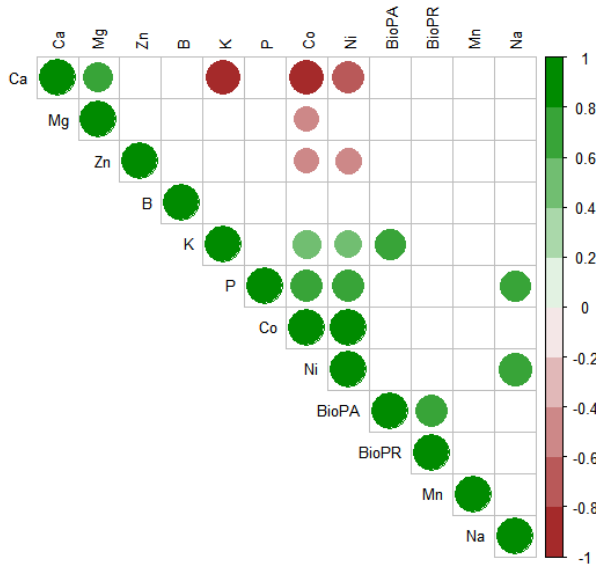
Annexe 54 _ Concentrations du Ni et du Zn dans les parties aériennes de *L. emarginata* selon le substrat élaboré. V: individu(s) vivant(s), M: individu(s) mort(s), MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche de boue pure. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$) : lettres majuscules pour NiV, lettres minuscules pour ZnV, lettres grecques pour ZnM, pas de différence significatives pour NiM.



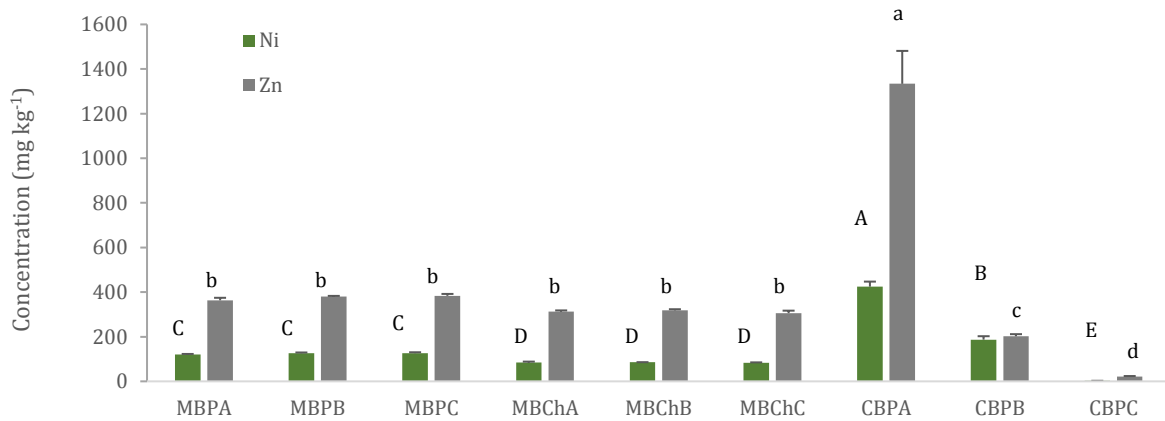
Annexe 55 _ Concentrations du Ni et du Zn dans les parties racinaires de *L. emarginata* en fonction du substrat et de la profondeur dans le vase. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche de boue pure, A : strate supérieure, B : strate intermédiaire, C : strate inférieure.



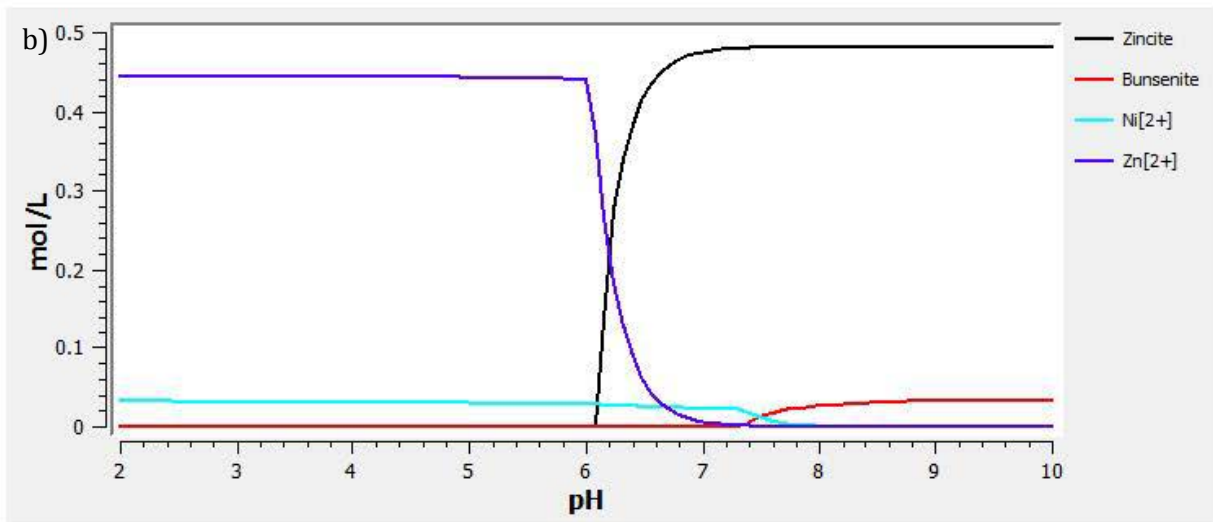
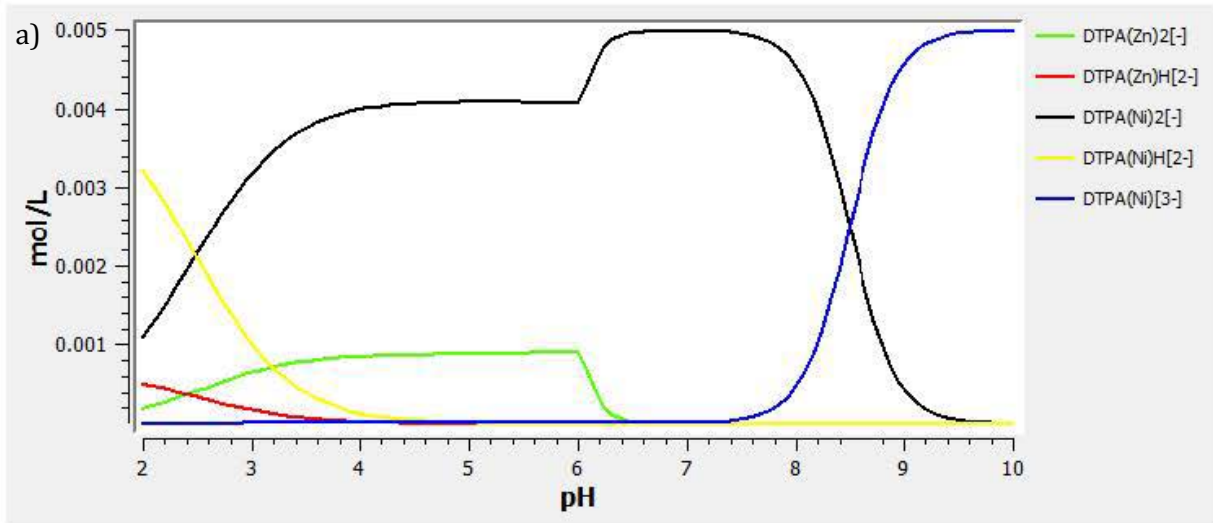
Annexe 56 _ Matrice de corrélation des éléments dosés dans les parties aériennes de *L. emarginata* ainsi que les biomasses aérienne (BioPA), racinaire (BioPR) et le taux de survie. Coefficients de Spearman, les cases blanches indiquent que le coefficient n'est pas significatif ($p>0,05$).



Annexe 57 _ Concentrations du Ni et du Zn disponibles (extraction DTPA) dans le substrat à l'issue de la culture en fonction de la profondeur et du substrat. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche de boue pure, A : strate supérieure, B : strate intermédiaire, C : strate inférieure. Les barres verticales indiquent les écarts-types. Les concentrations du Ni affectées de la même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p<0,05$). Les concentrations du Zn affectées de la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p<0,05$), N=3.




Annexe 58 _ Modélisation de la complexation du DTPA avec le Zn et le Ni lors d'une extraction sur la boue de phosphatation. D'après la norme NFX 31-121. a) Modélisation de l'extraction au DTPA sur la boue pure et b) Modélisation de la précipitation des hydroxydes métalliques (de Ni et Zn) sur la boue pure en fonction du pH. Conditions initiales en métaux : contenu total de la boue pure.



Annexe 59 _ Dispositif de culture en bacs. a) Schéma de l'emplacement des modalités b) Photographie à l'issue du remplissage des bacs (le 22 août 2016).

a)

CABANE	N°2 Rep1 Mélange boue chaulée	N°4 Rep1 COUCHE Boue pure	N°6 Rep2 COUCHE Boue pure	N°8 Rep2 Mélange boue pure	N°10 Rep3 Mélange boue chaulée	N°12 Rep3 Mélange boue pure
	N°1 Rep1 Mélange boue pure	X	X	N°7 Rep2 Mélange boue chaulée	N°9 Rep3 COUCHE Boue pure	X
	BLOC 1		BLOC 2		BLOC 3	

 Nord

b)



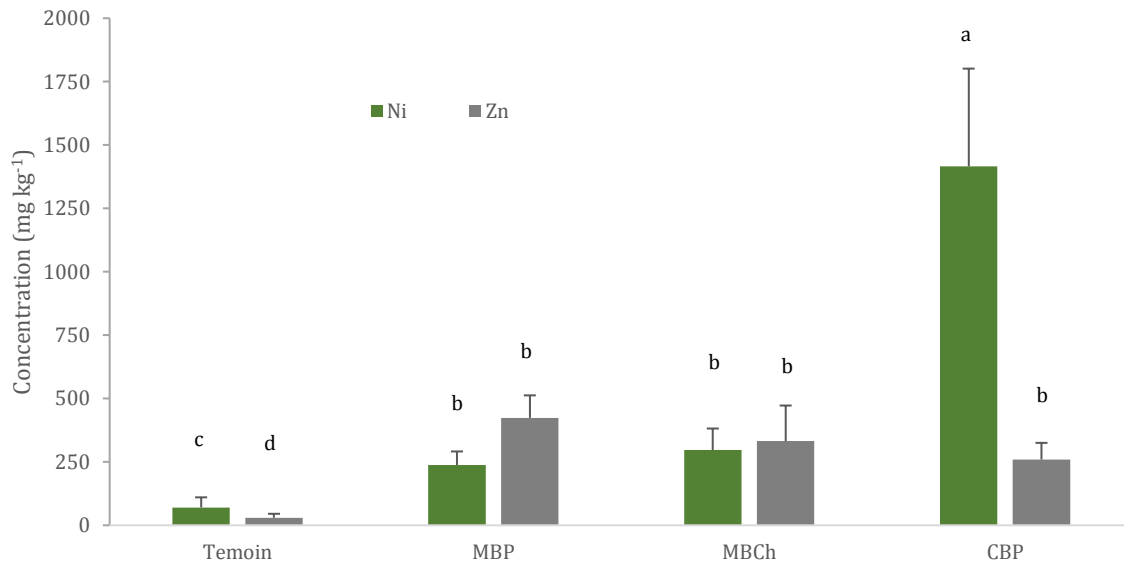
Annexe 60 _ Caractéristiques des substrats. Analyses sur la fraction inférieure à 2 mm (analyses agronomiques : Auréa AgroSciences, analyses élémentaires : Eurofins, et analyses DTPA au Laboratoire Sols et Environnement).

Paramètre mesuré	Mélange brut S/Bio/C	Mélange+ 10% Boue pure	Mélange+10% boue chaulée	Unité
Refus pondéral à 2 mm (Eurofins) ¹	63,3	10,7	58,6	% P.B.
Refus pondéral à 2 mm (Auréa) ¹	65	59	49	% P.B.
Texture²				
Argiles	131	142	150	g kg ⁻¹
Limons fins	128	179	170	g kg ⁻¹
Limons grossiers	84	67	77	g kg ⁻¹
Sables fins	155	132	163	g kg ⁻¹
Sables grossiers	502	479	439	g kg ⁻¹
Indice de battance	0,3	0,8	0,8	-
Indice de porosité	3,8	3,4	2,9	-
Matières organiques et azote				
C Organique Total par Combustion ³	3,26	1,66	1,32	%
Matières organiques ⁴	3,6	2,5	2,4	%
N total (Kjeldahl) ⁵	0,07	0,7	0,07	%
N total (Dumas) ⁶	0,187	0,406	0,373	%
Rapport C/N ^{4,6}	11,1	3,6	3,7	-
Statut acido-basique				
pH eau ⁷	8	6,6	6,7	-
CaCO ₃ total ⁸	565	383	463	g kg ⁻¹
CaCO ₃ actif ⁹	68	52	71	g kg ⁻¹
CaO échangeable ¹⁰	11,54	9,95	8,82	g kg ⁻¹
CEC Metson ¹¹	7,8	11,2	11,6	cmol ⁺ kg ⁻¹
Éléments nutritifs P, K, Mg				
P ₂ O ₅ Olsen ¹²	0,301	0,78	1,115	g kg ⁻¹
K ₂ O ¹³	0,538	0,139	0,163	g kg ⁻¹
MgO ¹⁴	0,365	0,348	0,337	g kg ⁻¹
K/Mg	0,62	0,17	0,21	-
K ₂ O/MgO	1,5	0,4	0,5	-
Capacité hydrique¹⁵				
Capacité de rétention en eau à pF 4,2	8,53	10,12	17,04	% MS
Capacité de rétention en eau à pF 2,5	23,51	33,18	36,103	% MS
Capacité de rétention en eau à pF 2,3	20,837*	34,529	33,639*	% MS
Réserve utile	95	81	86	mm d'eau cm ⁻¹ de sol
Biomasse microbienne¹⁶				
Biomasse microbienne	227	190	176	mg C microbien kg ⁻¹ sol sec
Éléments pseudo-totaux¹⁷				
Al	8150	7440	6590	mg kg ⁻¹
As	21,5	14,7	14,4	mg kg ⁻¹
Cd	1,17	0,49	<0.40	mg kg ⁻¹
Co	8,76	2,44	<1.00	mg kg ⁻¹
Cr	31,6	36,3	41,2	mg kg ⁻¹
Cu	46,3	24,6	20	mg kg ⁻¹
Fe	2,13	9,19	11,3	%
Ni	33,5	950	1610	mg kg ⁻¹
Pb	42,3	24,6	21,2	mg kg ⁻¹
Zn	0,0199	1,93	2,83	%

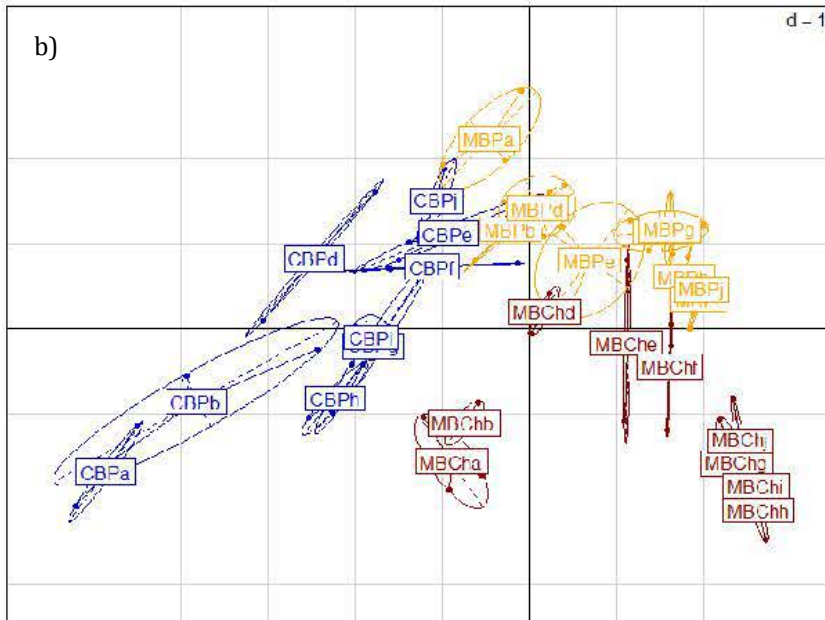
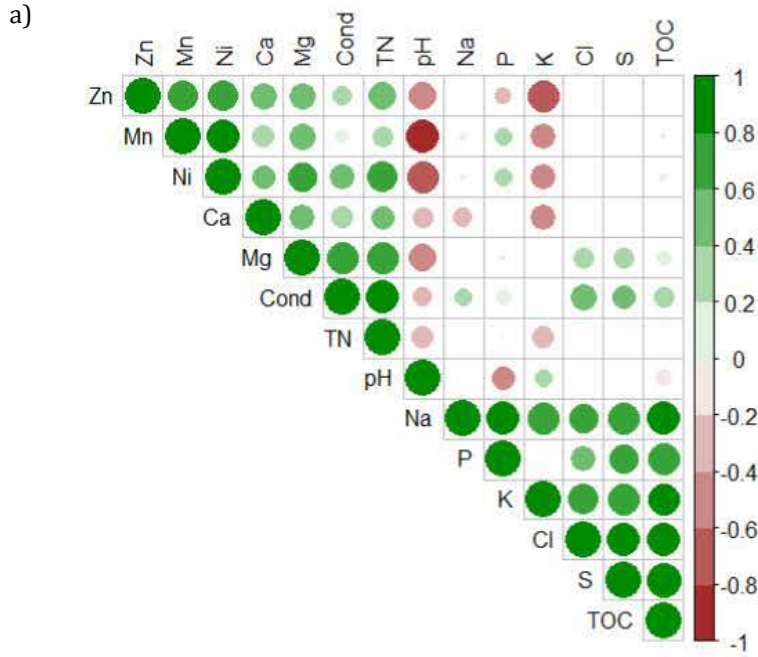
Paramètre mesuré	Mélange brut S/Bio/C	Mélange+ 10% Boue pure	Mélange+10% boue chaulée	Unité
DTPA¹⁸				
Fe	63,97	27,82	43,18	mg kg ⁻¹
Mn	5,55	82,79	57,89	mg kg ⁻¹
Ni	0,44	126,20	139,68	mg kg ⁻¹
Pb	5,25	0,90	2,60	mg kg ⁻¹
Zn	22,43	174,97	207,69	mg kg ⁻¹

¹ Refus à 2 mm selon NF ISO 11464, ² Granulométrie sans décarbonatation, ³ C organique total par combustion selon NF ISO 10694 (eurofins), ⁴ Matière organique NF EN 13039 (Auréo AgroScience), ⁵ N total Kjeldahl, adapté de NF EN 13342 (eurofins), ⁶ N total Dumas NF EN ISO 13654-2 (Auréo AgroScience), ⁷ pH eau, méthode Auréo, ⁸ CaCO₃ total, méthode Auréo selon NF ISO 10693, ⁹ CaCO₃ actif, NF X31-106 (méthode Drouineau), ¹⁰ Méthode Auréo selon NF X31-108, ¹¹ Capacité d'échange cationique, méthode Auréo selon NF ISO X31-130, ¹² P assimilable selon Olsen, méthode Auréo selon NF ISO 11263, ¹³ Potassium échangeable, méthode Auréo selon NF X31-108, ¹⁴ Magnésium échangeable, méthode Auréo selon NF X31-108, ¹⁵ Capacité hydrique, NF ISO 11274 (Auréo AgroScience, *pF 2,3<pF 2,5 en raison de l'hétérogénéité des substrats), ¹⁶ Biomasse microbienne, NF ISO 14240-2 mod., ¹⁷ Dosage des éléments après extraction à l'eau régale NF EN ISO 11885 et NF EN 13346 Méthode B (eurofins), ¹⁸ Dosage des éléments extractibles à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique NF X 31-121/NF ISO 22036.

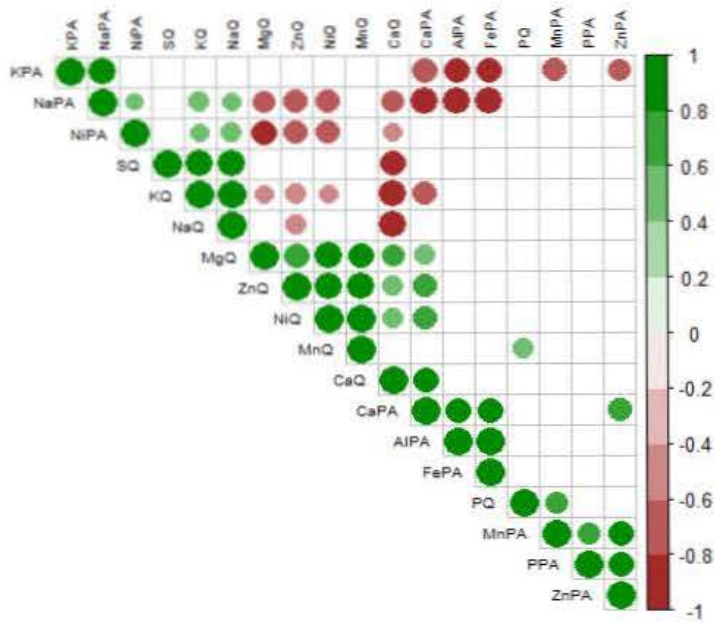
Annexe 61 _ Concentration en Zn et Ni dans les parties aériennes de *B. coddii* après 3 mois de culture sur les substrats élaborés et dans le témoin. MBP : mélange boue pure, MBCh : mélange boue chaulée, CBP : couche boue pure, Témoin : plante non installée dans bac. Les barres verticales indiquent les écarts-types. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman Keuls, $p < 0,05$, données transformées en log), $N=3$.



Annexe 62 _ Matrice de corrélations et analyse en composantes principales basées sur les paramètres mesurés sur les lixiviats. a) Matrice de corrélation sur les séries a, b, d, e, f, g, h, i, j de solutions de sol, coefficients de Spearman. b) Répartition des modalités dans le plan avec le détail des différents prélèvements (a, b, d, e, f, g, h, i, j : ordre chronologique des prélèvements) selon les composantes 2 et 3, respectivement 29 et 11%.



Annexe 63 _ Matrice de corrélation des quantités d'éléments cumulée dans les lixiviats (QX) au cours des 3 premiers mois d'expérimentation et des concentrations dosées dans les parties aériennes (XPA). Coefficients de Spearman.



Hyperaccumulation du nickel sur des substrats élaborés pour l'agromine

Au regard de l'amenuisement des ressources primaires et de l'augmentation de la production mondiale de déchets, le concept d'agromine propose de phytoextraire les métaux contenus dans les matériaux délaissés. La solution proposée dans ce concept s'inspire de la Nature (SBN) et des principes de l'agronomie et s'inscrit dans une démarche d'économie circulaire. Ainsi, les plantes hyperaccumulatrices (HA) sont capables de prélever les métaux à partir de leur système racinaire pour les stocker à de hautes concentrations dans leurs parties aériennes. Les enjeux de la thèse sont de valoriser des déchets ou matériaux secondaires par l'extraction des éléments d'intérêt qu'ils contiennent et d'identifier les plantes à même de pouvoir se développer sur ces milieux. L'objectif est de formuler à partir des matériaux choisis un substrat fonctionnel, c'est-à-dire capable de rendre un service de fourniture en nickel (Ni). Dans cette optique, le substrat doit permettre l'installation et le développement des HA pour parvenir au transfert des métaux vers les parties aériennes.

Les travaux s'intéressent à une boue de phosphatation acide essentiellement composée de Fe, Zn, P et Mn et contenant 0,5% de Ni. Des tests de germination et de croissance ont été effectués avec différents substrats élaborés à partir de cette boue assemblée avec un mélange terreux. Le substrat retenu est constitué de 10% de boue et 90% de terre (m/m). Sur celui-ci, l'HA *Alyssum murale* produit une biomasse supérieure comparée à un sol témoin (sol ultramafique au même pH et contenant la même quantité de Ni biodisponible), malgré des signes de toxicité pour les plantes. Un des verrous majeurs est la forte toxicité due à la présence de 6% de Zn dans la boue. Deux voies d'amélioration du substrat sont expérimentées : i) l'utilisation d'amendements et ii) la disposition des matériaux dans le profil. L'amendement le plus efficace est un biochar de bois ; il améliore le développement des plantes et ainsi la quantité de Ni phytoextraite. De plus, en modifiant la disposition des matériaux au sein du profil par une répartition en couches, la production de biomasse et la phytoextraction sont améliorées. Ce dispositif permet de lever la toxicité liée au Zn. Il apparaît essentiel de contrôler le pH du substrat lors d'une multi-contamination car l'immobilisation du métal varie selon l'élément.

L'association du génie pédologique et du génie végétal a permis de formuler un substrat fonctionnel pour la récupération d'éléments d'intérêt tel que le Ni. Ces travaux démontrent la possibilité de valoriser des sous-produits appelés classiquement « déchets » pour obtenir une plus-value, diminuant aussi leur charge métallique et faisant émerger une nouvelle source de métaux « d'origine végétale » obtenue par l'agromine.

Mots clés : hyperaccumulateurs, agromine, nickel, élaboration de substrats, phytodisponibilité, fertilité physico-chimique

Ni hyperaccumulation on elaborated substrate for agromining

In view of the depletion of primary resources and the increase in global waste production, the concept of agromining proposes phytoextracting the metals contained in abandoned materials. The solution proposed in this concept is inspired by Nature (NbS) and the principles of agronomy and is part of a circular economy. Thus, hyperaccumulator plants (HA) are able to collect metals from their root system and to store them at high concentrations in their aerial parts. The challenges of the thesis are to give value to waste or secondary materials by extracting the elements of interest that they contain and to identify the plants able to develop on these media. The objective is to formulate, from the chosen materials, a functional substrate, that is to say, capable of rendering a Ni supply service. From this point of view, the substrate must allow the installation and the development of the HAs in order to transfer the metals to the aerial parts.

The work focuses on an acid phosphating sludge essentially composed of Fe, Zn, P and Mn and containing 0.5% Ni. Germination and growth tests were carried out with different substrates prepared from this sludge assembled with a soil sample mixture. The retained substrate consists of 10% sludge and 90% soil (w/w). On the latter, HA *Alyssum murale* produces a higher biomass compared to a control soil (ultramafic soil at the same pH and containing the same amount of bioavailable Ni), despite signs of toxicity to plants. One of the major locks is the high toxicity due to the presence of 6% Zn in the sludge. Two ways of improving the substrate are tested: i) the use of amendments and ii) the arrangement of materials in the profile. The most efficient amendment is a wood biochar; it improves the development of plants and thus the amount of phytoextracted Ni. In addition, by modifying the layout of the materials within the profile by a layered distribution, biomass production and phytoextraction are improved. This device makes it possible to remove Zn-related toxicity. It is essential to control the pH of the substrate during multi-contamination because the immobilization of the metal varies according to the element.

The association of soil engineering and plant engineering has made it possible to formulate a functional substrate for the recovery of elements of interest such as Ni. This work demonstrates the possibility of upgrading by-products conventionally called "waste" in order to obtain a surplus value, also reducing their metallic charge and bringing about a new source of "plant-derived" metals obtained by agromining.

Key words: hyperaccumulator, agromining, nickel, elaboration of substrates, phytoavailability, physico-chemical fertility