



HAL
open science

Etude de deux modalités de phytomanagement testées sur un terrain de gestion de sédiments contaminés par des métaux et métalloïdes

Phonethip Phanthavongsa

► **To cite this version:**

Phonethip Phanthavongsa. Etude de deux modalités de phytomanagement testées sur un terrain de gestion de sédiments contaminés par des métaux et métalloïdes. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCD055 . tel-02862733

HAL Id: tel-02862733

<https://theses.hal.science/tel-02862733>

Submitted on 9 Jun 2020

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.

NNT :

THESE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée à l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS)

ECOLE DOCTORALE N° 554 ENVIRONNEMENTS – SANTE

Doctorat de Biologie des Populations et Ecologie

Par **Phonethip PHANTHAVONGSA**

Etude de deux modalités de phytomanagement testées sur un terrain de gestion de sédiments contaminés par des métaux et métalloïdes

Thèse présentée et soutenue à l'INERIS, le 09 avril 2018

Directeur / Co-directeur de thèse : **Dr. Emeric FREJAFON/ Pr. Michel CHALOT**

Encadrante : **Dr. Valérie BERT**

Composition du jury

M. MOTELICA-HEINO Stefan Mikael	Professeur, ISTO - CNRS - Université d'Orléans	Président
Mme LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa	Professeure, Université du Littoral Côte d'Opale	Rapporteur
M. MENCH Michel	Professeur, INRA - Université de Bordeaux	Rapporteur
Mme CADIERE Frédérique	Ingénieure, ADEME	Examinatrice
Mme DELPLANQUE Marion	Ingénieure, Voies navigables de France	Examinatrice
Mme BERT Valérie	Ingénieure de recherche, INERIS	Examinatrice
M. FREJAFON Emeric	Ingénieur de recherche, INERIS	Directeur de thèse
M. CHALOT Michel	Professeur, Université Bourgogne Franche-Comté	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Valérie BERT, mon encadrante de thèse à l'INERIS, pour sa confiance et son soutien tout au long de ces années. J'ai apprécié sa bienveillance en toutes circonstances, sa disponibilité, ses nombreux conseils autant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie également Michel CHALOT, mon co-directeur de thèse, avec qui j'ai été ravie de travailler. J'ai découvert un autre univers, celui du *métabarcoding*, au sein de son équipe au laboratoire Chrono-environnement à Montbéliard, dans lequel j'ai beaucoup appris.

Merci à Émeric FREJAFON, mon directeur de thèse à l'INERIS, qui a toujours été de bons conseils.

Je tiens aussi à remercier Rodolphe Gaucher, responsable de l'unité TPPD à l'INERIS, qui s'est beaucoup investi pour que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions, du début jusqu'à la fin.

J'ai eu l'opportunité de collaborer avec plusieurs équipes de l'INERIS qui m'ont ouvertes à d'autres compétences très enrichissantes : merci à Arnaud PAPIN et tous les techniciens de l'équipe RESA qui m'ont accueillie dans leur labo et formée à l'analyse des éléments chimiques par ICP et à l'analyse du carbone organique ; merci à Aurélien USTACHE, Pauline MOLINA, Vincent SUZZA (équipe COSM) qui m'ont accueillie dans leur labo à Aix-en-Provence, où j'ai appris à réaliser des extractions séquentielles, des tests de lixiviations, à modéliser la spéciation des métaux ; Nicolas Manier et Pascal Pandard (équipe EXES) de nous avoir permis de mener à bien les tests écotoxicologiques ; Nicolas Pucheux (équipe ETES) pour les études de risques environnementaux.

Un très grand merci à Fabrice RICHEZ, technicien de l'équipe, qui m'a été d'une aide précieuse que ce soit sur le terrain ou en laboratoire.

Merci à Nicole CHAUMONT, pour son aide et son implication en tant que stagiaire dans une partie de mes travaux de thèse (mesures sur le terrain, tests écotoxicologiques, analyses statistiques, etc.). Ce fut un plaisir de travailler avec une personne aussi enthousiaste ! Merci également aux autres stagiaires et thésards pour leur coup de main : Arnaud GRIGNET, Lisa CITERNE, Zoé BRETON ...

Je remercie mes collègues du Laboratoire Chrono-Environnement pour leur accueil très chaleureux et pour le temps qu'ils m'ont accordé à me former sur toute la partie *métabarcoding* : un grand merci à Julie FOULON, qui m'a non seulement formée sur les aspects techniques en laboratoire mais qui m'a aussi fourni un toit pour mes séjours à Montbéliard ; merci aussi à Alexis DURAND et Benoît VALOT pour la partie bio-informatique. Je n'oublie pas la contribution de Julien PARELLE, avec qui nous avons pu échanger sur l'écophysiologie végétale et grâce à qui nous avons pu initier quelques mesures de paramètres écophysiologiques chez les saules sur le terrain.

Je remercie Isabelle LAMY de m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire à l'INRA de Versailles-Grignon pour l'étude de la matière organique. Merci à Sébastien BREUIL de m'avoir formée et aidée tout au long des manips.

Encore merci à Isabelle LAMY pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et aussi à Jaco VANGRONSVELD, avec qui j'ai pu avoir des discussions très intéressantes sur mes travaux de recherche lors des différents comités.

Je remercie Anissa LOUNES – HADJ SAHRAOUI et Michel MENCH d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour leurs remarques très constructives. Je veux également remercier les autres membres du jury, Mikael MOTELICA-HEINO, Frédérique CADIERE et Marion DELPLANQUE pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

En dehors des collaborateurs, j'aimerais également remercier tous mes collègues de bureau et de couloir, de la même équipe ou non, que ce soit sur des questions scientifiques ou non. Je garde un très bon souvenir de tous les moments partagés autour d'un café, des gâteaux... même si ces moments sont devenus de plus en plus rares à la fin de ma thèse ...

Enfin, mes remerciements s'adressent à tous mes proches, famille et amis, pour leur soutien et leurs encouragements qui m'ont beaucoup aidée, notamment en fin de thèse (merci à Christophe et Margaux qui se sont dévoués pour la relecture du manuscrit !). Je ne remercierai jamais assez Christophe, qui m'a vivement lancée dans cette voie sans hésitation et qui a toujours été d'un soutien sans faille.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1. Pollution des sols et des sédiments par les métaux et métalloïdes	5
1.1.1. Les éléments potentiellement toxiques (EPT).....	5
1.1.2. Une contamination aux EPT liée aux activités humaines	6
1.1.3. Mobilité et biodisponibilité des EPT dans les sols	8
1.1.3.1. Impact des EPT sur la santé humaine	9
1.1.3.2. Impact des EPT sur les plantes	10
1.1.3.3. Impact des EPT sur les communautés microbiennes	11
1.2. Caractéristiques et gestion des sédiments de curage contaminés	13
1.2.1. Caractéristiques générales des sédiments.....	13
1.2.2. Curage des cours d'eau et gestion des sédiments	13
1.2.3. Caractérisation des sédiments avant curage	14
1.2.4. Les filières de gestion.....	15
1.2.5. Les terrains de gestion de sédiments	17
1.2.6. Impact de la mise en dépôt des sédiments sur la mobilité des EPT	18
1.3. Les phytotechnologies au service des sites et sols pollués	19
1.3.1. Les phytotechnologies	19
1.3.2. La phytostabilisation aidée	21
1.3.2.1. Sélection des plantes	21
1.3.2.2. Les espèces candidates	22
1.3.2.3. Les mécanismes d'immobilisation des EPT par les plantes.....	24
1.3.2.4. Les amendements	25
1.3.2.4.1. Immobilisation chimique des EPT	25
1.3.2.4.2. Immobilisation biologique des EPT par les mycorhizes	26
1.3.3. La valorisation économique de la biomasse : un enjeu majeur pour les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués	29
1.4. Application du phytomanagement à grande échelle : les projets BIOFILTREE, PHYTOSED 2 et DEMOPHYTO	31
1.4.1. Description du terrain de gestion de sédiments de curage (TD 107)	32
1.4.2. Le site A.....	32
1.4.2.1. Mise en place du dispositif expérimental	32
1.4.2.2. Les plantes sélectionnées : les cultivars de peupliers I-214 et Skado	33
1.4.2.3. L'amendement : les champignons mycorrhiziens	33
1.4.3. Le site B.....	35
1.4.3.1. Mise en place du dispositif expérimental	35
1.4.3.2. L'amendement minéral basique (Optiscor®)	37
1.4.3.3. Les plantes sélectionnées	38
CHAPITRE 2 : EFFETS DE L'INOCULATION DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS SUR LA MOBILITE D'EPT DANS LE SOL ET LEURS CONCENTRATIONS DANS LES FEUILLES DE PEUPLIERS	41
2.1. Article 1: Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites	43
2.1.1. Abstract.....	44
2.1.2. Introduction.....	45
2.1.3. Materials and methods.....	46
2.1.3.1. Site description.....	46
2.1.3.2. Sampling and analysis of soil and sediment.....	48
2.1.3.3. Sampling and analysis of poplar leaves.....	49

2.1.3.4. Statistical analyses.....	49
2.1.4. Results and discussion	49
2.1.4.1. Initial soil characterization.....	49
2.1.4.2. Evolution of pH and PTE mobility	54
2.1.4.3. Accumulation of major and trace elements in poplar leaves	54
2.1.4.4. Effects of mycorrhizal inoculation	57
2.1.4.5. Influence of site conditions on PTE accumulation in poplar leaves	59
2.1.4.6. Lessons from the field and recommendations.....	60
2.1.5. Conclusion.....	62

CHAPITRE 3 : EVALUATION DE L’EFFICACITE DE DEUX MODALITES DE PHYTOMANAGEMENT TESTEES A GRANDE ECHELLE ET SUR LE LONG TERME..... 69

<i>3.1. Article 2 : Long-term assessment of two phytomanagement options in two field trials at a metal-contaminated dredged sediment disposal site</i>	<i>73</i>
3.1.1. Abstract.....	74
3.1.2. Introduction.....	75
3.1.3. Materials and methods.....	77
3.1.3.1. Site description.....	77
3.1.3.2. Experimental design	78
3.1.3.3. Soil sampling	79
3.1.3.4. Soil analysis.....	79
3.1.3.5. Plant cover and diversity.....	80
3.1.3.6. Plant sampling	80
3.1.3.7. Plant analysis.....	81
3.1.3.8. Trees survival and growth.....	81
3.1.3.9. Environmental risk assessment	81
3.1.3.10. Statistical analysis	82
3.1.4. Results and discussion	82
3.1.4.1. Effects of phytomanagement on PTE availability in soil	82
3.1.4.2. Suitability of <i>D. cespitosa</i> for phytomanagement (site B)	84
3.1.4.3. Plant diversity in poplar and willow stands.....	85
3.1.4.4. Monitoring of the invasive species <i>F. japonica</i>	88
3.1.4.5. Are colonizing plants suitable for phytomanagement?	89
3.1.4.6. Growth and metal accumulation of poplars and willows	91
3.1.4.7. Environmental risk assessment	95
3.1.4.8. Lessons of the field and recommendations	96

CHAPITRE 4 : IMPACT DU PHYTOMANAGEMENT SUR LA MOBILITE D’EPT DANS LES SOLS ET SUR LEUR PHYTOTOXICITE..... 105

<i>4.1. Article 3: Metal mobility, availability and phytotoxicity in dredged sediment from a disposal site under different phytomanagement options</i>	<i>107</i>
4.1.1. Abstract.....	108
4.1.2. Introduction.....	109
4.1.3. Materials and methods.....	110
4.1.3.1. Site description.....	110
4.1.3.2. Soil sampling	110
4.1.3.3. Soil characterization	111
4.1.3.3.1. Physicochemical properties.....	111
4.1.3.3.2. pH-dependent leaching test (pH _{stat})	112
4.1.3.4. Chronic toxicity test	112
4.1.3.4.1. Growth conditions	112
4.1.3.4.2. Measurements	113
4.1.3.5. Data analysis.....	113
4.1.4. Results and discussion	114
4.1.4.1. Soil physicochemical properties	114
4.1.4.2. Geochemical distribution of PTEs	116

4.1.4.3.	Potential leachability of PTEs.....	117
4.1.4.4.	Plant responses to phytomanaged soils	119
4.1.4.4.1.	Seedling emergence and shoot dry biomass	119
4.1.4.4.2.	Reproductive development	120
4.1.4.4.3.	Shoot PTEs concentrations.....	121
4.1.5.	Conclusion	123
4.2.	<i>Résultats complémentaires : modélisation de la spéciation du Cd, Cu, Pb et Zn dans les sols</i>	129
4.2.1.	Modélisation de la spéciation des métaux via le code géochimique ORCHESTRA	129
4.2.2.	Acquisition des données d'entrée	130
4.2.3.	Résultats.....	133
CHAPITRE 5 : IMPACT DU PHYTOMANAGEMENT SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES AUX RACINES LIGNEUSES ET A LA RHIZOSPHERE.....		141
5.1.	<i>Article 4 : Microbial community diversity and composition in phytomanaged soils at field scale</i>	143
5.1.1.	Abstract.....	143
5.1.2.	Introduction.....	144
5.1.3.	Material and methods	145
5.1.3.1.	Study sites.....	145
5.1.3.2.	Sampling procedure.....	147
5.1.3.3.	DNA isolation and amplification	147
5.1.3.4.	Data analysis.....	148
5.1.3.5.	Statistical analysis.....	148
5.1.4.	Results and discussion	149
5.1.4.1.	Microbial community richness and diversity	149
5.1.4.2.	Composition of the microbial communities	153
5.1.5.	Conclusion	157
DISCUSSION GENERALE.....		161
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		177
ANNEXES.....		195

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1. 1 : Teneurs moyennes en EPT (mg/kg MS) dans la croûte terrestre et gammes de valeurs couramment observées dans les sols « ordinaires » en France. Les seuils d'investigation proposés pour les sols sont également indiqués.	5
Tableau 1. 2 : Valeurs du seuil S1 (mg/kg MS) fixés par l'arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux.	15
Tableau 1. 3 : Exemples de filières de gestion des sédiments à terre envisageables en fonction de leur caractère inerte, non dangereux non inerte ou dangereux (Voies navigables de France, 2014).	16
Tableau 1. 4 : Exemples d'essais au champ de phytostabilisation aidée.	23
Tableau 1. 5 : Concentrations totales en EPT (mg/kg MS) mesurées dans les sédiments du TD 107 (0-50cm). Les concentrations en EPT d'un sol local et les valeurs seuil S1 sont également indiquées (AIRELE, 2010).	32
Tableau 1. 6 : Composition d'un échantillon d'Optiscor® (Proportions des phases calculées par la méthode Rietveld).	37

Chapitre 2

Table 2. 1 : Physico-chemical characteristics of composite topsoil samples collected in both sites at the time of the plantation (2011). P _L and F _L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P _H and F _H refer to the most contaminated areas of the two sites.	51
Table 2. 2 : Total concentrations of trace and major elements of composite topsoil samples from the two sites (mg kg ⁻¹ DW), Pierrelaye and Fresnes at the time of the plantation (2011). Local usual agricultural concentrations (UAC; Lamy et al. (2006)) and threshold values used to assess the quality of dredged canal sediment (S1; MEDD (2006)) are indicated for comparison. P _L and F _L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P _H and F _H refer to the most contaminated areas of the two sites. P33 and F33 refer to unplanted plots.	52
Table 2. 3 : Ca(NO ₃) ₂ -extractable PTE concentrations of topsoil samples from the two sites (mg kg ⁻¹ DW), Pierrelaye and Fresnes. P _L and F _L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P _H and F _H refer to the most contaminated areas of the two sites. Soil samples were first collected in 2011 at the time of plantation (composites made of 10 topsoil samples), then in 2012 (means ± sd; n = 10) and 2013 (means ± sd; n = 10) at the Fresnes and Pierrelaye sites, respectively. "-ni" refers to non-inoculated clones; "-i" refers to inoculated clones. Different letters indicate significant differences between the treatments (with or without inoculation) for each site and each clone, for 2012 and 2013 data (p < 0.05). No letter indicates no difference (for 2012 and 2013 data).	53
Table 2. 4 : Bioconcentration factors of Cd and Zn based on their foliar concentrations in poplar leaves (mg kg ⁻¹ DW) and total concentrations in soil (mg kg ⁻¹ DW).	60
Table S2. 1 : Correlation between the supplementary variables and the two principal components Dim1 (correlated with the active variables Cd, Zn and Cu) and Dim2 (correlated with the active variable Pb). The terms ".tot" and ".extr" refer to total and extractable PTE concentrations, respectively.	63

Chapitre 3

Table 3. 1 : Main physicochemical properties of the soil samples before planting and sowing (2011) at 0-20 cm depth. Threshold values used to assess the quality of dredged canal sediment (S1; MEDD (2006)) and local values measured in an uncontaminated area near the field sites are indicated for comparison. Values are means \pm SD. 78

Table 3. 2 : pH and 0.01 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in topsoil samples at 20 cm depth ($\mu\text{g kg}^{-1}$ DW) collected in the rhizosphere of poplars (site A), willows and *D. cespitosa* (site B) before (2011) and after soil treatment. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. Values are means \pm SD. Different letters indicate significant differences between the treatments for each site and each year. No letter indicates no difference ($\alpha = 0.05$). 83

Table 3. 3 : List of plant species identified at the sites A and B in June 2015. Values are mean relative abundance (%). Diversity indices (H': Shannon index; D: Simpson's index; J: Pielou's measure of species evenness) are indicated for each treatment modality (A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows). "L" refers to plants life cycle: A: annual; B: biennial; P: perennial. 87

Table 3. 4 : Foliar nutrients concentrations of poplars and willows. Values are means \pm SD. The ratios show the interactions between the micronutrients Fe, Mn and Zn in tree leaves. "CCI" stands for Chlorophyll Content Index; it indicates the amount of chlorophyll in leaves. Baseline ranges are indicated for comparison (Ågren and Weih, 2012; Martín-García et al., 2012; Vanbeveren et al., 2016; Vandecasteele et al., 2004). For each clone, different letters between treatments indicate significant differences. No letter indicates no difference ($\alpha = 0.05$). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. 93

Table 3. 5 : Risk indices (R) related to total Cd and Zn in soils and plants, calculated as the PEC/PNEC ratio (method 1) and by the software program TerraSys^{MC} (method 2). A-I: soil planted with inoculated poplars; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. Risk indices in bold ($R > 1$) indicate potential adverse effects on the studied system. 96

Table S3. 1 : Parameters used in the software program TerraSys^{MC} for computing risk indices regarding the animals observed at the field sites. "NOAEL" stands for No Observable Adverse Effect Level. 98

Chapitre 4

Table 4. 1 : Physicochemical characteristics of soils (0-20 cm) under different phytomanagement practices. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; LUFA: control soil. 114

Table 4. 2 : Total element concentrations (in DW) in soils (0-20 cm) under different phytomanagement practices. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows). LUFA: control soil for the chronic toxicity tests. Values are means \pm SD (n=3). Different letters indicate significant differences between the treatments ($\alpha = 0.05$). 115

Table 4. 3 : Necrosis intensity observed after 34 days. The symbol "-" indicates no necrosis; "+" and "++" indicate the presence of a few or several necroses on the leaves, respectively). 120

Table 4. 4 : Mean number of spikelets (*A. sativa*) and pods (*B. rapa*). The mean number of ripe pods is expressed as a percentage of total pods. LUFA: control soil; A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated

amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. Different letters indicate significant differences between the treatments ($n= 16$, $\alpha= 0.05$).121

Table 4. 5 : Metal shoot concentrations (mg kg^{-1} DW) in *A. sativa* (d54) and *B. rapa* (d40). LUFA: control soil; A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. Values are means \pm SD ($n= 4$). Different letters indicate significant differences between the treatments among each species ($\alpha= 0.05$).123

Table S4. 1 : Seedling emergence rates of *A. sativa* and *B. rapa* expressed as a percentage of the mean emergence of control plants (LUFA). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. No letter indicates no difference between the treatments ($n= 4$; $\alpha= 0.05$).124

Table S4. 2 : Concentrations of PTE (mg kg^{-1} DW) in different soil fractions (0-20 cm) under different phytomanagement practices. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows). Values are means \pm SD ($n=3$).124

Table S4. 3 : Significant correlations between soil $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable PTEs concentrations and plant responses at d 40 and d 54, for *B. rapa* and *A. sativa*, respectively ($\alpha= 0.01$).125

Table S4. 4 : Significant correlations between shoot metal concentrations and plant responses at d 40 and d 54, for *B. rapa* and *A. sativa*, respectively ($\alpha= 0.01$).125

Tableau 4. 1 : Données d'entrée pour la modélisation de la spéciation des EPT dans les échantillons de sol131

Tableau 4. 2 : Minéraux sélectionnés pour la modélisation de la spéciation des métaux avec le logiciel LeachXS™ pour chaque traitement (A-NI ; A-I) du site A132

Tableau 4. 3 : Minéraux sélectionnés pour la modélisation de la spéciation des métaux avec le logiciel Leach XS pour chaque traitement (B-NADc-B-ADc-M) du site B133

Tableau 4. 4 : Valeurs des paramètres d'entrée (en mg/kg MS) pour la modélisation de la spéciation des EPT. A-NI : sol planté avec des peupliers Skado non inoculés ; A-I : sol planté avec des peupliers Skado inoculés ; B-NADc : sol non amendé planté avec des saules Tordis, en présence de *D. cespitosa* ; B-ADc-H : sol amendé planté avec des saules Tordis, en présence de *D. cespitosa*.135

Chapitre 5

Table 5. 1 : Description of the phytomanagement options.145

Table 5. 2 : Soil physicochemical properties (0-20 cm) before the establishment of the sites (2011).146

Table 5. 3 : Total and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable concentrations of PTEs in topsoil samples (0-20 cm) collected at the sites A and B before site preparation (2011).147

Table 5. 4 : Number of raw and effective sequences obtained from 36 DNA root samples and 45 DNA soil samples. Values are means \pm SD.149

Table 5. 5 : Richness and diversity indices of microbial communities based on the number of OTUs. Richness was calculated using the number of OTUs and Chao1 estimators. Values are means \pm SD. Different letters indicate significant differences between the treatments in roots or soil ($p< 0.05$).152

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1 : Sources et voies de transfert possibles des EPT dans l'environnement.	7
Figure 1.2 : Représentation schématique de la mobilité des EPT en fonction du pH (Kabata-Pendias, 2010).....	9
Figure 1.3 : Proportions relatives de séquences fongiques assignées aux groupes fonctionnels majeurs. Les abondances des différents groupes d'OTU obtenues à partir des échantillons de sol recueillis sous le cultivar de peuplier Skado ou sur les sols non plantés des sites expérimentaux de Leforest et de Pierrelaye ont été fixées à 100 % et les OTU ont été classées parmi les ectomycorhizes (ECM), mycorhizes à arbuscules (AM), endophytes, saprotrophes ou biotrophes. D'après Foulon et al. (2016b).	12
Figure 1.4 : Protocole de caractérisation des sédiments à draguer.	15
Figure 1.5 : Terrain de gestion de sédiments (Voies navigables de France, 2014).	17
Figure 1.6 : Schéma représentant le principe de la phytostabilisation (à gauche) et de la phytoextraction (à droite). 20	
Figure 1.7 : Ectomycorhizes (à gauche) et mycorhizes à arbuscules (à droite) représentées sur une coupe transversale de racine, d'après Selosse and Le Tacon (1998).	27
Figure 1.8 : Vue aérienne des dispositifs expérimentaux (site A et B) localisés à Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France).	31
Figure 1.9 : Schéma et photos du dispositif expérimental du site A.	34
Figure 1.10 : Schéma et photos du dispositif expérimental mis en place sur le site B.	36

Chapitre 2

Figure 2.1 : Location of the two sites. b) Aerial view of the Pierrelaye site. c) Aerial view of the Fresnes site. d) Experimental designs of the field trials which indicate the sampled plots in yellow boxes. On the left, the experimental design of the Pierrelaye site. On the right, the experimental design of the Fresnes site. P _L and F _L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P _H and F _H refer to the most contaminated areas of the two sites.	47
Figure 2.2 : a) Graph of active (black solid arrows; leaf metal contents) and supplementary variables (blue dotted arrows; soil physico-chemical parameters). b) Graph of individuals corresponding to inoculated ("-i") or non-inoculated ("-ni") Skado and I-214, of Pierrelaye (P) and Fresnes (F) sites.	55
Figure 2.3 : Foliar concentrations of Cd, Zn, Cu, Pb and Cr in Skado and I-214 clones. P _L and F _L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P _H and F _H refer to the most contaminated areas of the two sites. Data are means ± SE. Different letters indicate significant differences between the treatments for each site among each clone (Kruskal-Wallis test, p < 0.05). No letter indicates no difference. Data below the LQ are not represented (LQ = 1–2 mg kg ⁻¹ for Cr).	56
Figure 2.4 : Foliar concentrations of macronutrients P, K, Ca, Mg, Fe and Mn in Skado and I-214 clones. Data are means ± SE. Different letters indicate significant differences between the treatments for each site, among each clone (Kruskal-Wallis test, p < 0.05).	57
Figure S2.1 : Evolution of soil pH in the 8 plots at both sites, Fresnes and Pierrelaye. Values are means ± SD.	63

Chapitre 3

Figure 3. 1 : Location of the two experimental sites A and B. On the right, poplar (top) and willow (bottom) plantations in June 2016. 77

Figure 3. 2 : Concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in the shoots of *D. cespitosa* and plant colonists collected at the site B in June 2013 and 2014, grouped by treatment (B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows). Values are means \pm SE. For each PTE, the red dashed line indicates mean baseline concentrations in herbaceous plants (Kabata-Pendias, 2010). 88

Figure 3. 3 : Concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in the shoots of *U. dioïca* collected at the sites A (under Skado poplars) and B (under Tordis willows) in June 2016, under the different treatments. Values are means \pm SE (n=5). For each metal, the red dashed line indicates shoot baseline concentration for *U. dioïca* plants grown in uncontaminated soils (Bert et al., 2012b). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. 90

Figure 3. 4 : Survival rates (A), mean height increment (B) and mean diameter increment (C) of the willow clones Tordis and Inger planted in non-amended plots without *D. cespitosa* (B-NA), in non-amended plots with *D. cespitosa* (B-NADc) and amended plots with *D. cespitosa* (B-ADc) over time. 91

Figure 3. 5 : Foliar Cd, Pb, Cu and Zn concentrations of poplars (I-214, Skado) and willows (Inger, Tordis) in June 2015. Values are means \pm SE. Significant differences between the treatments for each clone are indicated by different letters ($p < 0.05$). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. 94

Figure S3. 1 : Conceptual model representing pathways and interactions between the environmental compartments (soil, air, plants and animals) considered in the software program TerraSys^{MC}. 98

Chapitre 4

Figure 4. 1 : Distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in soils under different phytomanagement practices at sites A and B (mean values expressed in mg kg^{-1} , n=3). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. 117

Figure 4. 2 : Leaching of metals and DOC as a function of pH and treatment. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. 118

Figure 4. 3 : Shoot dry biomass of *A. sativa* (white bars) and *B. rapa* (grey bars), measured at day 14 (A and C), at day 54 (B) and day 40 (D). Values are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between the treatments (n =4; $\alpha = 0.05$). LUFA: control soil; A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. 120

Figure 4. 4 : Relation entre les données expérimentales des tests de lixiviation et d'extraction avec la modélisation de la spéciation des EPT. 129

Figure 4. 5 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Cd en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Cd en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associées au COD. 136

Figure 4. 6 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Cu en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Cu en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associées au COD.....137

Figure 4. 7 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Pb en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Pb en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associées au COD.....138

Figure 4. 8 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Zn en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Zn en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associées au COD.....139

Chapitre 5

Figure 5. 1 : Rarefaction curves for bacterial (A) and fungal (B) OTUs.150

Figure 5. 2 : Relative abundance of bacterial (A) and fungal phyla (B) identified in soils and roots of poplars and willows under different phytomanagement options. See Table 5. 1 for the abbreviations. “UNT” refers to the untreated and unplanted soil.154

Figure 5. 3 : Relative abundance of bacterial classes identified in soils and roots of poplars and willows under different phytomanagement options. See Table 5. 1 for the abbreviations. “UNT” refers to the untreated and unplanted soil. ..155

Figure 5. 4 : Relative abundance of fungal classes identified in soils and roots of poplars and willows under different phytomanagement options. See Table 5. 1 for the abbreviations. “UNT” refers to the untreated and unplanted soil. ..156

ABREVIATIONS

ADEME	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Acide Fulvique
AH	Acide Humique
AMF	<i>Arbuscular Mycorrhizal Fungi</i>
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i>
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
BCF	<i>BioConcentration Factor</i>
BRGM	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
CCI	<i>Chlorophyll Content Index</i>
CEC	Capacité d'Echange Cationique / <i>Cation Exchange Capacity</i>
CEM	Champignons EctoMycorhiziens
CMA	Champignons Mycorhiziens à Arbuscules
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i>
DW	<i>Dry Weight</i>
ECM	Ectomycorhizes
EPT	Elément Potentiellement Toxique
ERA	<i>Environmental Risk Assessment</i>
ERE	Evaluation des Risques Environnementaux
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FA	<i>Fulvic Acid</i>
FBC	Facteur de BioConcentration
FT	Facteur de Translocation
FW	<i>Fresh Weight</i>
HA	<i>Humic Acid</i>
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
INERIS	Institut National de l'Environnement industriel et des RISques
IS	Indice de Saturation
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LQ	Limite de Quantification / <i>Limit of Quantification</i>
MA	Mycorhizes à Arbuscules
MEED	Ministère de l'Écologie et du Développement Durable
MEEM	Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer
MEDDE	Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie
MF	Matière Fraîche

MS	Matière Sèche
MO	Matière Organique
MOD	Matière Organique Dissoute
MOP	Matière Organique Particulaire
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OM	<i>Organic Matter</i>
ORCHESTRA	<i>Objects Representing CHEmical Speciation and TRANsport models</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCB	PolyChloroBiphényles
PEC	<i>Predicted Environmental Concentration</i>
PNEC	<i>Predicted No Effect Concentration</i>
PTE	<i>Potentially Toxic Element</i>
R	Quotient de risque / <i>Risk index</i>
SDRTD	Schéma Directeur Régional des Terrains de Dépôt
SH	Substance Humique
SRC	<i>Short Rotation Coppice</i>
TBS	<i>Thomas Basic Slag</i>
TCR	Taillis à Courte Rotation
TTCR	Taillis à Très Courte Rotation
VNF	Voies Navigables de France
VSRC	<i>Very Short Rotation Coppice</i>

INTRODUCTION

En France, près de 300 000 sites sont répertoriés comme étant pollués ou potentiellement pollués ([BASIAS, 2017](#)). La gestion des sites et sols pollués se base sur la gestion des risques en fonction de l'usage, défini suivant les techniques disponibles et les coûts économiques associés. La méthodologie de gestion des sites et sols pollués a été actualisée en 2017 afin de prendre en considération les retours d'expérience, les évolutions réglementaires et les pratiques. Elle encourage l'utilisation des meilleures technologies disponibles, prend en compte les outils de diagnostic devenus opérationnels et les nouvelles méthodes issues de la recherche ([MEEM, 2017](#)). En 2017, ce sont 6 590 sites qui appellent à des mesures de gestion pour prévenir les risques sanitaires et environnementaux, les principaux polluants étant les éléments métalliques (37%) et les hydrocarbures (14 %) ([BASOL, 2017](#)). Les origines sont multiples : déchets industriels (métallurgie, tannerie, papeterie), utilisation intensive de pesticides, fertilisants, rejets urbains, etc. Dans la région Hauts-de-France, de nombreux polluants se sont ainsi retrouvés dans les fleuves par rejets directs ou ruissellement, provoquant la contamination des sédiments. Suite aux opérations de curage indispensables à l'entretien des voies d'eau, des volumes importants de sédiments pollués ont été générés. Le traitement des sédiments chargés en métaux et métalloïdes potentiellement toxiques (regroupés sous les termes « éléments potentiellement toxiques » ou EPT dans ce manuscrit) est difficile car ces éléments ne sont pas dégradables, les procédés existant pour extraire ou stabiliser les polluants (extraction par lessivage, oxydation/réduction, solidification, etc.) sont lourds à mettre en œuvre et les coûts sont élevés. De ce fait, la mise en dépôt des sédiments pollués reste le principal mode de gestion ([Voies navigables de France, 2014](#)).

Sur le territoire du Nord - Pas-de-Calais, la gestion et l'aménagement des terrains de gestion de sédiments s'appuient sur un Schéma Directeur Régional des Terrains de Dépôt (SDRTD) élaboré par Voies navigables de France (VNF) selon une démarche de développement durable (Voies navigables de France, 2009 ; mis à jour en 2014). Cet engagement prévoit notamment la réduction des impacts environnementaux et la recherche de nouvelles voies de valorisation pour les différents terrains de gestion existants. Selon la qualité des sédiments, certains terrains de gestion ont par exemple été reconvertis en espaces naturels, en parcs de loisirs ou en terrain agricole. Pour garantir la réduction des risques, l'utilisation des phytotechnologies sur certains terrains de gestion de sédiments pourrait être un mode de gestion pertinent ([Bert et al., 2009](#); [Huguet et al., 2015](#); [Panfili et al., 2005](#)) sur le plan technique, économique et environnemental. Parmi les différentes techniques développées au cours des dernières décennies, la phytostabilisation aidée est basée sur l'utilisation de plantes et

d'amendements capables d'immobiliser ou de stabiliser les polluants dans les sols et sédiments ([Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). En valorisant la biomasse produite sur ces terrains pollués dans des filières non alimentaires, ce mode de gestion permettrait de générer des revenus économiques. Cette approche qui allie phytotechnologies et valorisation de la biomasse est désignée sous le terme de phytomanagement ([Evangelou and Deram, 2014](#)). En 2010, le recours aux phytotechnologies par les gestionnaires des sites et sols pollués était encore rare par manque de reculs opérationnels ([Cundy et al., 2013](#); [Ernst & Young, 2012](#)). Néanmoins, plusieurs programmes de recherche en France et en Europe s'appuyant sur des essais en laboratoire et au champ permettent aujourd'hui de mieux cerner les facteurs favorables à la mise en place des phytotechnologies ainsi que leurs limites ([Kidd et al., 2015](#); [Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Le concept de phytomanagement se concrétise progressivement grâce aux suivis des essais sur le long terme ([Kumpiene et al., 2014](#); [Quintela-Sabarís et al., 2017](#)) et l'étude des débouchés possibles pour les biomasses produites ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Delplanque et al., 2013](#)).

Pour alimenter les retours d'expériences et contribuer significativement à la compréhension des mécanismes de mobilité et de transfert d'EPT dans le système sol-plante-microorganismes en conditions réelles, deux essais de phytostabilisation aidée couplée à la production de bois énergie ont été mis en place en 2011 à l'échelle du champ par l'INERIS et le laboratoire Chrono-Environnement en collaboration avec VNF sur des terrains de gestion de sédiments de curage contaminés par des métaux à Fresnes-sur-Escaut (région Hauts-de-France). Ces essais, mis en place dans le cadre des projets BIOFILTREE (2011-2014) et PHYTOSED 2 (2011-2014), avaient pour objectif d'évaluer l'efficacité des traitements utilisés sur le long terme mais aussi la viabilité économique de telles approches.

Mon projet de thèse, cofinancé par l'ADEME et VNF dans le cadre du projet DEMOPHYTO (2014-2017), s'inscrit dans la continuité des projets BIOFILTREE et PHYTOSED 2 et repose sur les sites phytomanagés existants. Il vise à mieux comprendre les mécanismes de mobilité des EPT dans le sol ainsi que leur transfert dans les parties aériennes des plantes *in situ*. Pour évaluer l'efficacité des traitements testés, ces travaux s'articulent donc autour de deux axes principaux :

1. Dynamique et performance des espèces sélectionnées, colonisatrices et invasives
2. Effets des amendements sur la mobilité des EPT dans le sol, sur l'accumulation des EPT dans les parties aériennes des plantes et sur la diversité microbienne des sols.

Le manuscrit est organisé en 5 chapitres :

- Le **chapitre 1** est une synthèse bibliographique qui porte sur la contamination des sols et des sédiments par les métaux et métalloïdes ainsi que sur les moyens mis en œuvre pour limiter les impacts sanitaires et environnementaux liés aux sédiments de curage contaminés. Cette partie aborde en particulier la gestion à terre des sédiments de curage par la phytostabilisation aidée et des différents facteurs pouvant favoriser l'immobilisation des métaux. Une présentation des deux essais au champ étudiés dans le cadre de la thèse clôture cette première partie.
- Le **chapitre 2** présente des résultats obtenus concernant deux sites phytomanagés mis en place en 2011 à Fresnes-sur-Escaut (59) et Pierrelaye (95) dans le cadre du projet BIOFILTEREE. L'objectif de cette étude, publiée dans la revue *Environmental and Experimental Botany* en septembre 2017, était de déterminer les effets d'un amendement biologique (inoculum mycorhizien) sur la biodisponibilité des EPT dans le sol et leur transfert dans les feuilles de peupliers après 2 ou 3 saisons de croissance. Différentes analyses chimiques ont été effectuées pour caractériser les paramètres physico-chimiques des sols (mesures de pH, des concentrations totales et extractibles en EPT, etc.) et connaître les concentrations en EPT dans les feuilles des peupliers.
- Le **chapitre 3** aborde l'efficacité du phytomanagement, appliquée à deux terrains de gestion de sédiments phytomanagés situés à Fresnes-sur-Escaut (59). Plusieurs méthodes ont été utilisées pour appréhender la performance des plantes et des amendements ; elles s'appuient sur des analyses chimiques pour déterminer les concentrations en EPT dans les sols et dans les plantes, des analyses floristiques et des analyses de risques environnementaux. Une attention particulière a été portée sur certaines espèces végétales colonisatrices et invasives qui se sont développées sur ces sites car elles peuvent représenter un atout ou au contraire un frein pour le succès du phytomanagement en termes de risques pour l'environnement.
- Le **chapitre 4** permet d'approfondir les résultats exposés dans les chapitres 2 et 3. Les travaux présentés dans cette partie ont pour objectif d'identifier les principaux facteurs pouvant influencer la mobilité des EPT dans les sols amendés ou non à travers des analyses chimiques (tests de lixiviation, extractions sélectives et séquentielles). En complément, la phytotoxicité de ces sols a été évaluée à l'aide d'un test de toxicité chronique sur deux espèces végétales en conditions contrôlées.
- Le **chapitre 5** est consacré à l'exploration des communautés bactériennes et fongiques contenues dans les racines et la rhizosphère des cultures ligneuses. Par l'utilisation d'une technique innovante de séquençage à haut débit de l'ADN microbien (Miseq, Illumina), cette étude a pour objectif de mesurer l'impact des différentes modalités de phytomanagement sur la richesse, la diversité et la composition des communautés microbiennes.

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

1.1. Pollution des sols et des sédiments par les métaux et métalloïdes

1.1.1. Les éléments potentiellement toxiques (EPT)

En France et plus largement en Europe, la plupart des sites pollués ou potentiellement pollués présentent des concentrations élevées en éléments inorganiques ([BASOL, 2017](#); [Liedekerke et al., 2014](#)). Il s'agit principalement de métaux (tels que Cd, Cu, Pb, Zn) et de métalloïdes (As, Sb). La plupart des éléments concernés sont naturellement présents dans tous les compartiments de l'environnement avec des teneurs habituellement inférieures à 1000 mg/kg dans la croûte terrestre ([Kabata-Pendias, 2010](#)). Le fond pédogéochimique (concentrations naturelles) varie d'un sol à l'autre car il dépend de la composition de la roche-mère ainsi que des évolutions géologiques et pédologiques ([Baize, 2000b](#)). La détermination du fond pédogéochimique est importante pour estimer les apports et les contaminations dues aux activités anthropiques. En effet, certains milieux peuvent présenter des teneurs naturellement élevées en EPT. Les teneurs moyennes de quelques éléments dans la croûte terrestre et dans les sols français sont reportées dans le **Tableau 1. 1**. À des concentrations supérieures aux concentrations naturelles, ces éléments peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine mais aussi sur le fonctionnement des écosystèmes ([Kabata-Pendias, 2010](#)).

Tableau 1. 1 : Teneurs moyennes en EPT (mg/kg MS) dans la croûte terrestre et gammes de valeurs couramment observées dans les sols « ordinaires » en France. Les seuils d'investigation proposés pour les sols sont également indiqués.

Élément	Croûte terrestre ^(a)	Sols « ordinaires » ^(b)	Seuil d'investigation pour les sols ^(b)
As	1,8	1 - 25	-
Cd	0,1	0,05 - 0,45	0,70
Cr	100	10 - 90	100
Cu	55	2 - 20	35
Hg	0,07	0,02 - 0,10	-
Ni	20	2 - 60	70
Pb	15	9 - 50	60
Zn	70	10 - 100	150

^(a) Kabata-Pendias (2010)

^(b) Baize (2000b)

Les termes « métaux lourds » ou « éléments traces », souvent utilisés dans la littérature pour désigner ces éléments, prêtent à confusion car ils englobent des éléments ne répondant pas à leurs définitions. Selon les auteurs, un métal lourd peut être caractérisé par une masse volumique supérieure à 3,5, 5 ou 7 g/cm³ et une masse atomique élevée ([Hodson, 2004](#)). Les éléments As et Al sont souvent considérés comme des métaux lourds alors que l'As n'est pas un métal mais un métalloïde et Al a une masse volumique inférieure à 3,5 g/cm³. De plus, le terme « élément trace » n'est pas approprié dans un contexte de contamination puisque les éléments ne sont plus présents à l'état de traces. En accord avec les recommandations actuelles ([Pourret and Bollinger, 2018](#)), les contaminants seront désignés comme des « **éléments potentiellement toxiques** » (EPT) dans ce manuscrit. Au total, neuf EPT font l'objet d'une surveillance systématique dans les milieux contaminés pour réaliser des analyses de risques : As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb et Zn ([INERIS, 2006](#)).

Certains EPT interviennent dans des processus biologiques tels que Cu, Cr, Ni et Zn en tant qu'oligo-éléments tandis que d'autres n'ont pas de fonction biologique bien définie (As, Cd, Pb, Hg) ([Hooda, 2010](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Les éléments essentiels à la vie forment des métalloprotéines en tant que cofacteurs avec des enzymes pour assurer des fonctions structurales, catalytiques, de régulation (homéostasie) ou de transport ([Waldron et al., 2009](#)). Le Zn, sous la forme d'ions Zn²⁺, peut par exemple avoir un rôle catalytique et structurel pour assurer de nombreuses fonctions dont la reconnaissance de l'ADN ([Laity et al., 2001](#)). La complexation du Cu avec les oxydoréductases catalyse les réactions d'oxydoréduction. Chez les plantes, le Cu est notamment impliqué dans la photosynthèse et les phénomènes de détoxication ([Garcia et al., 2014](#); [Waldron et al., 2009](#)). Le Ni est utilisé dans des proportions moindre que le Zn et Cu par certaines enzymes (superoxyde dismutase, uréase) mais joue un rôle important dans le métabolisme des plantes et microorganismes ([Boer et al., 2014](#)).

1.1.2. Une contamination aux EPT liée aux activités humaines

Les EPT ont des propriétés physiques remarquables qui ont permis la fabrication de nombreux traitements, outils et infrastructures. De manière générale, ce sont des éléments malléables, très résistants selon les alliages ainsi que de bons conducteurs électriques et thermiques. Cependant, l'exploitation des métaux et métalloïdes a provoqué une forte contamination de l'environnement ([Hooda, 2010](#); [Järup, 2003](#); [Liedekerke et al., 2014](#); [Schneider, 2001](#)). Les voies de transfert possibles des EPT dans les différents compartiments de l'environnement sont représentées dans la **Figure 1. 1**.

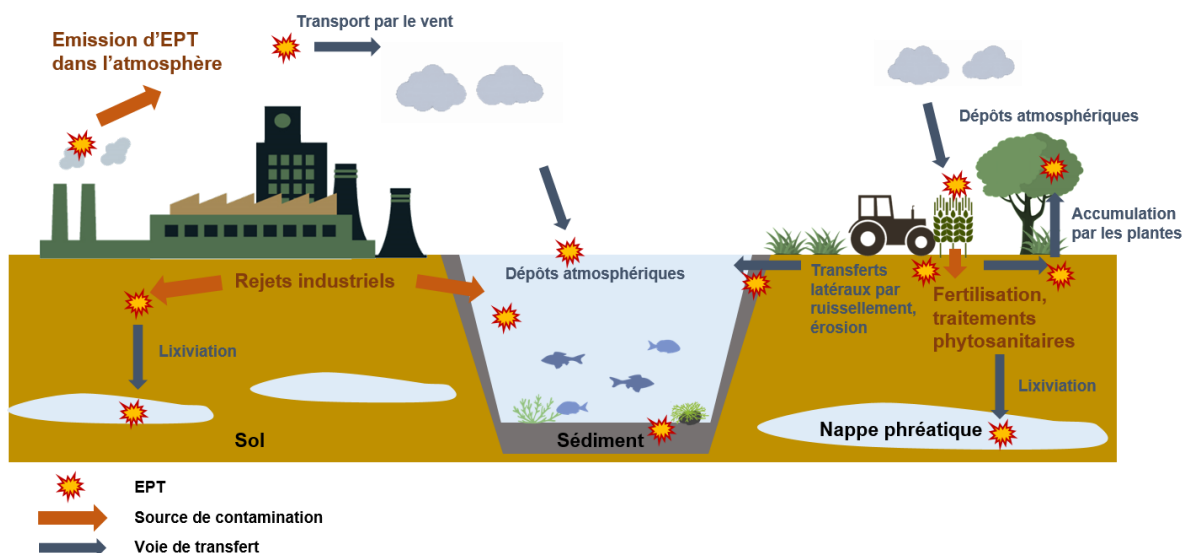


Figure 1. 1 : Sources et voies de transfert possibles des EPT dans l'environnement.

Le nord de la France a notamment été touché par une forte pollution en Pb, Zn et Cd suite aux activités métallurgiques ([Frangi and Richard, 1997](#)). L'émission des métaux dans l'atmosphère et leurs retombées dans les milieux environnants ont entraîné l'accumulation des contaminants dans les sols. Par exemple, les retombées provenant d'une usine de métaux non ferreux ont été estimées en 1989 à 55 t de Pb, 44 t de Zn et 1,6 t de Cd sur une surface de 10 000 ha ([Cambier and Mench, 1998](#)). Les déchets industriels (résidus de minerais, scories) ont par ailleurs été utilisés pour diverses applications (remblais d'entretien des routes, amendements pour alléger les sols, traitements herbicides) contribuant plus largement à la contamination des sols ([Cambier et al., 2009](#)). D'autres sources de contamination proviennent du secteur agricole avec l'utilisation souvent intensive de matières fertilisantes (lisiers, boues d'épuration, engrais phosphatés) et de pesticides. La « bouillie bordelaise » utilisée pour traiter les vignes en France a par exemple engendré une contamination des sols agricoles par le Cu, les concentrations étant comprises entre 50 et 600 mg/kg tandis que les sols « ordinaires » en contiennent entre 2 et 20 mg/kg ([Baize, 2000b](#)).

Les rejets directs et indirects (par ruissellement) de déchets urbains, industriels et agricoles sont responsables de la contamination des milieux aquatiques ([Bécart et al., 1997](#); [Berteau et al., 1993](#); [Fernandes et al., 2008](#); [Schneider, 2001](#)). Les EPT peuvent s'accumuler dans les organismes aquatiques et contaminer la chaîne alimentaire mais s'accumulent majoritairement dans les sédiments par adsorption sur les particules sédimentaires, par coagulation/floculation et par précipitation. Par conséquent, les sédiments sont considérés comme le plus gros réservoir d'EPT des écosystèmes aquatiques ([Fernandes et al., 2008](#); [Schneider, 2001](#); [Zhang et al., 2014](#)). Les sédiments du nord de la France ont été particulièrement marqués par une contamination en Cd, Cu, Hg, Pb, Ni et Zn ([Bécart et al., 1997](#); [Bert et al., 2012b](#);

[Huguet et al., 2015](#); [Isaure et al., 2002](#); [Lions et al., 2010](#); [Panfili et al., 2005](#); [Piou et al., 2009](#)). Près de 140 mg/kg de Cd, 600 mg/kg de Pb et 4 000 mg/kg de Zn ont par exemple été mesurés dans les sédiments de la Scarpe ([Huguet et al., 2015](#)). Suite aux opérations de curage indispensables pour l'entretien des voies d'eau, des volumes importants de sédiments chargés en EPT sont gérés à terre en l'absence de voie de valorisation pour ce type de sédiment ([Voies navigables de France, 2009, 2014](#)).

1.1.3. Mobilité et biodisponibilité des EPT dans les sols

Les EPT existent sous différentes formes chimiques (spéciation) dans les sols, les eaux et les sédiments. Ils peuvent être sous forme d'ion libre ou de complexe associé à des particules de sol organiques ou inorganiques. La mesure des concentrations totales en EPT dans les sols n'est pas suffisante pour évaluer les risques sanitaires et environnementaux ([Baize, 2000b](#)). En effet, selon leur spéciation et les caractéristiques physico-chimiques des sols, les EPT peuvent devenir mobiles et se retrouver dans les nappes d'eau souterraines. Une partie de cette fraction mobile ou mobilisable peut également être absorbée par les organismes vivants ; on parle alors de fraction « biodisponible ». Cette fraction peut induire une toxicité et contaminer la chaîne alimentaire ([Antoniadis et al., 2017](#); [Harmsen, 2007](#); [Hooda, 2010](#); [INERIS, 2006](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)).

Les EPT présents dans la solution du sol interagissent avec les différents constituants du sol selon divers processus : sorption, désorption, complexation, précipitation, etc. ([Hooda, 2010](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Les facteurs majoritairement responsables de la mobilité des EPT dans les sols sont le pH et le potentiel redox. En conditions réductrices, les EPT tendent à être moins mobiles, notamment lorsqu'ils sont associés aux sulfures. En conditions oxydantes, la solubilité de la plupart des EPT tend à augmenter avec une diminution de pH car les EPT chargés positivement peuvent entrer en compétition avec les protons H⁺ pour s'adsorber sur les surfaces chargées négativement. C'est par exemple le cas de Cd, Zn, Cu et Pb qui deviennent plus solubles en conditions acides (**Figure 1. 2**). Dans la phase solide du sol, les principales phases de rétention sont les argiles, les oxyhydroxydes de Fe et Mn, la matière organique (MO) et les carbonates ([Hooda, 2010](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Les végétaux et les microorganismes influencent également la mobilité des ETP par la libération d'exsudats racinaires et de sidérophores capables de se lier à des métaux ([Antoniadis et al., 2017](#); [Kidd et al., 2009](#)). Plusieurs méthodes basées sur des extractions chimiques et/ou biologiques ont été développées pour quantifier la fraction biodisponible ([Harmsen, 2007](#)). Depuis 2008, l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol est encadrée par la norme [ISO 17402 \(2011\)](#). La mobilité potentielle des contaminants dans le sol est généralement estimée par des méthodes d'extraction chimiques douces (ex. CaCl₂ 0,01 M), supposées mimer des

conditions physico-chimiques environnementalement réalistes ; analysée sous cet angle, la biodisponibilité est alors qualifiée de disponibilité environnementale ([Bert et al., 2017b](#)).

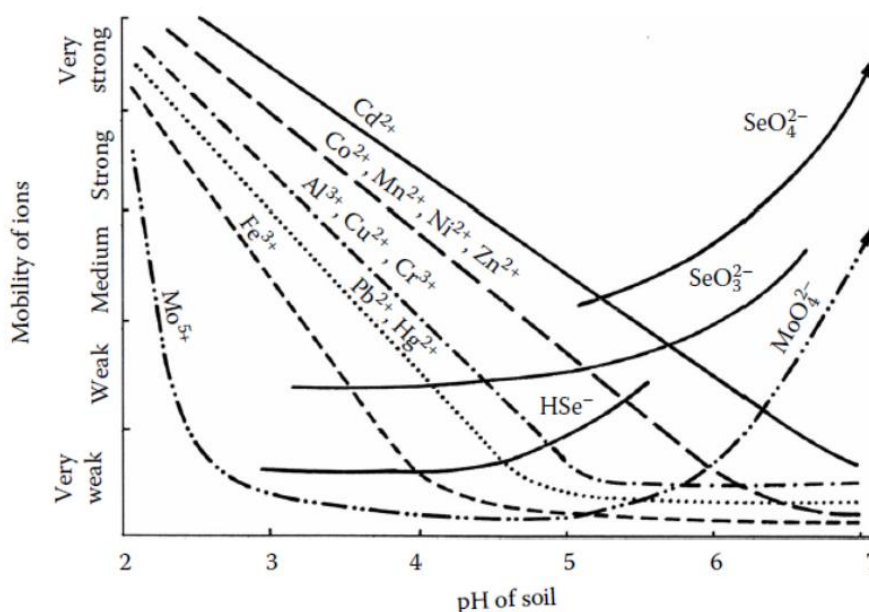


Figure 1. 2 : Représentation schématique de la mobilité des EPT en fonction du pH (Kabata-Pendias, 2010).

1.1.3.1. Impact des EPT sur la santé humaine

Chez l'Homme, les EPT (notamment le Pb, Cd, Hg et As) peuvent affecter différents organes suite à l'ingestion de particules de sol et d'aliments contaminés, à l'inhalation de particules ou à un simple contact cutané. Ils peuvent par exemple causer des cancers (As), des troubles neurologiques (As, Pb), une insuffisance rénale (Pb, Cd, Hg) et/ou des problèmes osseux (Pb, Cd) ([Järup, 2003](#); [Science Communication Unit, 2013](#)). Les EPT peuvent altérer le métabolisme cellulaire par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Lorsque l'organisme n'est pas capable de générer suffisamment de composés antioxydant (ex. glutathion, superoxyde dismutase), les cellules subissent un stress oxydant. En se fixant à l'ADN et aux protéines nucléaires, les EPT causent la dégradation de macromolécules biologiques et inhibent l'activité de nombreuses enzymes ([Flora et al., 2008](#); [Jan et al., 2015](#)). Pour réduire l'exposition de la population aux EPT, plusieurs réglementations ont été mises en place au niveau européen. Elles fixent par exemple les teneurs maximales en As, Cd, Hg et Pb dans les denrées alimentaires pour

la consommation humaine¹, les teneurs en EPT dans l'eau potable², dans les sols et boues utilisés en agriculture³.

1.1.3.2. Impact des EPT sur les plantes

La toxicité d'un métal ou métalloïde dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques et biologiques. Elle dépend notamment de la nature de l'élément (essentiel ou non essentiel), de la forme chimique de l'élément, de sa concentration (totale et biodisponible) dans le milieu, des propriétés physico-chimiques du sol (pH, potentiel redox, teneurs en argiles, teneurs et composition de la MO, CEC), de l'espèce végétale et des microorganismes associés ([Antoniadis et al., 2017](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Les plantes absorbent les EPT sous forme d'ions libres, de complexes solubles inorganiques et de complexes organométalliques (associés à des ligands) ([Antoniadis et al., 2017](#); [Hooda, 2010](#)). L'absorption excessive de ces EPT par les plantes peut perturber leur métabolisme.

Au niveau cellulaire, les métaux de transition (ex. Cr, Cu, Mn) induisent par exemple une augmentation de la production d'ERO responsables d'un stress oxydant, l'inhibition de l'activité de nombreuses enzymes et l'inactivation des défenses anti-oxydatives. Ils provoquent ainsi la dégradation des lipides, des protéines et des acides nucléiques ([Clemens, 2006](#); [Loix et al., 2017](#); [Polle and Douglas, 2010](#); [Shanker et al., 2005](#)). Par ailleurs, des interactions de compétition entre certains ETP peuvent se produire. C'est souvent le cas entre le Cd et le Zn car ces deux éléments partagent des similarités chimiques ; le Cd²⁺ peut ainsi emprunter les mêmes voies de transport que le Zn²⁺ et interférer dans les processus biologiques ([Clemens, 2006](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Les EPT peuvent également induire l'inhibition de transporteurs permettant la translocation de nutriments des racines vers les parties aériennes des plantes ([Solti et al., 2011](#)). En présence de Cd, le transport du Fe dans le xylème serait par exemple perturbé par une baisse d'activité du citrate (chélateur du fer) liée au blocage de l'expression du gène associé (FRD3). Les EPT provoquent ainsi des carences en éléments essentiels (ex. Ca, Mg, Mn, Fe et Zn) et divers symptômes visibles qui en résultent : chlorose, nécrose, croissance limitée ([Loix et al., 2017](#); [Solti et al., 2011](#)).

La pollution des sols par les métaux et métalloïdes n'est cependant pas limitante pour certaines espèces végétales ([Bert et al., 2012b](#); [Bes et al., 2010](#); [Remon et al., 2005](#)), grâce à leurs mécanismes de tolérance et de résistance ([Clemens, 2006](#)). La pollution peut entraîner une perte

¹ Règlement (CE) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.

² Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées.

³ Directive n° 86-278 du 12/06/86 relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture.

de la richesse et de la diversité floristique par la disparition des espèces les plus sensibles ([Meharg, 2003](#)). Sur un site industriel contaminé par Cd et Hg, une étude a d'ailleurs montré que la richesse et la diversité des espèces végétales avaient été négativement impactées par les métaux. La capacité des plantes à s'adapter à cette pollution était notamment liée à leur capacité à maintenir la production d'enzymes antioxydantes ([Dazy et al., 2009](#)). Sur un sol fortement contaminé par Cu, Cr, Mn, Ni, Pb et Zn, une étude botanique a montré que les communautés végétales étaient souvent dominées par des espèces pérennes herbacées (ex. Poacées et Astéracées), avec des taux de recouvrement variables allant de 5 à 100 %. De plus, les concentrations foliaires en EPT mesurées dans les plantes dominantes étaient proches de celles mesurées sur des sols non contaminés ([Remon et al., 2005](#)).

1.1.3.3. Impact des EPT sur les communautés microbiennes

Les microorganismes (bactéries, champignons, archéobactéries, protistes...) jouent un rôle essentiel dans les processus écologiques. Du fait de leur grande diversité génétique et fonctionnelle, ils contribuent de manière importante à la formation des sols, à la décomposition de la MO, au recyclage des nutriments, à la croissance des plantes, à la dégradation de polluants organiques, etc. ([Conrad, 1996](#); [Jeffries et al., 2003](#); [Whitman et al., 1998](#)). Cependant, la contamination des sols par les EPT peut affecter la diversité, la composition et l'activité des microorganismes ([Crowley, 2008](#)). Les conséquences sont notoires : altération des propriétés physico-chimiques des sols et de leur structure, diminution de la résilience des sols, réduction de la croissance des plantes, etc. ([Crowley, 2008](#); [Giller et al., 1998](#); [Meharg, 2003](#)). Néanmoins, certains microorganismes développent des mécanismes de tolérance et de résistance qui leur permettent de s'adapter aux sols contaminés par les EPT ([Fernández-Calviño et al., 2011](#); [Meharg, 2003](#); [Mertens et al., 2006a](#)). Il a également été démontré que la présence d'EPT pouvait entraîner la disparition des populations les plus sensibles et la croissance des populations les plus résistantes ([Rasmussen and Sørensen, 2001](#)).

L'étude de la diversité microbienne par les techniques de cultures reste très limitée car les microorganismes cultivables en laboratoire représentent moins de 1 % des espèces microbiennes ([Hugenholtz, 2002](#)). Grâce aux progrès de la nanotechnologie et de la bio-informatique, des nouvelles technologies de séquençage haut-débit appelées NGS (Next Generation Sequencing) ont été créées pour augmenter le débit de séquençage d'ADN. Cette méthode taxonomique permettant d'identifier une espèce sur la base d'une courte séquence génétique est appelée *barcoding*. Les régions utilisées, appelées barcodes, sont des régions variables bordées par des régions très conservées et sont l'ARNr 16s pour les bactéries ou l'ITS (Internal Transcribed Spacer) pour les champignons ([Schoch et al., 2012](#)). Selon la technique de séquençage utilisée la région du barcode peut varier en fonction de la taille des séquences. La technologie développée par Illumina est

basée sur l'amplification, la liaison sur une puce et l'utilisation de terminateurs de chaîne réversibles marqués par des fluorochromes. Cette méthode permet un séquençage dans les deux sens de lecture diminuant ainsi les erreurs de séquençage. Le séquenceur Miseq est le deuxième plus utilisé depuis 2012. L'approche communément appelée barcoding moléculaire ou « métabarcoding » basée sur l'extraction d'ADN issu de l'environnement et le séquençage haut-débit constitue donc une véritable révolution en microbiologie environnementale en donnant accès aux microorganismes non cultivés ([Bell et al., 2014](#); [Rastogi and Sani, 2011](#)). Elle permet ainsi d'établir un inventaire plus dense des gènes présents dans un environnement donné et de mettre en évidence d'éventuelles variations de la structure des communautés microbiennes en réponse à une pollution par des EPT ([Azarbad et al., 2015](#); [Op De Beeck et al., 2015](#)).

Plus particulièrement, le « barcoding moléculaire » couplé à l'analyse des sols a permis de caractériser les communautés microbiennes associées aux espèces ligneuses et de révéler l'émergence de microorganismes clés ou de groupes fonctionnels clés sur différents sites de phytomanagement ([Foulon et al., 2016a](#); [Foulon et al., 2016b](#)) (**Figure 1. 3**). La nature des sols (teneurs en éléments toxiques, en P et N), de même que l'origine des peupliers constituent des facteurs déterminants dans la structuration des communautés.

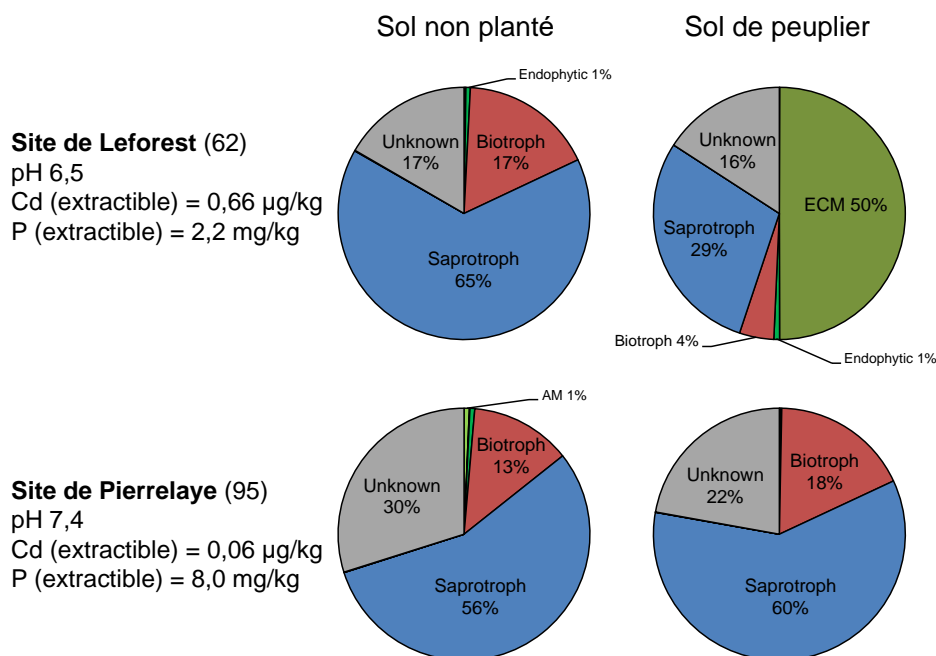


Figure 1. 3 : Proportions relatives de séquences fongiques assignées aux groupes fonctionnels majeurs. Les abondances des différents groupes d'OTU obtenues à partir des échantillons de sol recueillis sous le cultivar de peuplier Skado ou sur les sols non plantés des sites expérimentaux de Leforest et de Pierrelaye ont été fixées à 100 % et les OTU ont été classées parmi les ectomycorhizes (ECM), mycorhizes à arbuscules (AM), endophytes, saprotrophes ou biotrophes. D'après [Foulon et al. \(2016b\)](#).

1.2. Caractéristiques et gestion des sédiments de curage contaminés

1.2.1. Caractéristiques générales des sédiments

Un sédiment est un ensemble de particules organiques ou minérales qui s'est déposé au fond d'une voie d'eau. Ces particules proviennent principalement de l'érosion des sols du bassin versant, d'apports anthropiques (rejets urbains, rejets agricoles et industriels), de la décomposition de matières organiques (d'origine végétale et animale) et de dépôts atmosphériques ([Schneider, 2001](#)). Selon la taille des matières en suspension et des caractéristiques de la voie d'eau (vitesse de courant, morphologie), la sédimentation génère des dépôts plus ou moins importants. Les particules s'accumulent notamment au niveau des canaux où les courants sont atténués ([Voies navigables de France, 2014](#)). Les particules sédimentaires sont très variables en taille et leur composition minérale dépend essentiellement de la nature des terrains érodés. Les teneurs en MO sont généralement comprises entre 2 et 10 %, avec près de 60 % de composés humiques (composés stables de la MO) ([Schneider, 2001](#)). Dans les départements du Nord et du Pas-de-Calais, les sédiments fluviaux présentent des proportions importantes en particules fines, avec près de 54 % de limons (< 50 µm) et 20 % d'argiles (< 2 µm). Les analyses physico-chimiques de ces sédiments ont montré que les EPT étaient principalement concentrés dans la fraction fine constituée de plus de 30 % d'argiles ([Alary et al., 2011](#)). En effet, les argiles (notamment la montmorillonite) sont d'excellents adsorbants. Associés à la MO, ils forment des complexes argilo-humiques qui adsorbent fortement les EPT ([Zhang et al., 2014](#)). Les EPT peuvent également être associés à d'autres phases fixatrices tels que les sulfures, les oxyhydroxydes de Fe et Mn, et les carbonates ([Lesven et al., 2010](#); [Lions et al., 2010](#); [Zhang et al., 2014](#)). En milieu réducteur, la présence de sulfures métalliques (insolubles) est souvent relevée dans les sédiments tels que ZnS (sphalérite), CdS (greenockite), CuS (covellite), FeS₂ (pyrite) et PbS (galène) ([Lesven et al., 2010](#); [Tack et al., 1996](#); [Zhang et al., 2014](#)).

1.2.2. Curage des cours d'eau et gestion des sédiments

VNF gère et exploite la plus grande partie du réseau fluvial français, soit 6 700 km de fleuves, rivières et canaux du territoire. Le réseau fluvial géré par la direction territoriale Nord-Pas-de-Calais est le plus dense en France, avec 680 km de voies navigables. Ces voies d'eau permettent de nombreux usages (transport fluvial, pêche, loisirs, etc.) qui peuvent être perturbés par divers phénomènes tels que l'envasement et les inondations ([Voies navigables de France, 2009, 2014](#)). Ces phénomènes sont fortement liés aux activités humaines (urbanisation, activités industrielles et agricoles) qui ont accéléré l'érosion des sols. Certaines pratiques agricoles, notamment le labour, tendent par exemple à dégrader les terres cultivées ([Julien, 2010](#)). Par ruissellement, les particules de sols sont transportées vers les cours d'eau, sous l'action du vent

et des précipitations. En l'absence de systèmes d'épuration efficaces, les eaux usées des collectivités et des industries ont également provoqué l'augmentation du volume des vases ([Berteau et al., 1993](#)). En plus de l'envasement des cours d'eau, la présence de contaminants (notamment les métaux, métalloïdes et hydrocarbures) a fortement dégradé la qualité des milieux aquatiques ([Bécart et al., 1997](#); [Berteau et al., 1993](#); [Fernandes et al., 2008](#)). Pour assurer la navigation et protéger les milieux naturels, le curage des cours d'eau et canaux est donc indispensable.

En France, les opérations de curage sont soumises à différentes procédures réglementaires relatives à la loi sur l'eau et les milieux aquatiques du 30 décembre 2006 concernant le curage d'entretien et à la réglementation sur la gestion des déchets pour les sédiments extraits de l'eau. Ce cadre réglementaire vise à améliorer la gestion des sédiments en limitant l'impact des opérations de curage et l'impact environnemental de la gestion à terre des sédiments. Avant chaque opération de curage, un plan de gestion doit être clairement défini, consistant à caractériser le site de curage et les sédiments, identifier les impacts environnementaux et choisir les techniques de curage et de traitement appropriées ([Voies navigables de France, 2014](#)). VNF extrait ainsi chaque année 750 000 m³ de sédiments, soit le tiers des sédiments fluviaux dragués en France ([Voies navigables de France, 2018](#)).

1.2.3. Caractérisation des sédiments avant curage

La caractérisation de la qualité des sédiments est basée sur la mesure de paramètres physiques (teneur en eau, granulométrie, densité, etc.) et chimiques (concentrations en métaux et métalloïdes, PCB et HAP dans la fraction fine < 2 mm) et permet d'orienter les sédiments vers des filières de gestion appropriées ([Voies navigables de France, 2014](#)). En présence de contaminants, les risques associés sont évalués selon un quotient de risque Q_{Sm} qui prend en compte le nombre de contaminants, leur concentration et leur valeur seuil S_1 . Les valeurs du seuil S_1 sont définies par l'arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux (**Tableau 1. 2**). Les sédiments avec un Q_{Sm} inférieur à 0,5 présentent un risque faible pour le milieu aquatique tandis que les sédiments avec un Q_{Sm} supérieure à 0,5 sont considérés comme potentiellement dangereux. Des tests écotoxicologiques sont alors réalisés pour déterminer la dangerosité des sédiments. Ces tests s'appuient sur des essais normalisés de toxicité aiguë (test d'inhibition de la luminescence de bactéries marines (*Vibrio fischeri*, [ISO 11348-3 \(2007\)](#)) et chronique (test d'inhibition de la reproduction de *Brachionus calyciflorus*, [ISO 20666 \(2009\)](#); test d'inhibition de l'émergence et de la croissance de végétaux ; [ISO 22030 \(2011\)](#)) ([RECORD, 2017](#)). Si aucun effet n'est avéré, des tests supplémentaires de lixiviations sont réalisés pour évaluer les risques de transfert en milieu aqueux (évaluation du caractère inerte ou non des sédiments). Les

sédiments peuvent ainsi être classés selon trois catégories : déchets inertes, non dangereux ou dangereux (**Figure 1. 4**). Dans les départements du Nord et du Pas-de-Calais, le volume total de sédiments à curer entre 2007 et 2027 était estimé à 8,3 millions de m³ ([Voies navigables de France, 2009](#)). En procédant à l'analyse de ces sédiments dans les canaux selon la méthodologie développée par VNF, plus de 55 % de sédiments présentaient un taux de pollution nécessitant une mise en dépôt sécurisée ([Mouvet and Piantone, 2008](#)).

Tableau 1. 2 : Valeurs du seuil S1 (mg/kg MS) fixés par l'arrêté du 9 août 2006 relatifs aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux.

Contaminants	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	PCB totaux	HAP totaux
Concentration	30	2	150	100	1	50	100	300	0,68	22,8

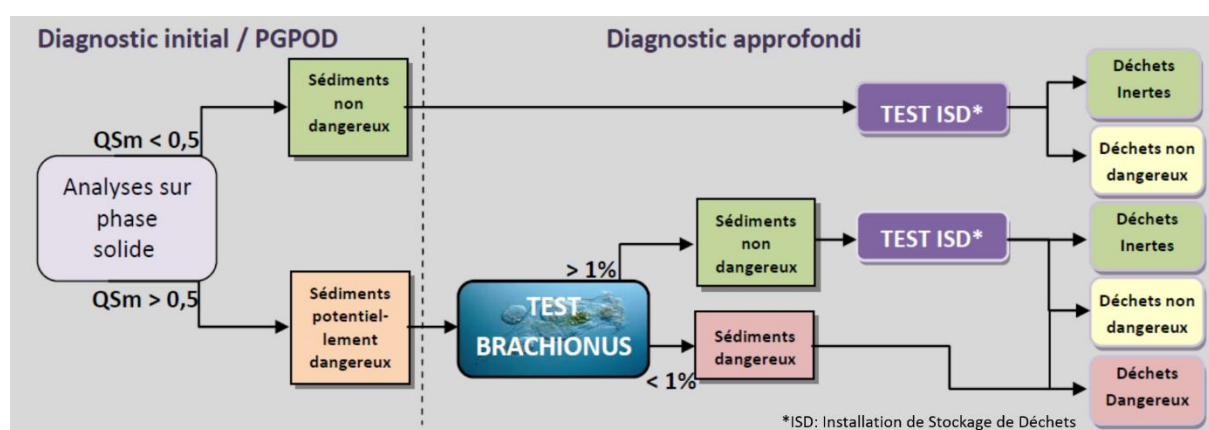


Figure 1. 4 : Protocole de caractérisation des sédiments à draguer.

1.2.4. Les filières de gestion

Une fois extraits des voies d'eau, les sédiments sont considérés comme des déchets. En tant que producteur, VNF est responsable de leur gestion, qui doit être en accord avec l'article L.541-2 du Code de l'Environnement. Il existe trois filières de gestion, établies selon les caractéristiques des sédiments et des réglementations en vigueur ([Voies navigables de France, 2014](#)) :

- Prétraitement et traitement des sédiments
- Gestion des sédiments en eau
- Gestion des sédiments à terre

Les sédiments caractérisés comme inertes ou non dangereux non inertes peuvent être remis en suspension afin de maintenir le lit du cours d'eau dans son profil d'équilibre. Lorsque la gestion en eau n'est pas envisageable, les sédiments sont gérés à terre et doivent faire l'objet d'une valorisation ou d'un stockage selon leurs caractéristiques physico-chimiques, leur impact sur l'environnement, les coûts de mise en œuvre et la réglementation en vigueur. Dans le cadre de sa

politique environnementale, VNF privilégie les filières permettant la valorisation des matériaux de curage face à la mise en dépôt (filière d'élimination). Différentes filières de gestion à terre sont présentées dans le **Tableau 1. 3**. Un prétraitement des sédiments basé sur des méthodes physico-chimiques est généralement réalisé pour réduire le volume des sédiments extraits afin de faciliter leur gestion. Selon leur destination (valorisation ou stockage), les sédiments peuvent être soumis à divers traitements (physiques, chimiques et/ou biologiques) pour réduire, extraire ou immobiliser les contaminants, ou renforcer leurs caractéristiques géotechniques. Cependant, les traitements disponibles pour immobiliser ou extraire les EPT et qui reposent sur des méthodes physiques et chimiques (extraction par lessivage, oxydation/réduction, vitrification, solidification, incinération, etc.) sont généralement lourds à mettre en œuvre et coûteux. Face à ces méthodes, l'utilisation des phytotechnologies pour gérer ou traiter certains de ces sédiments pourrait permettre de réduire les coûts de mise en œuvre avec d'éventuels retours financiers via des filières de valorisation de la biomasse produite *in situ*. ([Bert et al., 2017b](#); [Bert et al., 2012a](#); [Voies navigables de France, 2014](#)). Cette filière de traitement et de gestion est encore au stade de développement. Les phytotechnologies sont décrites plus en détail dans le paragraphe 1.3 de ce chapitre.

Tableau 1. 3 : Exemples de filières de gestion des sédiments à terre envisageables en fonction de leur caractère inerte, non dangereux non inerte ou dangereux ([Voies navigables de France, 2014](#)).

Type de sédiment	Filières de gestion envisageables
Inerte	<ul style="list-style-type: none"> • Aménagements paysagers • Renforcement de berges • Comblement de carrières et de gravières • Valorisation en technique routière • Epannage agricole • Stockage (temporaire ou définitif)
Non dangereux non inerte	<ul style="list-style-type: none"> • Aménagements paysagers • Renforcement de berges • Valorisation en technique routière • Epannage agricole • Stockage (temporaire ou définitif)
Dangereux	<ul style="list-style-type: none"> • Stockage (temporaire ou définitif)

1.2.5. Les terrains de gestion de sédiments

En attente de leur valorisation ou de leur élimination, les sédiments peuvent être stockés temporairement ou définitivement sur des terrains aménagés de manière à limiter les impacts environnementaux (**Figure 1. 5**). La durée de stockage des sédiments sur des terrains de dépôt temporaire (ou installations de transit) ne doit pas excéder 1 an avant une élimination définitive et 3 ans pour une valorisation ([Voies navigables de France, 2014](#)). Au-delà de ces délais, le stockage est considéré comme définitif. Depuis 2010, les terrains de dépôt sont particulièrement encadrés et contrôlés car soumis à la réglementation sur les installations classées pour la protection de l'environnement (Décret n° 2010-369 du 13 avril 2010). Une valorisation de ces sites peut être envisagée en fonction des caractéristiques physico-chimiques des sédiments, s'ils ne sont pas classés comme dangereux. Ces terrains peuvent par exemple être aménagés et valorisés en zones de loisirs, en zones agricole ou en espaces naturels pour préserver la biodiversité ([Voies navigables de France, 2009](#)). Les sédiments non valorisables (dangereux ou pas) sont confinés dans des dispositifs limitant les impacts environnementaux (ex. géotextile, géomembranes).



Figure 1. 5 : Terrain de gestion de sédiments ([Voies navigables de France, 2014](#)).

Afin de diminuer les impacts sanitaires et environnementaux liés aux terrains de gestion de sédiments, la direction territoriale Nord-Pas-de-Calais de VNF a élaboré un Schéma Directeur Régional des Terrains de dépôt (SDRTD) qui présente les stratégies d'aménagement des 183 terrains recensés dans les départements concernés, sur la base de diagnostics approfondis. Dans ce cadre, des analyses de risques sanitaires et environnementaux accompagnés de plans de gestion ont été réalisés pour s'assurer de l'innocuité des anciens terrains de gestion (créés avant

la mise en place de la circulaire environnementale dragage⁴), vérifier la compatibilité de l'état des terrains avec leurs usages (actuels et futurs) et proposer des usages plus adéquats si nécessaire. Les diagnostics réalisés sur l'ensemble de ces anciens terrains ont permis d'identifier des zones potentiellement polluées ([Voies navigables de France, 2009](#)).

1.2.6. Impact de la mise en dépôt des sédiments sur la mobilité des EPT

Après leur mise en dépôt, les sédiments subissent des changements physico-chimiques importants qui peuvent impacter la spéciation des EPT, et donc leur mobilité et leur biodisponibilité. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la répartition des EPT entre les phases solides et liquides des EPT dans les sédiments de curage : le pH, le potentiel redox, la présence de phases porteuses (minérales et organiques), les végétaux, les microorganismes et les conditions climatiques ([Kabata-Pendias, 2010](#); [Lions et al., 2010](#); [Panfili et al., 2005](#); [Piou et al., 2009](#); [Singh et al., 1998](#); [Stephens et al., 2001](#); [Tack et al., 1996](#)). Comme dans les sols, le comportement des EPT dans les sédiments gérés à terre est majoritairement influencé par le pH et le potentiel redox ([Kabata-Pendias, 2010](#)). L'aération et la déshydratation des sédiments après curage entraînent l'oxydation des sulfures métalliques et la dégradation de la MO par les organismes présents dans la matrice. Dans ces conditions, le pH tend à diminuer et à provoquer le relargage de certains EPT (ex. Cd, Cu, Pb et Zn) par des processus de dissolution et/ou de désorption. Les EPT peuvent ainsi se retrouver liés à d'autres phases porteuses ou migrer vers les nappes d'eau souterraines ([Huguet et al., 2015](#); [Isaure et al., 2005](#); [Singh et al., 1998](#); [Tack et al., 1996](#)). En conditions oxydantes et lorsque le sédiment est bien drainé, les EPT peuvent former des composés stables par adsorption et/ou précipitation avec des oxyhydroxydes de Fe et des minéraux argileux ([Isaure et al., 2002](#); [Kabata-Pendias, 2010](#); [Piou et al., 2009](#); [Tack et al., 1996](#)). Quelques formes chimiques du Zn ont été identifiées dont le phyllosilicate de Zn, $ZnCO_3$ (smithsonite), Zn_2SiO_4 (willemite), le Zn associé aux oxyhydroxydes de Fe et ZnO (zincite) ([Isaure et al., 2002](#); [Panfili et al., 2005](#); [Van Damme et al., 2010](#)). Pour le Cd, des formes associées à l'oxygène de la MO et des phosphates ont été rapportées ([Huguet et al., 2015](#)).

Par ailleurs, il a été démontré que l'installation d'un couvert végétal pouvait favoriser la formation de complexes phosphatés et organiques issus de l'oxydation des sulfures ([Huguet et al., 2015](#); [Panfili et al., 2005](#)). La MO contribue à la rétention d'EPT (notamment Cu et Pb) de manière substantielle. La complexation des EPT avec les acides humiques (AH) est reconnue comme étant très stable ([Hooda, 2010](#); [Kabata-Pendias, 2010](#); [Tack et al., 1996](#)). Les liaisons entre les EPT et les constituants du sédiment peuvent être cependant réversibles en fonction des conditions climatiques qui influencent le potentiel redox ; Cd et Zn se fixent plutôt à la MO en hiver et aux

⁴ Circulaire du 04/07/08 relative à la procédure concernant la gestion des sédiments lors de travaux ou d'opérations impliquant des dragages ou curages maritimes et fluviaux.

oxyhydroxydes de Fe en été suite à la minéralisation de la MO (Piou et al., 2009). La remobilisation périodique des EPT dans le sédiment géré à terre peut constituer un risque pour l'environnement car les EPT sont susceptibles de contaminer les nappes souterraines. De plus, la fraction mobile des éléments peut s'avérer toxique pour les organismes terrestres (Piou et al., 2009). L'application de traitements appropriés et un suivi sur le long terme des terrains de gestion sont donc indispensables pour réduire les impacts environnementaux.

1.3. Les phytotechnologies au service des sites et sols pollués

1.3.1. Les phytotechnologies

Dans le cadre de la gestion des sites et sols pollués, les phytotechnologies ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche et développement depuis les années 1990 pour réduire les risques environnementaux et sanitaires liés aux polluants (Bert et al., 2017b; Bert et al., 2012a; Bert et al., 2009; Conesa et al., 2012; Mench et al., 2010; Vangronsveld et al., 2009). Ces phytotechnologies regroupent des techniques basées sur l'utilisation de plantes capables d'extraire, d'immobiliser ou de dégrader des polluants organiques ou inorganiques *in situ* (Mench et al., 2010). Les plantes capables de se développer dans des milieux riches en métaux et métalloïdes sont dites « métalphytes » et leurs mécanismes de tolérance ont été considérablement étudiés afin d'optimiser l'extraction ou l'immobilisation des EPT (Bothe and Słomka, 2017; Colzi et al., 2014). D'après Clemens (2006), on peut distinguer deux principales stratégies de tolérance aux EPT qui sont l'exclusion (réduction de la translocation des EPT vers les parties aériennes des plantes) et l'accumulation (chélation des EPT par des exsudats racinaires puis translocation et séquestration des EPT dans les parties aériennes).

Ces technologies « vertes » répondent à des enjeux environnementaux, économiques et sociaux et s'inscrivent dans une dynamique de développement durable. De manière générale, l'installation d'un couvert végétal améliore les propriétés biologiques et physico-chimiques des sols par l'apport de matières organiques (Touceda-González et al., 2017; Vezzani et al., 2018). Les plantes jouent notamment un rôle central dans la production de services écosystémiques tels que le recyclage des nutriments, la production de nourriture ou de biomasse, la régulation de l'érosion et l'atténuation des changements climatiques (Faucon et al., 2017). Sur des surfaces contaminées, la formation d'un couvert végétal dense permet également de limiter la dispersion des contaminants par le vent, leurs transferts verticaux (évapotranspiration/ lixiviation) et horizontaux (ruissellement) au niveau du sol (Mench et al., 2010; Vangronsveld et al., 2009).

En France, et plus globalement en Europe, les techniques les plus couramment étudiées ayant atteint un stade de développement avancé (essais à grande échelle et sur le long terme) pour la gestion des sols contaminés aux EPT sont la **phytoextraction** et la **phytostabilisation**

([Bert et al., 2017b](#); [Bert et al., 2012a](#); [Kidd et al., 2015](#); [Mench et al., 2010](#)). La **phytoextraction** utilise des plantes capables d'absorber et d'accumuler de fortes concentrations en EPT dans les parties aériennes qui seront ensuite récoltées pour décontaminer partiellement les sols (**Figure 1. 6**). Certaines plantes sont hyper-accumulatrices : les concentrations en métaux ou métalloïdes dans leurs parties aériennes sont de l'ordre de 10 000 mg/kg MS pour Zn et Mn, 1 000 mg/kg MS pour Co, Cu, Ni, As et Se, et 100 mg/kg MS pour Cd ([McGrath and Zhao, 2003](#)). Les espèces hyper-accumulatrices les plus étudiées appartiennent à la famille des *Brassicaceae* ; *Noccaea caerulescens* et *Arabidopsis halleri* sont notamment connues pour l'extraction du Zn et du Cd ([Pollard et al., 2014](#)). Des plantes non hyper-accumulatrices à forte production de biomasse (maïs, tournesol, saule, peuplier, etc.) ont été testées en combinaison avec des amendements pour augmenter la biodisponibilité des EPT dans le sol et renforcer leur accumulation dans les plantes (Evangelou and Deram, 2014). Par ailleurs, d'autres procédés se sont développés sur le principe de la phytoextraction tels que le « phytomining » et l'« agrofarming » pour l'extraction de métaux à haute valeur ajoutée (notamment Ni, Tl, Co, Au et Ag) via des plantes hyper-accumulatrices ([Grison, 2015](#); [Sheoran et al., 2009](#); [van der Ent et al., 2015](#)). Contrairement à la phytoextraction, la **phytostabilisation** ne permet pas de réduire la pollution d'un site. Elle vise à maîtriser les sources de pollution d'un site en réduisant la mobilité et la biodisponibilité des EPT au niveau de la rhizosphère, par l'action des racines des plantes et des microorganismes associés ([Bolan et al., 2011](#); [Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). En limitant le transfert et l'accumulation des EPT dans les parties aériennes des plantes, l'exposition des maillons de la chaîne trophique aux polluants est ainsi réduite (**Figure 1. 6**). Pour renforcer l'action des plantes, des amendements biologiques ou chimiques sont souvent utilisés ; on parle alors de « **phytostabilisation aidée** ». La phytostabilisation aidée est détaillée dans la partie suivante.

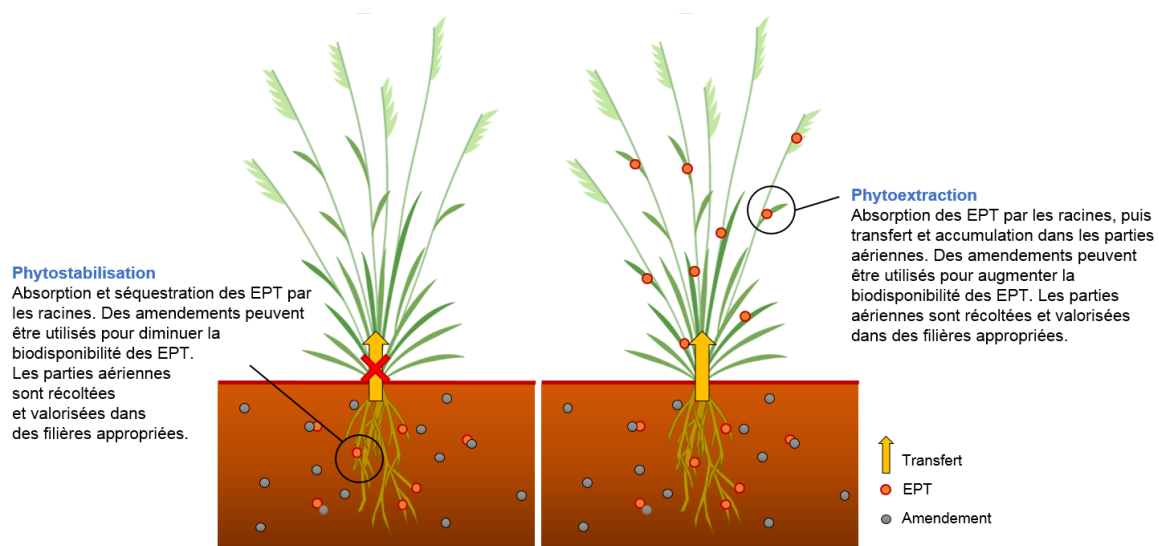


Figure 1. 6 : Schéma représentant le principe de la phytostabilisation (à gauche) et de la phytoextraction (à droite).

1.3.2. La phytostabilisation aidée

Le recours à la phytostabilisation (aidée) peut être pertinent pour le traitement de surfaces importantes contaminées par des métaux et métalloïdes. En fonction de l'usage du site, c'est un mode de gestion qui peut être utilisé temporairement dans l'attente d'un traitement plus adéquat ([Vangronsveld et al., 2009](#)) ou être utilisé sur du long terme si la disponibilité du foncier le permet.

1.3.2.1. Sélection des plantes

Un effort de recherche considérable s'est développé ces dernières décennies pour identifier des plantes pertinentes pour la phytostabilisation. Les plantes doivent idéalement être pérennes pour recouvrir le sol toute l'année, locales, tolérantes à des stress biotiques (pathogènes, herbivorie) et abiotiques (contaminants, sécheresse, salinité, froid, excès d'eau) pour une croissance optimale. Elles doivent notamment être capables de limiter la translocation et l'accumulation des contaminants dans leurs parties aériennes (tiges, feuilles, fruits) pour limiter les risques d'exposition et de transfert dans la chaîne alimentaire ([Mench et al., 2010](#); [Mench et al., 2009](#); [Mendez and Maier, 2008](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Quelques indicateurs permettent d'évaluer la pertinence des espèces végétales testées en phytostabilisation. Le facteur de bioconcentration (FBC ; rapport entre la concentration d'un EPT dans les parties aériennes et la concentration totale de l'élément dans le sol) et le facteur de translocation (FT ; rapport entre la concentration d'un EPT dans les parties aériennes et la concentration totale de l'élément dans la racines) permettent de déterminer si les EPT sont accumulés dans la plante. Les ratios inférieurs à 1 indiquent que les plantes n'accumulent pas les EPT ([Mench et al., 2010](#)). Cependant, certaines plantes peuvent présenter des concentrations en EPT supérieures aux valeurs « ordinaires » mesurées dans des plantes issues de milieux non contaminés. Il convient alors d'évaluer les risques liés à ces biomasses enrichies en EPT pour éviter l'intoxication des animaux domestiques ou sauvages ([Enell et al., 2016](#); [Mendez and Maier, 2008](#); [Pourrut et al., 2011](#)).

De plus, la mise en place d'un couvert végétal dense est nécessaire pour limiter l'érosion du sol, la dispersion des contaminants par le vent et leur lixiviation vers les nappes d'eaux souterraines ([Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Le choix des plantes dépend finalement de l'usage du site ; si l'objectif est de valoriser économiquement le foncier (ex. culture de biomasse non alimentaire), les espèces cultivées devront respecter certains critères de qualité, de rendement et de rentabilité selon les filières de valorisation envisagées et les réglementations en vigueur ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Ciadamidaro et al., 2017](#); [Kidd et al., 2015](#)). Pour accompagner les gestionnaires de sites pollués, différents guides et outils d'aide à la décision ont

récemment été développés pour sélectionner les plantes les plus appropriées ([Andersson-Sköld et al., 2014](#); [Bert et al., 2017b](#); [Bert et al., 2012a](#)).

1.3.2.2. Les espèces candidates

Les plantes potentiellement efficaces pour la phytostabilisation proviennent souvent de milieux dégradés et contaminés par des EPT (ex. anciens sites miniers, sols contaminés par des boues toxiques, terrains de dépôt de sédiments, etc.) dans lesquels elles se développent naturellement ([Bes et al., 2010](#); [Colzi et al., 2014](#); [Domínguez et al., 2008](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Mendez and Maier, 2008](#); [Mertens et al., 2004](#); [Remon et al., 2005](#)). Le **Tableau 1. 4** présente quelques exemples d'espèces végétales testées au champ. La plupart des espèces pertinentes pour la phytostabilisation (aidée) font partie de la famille des Poacées. Par exemple, *Agrostis capillaris*, *Festuca rubra*, *Deschampsia cespitosa*, *Calamagrostis epigeios* et *Miscanthus sinensis* × *giganteus* ont montré des résultats *in situ* très prometteurs ([Bert et al., 2012b](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Mench et al., 2010](#); [Pavel et al., 2014](#); [Touceda-González et al., 2017](#)). De plus, certaines Poacées, comme la fétuque et le miscanthus pourraient être utilisées à des fins énergétiques (combustion, méthanisation, biocarburant) ([Lignoguide, 2013](#); [Pavel et al., 2014](#)). En complément, les espèces ligneuses peuvent renforcer la stabilisation des sols et l'immobilisation des EPT grâce à une extension plus importante de leur système racinaire ([González-Oreja et al., 2008](#); [Pulford and Watson, 2003](#)).

Pour accroître la valeur foncière des sites contaminés aux EPT, la culture d'espèces ligneuses en taillis à courte rotation (TCR) ou à taillis à très courte rotation (TTTCR) dédiées à la production de bois énergie peut constituer une stratégie pérenne et pertinente ([Andersson-Sköld et al., 2014](#); [Ciadamidaro et al., 2017](#); [Kidd et al., 2015](#); [Robinson et al., 2009](#)). En France et en Europe, les principales espèces capables de produire rapidement de la biomasse en TCR/TTTCR sur des sols non contaminés sont le peuplier (*Populus* spp.), le saule (*Salix* spp.) et l'eucalyptus (*Eucalyptus gunnii* et *E. gundal*) ([Lignoguide, 2013](#)). Depuis quelques années, un nombre croissant d'essais *in situ* de phytostabilisation (aidée) permettent d'évaluer le potentiel de plusieurs espèces/cultivars de saules et de peupliers ([Enell et al., 2016](#); [Kidd et al., 2015](#); [Touceda-González et al., 2017](#)). D'autres espèces ligneuses non accumulatrices telles que *Alnus glutinosa* (aulne glutineux), *Acer pseudoplatanus* (érable sycomore) et *Robinia pseudoacacia* (robinier faux-acacia) pourraient également être de bons candidats pour la production de bois énergie ([Mertens et al., 2004](#); [Pourrut et al., 2011](#)).

Tableau 1. 4 : Exemples d'essais au champ de phytostabilisation aidée.

EPT	Amendement	Plantes	Lieu	Référence / Projet
Cd, Ni	Cendres volantes, Fe ⁰	Maïs	Louis Fargues (33)	Boisson et al. (1998) ; Mench et al. (2007)
Cu, As, Cr	Compost, dolomite, Fe ⁰	<i>Agrostis capillaris</i> , <i>A. gigantea</i> , peuplier, saules, <i>miscanthus</i>	Biogeco (33)	Mench et al. (2010)
As	Grenaille d'acier	Mélanges de poacées et d'herbacées dicotylédones	La Combe du Sault (11)	Difpolmine, phytoperf
Cd, Zn, Pb, Cu, As	Amendement minéral basique, hydroxylapatite	<i>Deschampsia cespitosa</i> , <i>Festuca rubra</i> , végétation colonisatrice	Lallaing (59)	Bert et al. (2012b)
Cd, Zn, Pb, Cu, As	Amendement minéral basique	<i>Deschampsia cespitosa</i> , <i>Salix viminalis</i> (Inger et Tordis)	Fresnes-sur-Escaut (59)	Phytosed 2
As, Hg	Amendement biologique	Peupliers (Skado et I-214) et aulne	Tavaux (39)	Biofintree
Cd, Zn, Pb, Cu	Amendement biologique	Peupliers (Skado et I-214) et aulne	Pierrelaye (95) et Fresnes-sur-Escaut (59)	Ciadamidaro et al. (2017) ; Phanthavongsa et al. (2017)
Cd, Ni	Béringite, grenaille d'acier	Maïs	Couhins (33)	Boisson <i>et al.</i> (1998)
Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	MIATE, BRF	Mélanges de poacées et d'herbacées dicotylédones	Châteauneuf (42)	Physafimm
Cd, Pb, Zn	Cendres volantes	<i>Trifolium repens</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i>	Évin-Malmaison (62, France)	Pourrut et al. (2011) ; Bidar et al. (2007)
Pb, Cd, Zn	Phosphate de calcium	<i>Deschampsia cespitosa</i>	Pologne	Kucharski et al. (2005)

La co-culture herbacées/ligneux selon des pratiques agroforestières est bien documentée car elle permet d'augmenter les rendements et de limiter des intrants (engrais, pesticides) ([Dupraz and Liagre, 2008](#); [Torquebiau, 2007](#)). Cependant, ces pratiques ont rarement été testées dans le cadre du phytomanagement. La compréhension des interactions possibles entre les espèces herbacées et ligneuses est indispensable pour générer une croissance et une productivité optimales car des interactions de compétition peuvent se manifester à plusieurs niveaux ([Albertsson et al., 2014a](#); [Tian et al., 2017](#)). La compétition pour la lumière est une des interactions les plus courantes ; si les espèces herbacées ne tolèrent pas les faibles luminosités, leur croissance peut assez vite être limitée par la présence d'arbres à feuillage dense ([Tian et al., 2017](#)). Au contraire, les espèces herbacées peuvent également limiter la croissance des arbres par compétition pour l'eau et les nutriments ([Albertsson et al., 2014a](#); [Collet et al., 1999](#); [Guérard et al., 2001](#)). De plus, des interactions allélopathiques peuvent se produire par l'émission de molécules toxiques synthétisées par certaines plantes (arbres ou herbacées) pour inhiber la croissance des plantes voisines ([Gallet and Pellissier, 2002](#)).

1.3.2.3. Les mécanismes d'immobilisation des EPT par les plantes

Selon les espèces, différents mécanismes d'immobilisation des EPT peuvent se mettre en place pour réduire leur toxicité. Ces mécanismes impliquent divers processus biochimiques et biologiques qui affectent la spéciation des EPT dans la rhizosphère et dans la plante. Au niveau de la rhizosphère, les exsudats racinaires impliqués dans la nutrition des plantes et libérés par les racines peuvent influencer la biodisponibilité d'EPT ([Ma et al., 2016b](#)). Certains composés tels que l'oxalate peuvent en effet chélater les EPT et former des complexes stables dans le sol, tandis que d'autres (ex. acide citrique, acide oxalique) peuvent augmenter la solubilité et la biodisponibilité des EPT ([Ma et al., 2016b](#); [Rajkumar et al., 2012](#)). Certains microorganismes associés aux plantes peuvent également contribuer à l'immobilisation des EPT dans le sol via la libération de composés organiques (ex. glomaline) ou inorganiques (ex. phosphates) ([Ma et al., 2016b](#)). Associés à des champignons mycorhiziens, certaines plantes (ex. peupliers) peuvent acquérir une tolérance accrue aux EPT en libérant des molécules (ex. métallothionéines) induites par leurs symbiotes et capables de complexer les contaminants ([Cicatelli et al., 2014](#); [Meharg, 2003](#)).

Au niveau des racines, les parois cellulaires peuvent constituer une barrière supplémentaire contre les EPT, car elles contiennent des substances (pectine, lignine) capables de les séquestrer ([Loix et al., 2017](#)). L'entrée des EPT dans les cellules racinaires est régulée par des transporteurs membranaires. Le Cd qui n'a pas de transporteur spécifique pénètre dans les cellules racinaires par les mêmes transporteurs que Ca, Fe et Zn ([Clemens, 2006](#); [Loix et al., 2017](#)). La présence d'EPT en fortes concentrations dans les cellules déclenche un stress oxydant par la libération d'ERO. En réponse à ces molécules toxiques, les plantes mettent en place des

mécanismes de défense par l'activation d'enzymes antioxydantes (telles que la superoxyde dismutase et l'ascorbate peroxydase) et de métabolites (glutathion, ascorbate) pour limiter les dégradations cellulaires liées aux EPT ([Loix et al., 2017](#)). Les mécanismes d'exclusion des EPT, qui impliquent une forte accumulation d'EPT dans les racines, se manifestent par une faible translocation des EPT dans les parties aériennes des plantes ([Clemens, 2006](#)). Certains ligands activés par le stress métallique tels que les phytochélatines seraient impliqués dans le transport de certains EPT dans les vacuoles, dans lesquels ils s'accumulent ([Blaudez et al., 2003](#); [Clemens, 2006](#); [Montanini et al., 2007](#); [Peiter et al., 2007](#)).

1.3.2.4. Les amendements

En complément des plantes, divers amendements organiques et/ou inorganiques ont été testés sur le terrain pour réduire la mobilité des EPT dans le sol ainsi que leur biodisponibilité ([Mench et al., 2009](#); [O'Day and Vlassopoulos, 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Ils permettent ainsi de limiter la lixiviation des éléments vers les nappes souterraines, de favoriser la croissance des plantes et d'améliorer les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols. Les amendements testés comprennent les produits de chaulage (chaux vive, calcaire dolomitique), des phosphates (hydroxyapatite, phosphorite, phosphates de calcium), des sous-produits/déchets issus d'activités industrielles (ex. scories), des déchets issus du traitement d'eaux usées (boues résiduaire municipales et industrielles) et des activités agricoles et d'élevage (lisiers, fumiers, compost) et des produits à base de microorganismes (bactéries, champignons mycorhiziens) ([Vangronsveld et al., 2009](#)).

1.3.2.4.1. Immobilisation chimique des EPT

L'immobilisation des EPT par l'ajout d'amendements chimiques implique une modification de la spéciation des éléments. Différents mécanismes peuvent entrer en jeu selon le type d'amendement : modification du pH, adsorption des EPT sur les phases solides, complexation/précipitation des EPT, échanges ioniques, etc. ([Kumpiene et al., 2008](#)). Ces mécanismes d'action dépendent fortement des propriétés physico-chimiques du sol (pH, potentiel redox) ainsi que des types et concentrations des contaminants présents. Un intérêt croissant est porté sur les amendements minéraux basiques (ex. chaux, carbonates, scories) communément utilisés en agriculture pour augmenter le pH du sol et rétablir un milieu propice aux cultures ([Bert et al., 2012a](#); [O'Day and Vlassopoulos, 2010](#)). Des essais en pots, réalisés sur du sédiment de curage contaminé par du Zn (4 700 mg/kg MS) faiblement alcalin, végétalisé avec des Poacées et traité avec un amendement minéral basique (Thomas Basic Slag, TBS ; 5 % MS) ont montré qu'après 2 ans de phytostabilisation aidée, les sulfures de Zn (ZnS) étaient complètement dissous en présence de plantes et que le Zn était immobilisé sous forme de phosphates et dans une

moindre mesure sous forme de phyllosilicates et hydrotalcites, plus stables que ZnS en conditions oxydantes ([Panfili et al., 2005](#)). A plus grande échelle en parcelle, l'addition du même amendement (TBS ; 5 % MS) dans un sédiment déposé à terre depuis 5 ans et principalement contaminé par du Zn et Cd a permis de réduire les fractions extractibles de ces métaux mesurées au $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,01 M) et de diminuer leur concentrations dans les parties aériennes d'une espèce dominante (*Calamagrostis epigejos*). Le TBS a également réduit l'écotoxicité du sédiment et amélioré la croissance de la population bactérienne totale ([Bert et al., 2012b](#)). Une étude récente a démontré que l'utilisation d'un amendement minéral basique proche du TBS (1 % MS) permettait de réduire le pool labile du Cu, la phytodisponibilité du Cu suite à une augmentation de pH ([Le Forestier et al., 2017](#)). Selon les facteurs abiotiques et biotiques, ces mécanismes peuvent évoluer dans le temps ([Kumpiene et al., 2008](#); [O'Day and Vlassopoulos, 2010](#)). Pour vérifier la pérennité de l'efficacité des amendements, il est nécessaire de conduire des essais sur le long terme.

1.3.2.4.2. Immobilisation biologique des EPT par les mycorhizes

La majorité des plantes terrestres vit en symbiose avec des champignons mycorhiziens, qui jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes. En s'associant aux racines des plantes, ces champignons forment des mycorhizes qui deviennent le siège d'échanges de ressources nécessaires à leur croissance : les champignons fournissent des éléments nutritifs (notamment N et P) à la plante, qui en retour, fournit des composés carbonés issus de la photosynthèse ([Smith and Read, 2008](#); [van der Heijden et al., 2015](#)). L'acquisition et le transfert des nutriments sont assurés par des réseaux mycéliens formés par les hyphes des champignons (filaments à structure cellulaire) capables d'explorer de grands volumes de sols. Cette relation symbiotique permet ainsi d'améliorer la nutrition de ces différents organismes et de stimuler la croissance des plantes ([Garbaye, 2013](#); [Van Der Heijden and Horton, 2009](#)). Les mycorhizes permettent également aux plantes de mieux s'adapter à divers stress biotiques (pathogènes) et abiotiques (sécheresse, contaminants) ([Cicatelli et al., 2014](#); [van der Heijden et al., 2015](#)). Il existe différents types de mycorhizes dont les mycorhizes à arbuscules (MA) et les ectomycorhizes (ECM), qui se distinguent par leurs structures et leurs fonctions ([van der Heijden et al., 2015](#)). La **Figure 1. 7** illustre ces différentes associations mycorhiziennes.

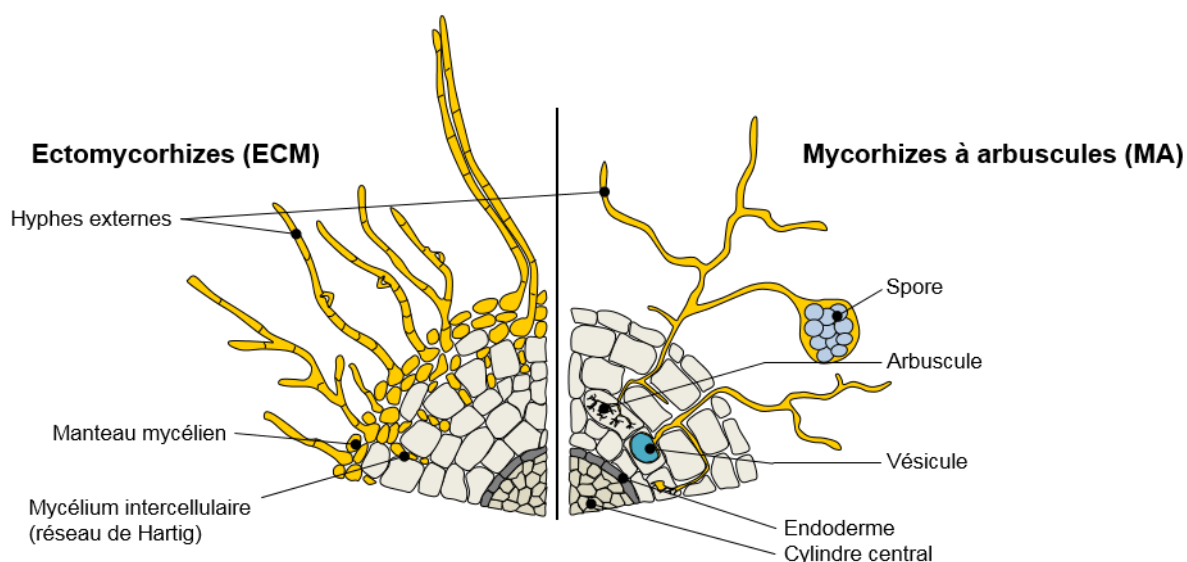


Figure 1.7 : Ectomycorhizes (à gauche) et mycorhizes à arbuscules (à droite) représentées sur une coupe transversale de racine, d'après Selosse and Le Tacon (1998).

▪ Les mycorhizes à arbuscules (MA)

Les MA se forment à partir de champignons endomycorhiziens appartenant à la division des Gloméromycètes. Ils se développent à l'intérieur des cellules corticales des racines dans lesquelles ils créent des structures finement ramifiées appelées « arbuscules » qui permettent les échanges métaboliques. Il se forme également des vésicules, des structures intra- ou intercellulaires qui contiennent des lipides ; cependant leur fonction n'a pas été clairement définie. Les hyphes peuvent se développer à l'extérieur de la racine pour acquérir des nutriments et disséminer des spores pour leur reproduction. La germination des spores (émission d'hyphes) est induite par des racines se trouvant à proximité. En l'absence de racines, la croissance du champignon s'arrête, d'où le caractère strictement symbiotique des Gloméromycètes ([Garbaye, 2013](#); [Selosse and Le Tacon, 1998](#)). Les champignons endomycorhiziens sont capables de coloniser une grande diversité de plantes herbacées et ligneuses. De ce fait, les MA sont considérées comme les plus répandues dans l'environnement ([van der Heijden et al., 2015](#)).

▪ Les ectomycorhizes (ECM)

Les ECM se forment à partir de champignons ectomycorhiziens appartenant principalement à la division des Ascomycètes et Basidiomycètes. Contrairement aux MA, ces mycorhizes ne pénètrent pas dans les cellules corticales mais forment un manteau (ou une gaine) de mycélium autour de la racine et se développent entre les parois des cellules racinaires, formant ainsi le « réseau de Hartig » qui constitue l'interface symbiotique entre les champignons et la plante hôte. Ces mycorhizes se forment majoritairement chez les arbres de forêts tempérées (Pinacées et Angiospermes) ([Selosse and Le Tacon, 1998](#); [van der Heijden et al., 2015](#)).

Les champignons mycorhiziens sont peu spécifiques car beaucoup d'entre eux peuvent s'associer à différentes espèces de plantes. Dans les forêts tempérées, un même mycélium ectomycorhizien peut, par exemple, s'étendre sur une surface de plus de 100 m² et s'associer avec les racines de tous les arbres qui s'y trouvent ([Garbaye, 2013](#)). Par ces réseaux mycéliens, les champignons mycorhiziens peuvent occasionner des interactions de facilitation entre les plantes ; en créant des conditions favorables à certaines plantes, ces dernières peuvent à leur tour favoriser la croissance d'autres plantes de la même espèce ou non, ce qui influence par conséquent la diversité des communautés végétales ([Van Der Heijden and Horton, 2009](#)). Cependant, l'influence des champignons mycorhiziens sur la diversité des communautés végétales semble être très variable selon les espèces végétales et les types de mycorhizes formés. Les champignons peuvent en effet diminuer la diversité végétale en s'associant avec les plantes dominantes ou au contraire, augmenter la diversité végétale en s'associant avec des plantes peu abondantes ([Van Der Heijden and Horton, 2009](#)).

En lien avec ces processus interactifs dans le sol, le concept de réseau mycorhizien est développé depuis quelques années ([Simard et al., 2012](#)). Les réseaux mycorhiziens sont considérés comme des systèmes adaptatifs complexes (écosystèmes), car ils offrent des possibilités de rétroactions et d'interactions inter-échelles qui mènent à l'auto-organisation et aux propriétés émergentes dans les écosystèmes. Entre autres, ces réseaux peuvent faciliter la survie précoce des plantes et accroître leurs capacités de croissance et de défense.

Pour réduire la toxicité des métaux et métalloïdes dans les sols, les champignons mycorhiziens ont développé divers mécanismes de tolérance et de résistance ([Meharg, 2003](#)). Il a été démontré que les champignons mycorhiziens améliorent la croissance des plantes et leur résistance à la toxicité produite par les EPT, affectant leur phytodisponibilité dans le sol, leur absorption par les plantes et leur translocation vers les parties aériennes ([Meier et al., 2012a](#)). Dans la rhizosphère, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sécrètent de fortes quantités de glycoprotéines insolubles appelées glomalines capables de complexer des EPT tels que Cu, Pb et Cd ([González-Chávez et al., 2004](#)). En cas de carence en Fe dans le sol, certains champignons ectomycorhiziens (CEM) sécrètent des sidérophores, des molécules qui chélatent le Fe et qui complexent également d'autres éléments tels que le Cd, Cu, Pb et Zn. Cependant, les effets peuvent être très variables selon les espèces végétales et les propriétés chimiques des sols (concentrations en EPT, pH) car la présence de sidérophores peut aussi bien limiter et accroître l'absorption des EPT par les plantes ([Rajkumar et al., 2012](#)).

Chez certaines plantes mycorhizées (ex. peuplier), le stress métallique induit l'activation de protéines appelées métallothionéines ([Cicatelli et al., 2014](#)) qui complexent les EPT et

entraînent leur accumulation dans les racines. Les voies de séquestration des EPT ont bien été identifiées chez les champignons ectomycorhiziens ; ils font intervenir des mécanismes intracellulaires comme par exemple la chélation par les métallothionéines ([Bellion et al., 2007](#); [Reddy et al., 2016](#)) ou le stockage vacuolaire ([Blaudez and Chalot, 2011](#)). Les EPT peuvent également être séquestrés dans le réseau mycélien des champignons mycorhiziens à arbuscule (CMA) afin de réduire la toxicité des contaminants et favoriser la croissance des plantes hôtes. En limitant ainsi la translocation d'EPT vers les parties aériennes des plantes, les mycorhizes agissent alors comme des filtres biologiques ([Cabral et al., 2015](#); [Rajkumar et al., 2012](#)). Une expérience en pot a été réalisée pour examiner l'effet de l'inoculation avec des CMA (provenant d'un sol pollué par du Pb) sur la colonisation mycorhizienne racinaire, la survie, la croissance et la production en volume de peupliers noirs et blancs cultivés sur des sols pollués (Pb) et non pollués ([Salehi et al., 2016](#)). L'inoculation mycorhizienne a amélioré la croissance, la survie et la productivité des peuplier blanc sur sol pollué.

Cependant, les effets des mycorhizes sur les EPT varient selon les espèces végétales, les espèces fongiques associées, les types d'EPT et leurs concentrations ([Cicatelli et al., 2014](#)). Le potentiel des mycorhizes en phytostabilisation aidée a largement été étudié en conditions contrôlées (pot) et il existe encore peu d'expérimentations au champ alors que les interactions entre le sol, les plantes, les champignons mycorhiziens en conditions réelles sont bien plus complexes ([Cabral et al., 2015](#); [van der Heijden et al., 2015](#)). Pour évaluer plus efficacement la performance des inoculants mycorhiziens en phytomanagement, la mise en place d'essais au champ est donc indispensable ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)).

1.3.3. La valorisation économique de la biomasse : un enjeu majeur pour les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués

D'un point de vue économique, les phytotechnologies sont souvent considérées comme moins coûteuses que les méthodes conventionnelles ([Conesa et al., 2012](#); [Cundy et al., 2013](#)). Les coûts peuvent être très variables d'un site à l'autre car les pratiques agricoles (choix des plantes et des amendements, fertilisation, irrigation, gestion des adventices, etc.) vont dépendre des conditions pédoclimatiques du milieu et de la nature des polluants. En France, selon une analyse coûts-bénéfices réalisée par le BRGM ([Colombano et al., 2010](#)), la mise en place des phytotechnologies (phytoextraction et phytostabilisation) avait été chiffrée entre 2 et 40 €/m² de surface de sols traités. Ces coûts étaient relativement faibles comparés à des méthodes physiques et chimiques réalisées *in situ* (confinement, stabilisation) ou *ex situ* (excavation, lavage). Sur la base de frais réellement investis, les coûts de mise en œuvre de différentes modalités de phytostabilisation s'élevaient entre 0,49 et 3 €/m² ([Bert et al., 2012a](#)). Le recours aux phytotechnologies est souvent évoqué lors des opérations de réhabilitation de friches

industrielles ou urbaines, mais rarement concrétisé par manque de retours d'expérience. En 2010, seulement 0,3 % des volumes de terres étaient traitées par les phytotechnologies selon [Ernst & Young \(2012\)](#). Pour renforcer l'attractivité et l'acceptabilité de ces techniques, la valorisation économique du foncier via la production de biomasse est indispensable tout comme les pratiques agricoles qui tendent à réduire le transfert des EPT dans la chaîne alimentaire et à améliorer la production de biomasse valorisable dans des filières non alimentaires (production d'énergie, récupération de métaux, bioraffineries) : c'est le concept de phytomanagement ([Conesa et al., 2012](#); [Evangelou et al., 2012](#); [Kidd et al., 2015](#); [Mench et al., 2010](#)).

Au niveau européen, un certain nombre de sites pilotes ont fait l'objet d'études approfondies pour évaluer la performance et la pertinence des phytotechnologies à grande échelle et sur le long terme ([Andersson-Sköld et al., 2014](#); [Kidd et al., 2015](#); [Ruttens et al., 2011](#); [Van Slycken et al., 2013](#); [Witters et al., 2012](#)). La mise en place de ces sites s'appuie pour la plupart sur des itinéraires techniques déjà existants. Pour des dispositifs dédiés à la production de biomasse ligneuse, les arbres à croissance rapide (ex. saules et peupliers) sont généralement plantés en TCR ou TCCR ([Bert et al., 2012a](#); [Ciadamidaro et al., 2017](#); [Kidd et al., 2015](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)). La plupart de ces travaux se placent dans le contexte de la directive 2009/28/CE relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables. Elle mentionne notamment la possibilité d'exploiter des cultures énergétiques sur des sols contaminés en accordant un bonus d'émission de gaz à effet de serre. Dans le cadre du projet européen GREENLAND, l'étude de sept sites pilotes a permis le développement d'outils de suivi sur la base de tests chimiques et écotoxicologiques afin d'évaluer l'efficacité des phytotechnologies ([Kumpiene et al., 2014](#)). Par ailleurs, des études approfondies sur différentes filières de valorisation de la biomasse issue des phytotechnologies ont également été menées ces dernières années ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Delplanque et al., 2013](#); [Witters et al., 2012](#)). Cependant, le contexte réglementaire peut représenter un frein à l'intégration des biomasses enrichies aux EPT (concentrations en EPT supérieures à celles habituellement mesurées dans une végétation similaire poussant sur des sols non contaminés) dans les filières de valorisation existantes. La création de nouvelles filières pour la valorisation de la biomasse issue des phytotechnologies (ex. : chimie verte ([Grison, 2015](#))) pourrait donc permettre de lever les verrous techniques et économiques, et permettre l'entrée des phytotechnologies de manière opérationnelle sur le marché de la gestion et du traitement des sols pollués.

1.4. Application du phytomanagement à grande échelle : les projets BIOFILTREE, PHYTOSED 2 et DEMOPHYTO

Deux essais de phytostabilisation aidée couplée à la valorisation de la biomasse en bois énergie ont été mis en place dans le cadre des projets BIOFILTREE (ANR, 2011-2014 ; **site A**) et PHYTOSED 2 (2011-2014 ; **site B**) sur un ancien terrain de gestion de sédiments de curage (TD 107) appartenant à VNF et localisé à Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France) (**Figure 1. 8**). L'objectif principal de ces deux projets était d'évaluer la performance du phytomanagement dans des conditions réelles, à grande échelle (1 ha par site) et sur le long terme. Le projet BIOFILTREE comprend également deux autres dispositifs expérimentaux similaires à celui de Fresnes-sur-Escaut, localisés à Pierrelaye ([Ciadamidaro et al., 2017](#)) et Tavaux ([Durand et al., 2018](#); [Durand et al., 2017](#)). Mes travaux de thèse se sont déroulés sur les deux sites A et B existants à Fresnes-sur-Escaut dans le cadre du projet DEMOPHYTO (ADEME-VNF, 2014-2017).

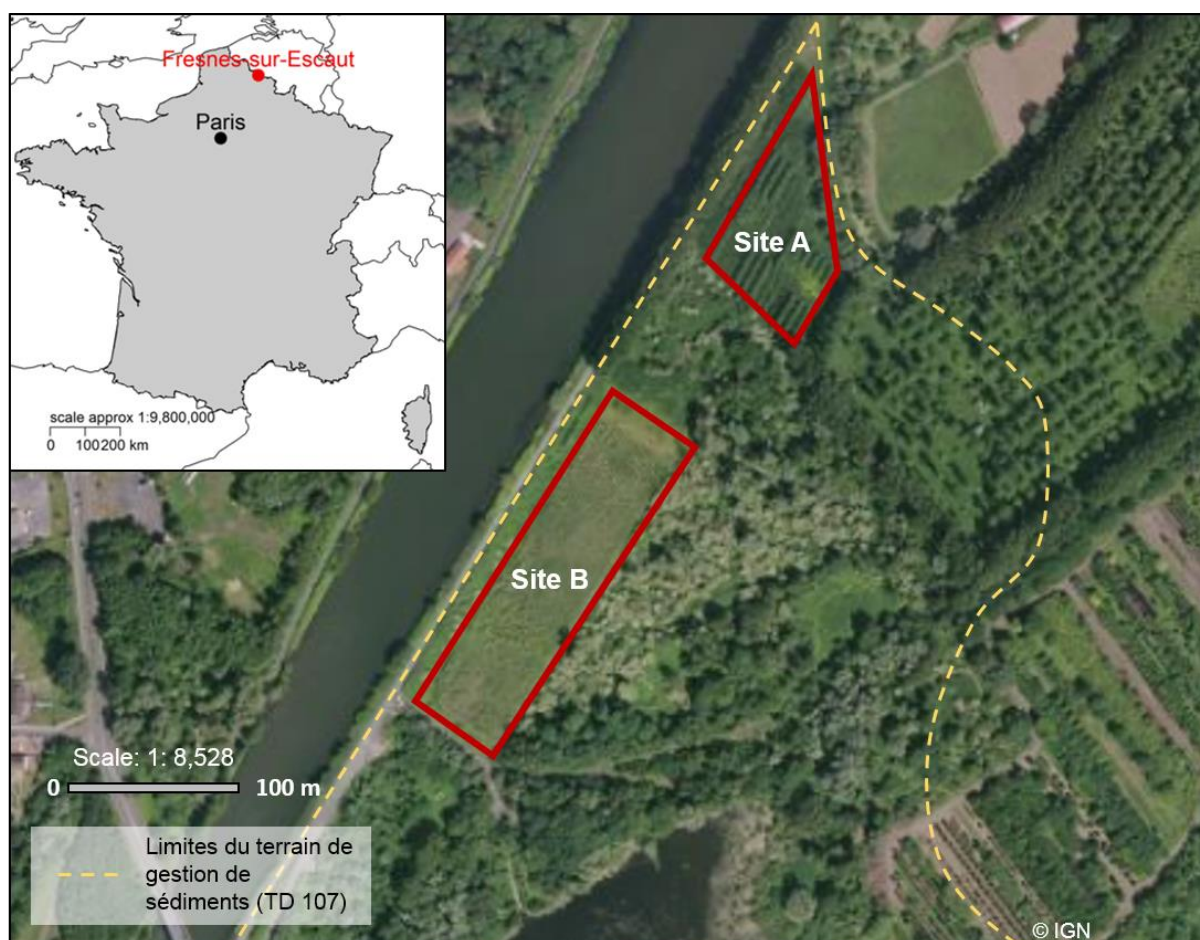


Figure 1. 8 : Vue aérienne des dispositifs expérimentaux (site A et B) localisés à Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France).

1.4.1. Description du terrain de gestion de sédiments de curage (TD 107)

Le terrain de gestion de sédiments qui accueille les deux dispositifs a été créé en 1978. Près de 200 000 m³ de limons et de sables issus du curage d'élargissement du bief de Fresnes ont été déposés sur le site. En 1989, un second dépôt de 20 000 m³ de vases issues du curage d'entretien du bief de Fresnes a également été réalisé (AIRELE, 2010). Ce terrain avait révélé une contamination en As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn au niveau des horizons de surface (0-50 cm). Les concentrations totales de ces EPT sont présentées dans le **Tableau 1. 5**. Compte tenu de l'absence de contaminants dans la nappe, les risques sur la ressource en eau ont été écartés. Les deux dispositifs de phytostabilisation aidée ont été implantés dans la zone la plus contaminée (**Tableau 1. 5**), où des risques sanitaires avaient été identifiés en cas de promenade (AIRELE, 2010). D'autres critères importants avaient également été pris en compte pour l'installation des sites A et B sur le terrain de gestion : il présentait une topographie plane, était facilement accessible par les engins motorisés via le chemin de halage et pouvait être mis à disposition pour plus de 4 ans (Delplanque, 2010).

Tableau 1. 5 : Concentrations totales en EPT (mg/kg MS) mesurées dans les sédiments du TD 107 (0-50cm). Les concentrations en EPT d'un sol local et les valeurs seuil S1⁵ sont également indiquées (AIRELE, 2010).

EPT	Ensemble du TD 107	Zone la plus contaminée	Sol non contaminé	Seuil S1
As	<4 - 67	45	7,9	30
Cd	<0,4 - 12	8,0	0,4	2
Cu	9,6 - 130	106	25	100
Ni	15 - 52	39	19	50
Pb	20 - 1 200	750	45	100
Zn	70 - 9 300	5 500	160	300

1.4.2. Le site A

1.4.2.1. Mise en place du dispositif expérimental

Le site A a été mis en place dans le cadre du projet BIOFILTREE en avril 2011. Il repose sur l'utilisation de peupliers inoculés par des champignons endo- et ectomycorhiziens pour réduire les transferts d'EPT dans les parties récoltables des arbres. Dans un objectif de valorisation de la biomasse en bois énergie, deux cultivars de peupliers à croissance rapide et à forte production de biomasse, Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) et I-214 (*Populus deltoides* x *P. nigra*) ont été sélectionnés. La sélection a pris en compte le fait que sur un ensemble de cultivars de peupliers testés dans le cadre du projet PHYTOPOP (Pottier et al., 2015), ces cultivars étaient les moins

⁵ Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux.

accumulateurs de Cd et de Zn. Le dispositif expérimental est divisé en 32 parcelles (12 x 18 m) comportant chacune 48 peupliers (2 200 arbres/ha) inoculés ou non inoculés (**Figure 1. 9**). Les arbres ont été plantés en taillis à courte rotation (récolte tous les 5-7 ans), à partir de plançons sans racines de 1,5 m. En plus des 32 parcelles, une parcelle non plantée (F33) a été sélectionnée pour étudier les effets des arbres sur les propriétés physico-chimiques et biologiques dans le sol. Aucune plante herbacée n'a été sélectionnée pour recouvrir le sol. Pour garantir un développement optimal des peupliers, un débroussaillage a été réalisé pendant les deux premières années.

1.4.2.2. Les plantes sélectionnées : les cultivars de peupliers I-214 et Skado

Le genre *Populus* regroupe une trentaine d'espèces appartenant à la famille des Salicacées. L'aire de répartition naturelle du peuplier s'étend dans toutes les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord, au niveau de zones humides, de vallées, de plaines alluviales temporairement inondées ou à proximité de cours d'eau. En Europe, on retrouve principalement *P. alba* (peuplier blanc), *Populus tremula L.* (peuplier tremble) et *P. nigra* (peuplier noir) dans les milieux naturels ([Doré and Varoquaux, 2006](#)). Le peuplier est également cultivé en TCR/TTCR pour la production de bois ([Lignoguide, 2013](#)). Il est capable de tolérer des sols fortement contaminés en EPT et peut accumuler des concentrations importantes en Cd et en Zn ([Migeon et al., 2009](#); [Pottier et al., 2015](#)). Des études ont également mis en évidence qu'une augmentation par 10 de la concentration en ETM dans le sol n'affecte généralement pas sa croissance (projet PHYTOPOP ; [Laureysens et al. \(2004\)](#)).

1.4.2.3. L'amendement : les champignons mycorhiziens

Un mélange de champignons ecto- et endomycorhiziens commercialisés par les sociétés Agronutrition (Toulouse, France) et Symbiom (République tchèque) a été utilisé pour réduire le transfert des EPT dans les parties récoltables des peupliers. Les souches utilisées sont les suivantes :

- **Champignons endomycorhiziens** : *Rhizophagus intraradices* BEG140, *Funelliformis mosseae* BEG95, *F. geosporum* BEG199, *Claroideoglossum claroideum* BEG96, *C. etunicatum* BEG92, *Glomus microaggregatum* BEG56, *Rhizophagus irregulare* DAOM1971989.
- **Champignons ectomycorhiziens** : *Hebeloma mesophaeum*, *Amanita rubescens*, *Laccaria proxima*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus arrhizus* and *Scleroderma citrinum*.

L'inoculum a été ajouté au pied des plançons au moment de la plantation des peupliers. Chaque arbre a ainsi reçu 26 000 propagules de champignons mycorhiziens ([Ciadamidaro et al., 2017](#)).

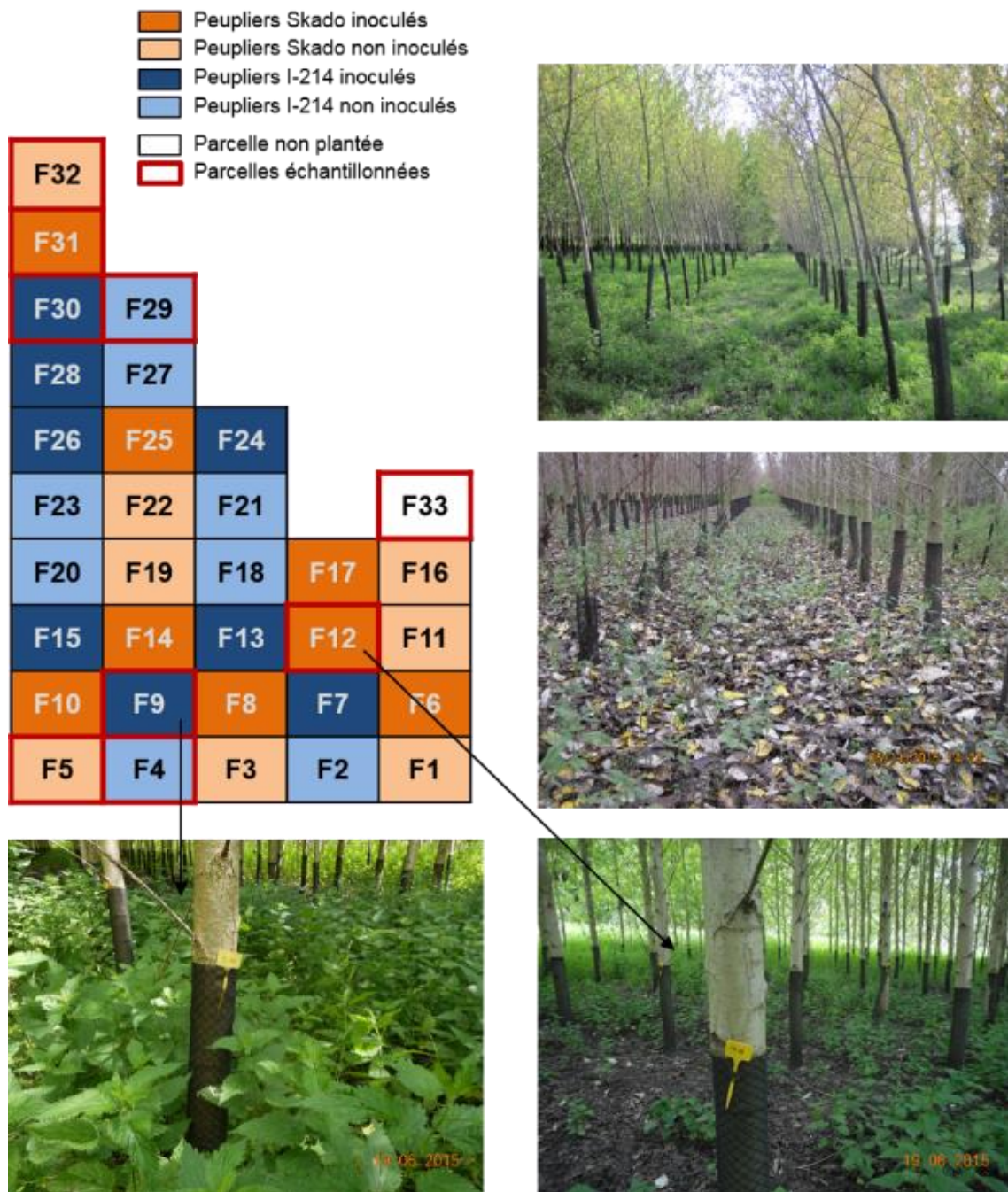


Figure 1. 9 : Schéma et photos du dispositif expérimental du site A.

1.4.3. Le site B

1.4.3.1. Mise en place du dispositif expérimental

Avant la mise en place du dispositif, un inventaire de la faune et de la flore avait été réalisé pour s'assurer du faible impact environnemental du projet. Parmi les espèces végétales identifiées, la plante invasive *Fallopia japonica* (Renouée du Japon, famille des Polygonacées) avait été localisée à différents endroits du site ([Bourdon, 2011](#)). Cette plante se développe très rapidement à partir de ses tiges et rhizomes et peut créer un réseau souterrain dense pouvant descendre à plus de 2 m de profondeur et s'étendre latéralement jusqu'à 20 m. En surface, ses tiges aériennes peuvent atteindre 3 m de hauteur au printemps ([Dommaget et al., 2015](#)). A cause de sa vitesse de propagation élevée et de son caractère très compétitif vis-à-vis des autres plantes ([Schnitzler and Muller, 1998](#)), sa présence peut représenter un frein pour le succès du phytomanagement si elle n'est pas prise en charge régulièrement. Lors des premières opérations, les tiges de *F. japonica* ont été sectionnées puis stockées en dehors du site ([Bourdon, 2011](#)). Pour limiter et réduire sa propagation, ses tiges sont coupées deux fois par an, au printemps et à l'automne.

Pour réduire l'exposition aux EPT, l'utilisation conjointe d'un amendement minéral basique (Optiscor®, Carmeuse France) et d'une espèce herbacée, *Deschampsia cespitosa* (canche cespiteuse, var. *Barcampsia cespitosa*, Grainor S.A., France), a été testée sur une surface d'un hectare ([Bert et al., 2012a](#); [Kidd et al., 2015](#)). L'amendement a été incorporé dans les 25 premiers cm du sol en octobre 2011 (9 t MS/ha, soit 0,2 %), 4 jours avant le semis de *D. cespitosa* à forte densité (40 g/m²). La dose d'amendement a été choisie suite à des expériences en pot en tenant compte des pratiques agricoles et de l'optimum écologique des espèces végétales sélectionnées ([Bourdon, 2011](#)). L'amendement minéral basique a été choisi sur la base de travaux antérieurs menés sur du sédiment excavé contaminé par les EPT depuis 2000 en pots (projet PHYTODEC ; FP5 et ADEME, 2000-2004) et depuis 2002 dans le cadre d'un essai en parcelles mené en conditions réelles (projets PHYTODEC, PHYTOSTAB et PHYTOSED ; FP5 et ADEME, 2002-2014). Ces travaux avaient mis en évidence l'efficacité du TBS (5 % MS) pour la phytostabilisation aidée (diminution des concentrations en Cd et en Zn extractibles dans le sédiment et dans les parties aériennes d'espèces végétales) ([Panfili et al., 2005](#)). Les arbres sélectionnés pour la production de bois énergie sont deux cultivars commerciaux de saule, Inger (*Salix triandra* x *S. viminalis*) et Tordis ((*Salix schwerinii* x *S. viminalis*) x *S. vim.*). En mars 2012, près de 11 100 plançons de saules sans racines de 2 m ont été plantés en TTCR, répartis dans 18 parcelles amendées et semées avec *D. cespitosa* (33,3 x 16,6 m), 4 parcelles non amendées (5 x 5 m) dont 2 parcelles semées avec *D. cespitosa* et 2 parcelles sans végétation herbacée (désherbage réalisé manuellement deux fois par an). Un schéma du dispositif est représenté sur la **Figure 1. 10**. Par ailleurs, nous avons émis

l'hypothèse que la croissance et la vigueur de la plante invasive *F. japonica* pouvait être limitée par une compétition avec *D. cespitosa*, par des tontes régulières du couvert herbacé et à une compétition avec les saules pour la lumière ([Schnitzler and Muller, 1998](#); [Seiger and Merchant, 1997](#)).

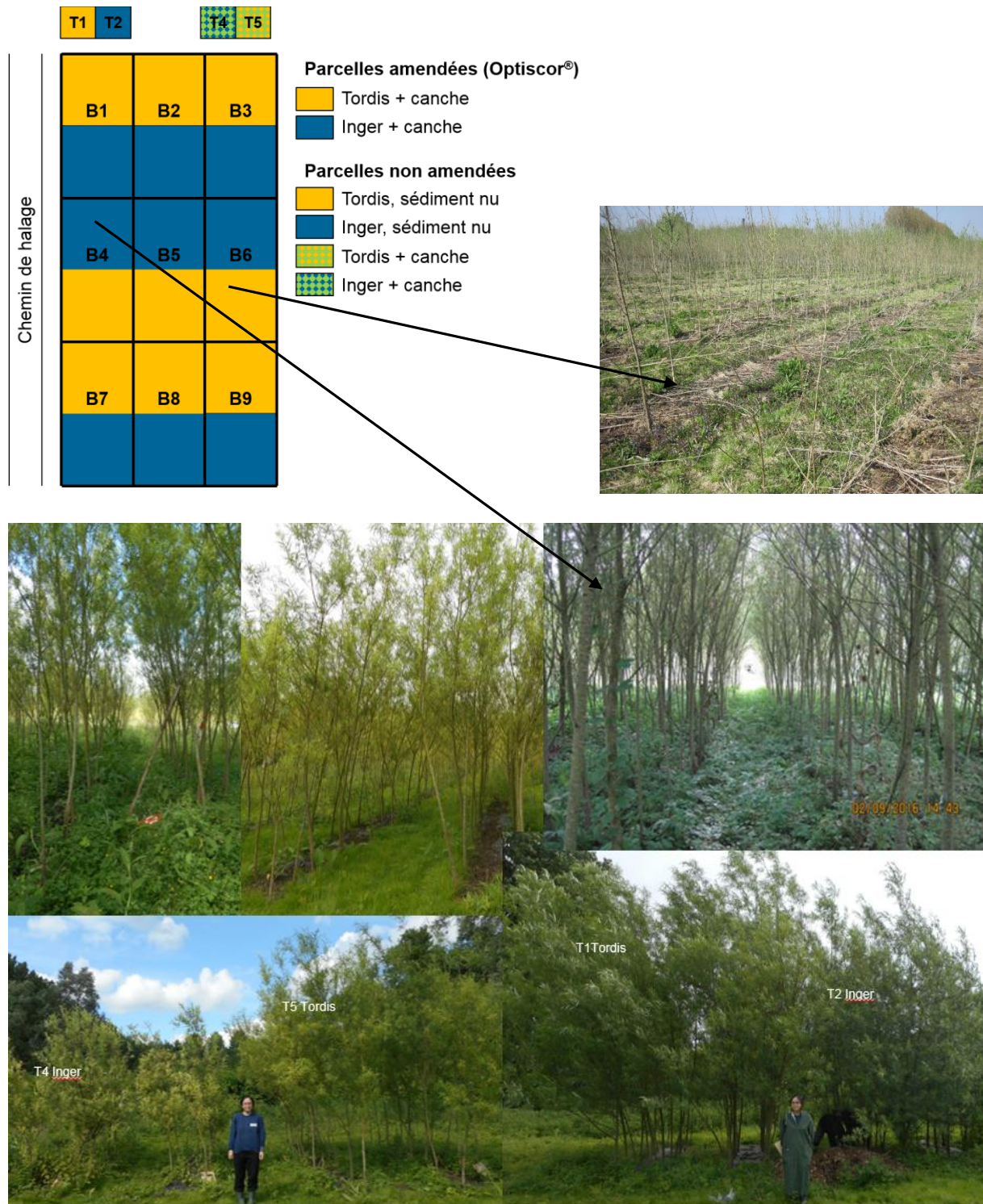


Figure 1. 10 : Schéma et photos du dispositif expérimental mis en place sur le site B.

1.4.3.2. L'amendement minéral basique (Optiscor®)

L'amendement minéral basique Optiscor® est un sous-produit de l'industrie sidérurgique proposé en agriculture pour améliorer les propriétés physico-chimiques des sols. Cet amendement commercial a été fourni par la société Carmeuse France. L'utilisation de ce type d'amendement est encadrée par la norme [NF U44-001 \(2009\)](#), qui fixe les teneurs en certains EPT à respecter. Les phases minérales minoritaires et majoritaires sont présentées dans le **Tableau 1. 6**. Sur le court terme, l'hydratation de la chaux devrait augmenter le pH en libérant des ions OH⁻, rendant ainsi le milieu basique. En milieu aqueux, les ions OH⁻ vont avoir tendance à arracher les atomes d'hydrogène présents à la surface des solides comme la MO (déprotonation). Ce phénomène va créer des espaces attractifs pour les cations métalliques favorisant ainsi leur adsorption. Les cations métalliques vont se fixer sur les hydroxydes de calcium Ca(OH)₂ (portlandite) et les carbonates de calcium CaCO₃ (calcite) apportés par l'amendement. Ces composés développent une importante surface spécifique sur laquelle les métaux vont pouvoir se fixer. Sur le long terme, les silicates présents sous forme de Ca₂SiO₄ (larnite) et Ca₃SiO₅ (silicate tricalcique) vont également s'hydrater et former des molécules ayant des structures dites « en feuillets ». Les cations métalliques en milieu aqueux vont alors pouvoir s'insérer entre les feuillets ou se substituer à certains atomes déjà présents et seront alors immobilisés ([Bourdon, 2011](#)).

Tableau 1. 6 : Composition d'un échantillon d'Optiscor® (Proportions des phases calculées par la méthode Rietveld).

		Formule chimique	Proportions (% massiques de l'échantillon)	Remarques
Phases majoritaires	Larnite	Ca ₂ SiO ₄	38	Composé anhydre sous sa forme bêta
	Magnésio wuestite	(MgO) _{0,239} (FeO) _{0,761}	23	Solution solide de magnésium et de fer
	Alumino Ferrite de Calcium (Brownmillerite)	Ca ₂ Fe _{1,52} Al _{0,48} O ₅	18	Solution solide de fer et d'aluminium
	Portlandite	Ca(OH) ₂	13	Composé issu de l'hydratation de la chaux libre
Phases minoritaires	Chaux libre	CaO	5	-
	Silicate tricalcique	Ca ₃ (SiO ₄)O	2	-
	Calcite	CaCO ₃	1	Composé issu de la carbonatation de la chaux libre

1.4.3.3. Les plantes sélectionnées

- ***D. cespitosa***

D. cespitosa (canche cespiteuse) est une espèce herbacée pérenne de la famille des *Poaceae*, qui se développe dans des zones humides et forestières ([Streeter, 2011](#)). C'est une plante métalphyte facultative, c'est-à-dire qu'elle s'adapte aussi bien sur des sols contaminés en métaux et métalloïdes que sur des sols non contaminés ([Prasad, 2001](#)). Différentes études ont rapporté sa tolérance à plusieurs EPT tels que Al, As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn ([Coulaud and McNeilly, 1992](#); [Cox and Hutchinson, 1980](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Meharg and Macnair, 1991](#); [Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)). De plus, il a été démontré que sur des sols contaminés colonisés par *D. cespitosa*, celle-ci était capable de limiter la translocation d'ETP tels que Cu, Ni et Zn dans ses parties aériennes ([Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)). Considérée comme non appétente ([Langer and Hill, 1991](#)), la contamination de la chaîne alimentaire par son ingestion semble peu probable. Cependant, son potentiel pour la phytostabilisation a été peu exploité ([Bert et al., 2012b](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)). Le choix d'étudier *D. cespitosa* sur le site B est issu des travaux réalisés sur du sédiment excavé contaminé par les EPT de puis 2000 en pots (projet PHYTODEC ; FP5 et ADEME, 2000-2004) et depuis 2002 dans le cadre d'un essai en parcelles menée en conditions réelles (projets PHYTODEC, PHYTOSTAB et PHYTOSED ; FP5 et ADEME, 2002-2014) qui a révélé le potentiel de *D. cespitosa* en combinaison avec un amendement minéral basique (TBS, 5 %) pour la phytostabilisation aidée (couvert végétal dense, système racinaire important, très faible translocation des EPT dans les parties aériennes, diminution de la lixiviation).

- **Les cultivars de saule Inger et Tordis**

Comme le peuplier, le saule (*Salix* spp.) fait partie de la famille des Salicacées. Il est principalement réparti dans les zones fraîches et humides des régions tempérées et froides de l'hémisphère nord ([Lignoguide, 2013](#)). Il est peu exigeant vis-à-vis du sol mais se développe plus facilement dans des sols profonds dont le pH est compris entre 5,5 et 6,5 ; néanmoins il peut tolérer un pH basique jusqu'à 8 ([Bourdon, 2011](#); [CREFF, 2012](#)). Egalement capable de tolérer des milieux contaminés aux EPT ([Pulford and Watson, 2003](#); [Van Slycken et al., 2013](#)), le saule avait été identifié lors de l'inventaire floristique réalisé avant la mise en place du site. Plusieurs espèces (ex. *S. viminalis*, *S. alba*, *S. cinerea*, *S. caprea*) peuvent en effet être rencontrées sur des terrains de dépôt de sédiments de curage contaminés ([Bert et al., 2012b](#); [Vandecasteele et al., 2002](#); [Vandecasteele et al., 2004](#)). En France, le saule est principalement cultivé en TTCR pendant une vingtaine d'années, avec un cycle de récolte de 3-4 ans. Dans ce système de culture, les saules sont généralement plantés à très haute densité (entre 10 000 et 15 000 tiges/ha). Les variétés sont sélectionnées pour leur rendement, leur capacité à produire de longues tiges sans ramification et

pour leur résistance au froid et à la rouille ([Lignoguide, 2013](#)). Les cultivars commerciaux (ou clones) Inger et Tordis développés en Suède, répondent à ces critères ([Agrobränsle, 2006](#)). Les articles scientifiques faisant mention de l'utilisation de ces cultivars en phytomanagement n'étant pas publiés au moment de la mise en place du dispositif expérimental, aucune information n'était disponible quant à leur capacité à accumuler les EPT. Les cultivars alors utilisés pour la phytoextraction ont été exclus des choix possibles (ex : *S. viminalis* ou cv. Tora). Malgré les résultats issus d'études récentes conduites au champ montrant que le cultivar Inger pouvait accumuler de fortes quantités de Cd et Zn ([Van Slycken et al., 2013](#)), son utilisation en phytostabilisation (aidée) n'est pas remise en cause d'après des analyses de risques rapportées par [Enell et al. \(2016\)](#). Comme le peuplier sur le site A, les saules Inger et Tordis ont été plantés pour produire du bois utilisable dans une filière énergétique.

CHAPITRE 2 : Effets de l'inoculation de champignons mycorhiziens sur la mobilité d'EPT dans le sol et leurs concentrations dans les feuilles de peupliers

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article. Il a été publié dans « Environmental and Experimental Botany » en septembre 2017 (volume 143, p. 72–81).

Il est disponible via le lien <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.08.012>.

Malgré de nombreuses études sur les phytotechnologies ([Mench et al., 2009](#); [Salt et al., 1995](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)), le recours à ces techniques est rare par manque de retours d'expérience *in situ* ([Cundy et al., 2013](#)). Afin de renforcer l'acceptabilité de ces techniques émergentes, les travaux de recherche se sont orientés vers le phytomanagement, qui vise à générer des bénéfices économiques via la valorisation de la biomasse issue des phytotechnologies ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Delplanque et al., 2013](#); [Evangelou and Deram, 2014](#); [Witters et al., 2012](#)). Dans ce contexte, l'utilisation de la phytostabilisation aidée pourrait permettre de limiter la dispersion des contaminants dans l'environnement via l'action de plantes et d'amendements ([Mench et al., 2010](#)). Pour valoriser le foncier, la culture de peupliers en TCR pour la production de bois énergie se présente comme une stratégie de phytomanagement pertinente ([Chalot et al., 2012](#); [Kidd et al., 2015](#); [Pulford and Watson, 2003](#); [Robinson et al., 2009](#)). La sélection de cultivars peu accumulateurs devrait limiter le transfert des contaminants dans la chaîne alimentaire et dans les produits issus de la conversion du bois ([Bert et al., 2017a](#); [Kidd et al., 2015](#)).

Pour améliorer la phytostabilisation, l'utilisation d'amendements biologiques tels que les champignons mycorhiziens peut être envisagée. En effet, la mycorhization peut conférer aux peupliers une tolérance accrue aux stress biotiques et abiotiques, qui leur permet d'avoir une meilleure croissance ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Cicatelli et al., 2014](#)). Cependant, le succès *in situ* de ce mode de gestion dépend des souches introduites ([Bell et al., 2015](#)) et des caractéristiques physico-chimiques des sites ([Foulon et al., 2016b](#)). En fonction des espèces végétales, les champignons mycorhiziens peuvent augmenter ([Cicatelli et al., 2014](#); [Sell et al., 2005](#)) ou réduire ([Bojarczuk and Kieliszewska-Rokicka, 2010](#); [Mrnka et al., 2012](#)) le transfert des EPT vers les parties aériennes de leur plante hôte. Cependant, la plupart de ces résultats se basent sur des études en pots et les études au champ sont rares ([Colpaert et al., 2011](#)). De plus, les essais en pots ne sont pas toujours transposables au champ puisque de nombreux facteurs géochimiques, climatiques et biologiques affectent le système étudié ([Kabata-Pendias, 2004](#)).

Pour le phytomanagement de sites contaminés, la capacité de certains champignons mycorhiziens à limiter ou filtrer les EPT au niveau des racines des arbres est une stratégie intéressante qu'il convient d'étudier *in situ*. Dans ce cadre, nous avons tenté d'évaluer l'influence de champignons ecto- et endomycorhiziens sur le transfert d'ETP dans les parties aériennes de deux peupliers hybrides, Skado (*Populus trichocarpa* x *P. maximowiczii*) et I-214 (*P. deltoides* x *P. nigra*) en conditions réelles et à grande échelle. Cette étude repose sur deux essais de 1 ha chacun, situés à Fresnes-sur-Escaut (59 - site A, dispositif présenté dans le chapitre 1) et Pierrelaye (95). Pour éviter la récolte précoce des arbres, notre étude s'est appuyée sur des analyses foliaires afin de déterminer si l'inoculation des champignons mycorhiziens pouvait effectivement réduire le transfert des EPT vers ces organes.

Les résultats obtenus montrent que les deux cultivars Skado et I-214 présentent des concentrations foliaires élevées en Cd et Zn comparées à des peupliers cultivés sur des sols non contaminés. Néanmoins, une diminution significative des concentrations foliaires en Zn, Cu, Pb et Cr a été observée chez le peuplier Skado inoculé dans les zones les plus contaminées après deux saisons de croissance. Aucune corrélation entre les concentrations foliaires et les concentrations extractibles au $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,01 M) n'a été détectée. Ces résultats suggèrent donc que la réduction des transferts d'EPT dans les feuilles de peuplier dépend à la fois du cultivar, de la nature de l'inoculum et des conditions physico-chimiques du sol. Compte tenu des concentrations en Cd et Zn dans les feuilles des peupliers, des mesures de gestion devront être mises en œuvre pour éviter la dispersion des contaminants après la chute des feuilles. Pour optimiser la réduction des transferts d'ETP dans les peupliers, d'autres combinaisons arbres/champignons mycorhiziens pourraient être testées.

2.1. Article 1: Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites

Phonethip Phanthavongsa ^{a,b}, Michel Chalot ^{b,c}, Arnaud Papin ^d, Laurence Lacercat-Didier ^c, Sébastien Roy ^e, Damien Blaudez ^f, Valérie Bert ^a

^a INERIS, Clean and Sustainable Technologies and Processes Unit, DRC/RISK, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^b Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6249 Laboratoire Chrono-environnement, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

^c Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^d INERIS, Analytical Ressources Unit, DRC/RISK, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^e Agronutrition SA, 436 rue Pierre et Marie Curie, 31670 Labège, France

^f Université de Lorraine, UMR CNRS 7360 Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Highlights

- Cd and Zn concentrations in leaves exceeded physiological values.
- PTE accumulation in poplar leaves was enhanced in more fertile soils.
- Mycorrhizal inoculation limited Zn, Cu, Pb and Cr accumulation in Skado leaves.
- The inoculum was effective in highly contaminated soils.

2.1.1. Abstract

Phytotechnologies for the management of lands contaminated with potentially toxic elements (PTEs) are considered as gentle alternatives to conventional remediation techniques. During the last few years, phytotechnologies have progressively shifted to phytomanagement, a concept that includes the valorization of the plant biomass produced on the contaminated site. This study aimed at evaluating the mid-term effect of ecto- and endomycorrhizal inoculation on the reduction of PTE mobility in soils and foliar accumulation by two poplar clones, Skado (*Populus trichocarpa* x *P. maximowiczii*) and I-214 (*P. deltoides* x *P. nigra*), dedicated to bioenergy purposes. The effects of inoculation were investigated in two large scale trials of 1 ha each. Poplars grown on highly contaminated soils accumulated excessive Cd and Zn in leaves compared with those planted on less contaminated soils, and the I-214 clone generally accumulated less PTEs than the Skado clone. Interestingly, the filtering capacity of mycorrhizal fungi was significant for Zn, Cu, Pb and Cr in Skado leaves only at the most contaminated areas after two growing seasons. These foliar concentrations were not correlated with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable concentrations in soils, suggesting that mycorrhizal fungi limited PTE translocation from roots to leaves without impacting PTE mobility in soils. Therefore, the reduction of PTE accumulation in poplar leaves may be optimized by selecting appropriate combinations of cultivars and inocula at specific PTE levels and soil conditions. Because Cd and Zn may pose a risk after leaf abscission and wood harvest, further research is needed to efficiently reduce Cd and Zn concentrations in poplar tissues. Otherwise, the phytomanagement of metal contaminated sites with poplars should include options to safely manage both leaves and wood.

2.1.2. Introduction

Since the 1990s, phytotechnologies are considered as an alternative to conventional remediation techniques ([Salt et al., 1995](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). They have been applied to manage sites contaminated by potentially toxic elements (PTEs), which may deeply alter the environment and human health through the food chain ([Järup, 2003](#); [Kabata-Pendias, 2004](#)). The last few years, phytotechnologies have progressively shifted to phytomanagement, a concept which included the valorization of the plant biomass produced on contaminated sites, to generate economic revenue ([Evangelou and Deram, 2014](#)). Although some valorization options have been deeply investigated and provided opportunities for such biomass ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Delplanque et al., 2013](#)) phytomanagement is still scarcely applied in European countries and suffer from lack of field experiment feedbacks ([Cundy et al., 2013](#)).

Among the different phytotechnologies that can be applied to large contaminated areas, aided phytostabilization aims at using plants and biological or chemical amendments to retain pollutants in soils via root uptake, chelation or reduction ([Mench et al., 2010](#)). Fast growing tree species such as willows and poplars have been suggested as suitable for phytostabilization due to their high biomass production and their wide-spreading root system which can protect soil surface from erosion ([Pulford and Watson, 2003](#)). In addition, this strategy is based on the selection of the less accumulating cultivars to avoid or limit the transfer of the contaminants in the food chain and in the end-products after wood conversion process ([Bert et al., 2017a](#)). Short rotation coppice (SRC) of inoculated poplars for bioenergy production in metal contaminated lands has been proposed as a phytomanagement strategy that may control environmental impacts and increase economic opportunities ([Chalot et al., 2012](#)).

Biological amendments such as mycorrhizal fungi have been for long envisaged as relevant microorganisms to help for restoration or improvement of derelict soils. Indeed, when associated with endomycorrhizal fungi, poplars exhibit enhanced tolerance to biotic and abiotic stress, with better growth and higher biomass production ([Cicatelli et al., 2014](#)). When plants are introduced for site restoration, the in-situ success of these plants will likely be depending on the recruitment of appropriate rhizosphere microorganisms from their new environment ([Bell et al., 2015](#)). In a recent study, we demonstrated that the occurrence and persistence of ectomycorrhizal symbionts were greatly driven by site characteristics ([Foulon et al., 2016a](#)). Mycorrhizal inoculation at plantation may be thus necessary, either to improve mycorrhizal infection when the local symbionts are lacking, or to improve the competitiveness and tolerance of the mycorrhizal microbiome.

Most studies to date have proposed adequate tree/ecto- or endo-mycorrhizal combinations to either increase ([Cicatelli et al., 2010](#); [Sell et al., 2005](#)) or decrease ([Bojarczuk and Kieliszewska-Rokicka, 2010](#); [Mrnka et al., 2012](#)) PTE transfer from soil to aboveground plant tissues. [Colpaert et al. \(2011\)](#) pointed out the fact that most of these studies were based solely on pots/greenhouse experiments and field studies remained scarce. It is admitted that extrapolation from laboratory/greenhouse to field is not reliable, since soil–plant transfer of PTEs is a complex process governed by geochemical, climatic, biological and anthropogenic factors ([Kabata-Pendias, 2004](#)). These data nevertheless highlighted the filtering potential of some mycorrhizal fungi, in some specific conditions such as elevated concentrations of PTEs. This filter function is an interesting feature of mycorrhizal fungi, when the phytomanagement approach aims at valorizing the aboveground biomass to increase economic opportunities. As metal concentrations in wood are generally lower than those in leaves ([Laureysens et al., 2004](#); [Madejón et al., 2004](#); [Robinson et al., 2000](#)), the determination of leaf metal concentrations is commonly used as non-destructive method to assess poplar metal uptake.

In a recent paper, we demonstrated that ecto- and endomycorrhizal inoculation significantly increased poplar biomass production at phytomanaged sites ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). In the present study, we hypothesized that the inoculation of poplars with these mycorrhizal fungi would reduce the transfer of PTEs from soil to the aboveground parts of the trees. The aim of this paper was to investigate, at field scale, the impact of mycorrhizal inoculation on the foliar accumulation of trace and major elements of two hybrid poplars Skado (*Populus trichocarpa* x *P. maximowiczii*) and I-214 (*P. deltoides* x *P. nigra*), grown at two different PTE-contaminated sites. The paper discusses the results from an applied point of view and provides recommendations for phytomanagement improvement.

2.1.3. Materials and methods

2.1.3.1. Site description

Two field sites of 1 ha each located in Pierrelaye (Ile-de-France, France, 49°01'47.4''N 2°10'29.2''E) and Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France, France, 50°25'47.9''N 3°35'07.8''E) were set up in February and April 2011, respectively. The Pierrelaye site was formerly used for market gardening and was irrigated with raw wastewater in the end of the 19th century, for more than 100 years. These inputs led to an enrichment of PTEs such as Zn, Pb, Cd and Cu in top surface ([Lamy et al., 2006](#)). The Fresnes-sur-Escaut site (Fresnes further in the text) was established on a metal contaminated dredged sediment landfill site, operating between 1978 and 1989. The two sites were under the same temperate climatic conditions, with average annual temperatures of 10.8-10.9°C and average annual rainfall ranging between 639 and 743 mm ([Météofrance, 2016](#)).

The experimental designs of the two sites are presented in **Figure 2. 1**. Thirty-two plots of 12 m × 18 m each were planted with 1.5 m length unrooted cuttings of the two poplar clones, Skado (*Populus trichocarpa* × *P. maximowiczii* section *Tacahamaca*) and I-214 (*P. deltoides* × *P. nigra* section Aigeiros), at a spacing of 1.8 m × 2.75 m with a plant density of 2,200 trees ha⁻¹ (Ciadamidaro et al., 2017). These two clones were selected for their high biomass production and reduced PTE accumulation in their harvestable parts according to the Phytopop project (Pottier et al., 2015). Half of the trees were inoculated with a mixture of endomycorrhizal (*Rhizophagus intraradices* BEG140, *Funelliformis mosseae* BEG95, *F. geosporum* BEG199, *Claroideoglossum claroideum* BEG96, *C. etunicatum* BEG92, *Glomus microaggregatum* BEG56, *Rhizophagus irregular* DAOM1971989) and ectomycorrhizal (*Hebeloma mesophaeum*, *Amanita rubescens*, *Laccaria proxima*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus arrhizus* and *Scleroderma citrinum*) strains. The inoculum was spread at the foot of the cuttings, at the moment of plantation. Each tree received 26,000 propagules of ectomycorrhizal and endomycorrhizal fungi, the latest being dominant in the mixture following the manufacturers' recommendations (Ciadamidaro et al., 2017). One additional plot in each site was left unplanted and used as control (P33 and F33).

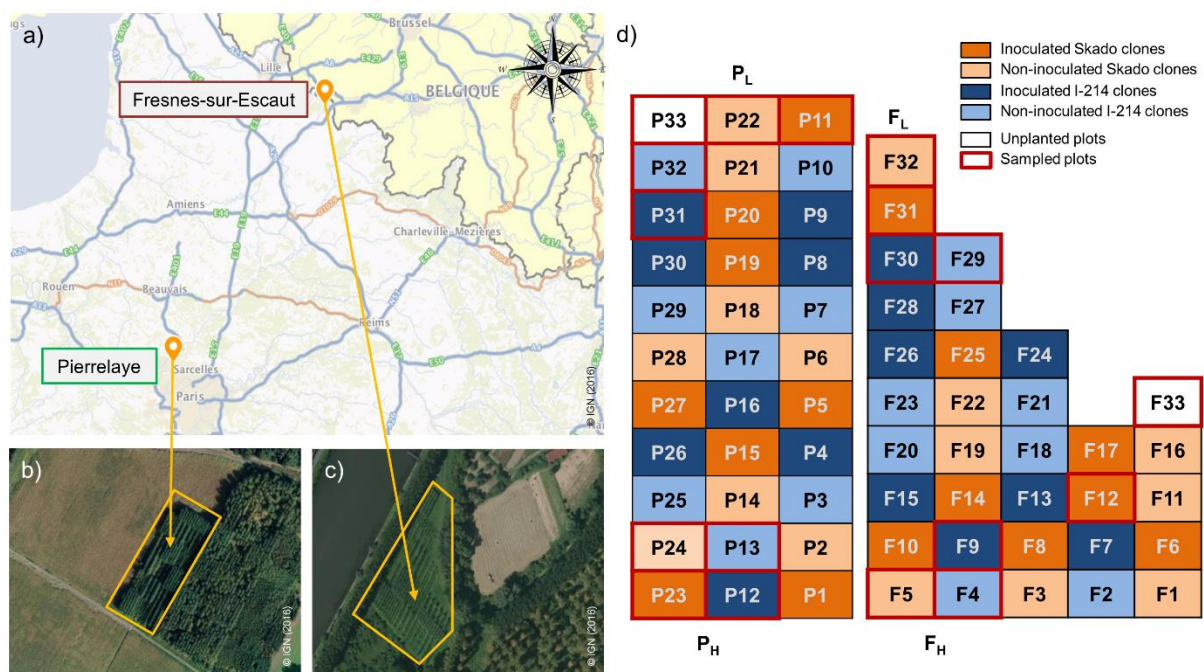


Figure 2. 1 : Location of the two sites. b) Aerial view of the Pierrelaye site. c) Aerial view of the Fresnes site. d) Experimental designs of the field trials which indicate the sampled plots in yellow boxes. On the left, the experimental design of the Pierrelaye site. On the right, the experimental design of the Fresnes site. P_L and F_L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P_H and F_H refer to the most contaminated areas of the two sites.

2.1.3.2. Sampling and analysis of soil and sediment

At both sites, a sampling campaign was carried out during the establishment of the poplar plantation in 2011. We selected 8 plots per site corresponding to the least (F_L , P_L) and the most (F_H , P_H) metal polluted areas at each site (**Figure 2. 1**). In each plot, ten soil samples were collected with a hand auger at 20 cm from 10 planted poplars. In October 2012 (Fresnes) and September 2013 (Pierrelaye), 10 topsoil samples (0–20 cm) per plot were again collected at each site. Representative samples obtained by quartering following the French standard X31-100 were oven-dried at 40°C until constant weight and ground with a grinder (agate mortar, Retsch RM100).

For both sites, physico-chemical analyses were performed by an external laboratory (Galys, Blois, France) on the 8 soil and sediment samples. They included: particle size distribution, available P (P_2O_5) (NF ISO 11263), exchangeable Ca (CaO), Mg (MgO), K (K_2O) and Na (Na_2O), organic matter (OM) (NF ISO 14235), total nitrogen (N) (NF ISO 13878), available N (NH_4^+ and NO_3^-) (ISO/TS 14256-1/NF EN ISO 11732; NF EN ISO 13395), total $CaCO_3$ (NF ISO 10693), cation exchange capacity (CEC) (NF X 31-130) and soluble bore (B) (NF X 31-122).

Total concentrations of major and trace elements of soil and sediment samples were determined in 2011. Before analysis, 0.5 g samples were sieved to < 200 μm (Retsch AS 200 digit) then digested at 180°C for 20 min with 2 mL of nitric acid (67%), 6 mL of hydrochloric acid (34%) and 2 mL of hydrofluoric acid (48%). Extracts were neutralized by 20 mL of boric acid (4%) and filtered using 0.45 μm Whatman® filter paper. Total concentrations of Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Ni, Pb, Zn were measured using ICP-OES (Ultima 2, Jobin Yvon Horiba). Soil samples which presented element concentrations below the limit of quantification (LQ), i.e. As and Cd ($LQ_{As} < 5 \text{ mg kg}^{-1}$, $LQ_{Cd} < 2 \text{ mg kg}^{-1}$), were analyzed using ICP-MS (Agilent 7500). Two standard reference materials were included for analytical quality control (PACS-2, National Research Council of Canada; NCD 73310, Stream sediment). Recovery rates ranged between 92 and 110% for Cd, 87–101% for Cu, 83–92% for Pb and 87–105% for Zn. For the other elements, recovery rates ranged from 72% to 112%.

$Ca(NO_3)_2$ -extractable fractions of PTE were determined in soil and sediment samples collected in 2011, 2012 and 2013. Extractions of As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn were performed with a 0.01 M $Ca(NO_3)_2$ solution to estimate the plant-available fraction of PTE in the soil and sediment samples. Sixty grams of dried samples, sieved to 2 mm, were shaken (Heidolph Reax 2) with 120 mL of $Ca(NO_3)_2$ (0.01 M) for 48 h. The resulting soil and sediment mixtures were filtered on filtration units at 0.45 μm (Millipore). Eluates were acidified to a pH <2 for preservation and analyzed by ICP-MS (Agilent 7500).

Soil and sediment pH were measured following the NF ISO 10390 (2005) standard. Five grams of sieved sample were shaken (Heidolph Reax 2) with 25 mL of distilled water for 1 h, then left to rest for 1 h. The pH was measured under constant stirring.

2.1.3.3. Sampling and analysis of poplar leaves

Poplar leaves were collected in the 8 previously selected plots, in October 2012 (Fresnes site) and September 2013 (Pierrelaye site). On each studied plot, 10 samples of leaves were harvested at around 1.70 m height at the same time as the sediment or soil sampling. Leaves were carefully washed with tap and deionized water, then oven-dried at 40°C until constant weight. Dry leaves were ground and 0.5 g were digested at 180°C for 20 min in 10 mL of nitric acid (67%) and 3 mL of ultra-pure water using a microwave digester (Mars Xpress, CEM). The digested samples were filtered to < 0.45 µm (Millipore) and acidified to a pH <2 for preservation. The analyses of Cd, Cr, Cu, Pb and Zn concentrations were performed by ICP-OES (Agilent 720ES) or ICP-MS (Agilent 7500). Two standard references of plant material (white cabbage “BCR-679”, Community Bureau of Reference and tobacco leaves “CTA-VTL-2”) were included for analytical quality control. Recovery rates ranged between 111 and 113% for Cd, 75–78% for Cr, 117–119% for Cu, 126% for Pb (in tobacco leaves), and 107–118% for Zn.

2.1.3.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software version 3.2.3 ([R Core Team, 2015](#)). All data distributions were checked for normality (Shapiro test). Concentrations of soil extractable and leaf PTEs were compared between plots planted with inoculated and non-inoculated poplars, among each site and clone using Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$). Student’s *t*-tests for a single sample were run to compare soil PTEs data between 2011 and 2012 or 2013. Paired samples *t*-tests were used to compare pH data between 2011 and 2012 or 2013, for the 8 selected plots in each site. A Principal Component Analysis (PCA) was performed to explore the distribution of foliar PTE concentrations using the R package “FactoMineR”. For values below the LQ, values were divided by 2 for the PCA. Correlations between PTEs data in poplars and soils were calculated using Pearson correlations tests ($p < 0.01$; R package Hmisc).

2.1.4. Results and discussion

2.1.4.1. Initial soil characterization

The soil properties of both sites are presented in **Table 2. 1**. According to the French GEPPA triangle (1963), the soil from the Pierrelaye site had a sand texture whereas the dredged sediment from the Fresnes site was a silt loam. Higher levels of OM and clay were found in the Fresnes plots, resulting in a higher CEC and suggesting a strong buffering capacity ([Baize, 2000a](#)).

The average pH at both sites was alkaline (7.7 ± 0.1 and 7.6 ± 0.1 for Pierrelaye and Fresnes, respectively). Available NO_3^- concentrations at the Fresnes site were almost 3-fold higher than those at the Pierrelaye site. Ammonium concentrations were much lower than NO_3^- concentrations but showed an opposite trend.

Concentrations of total major elements were contrasted between the two sites (**Table 2. 2**). Total Al, Fe and K concentrations at the Pierrelaye site were about 30 times higher than those at the Fresnes site whereas the latter contained 2 to 5 times more Ca, Mg and Na. Regarding total PTE concentrations (**Table 2. 2**), the Pierrelaye site showed high concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in the investigated plots compared with local usual agricultural concentrations ([Lamy et al., 2006](#)). At the Fresnes site, high concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn were mostly found in the F_H area according to threshold values in dredged sediment ([MEDD, 2006](#)). The F_H area appeared to be the most heavily Cd and Zn contaminated area, although a high variability was noticed for Cd concentrations (from 0.93 to 67.1 mg kg^{-1} DW). PTE concentrations in Pierrelaye plots ranged between those found at the F_L and F_H areas.

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable Cd, Cr, Cu, Ni and Pb concentrations in soil and sediment (**Table 2. 3**) were extremely low as almost all values were below limits of quantification (LQ). Zn-extractable concentrations ranged from <0.06 (LQ) to 1.56 mg kg^{-1} DW and from <0.06 to 0.77 mg kg^{-1} DW in the Pierrelaye and the Fresnes sites, respectively. Thus, the maximal Zn extractable fractions represented 0.43% of the total Zn concentrations at Pierrelaye and 0.03% at Fresnes, showing a much higher Zn mobility at Pierrelaye. Regarding As, the maximal extractable fraction at Pierrelaye was higher (0.32%) than that of Fresnes (0.25%). In agreement with CEC values, higher extractable concentrations in soil were expected at Pierrelaye ([Rieuwerts et al., 1998](#)).

Table 2. 1 : Physico-chemical characteristics of composite topsoil samples collected in both sites at the time of the plantation (2011). P_L and F_L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P_H and F_H refer to the most contaminated areas of the two sites.

Site	Pierrelaye								Fresnes							
Area	P _L				P _H				F _L				F _H			
Plot	P32	P31	P22	P11	P13	P12	P24	P23	F29	F30	F32	F31	F4	F9	F5	F12
Sand (%)	91	91	91	91	85	81	83	80	16	15	22	19	24	21	24	22
Silt (%)	4.8	5.3	5.2	5.6	8.5	11	11	11	67	68	62	65	61	61	59	61
Clay (%)	3.9	4.2	3.8	3.7	6.1	8	6.1	8.3	18	17	17	16	15	17	17	17
CaCO ₃ (%)	0.7	0.7	0.6	0.7	1.5	1.9	1.3	1.8	2.3	2.0	2.9	2.1	5.3	4.8	7.9	4.6
OM (%)	2.2	2.4	2.6	2.0	3.8	5.4	3.9	4.6	3.4	3.6	4.1	3.8	6.9	8.7	7.2	7.7
pH-H ₂ O	7.8	7.8	7.9	7.6	7.5	7.6	7.7	7.6	7.4	7.7	7.6	7.7	7.5	7.6	7.6	7.3
N (g kg ⁻¹)	1.1	1.8	1.9	1.2	3.4	3.2	2.8	3.2	2.2	2.3	2.6	2.8	3.8	5.0	4.7	4.6
NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	33	21	37	30	42	62	46	64	113	99	108	110	129	145	132	121
NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	0.4	0.6	0.5	0.5	0.3	0.4	0.3	0.7	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3
C/N	11	7.5	7.8	10	6.5	10	7.9	8.3	8.9	8.8	8.9	7.9	11	10	8.8	10
CEC (meq kg ⁻¹)	61	66	62	57	115	148	121	149	138	138	147	138	169	206	187	193
B (mg kg ⁻¹)	0.5	0.6	0.5	0.5	0.8	1.0	0.9	0.9	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0.6	0.4
P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	106	107	115	107	164	228	154	216	120	125	188	157	195	227	220	285
K ₂ O (mg kg ⁻¹)	131	151	133	96	231	314	215	270	177	164	197	181	320	258	439	248
MgO (mg kg ⁻¹)	181	181	140	135	131	175	151	166	95	97	126	115	126	148	160	125
CaO (mg kg ⁻¹)	3430	3399	3215	3697	4888	5528	5352	5671	6987	6755	7227	6882	8189	8527	8183	8271
Na ₂ O (mg kg ⁻¹)	16	16	5.0	9.0	13	19	16	26	14	16	17	17	23	24	18	20

Table 2. 2 : Total concentrations of trace and major elements of composite topsoil samples from the two sites (mg kg⁻¹ DW), Pierrelaye and Fresnes at the time of the plantation (2011). Local usual agricultural concentrations (UAC; [Lamy et al. \(2006\)](#)) and threshold values used to assess the quality of dredged canal sediment (S1; [MEDD \(2006\)](#)) are indicated for comparison. P_L and F_L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P_H and F_H refer to the most contaminated areas of the two sites. P33 and F33 refer to unplanted plots.

Site	Area	Plot	Al	As	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Na	Ni	Pb	Zn
Pierrelaye	P _L	P32	13600	4.52	6850	1.69	6.52	44.8	130	13500	3320	1170	759	21.4	243	352
		P31	9130	4.14	6110	1.61	5.38	42.8	123	8500	3300	980	745	17.4	214	365
		P22	7790	3.41	5160	1.47	5.5	36.4	94.4	6440	2870	769	615	16.4	207	289
		P11	8530	4.22	5730	1.40	5.22	38.2	107	8030	3190	803	760	17.18	236	218
	P _H	P13	13500	10.7	12500	3.85	7.49	59.0	229	11400	4190	1670	970	22.8	318	561
		P12	16300	13.4	17000	5.93	7.83	76.9	281	14000	4603	2023	1148	27.6	361	525
		P24	11600	8.53	8290	3.26	5.87	53.7	179	9700	3950	1410	931	17.8	263	268
		P23	16600	15.9	13600	6.11	9.07	92.1	340	14300	4690	2083	1557	31.3	488	427
			P33		4.07		2.97	2.75	28.7	51.0				9.83	244	677
			UAC				0.19-0.42	3.0-7.7	15-29	8-19					6-20	18-43
Fresnes	F _L	F29	337	9.16	13900	0.49	10.1	46.6	19.6	183	141	3012	5620	20.9	40.5	79.0
		F30	345	8.69	13200	0.46	9.40	53.0	25.5	184	143	2890	5860	18.8	44.5	92.0
		F32	424	10.7	19200	0.52	12.2	51.9	29.3	224	159	3230	6500	22.7	52.1	172
		F31	373	10.2	15200	0.49	10.6	50.4	27.8	196	145	3010	6060	21.3	47.0	137
	F _H	F4	505	23.5	30400	67.1	10.4	9.00	114	374	168	3750	3440	17.3	459	2560
		F9	505	24.3	29600	10.1	18.2	86.1	114	395	128	3710	3570	40.6	497	2580
		F5	483	21.0	39300	60.1	8.60	7.5	101	348	131	3807	3527	15.7	390	2023
		F12	448	19.1	19000	0.93	14.5	67.8	62.6	277	141	3460	4990	29.3	224	1105
			F33				6.52			65.4					335	1600
			S1		30		2		150	100				50	100	300

Table 2. 3 : Ca(NO₃)₂-extractable PTE concentrations of topsoil samples from the two sites (mg kg⁻¹ DW), Pierrelaye and Fresnes. P_L and F_L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P_H and F_H refer to the most contaminated areas of the two sites. Soil samples were first collected in 2011 at the time of plantation (composites made of 10 topsoil samples), then in 2012 (means ± sd; n = 10) and 2013 (means ± sd; n = 10) at the Fresnes and Pierrelaye sites, respectively. “-ni” refers to non-inoculated clones; “-i” refers to inoculated clones. Different letters indicate significant differences between the treatments (with or without inoculation) for each site and each clone, for 2012 and 2013 data (p < 0.05). No letter indicates no difference (for 2012 and 2013 data).

Site	Area	Plot	Clone-Treatment	As		Cd		Cr		Cu		Ni		Pb		Zn	
				2011	2012 / 2013	2011	2012 / 2013	2011	2012 / 2013	2011	2012 / 2013	2011	2012 / 2013	2011	2012 / 2013	2011	2012 / 2013
Pierrelaye	P _L	P32	I214-ni	0.023	0.031 (0.003) ^c	<0.005	0.002 (0.000) ^c	0.007	0.014 (0.005) ^b	<0.015	0.202 (0.027) ^b	<0.015	0.032 (0.006) ^c	<0.006	0.015 (0.005) ^c	<0.06	0.411 (0.156) ^b
		P31	I214-i	0.022	0.039 (0.005) ^b	0.011	0.003 (0.000) ^c	0.007	0.024 (0.006) ^a	0.024	0.220 (0.028) ^b	<0.015	0.048 (0.013) ^b	0.115	0.045 (0.028) ^a	1.556	0.779 (0.377) ^a
		P22	Skado-ni	0.019	0.040 (0.005) ^c	<0.005	0.003 (0.001) ^B	0.020	0.018 (0.003) ^B	0.024	0.223 (0.027) ^c	<0.015	0.040 (0.006) ^B	<0.006	0.031 (0.012) ^A	0.252	0.756 (0.318) ^B
		P11	Skado-i	0.021	0.033 (0.005) ^D	<0.005	0.002 (0.001) ^c	0.007	0.018 (0.003) ^B	<0.015	0.206 (0.020) ^c	<0.015	0.032 (0.003) ^c	<0.006	0.039 (0.028) ^A	<0.06	0.484 (0.129) ^c
	P _H	P13	I214-ni	0.034	0.047 (0.006) ^a	<0.005	0.004 (0.001) ^b	0.014	0.020 (0.003) ^a	0.121	0.355 (0.036) ^a	<0.015	0.059 (0.005) ^a	<0.006	0.026 (0.007) ^b	0.182	0.653 (0.165) ^a
		P12	I214-i	0.026	0.047 (0.008) ^a	<0.005	0.004 (0.001) ^a	0.008	0.024 (0.009) ^a	0.064	0.355 (0.047) ^a	<0.015	0.067 (0.015) ^a	<0.006	0.044 (0.030) ^{ab}	0.288	0.889 (0.381) ^a
		P24	Skado-ni	0.028	0.052 (0.008) ^A	<0.005	0.003 (0.000) ^B	0.010	0.023 (0.004) ^A	0.055	0.309 (0.056) ^B	<0.015	0.058 (0.007) ^A	<0.006	0.032 (0.009) ^A	0.123	0.916 (0.317) ^A
		P23	Skado-i	0.024	0.044 (0.006) ^B	<0.005	0.004 (0.001) ^A	0.013	0.022 (0.004) ^A	0.091	0.384 (0.053) ^A	<0.015	0.059 (0.011) ^A	<0.006	0.022 (0.006) ^B	0.232	0.797 (0.138) ^{AB}
		P33	Unplanted	0.023	0.025 (0.002)	<0.005	0.002 (0.000)	0.006	0.015 (0.004)	<0.015	0.182 (0.016)	<0.015	0.027 (0.002)	<0.006	0.027 (0.014)	<0.060	0.425 (0.175)
		Fresnes	F _L	F29	I214-ni	0.016	0.015 (0.005) ^a	<0.005	<0.002	<0.006	0.004 (0.000) ^c	<0.015	0.036 (0.004) ^c	<0.015	0.016 (0.002)	<0.006	0.003 (0.002) ^b
F30	I214-i	0.014		0.017 (0.004) ^a	<0.005	<0.002	<0.006	0.005 (0.001) ^b	<0.015	0.057 (0.018) ^b	<0.015	0.015 (0.002)	<0.006	0.003 (0.001) ^b	<0.06	0.073 (0.056) ^c	
F32	Skado-ni	0.027		0.014 (0.004) ^B	<0.005	<0.002	<0.006	0.005 (0.001) ^B	<0.015	0.051 (0.010) ^B	<0.015	0.018 (0.002)	<0.006	0.003 (0.001) ^B	<0.06	0.084 (0.020) ^B	
F31	Skado-i	0.023		0.020 (0.004) ^A	<0.005	<0.002	<0.006	0.006 (0.001) ^{AB}	<0.015	0.055 (0.021) ^B	<0.015	0.019 (0.005)	<0.006	0.003 (0.002) ^B	<0.06	0.071 (0.034) ^B	
F4	I214-ni	0.010		0.015 (0.002) ^{ab}	<0.005	0.003 (0.001)	<0.006	0.006 (0.002) ^b	<0.015	0.085 (0.014) ^a	<0.015	0.020 (0.011)	<0.006	0.010 (0.005) ^a	0.151	0.402 (0.141) ^a	
F9	I214-i	0.012		0.013 (0.001) ^b	0.014	0.003 (0.001)	<0.006	0.007 (0.003) ^a	<0.015	0.084 (0.016) ^a	<0.015	0.017 (0.009)	<0.006	0.011 (0.004) ^a	0.770	0.276 (0.108) ^b	
F5	Skado-ni	0.013		0.018 (0.004) ^A	<0.005	0.003 (0.001) ^A	<0.006	0.007 (0.003) ^A	<0.015	0.084 (0.012) ^A	<0.015	0.022 (0.009)	<0.006	0.014 (0.006) ^A	0.278	0.353 (0.114) ^A	
F12	Skado-i	0.012	0.014 (0.002) ^B	<0.005	0.002 (0.001) ^B	<0.006	0.006 (0.003) ^B	<0.015	0.073 (0.008) ^A	<0.015	0.015 (0.004)	<0.006	0.014 (0.005) ^A	0.234	0.311 (0.060) ^A		
F33	Unplanted	-	0.011	0.005 (0.002)	<0.002	-	0.005	0.027 (0.008)	0.057	-	0.016	0.002 (0.001)	0.002	1.107 (0.843)	0.312		

2.1.4.2. Evolution of pH and PTE mobility

At Pierrelaye, a low but significant decrease of the average pH (from 7.7 ± 0.1 to 7.2 ± 0.1) was observed in the 8 selected plots after 2 years (**Figure S2. 1**). Soil extractable concentrations of PTEs increased significantly in most plots of the Pierrelaye site (**Table 2. 3**). The increased extractable fractions of PTEs observed in the poplar planted plots at Pierrelaye between 2011 and 2013 can be linked to the decrease of the soil pH, which may have affected speciation of PTEs in soil, rendering PTEs more soluble ([Kabata-Pendias, 2010](#)). Soil acidification has often been reported after afforestation ([Jug et al., 1999](#); [Makeschin, 1994](#)), and may result from losses of base cations such as Ca and/or release of root acidic exudates involved in uptake mechanisms ([Kabata-Pendias, 2004](#)). However, the decrease in soil pH cannot be solely attributed to the presence of trees, as similar decreases were observed in the unplanted plots (Supplemental Fig. S1), in which increases of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn extractable fractions were also noticed. However, since most of the concentrations were under the LQ for the 2011 sampling, these conclusions must be taken cautiously.

Conversely, the average pH at Fresnes increased significantly from 7.6 ± 0.1 to 8.1 ± 0.1 , between 2011 and 2012 (**Figure S2. 1**). At the same site, sediment extractable concentrations of As and Zn significantly increased in some plots of the most contaminated area (F_H). The same trend occurred with extractable Cu (in all plots) and Pb (in F_H). Overall, higher extractable concentrations of PTEs in soil were measured at Pierrelaye. At the Fresnes site, the limited increase of PTE-extractable concentrations between 2011 and 2012 may be explained by the alkalization of the sediment. Here, the changes in pH value may be related to the microbial activity and/or higher CaCO_3 and Ca concentrations ([van Hullebusch et al., 2005](#)). Nevertheless, a longer-term monitoring of these field sites is needed to assess the evolution of pH and PTE mobility on these phytomanaged sites.

2.1.4.3. Accumulation of major and trace elements in poplar leaves

A principal component analysis (PCA) was first performed to characterize the accumulation of PTEs in leaves of both poplar clones grown at the two sites (**Figure 2. 2**). The first principal component (Dim1) opposed 4 variables (**Figure 2. 2a**), foliar Cu concentrations being negatively correlated to Cd, Zn and Cr foliar concentrations. These negative correlations revealed a well-known antagonistic relationship between Cu and Zn in leaves, when high levels of these micronutrients were reported ([Läuchli and Bielecki, 1983](#)). The second principal component (Dim2) clustered poplar Skado clones from the Pierrelaye site, which accumulated the highest amounts of Pb (**Figure 2. 2**). Our analysis (**Figure 2. 2b**) clearly discriminated the two poplar clones, with the Skado clone accumulating more Cd, Cr, Pb, and Zn than the I-214 clone (except for

I-214 at the F4 and F9 plots). Control of leaf PTE translocation might therefore be determined by genetic traits, as demonstrated in one of our previous study ([Pottier et al., 2015](#)) or other previous studies on Salicaceous trees ([Castiglione et al., 2009](#); [Konlechner et al., 2013](#); [Laureysens et al., 2004](#)).

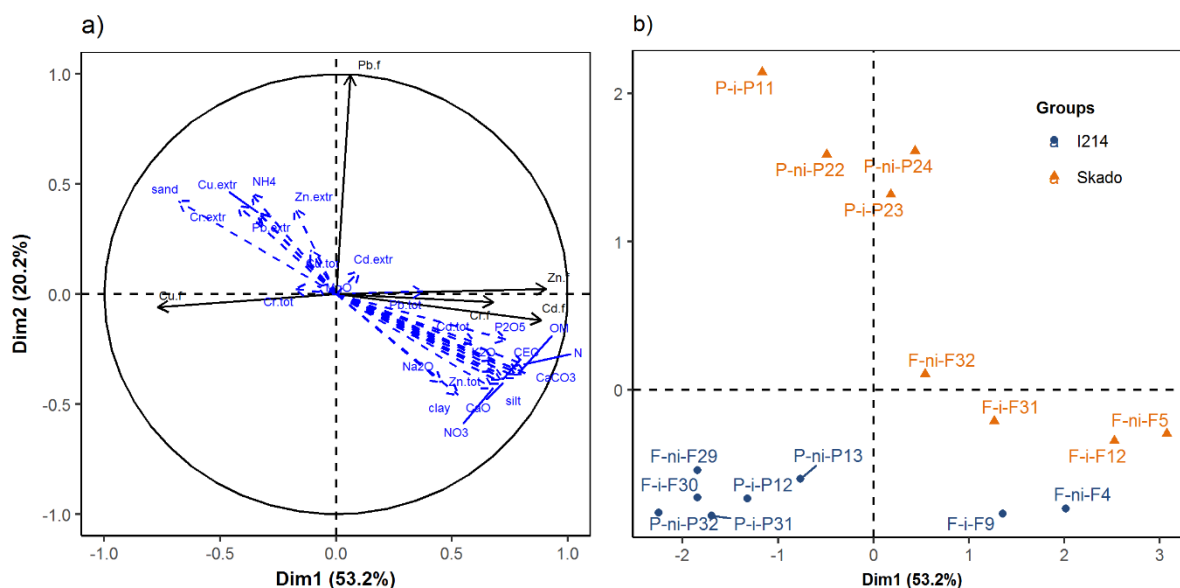


Figure 2.2 : a) Graph of active (black solid arrows; leaf metal contents) and supplementary variables (blue dotted arrows; soil physico-chemical parameters). b) Graph of individuals corresponding to inoculated ("i") or non-inoculated ("ni") Skado and I-214, of Pierrelaye (P) and Fresnes (F) sites.

In more details, both Skado and I-214 clones from the two sites exhibited excessive foliar concentrations of Cd and Zn compared to those usually measured in poplars grown on uncontaminated sites (**Figure 2.3**). Indeed, [Vandecasteele et al. \(2003\)](#) reported baseline foliar concentrations for 2-year-old poplar clones grown in a tree-nursery of 2.0-4.4 mg Cd kg⁻¹ DW and 60-184 mg Zn kg⁻¹ DW whereas in our case, foliar Cd concentrations ranged from 1.10 to 18.9 mg kg⁻¹ DW and from 1.29 to 14.2 mg kg⁻¹ DW in I-214 and Skado, respectively. For Zn, foliar concentrations ranged from 101 to 748 mg kg⁻¹ DW and from 192 to 928 mg kg⁻¹ DW in I-214 and Skado, respectively. The highest Cd and Zn concentrations were measured in poplar leaves collected in the most heavily contaminated area F_H at Fresnes (**Figure 2.3**). No statistical differences were found between leaf Cd concentrations of I-214 and Skado at the Fresnes site, whereas Skado accumulated more Cd than I-214 at the Pierrelaye site. Skado accumulated more Zn than I-214 in most plots of the two sites. Similar concentration ranges of Cd and Zn in poplar leaves measured at the end of growing seasons were reported in several studies performed at moderately contaminated sites ([Laureysens et al., 2004](#); [Madejón et al., 2012](#); [Mertens et al., 2004](#); [Pottier et al., 2015](#)). In our study, foliar Cd concentrations were strongly correlated with foliar Zn concentrations in both clones and sites (r ranged from 0.74 to 0.92, $p < 0.01$) as reported in various studies on poplar ([Lettens et al., 2011](#); [Migeon et al., 2009](#); [Pottier et al., 2015](#)). Although

Cd is not an essential element for plant nutrition, it may be transferred to plants with similar mechanisms to Zn, as it is chemically and physically similar to Zn ([Kabata-Pendias, 2010](#)). In this regard, [Pottier et al. \(2015\)](#) pointed out a contribution of the NRAMP1 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1) transporter for Cd and Zn accumulation by poplars. High concentrations of PTE in leaves can be the result of their bioavailability in the soil, high transpiration rate, and common transport pathways in plant tissues ([Robinson et al., 2000](#)).

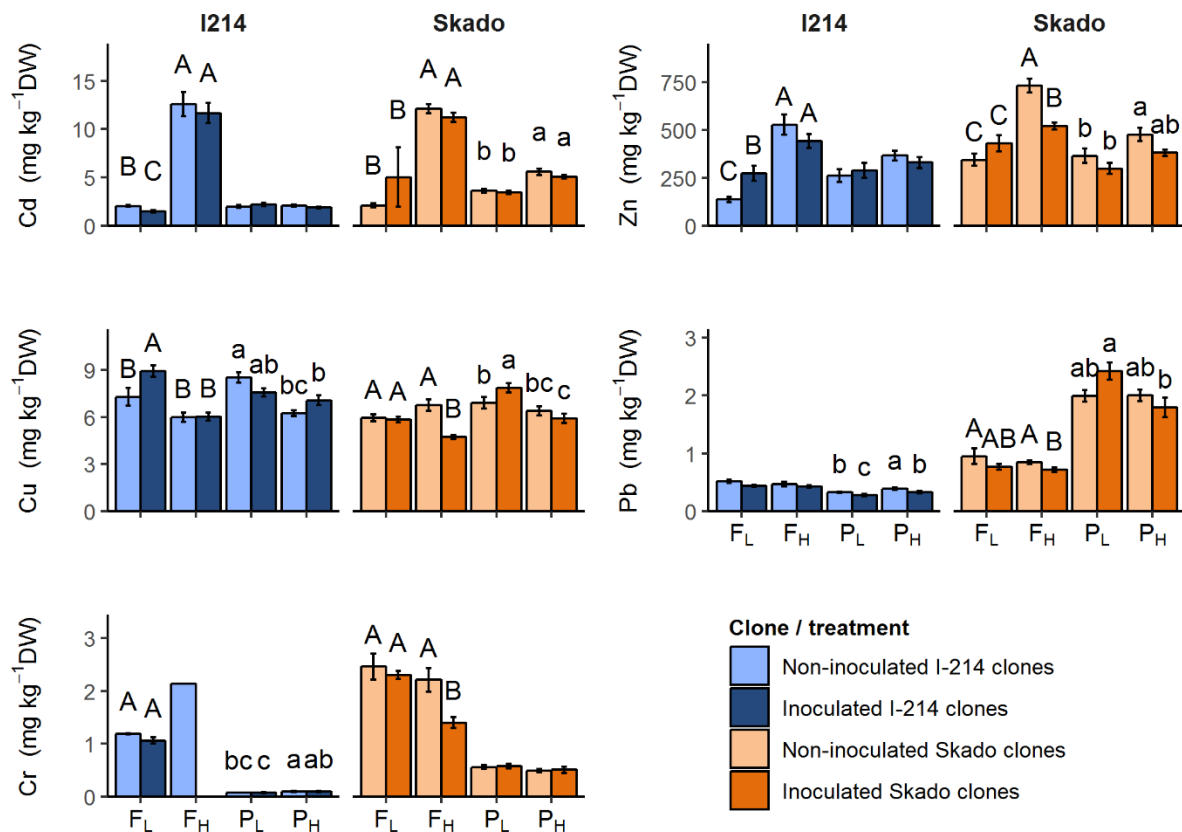


Figure 2. 3 : Foliar concentrations of Cd, Zn, Cu, Pb and Cr in Skado and I-214 clones. P_L and F_L refer to the least contaminated areas at the Pierrelaye and Fresnes sites, respectively whereas P_H and F_H refer to the most contaminated areas of the two sites. Data are means ± SE. Different letters indicate significant differences between the treatments for each site among each clone (Kruskal-Wallis test, p < 0.05). No letter indicates no difference. Data below the LQ are not represented (LQ = 1–2 mg kg⁻¹ for Cr).

Foliar Cu concentrations in both clones ranged within physiological values ([Letten et al., 2011](#)) and did not vary between the two sites (**Figure 2. 3**). In contrast to I-214, foliar Pb concentrations in Skado were close or above baseline values at both sites (1.5 mg Pb kg⁻¹ DW; [Kalra \(1998\)](#)). The highest concentrations of Cr in leaves were measured in I-214 and Skado clones at the Fresnes, these concentrations however remaining close to baseline values (about 2 mg Cr kg⁻¹ DW; [Giachetti and Sebastiani \(2006\)](#)).

Adequate nutrient concentrations in tree growth are crucial when considering biomass production and foliar diagnosis can be a useful tool to determine nutritional status. Among the

nutrients measured in poplar leaves at the Pierrelaye site, P, Ca, Mg and Mn concentrations (**Figure 2.4**) fell within the range of “optimal” levels found in I-214 leaves ([Garbaye et al., 1980](#)) and other poplar leaves ([Kalra, 1998](#)). Conversely, leaf K and Fe concentrations were lower than expected, suggesting a potential deficiency. Skado clones were characterized by higher Ca and Fe leaf concentrations, whereas I-214 contained more Mg ($p < 0.05$).

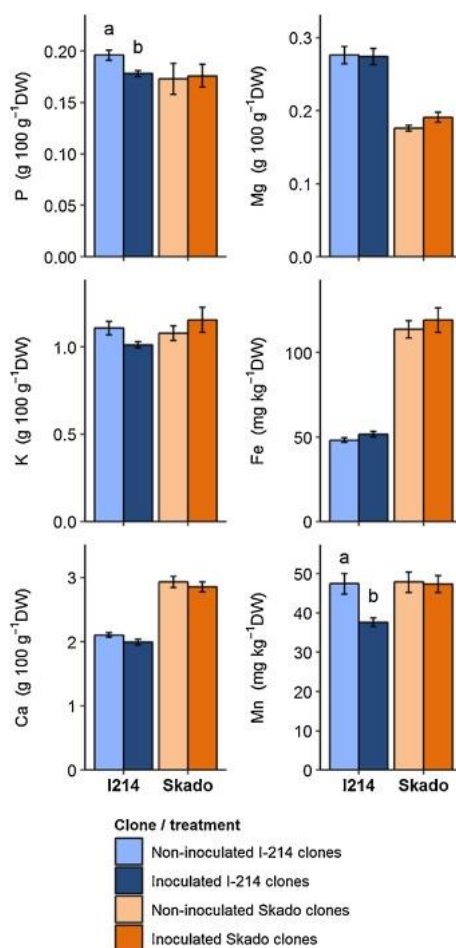


Figure 2.4 : Foliar concentrations of macronutrients P, K, Ca, Mg, Fe and Mn in Skado and I-214 clones. Data are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between the treatments for each site, among each clone (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). No letter indicates no difference.

2.1.4.4. Effects of mycorrhizal inoculation

We evidenced a significant decrease in foliar Zn, Cu, Pb and Cr concentrations in inoculated Skado poplars compared with the non-inoculated ones at the Fresnes F_H area (**Figure 2.3**). In the same area, there was a clear similar tendency for Zn concentrations measured in the I-214 leaves, and Cd concentrations in the I-214 and Skado leaves, although not statistically significant. Noticeably, the impact of inoculation was only evidenced for Skado clones at the Fresnes F_H area, which was characterized by the highest total PTE concentrations in soil (**Table 2.2**). This trend was confirmed by the PCA performed with PTE concentrations in leaves, which discriminated non-inoculated Skado (F-ni-F5) and I-214 (F-ni-F4) with higher concentrations of Zn and Cd in

leaves, as compared with inoculated Skado (F-i-F12) and I-214 (F-i-F9), all from the Fresnes F_H area (**Figure 2. 2b**). Conversely, inoculation also induced an increase of foliar Cu and Zn concentrations in some plots of F_L and P_L areas.

It is interesting to note that the filter function of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), in the case of highly contaminated soils, dominates the literature, as for example in the works described by [Meier et al. \(2012b\)](#) and [Garg and Aggarwal \(2012\)](#), most of the studies being performed in pot experiments. Conversely, some authors demonstrated that the inoculation of plants by AMF such as *Glomus* species significantly enhanced PTE translocation to the aboveground parts of plants ([Meier et al., 2012a](#)). Levels of PTEs in soil may also affect the role of arbuscular mycorrhizal symbiosis ([Audet and Charest, 2007](#)), which can lead to an increase of plant metal uptake at low soil PTE concentrations as well as a reduction of PTE bioavailability via fungal metal-binding processes at high soil PTE levels. The mechanisms underlying metal accumulation may involve metallothioneins, small proteins that bind metals in plant detoxification process, as demonstrated in a greenhouse experiment ([Cicatelli et al., 2014](#)). [Garg and Aggarwal \(2011\)](#) also reported that AMF induced the production of chelating agents (phytochelatin) and antioxidants (glutathione) to reduce PTE toxicity and translocation in plant shoots. By forming extraradical mycelium networks, AMF can also minimize the exposure of plants to excessive PTE levels by producing glomalins, proteins allowing PTE immobilization in hyphae ([Cabral et al., 2015](#)). The authors however often questioned the fact that investigations in field experiments are needed to demonstrate the applicability of their findings. Our work therefore corroborates this major conclusion. Compared with non-inoculated poplars, inoculation did not improve nutrient concentrations when considering P, K, Ca, Mg, Fe and Mn in leaves analyzed at the end of the growing season in 2013 (**Figure 2. 4**). Despite this, we measured significant increases in biomass production at both sites for the poplar Skado clone in early spring 2013 ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). We might therefore conclude that mycorrhizal fungi may have increased the volume of soil explored by single trees, thus allowing for an improved production of biomass.

An increase in extractable PTE concentrations was significant in some plots (**Table 2. 3**) planted with inoculated clones (on P31, P12, P23, F30, F31 and F9), suggesting an induction of PTE mobilization in soils by the inoculation. Mycorrhizal fungi can trigger root exudation of organic acids, and solubilize PTEs ([Churchland and Grayston, 2014](#)). Conversely, it is likely that the inoculation also decreased PTE mobility in other plots (P11, P23, F9 and F12), via metal-binding processes ([Cicatelli et al., 2014](#)). Moreover, the extractable PTE concentrations in soils was not correlated with the effect of inoculation on PTE accumulation by poplars (**Figure 2. 2**). As discussed in our previous paper ([Ciadamidaro et al., 2017](#)), mycorrhizal colonization rates did

not differ statistically between the four areas (F_L , F_H , P_L and P_H), and therefore cannot explain the lowest accumulations of PTE in leaves of inoculated poplars, as compared with non-inoculated ones. As there are no means (and thereof no attempt) to definitely identify the mycorrhizal isolates that were added as biological amendments to the trees at the plantation, we could only speculate that the mycorrhizal fungi present in the inoculum would be more efficient than the endogenous mycorrhizal fungi in their filtering PTE capacity (by producing more glomalins for example).

2.1.4.5. Influence of site conditions on PTE accumulation in poplar leaves

Pearson correlation tests revealed a positive linear relationship between foliar Zn concentrations in both clones and extractable Zn concentrations in soil at the Fresnes site ($r_{Zn} = 0.57$ for I-214, $r_{Zn} = 0.68$ for Skado; $p < 0.01$). At the Pierrelaye site, Cd and Zn concentrations in Skado leaves were positively correlated with extractable concentrations in soil ($r_{Cd} = 0.50$, $r_{Zn} = 0.53$; $p < 0.01$), as previously reported ([Madejón et al., 2004](#); [Pourrut et al., 2011](#)). Despite similar concentrations of extractable PTEs between some plots of the two sites, poplars could accumulate more PTEs in their leaves at the Fresnes site, which implies other soil parameters in soil-plant transfers of PTEs. The addition of soil parameters in the PCA as illustrative variables highlighted potential correlations between leaf Cd and Zn concentrations and their total concentrations in soil, $CaCO_3$, N, OM, silt, P_2O_5 , CEC, CaO, K_2O , NO_3^- and clay (**Table S2. 1**). This analysis suggested that PTEs were more bioavailable in more fertile soils, which is indeed the case for the Fresnes soil. Besides, negative correlations were found between K in leaves and soil extractable concentrations of As, Cu, Ni (for I-214) and Cd (for Skado). As foliar K concentrations were below optimal values (**Figure 2. 4**), those negative correlations suggested an inhibition of K accumulation in leaf tissues by these PTEs.

Bioconcentration factors (BCFs) were calculated as the ratio of the PTE concentrations in leaves ($mg\ kg^{-1}\ DW$) and the total PTE concentration in soil ($mg\ kg^{-1}\ DW$). A BCF value above 1 indicates that the plant is a metal accumulator. Cd and Zn BCFs were highest in F_L and P_L (the least contaminated areas of Fresnes and Pierrelaye sites, respectively), where almost all values were above 1 for both clones (**Table 2. 4**). At both sites, Cd BCF values were higher than Zn BCF values and Skado clones accumulated more Cd and Zn in their leaves than I-214. Conversely, poplars did not accumulate Zn in F_H ($BCF < 1$), the most contaminated area of the Fresnes site. Such Cd and Zn BCF values were reported in other poplar species in field trials, which confirmed their abilities to take up and transfer these two PTEs in their leaves ([Migeon et al., 2009](#); [Vandecasteele et al., 2003](#)). At the Fresnes site, BCF values calculated for inoculated poplars were higher than those of non-inoculated poplars in most cases, suggesting that mycorrhizal fungi did not act as an effective

barrier against poplar PTE translocation in leaves, considering soil total element concentrations in soil. Besides, poplars did not accumulate Cr, Cu and Pb in their leaves (BCFs <1).

Table 2. 4 : Bioconcentration factors of Cd and Zn based on their foliar concentrations in poplar leaves (mg kg⁻¹ DW) and total concentrations in soil (mg kg⁻¹ DW).

Site	Area	Clone	Treatment	Plot	Cd	Zn
Pierrelaye	P _L	I214	Not inoculated	P32	1.17	0.74
			Inoculated	P31	1.36	0.79
		Skado	Not inoculated	P22	2.46	1.26
			Inoculated	P11	2.46	1.37
	P _H	I214	Not inoculated	P13	0.54	0.65
			Inoculated	P12	0.32	0.63
		Skado	Not inoculated	P24	1.71	1.78
			Inoculated	P23	0.83	0.89
Fresnes	F _L	I214	Not inoculated	F29	4.13	1.73
			Inoculated	F30	3.24	2.97
		Skado	Not inoculated	F32	4.02	2.00
			Inoculated	F31	10.3	3.14
	F _H	I214	Not inoculated	F4	0.19	0.21
			Inoculated	F9	1.16	0.17
		Skado	Not inoculated	F5	0.20	0.36
			Inoculated	F12	12.1	0.47

2.1.4.6. Lessons from the field and recommendations

In recent years, poplar SRC on uncontaminated soils have been widely studied under field conditions in Europe to promote their environmental ([Tricker et al., 2009](#); [Verlinden et al., 2013](#)) and socio-economic advantages ([Marron et al., 2012](#)). On contaminated lands, the application of aided phytostabilization with bioenergy crops at field scale is a great challenge that aims at controlling and reducing the environmental impact of those sites while developing economic opportunities. With regard to this purpose, feedback from field study is scarce.

Many authors highlighted the necessity to select appropriate combinations of plant genotypes and mycorrhizal strains for phytoremediation purposes ([Lingua et al., 2008](#); [Mrnka et al., 2012](#)). In fact, specific root exudates released by trees trigger the expression of mycorrhization genes, resulting in symbiotic relationships between plants and mycorrhizal fungi ([Churchland and Grayston, 2014](#)). Depending on their type (endo- or ectomycorrhizas), mycorrhizal fungi may interact differently with plants, by transferring limited or larger amount of nutrients or PTEs to their hosts. The role of mycorrhizal fungi in poplar growth, tolerance, and metal accumulation in tissues has been largely demonstrated in pot experiments under controlled conditions, in uncontaminated or metal contaminated soils ([Baum et al., 2012](#); [Cicatelli et al., 2014](#); [Mrnka et al., 2012](#)) but rarely in field conditions. On a slightly contaminated site, [Bissonnette et al. \(2010\)](#)

reported that arbuscular mycorrhizal fungi inoculation had no significant effect on Cd accumulation in poplars shoots used for phytoextraction. In most of the less contaminated areas of our study, PTE concentrations of poplar leaves did not vary under inoculation. Interestingly, our results showed a significant decrease in foliar concentrations of Zn, Cu, Pb and Cr for the poplar Skado clone grown on the most highly polluted areas, which confirms fungal mycorrhizal symbiosis dynamics at elevated soil PTE concentrations ([Audet and Charest, 2007](#); [Bojarczuk and Kieliszewska-Rokicka, 2010](#)). Therefore, the inocula and poplar cultivars used in this study were strongly influenced by the sites conditions (levels of PTEs in soil, OM, CEC, and certainly native microbial communities, vegetation, etc.). With the aim of managing risk at contaminated sites, further studies are needed to isolate fungal strains able to reduce Cd and Zn transfers in the aboveground parts of poplars, to reach baseline concentrations in tissues. Tripartite relationship including bacteria and fungi should also be considered to optimize root colonization by mycorrhizal fungi and reduce PTE transfers in poplars ([Labbé et al., 2014](#)).

Despite the positive effect of the inoculation observed in Skado clones *in situ*, the high Cd and Zn concentrations measured in poplar leaves is of concern since PTEs may disseminate in the environment after leaf abscission. Litter decomposition rates may be strongly reduced by the metal pollution, affecting consequently soil physicochemical and biological conditions ([Berg et al., 1991](#)). Therefore, a risk assessment is required to characterize Cd and Zn accumulation in the litter layer, as well as their potential transfers to other organisms since changes in metal speciation can be expected ([Nirola et al., 2016](#)). Based on the outcomes, PTEs could be removed from contaminated sites by collecting the leaves after abscission. Also, the use of poplars for energy production in phytomanagement strategies requires low concentrations of PTEs in wood, in agreement with current local regulations. As poplars accumulate lower amounts of PTEs in wood than in leaves, we assume that Cd concentrations in wood are 1.2 to 2-fold lower than in leaves, and Zn concentrations, 4 to 10-fold lower considering similar foliar concentrations and moderately contaminated soils ([Laureysens et al., 2004](#); [Madejón et al., 2004](#); [Migeon et al., 2009](#)). In comparison with reference values obtained from a non-contaminated area ([Chalot et al., 2012](#)), Cd and Zn estimated concentrations in the wood of the present poplars may be in excess by the end of the first rotation. Valorization options (torrefaction, pyrolysis) of non-inoculated 7-year-old Skado poplars were investigated at a Zn and Cd contaminated site in Northern France ([Bert et al., 2017a](#)). The Leforest site showed close physico-chemical characteristics, especially the soil texture and low CaCl₂-extractable fractions, compared to the Fresnes site ([Foulon et al., 2016b](#)). Wood concentrations of Cd and Zn after the first harvest were 5.66 ± 0.51 mg Cd kg⁻¹ DW and 64.10 ± 11.61 mg Zn kg⁻¹ DW, suggesting that Cd could be of concern for Skado poplar conversion processes as the concentration of Cd exceeded its baseline value (0.53 ± 0.1 mg Cd kg⁻¹ DW; [Bert et al. \(2017a\)](#)). In addition, in France, a threshold value for Cd was stated at 5 mg kg⁻¹ DW to

regulate the use of wood as fuel in combustion plants ([MEDDE, 2013](#)). In some plants covered by this regulation, Cd concentration in Skado poplar could limit its use for combustion. Concerning the use of Cd-enriched poplar wood as feedstock for pyrolysis and torrefaction, the potential limitation due to Cd could be overcome if end-products can be treated or upgraded. Due to the short duration of the study (3 years), we were not able to harvest poplars and report the Cd concentration of the woody biomass, poplar SRC being usually harvested on a cycle of 6 to 8 years ([Marron et al., 2012](#)). Nevertheless, we expect that the upcoming results would be comparable to those obtained in ([Bert et al., 2017a](#)). One can expect that inoculated poplars with efficient mycorrhiza for Cd sequestration could contribute to decrease the Cd wood accumulation in poplars. These hypotheses need to be assessed in further long-term field studies.

2.1.5. Conclusion

The implementation of large field trials is a key stage to provide theoretical and technical knowledge in phytotechnologies. Our large-scale study pointed out the complexity of environmental processes that are not taken into account in greenhouse experiments. With the objective of limiting poplar metal accumulation in the aboveground parts of poplars and optimizing their growth *in situ*, mycorrhizal fungi inoculation revealed to be effective in reducing Zn, Cu, Pb and Cr accumulation in Skado leaves after two growing seasons, in highly polluted areas. The same trend was also observed for most plots planted with I-214 or Skado clones. Therefore, mycorrhizal fungi interacted differently with poplars depending on the cultivars, soil physico-chemical properties and certainly other conditions specific to each site (vegetation, native microbial communities, etc.). In terms of territorial and sustainable development, the use of mycorrhizal poplars tends to be efficient in heavily polluted areas but further research is needed to identify and isolate fungal strains that have the capacity to reduce Cd and Zn accumulation in poplar tissues, to reach baseline concentrations for risk management and valorization purposes. Otherwise, poplar wood and leaves have both to be safely managed to prevent food chain contamination and pollutant emissions. Despite these promising results, a better understanding of interactions between mycorrhizal fungi, poplars and soil conditions in the field are still needed to allow operational implementations of phytomanagement options.

Supplemental data

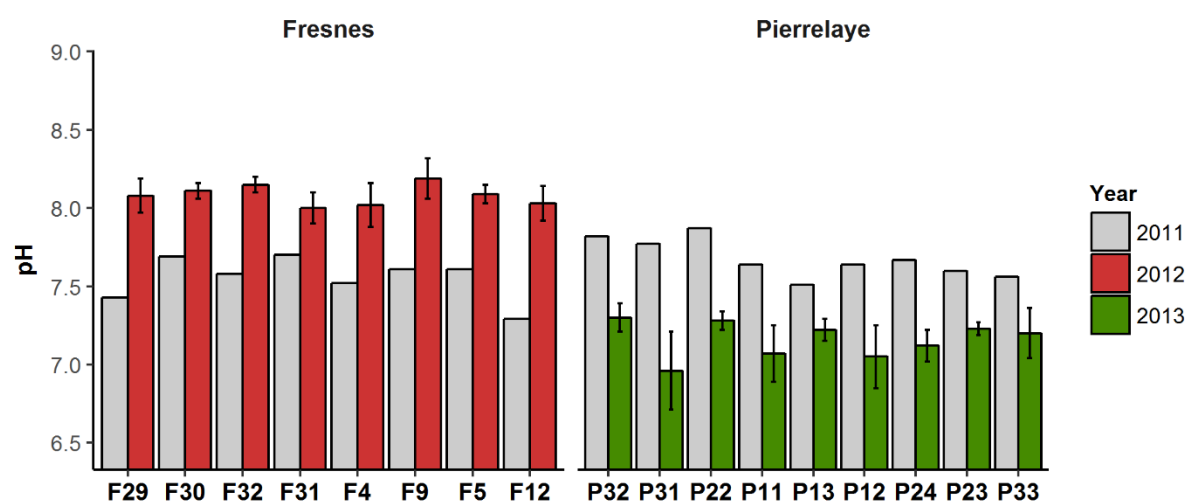


Figure S2. 1 : Evolution of soil pH in the 8 plots at both sites, Fresnes and Pierrelaye. Values are means \pm SD.

Table S2. 1 : Correlation between the supplementary variables and the two principal components Dim1 (correlated with the active variables Cd, Zn and Cu) and Dim2 (correlated with the active variable Pb). The terms ".tot" and ".extr" refer to total and extractable PTE concentrations, respectively.

	Dim1	Dim2
CaCO ₃	0,82	-0,36
N	0,81	-0,32
OM	0,79	-0,36
Silt	0,78	-0,38
P ₂ O ₅	0,73	-0,21
CEC	0,72	-0,39
CaO	0,72	-0,41
Zn.tot	0,68	-0,35
K ₂ O	0,68	-0,30
NO ₃	0,67	-0,43
Cd.tot	0,60	-0,22
Clay	0,53	-0,46
Na ₂ O	0,45	-0,40
Pb.tot	0,38	0,01
Cd.extr	0,10	0,10
MgO	-0,08	0,04
Cu.tot	-0,11	0,20
Zn.extr	-0,18	0,39
Cr.tot	-0,18	0,02
Pb.extr	-0,33	0,37
Cu.extr	-0,34	0,37
NH ₄	-0,37	0,46
Cr.extr	-0,43	0,41
Sand	-0,68	0,42

Acknowledgments

This work was financially supported by national fundings through BIOFILTREE (ANR Programme Blanc International, 2010-INTB-1703-03) and Phytosed 2 (ADEME, 1072C0044 and VNF, 2011/01/02). P. Phanthavongsa was granted through the Demophyto project (ADEME, 1472C0059 and VNF, N°2014/I01/21). The authors thanked Francis Guillot and Fabrice Richez for their technical help during the sampling campaigns.

References

- Audet, P., Charest, C. (2007) Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 147, 609-614.
- Baize, D. (2000) Guide des analyses en pédologie: 2e édition, revue et augmentée. Editions Quae.
- Baum, C., Stetter, U., Makeschin, F. (2002) Growth response of *Populus trichocarpa* to inoculation by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in a pot and a field experiment. *Forest Ecology and Management* 163, 1-8.
- Bell, T.H., Cloutier-Hurteau, B., Al-Otaibi, F., Turmel, M.-C., Yergeau, E., Courchesne, F., St-Arnaud, M. (2015) Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Environmental Microbiology* 17, 3025-3038.
- Berg, B., Ekbohm, G., Söderström, B., Staaf, H. (1991) Reduction of decomposition rates of scots pine needle litter due to heavy-metal pollution. *Water, Air, and Soil Pollution* 59, 165-177.
- Bert, V., Allemon, J., Sajet, P., Dieu, S., Papin, A., Collet, S., Gaucher, R., Chalot, M., Michiels, B., Raventos, C. (2017) Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. *Biomass and Bioenergy* 96, 1-11.
- Bissonnette, L., St-Arnaud, M., Labrecque, M. (2010) Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial. *Plant and Soil* 332, 55-67.
- Bojarczuk, K., Kieliszewska-Rokicka, B. (2010) Effect of Ectomycorrhiza on Cu and Pb Accumulation in Leaves and Roots of Silver Birch (*Betula pendula* Roth.) Seedlings Grown in Metal-Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 207, 227-240.
- Cabral, L., Soares, C.R.F.S., Giachini, A.J., Siqueira, J.O. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1655-1664.
- Castiglione, S., Todeschini, V., Franchin, C., Torrigiani, P., Gastaldi, D., Cicatelli, A., Rinaudo, C., Berta, G., Biondi, S., Lingua, G. (2009) Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: A large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environmental Pollution* 157, 2108-2117.
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S., Pascual, C. (2012) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology* 46, 13361-13369.
- Churchland, C., Grayston, S.J. (2014) Specificity of plant-microbe interactions in the tree mycorrhizosphere biome and consequences for soil C cycling. *Frontiers in Microbiology* 5.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappellini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., Chalot, M. (2017) Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environmental and Experimental Botany* 139, 48-56.
- Cicatelli, A., Lingua, G., Todeschini, V., Biondi, S., Torrigiani, P., Castiglione, S. (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Annals of Botany* 106, 791-802.
- Cicatelli, A., Torrigiani, P., Todeschini, V., Biondi, S., Castiglione, S., Lingua, G. (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi as a tool to ameliorate the phytoremediation potential of poplar: biochemical and molecular aspects. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 7, 333-341.

- Colpaert, J.V., Wevers, J.H.L., Krznaric, E., Adriaensen, K. (2011) How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science* 68, 17-24.
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Church, A., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Neu, S., Mench, M., Witters, N., Vangronsveld, J. (2013) Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for “gentle” remediation approaches: The European context. *Journal of Environmental Management* 129, 283-291.
- Delplanque, M., Collet, S., Del Gratta, F., Schnuriger, B., Gaucher, R., Robinson, B., Bert, V. (2013) Combustion of *Salix* used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass and Bioenergy* 49, 160-170.
- Evangelou, M.W., Deram, A. (2014) Phytomanagement: a realistic approach to soil remediating phytotechnologies with new challenges for plant science. *Int J Plant Biol Res* 2, 1023.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., Chalot, M. (2016) Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Science of The Total Environment* 571, 1230-1240.
- Garbaye, J., Courrier, G., Masar, L., (1980) Nutrition minérale et production des peupliers «Robusta» et «I-214» en populiculture traditionnelle dans le nord du bassin parisien, *Annales des Sciences Forestières*. EDP Sciences, pp. 159-172.
- Garg, N., Aggarwal, N. (2012) Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. *Plant Growth Regulation* 66, 9-26.
- Giachetti, G., Sebastiani, L. (2006) Development and chromium uptake in hybrid poplars cultivated on substrate polluted with industrial slags. *Advances in Horticultural Science* 20, 193-198.
- Järup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182.
- Jug, A., Makeschin, F., Rehfuss, K.E., Hofmann-Schielle, C. (1999) Short-rotation plantations of balsam poplars, aspen and willows on former arable land in the Federal Republic of Germany. III. Soil ecological effects. *Forest Ecology and Management* 121, 85-99.
- Kabata-Pendias, A. (2004) Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A. (2010a) Soils and Soil Processes, Trace Elements in Soils and Plants, Fourth Edition. CRC Press, pp. 37-63.
- Kabata-Pendias, A. (2010b) Trace Elements of Group 12 (Previously of Group IIb), Trace Elements in Soils and Plants, Fourth Edition. CRC Press, pp. 275-314.
- Kalra, Y. (1998) Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press.
- Konlechner, C., Türkteş, M., Langer, I., Vaculík, M., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., Hauser, M.-T. (2013) Expression of zinc and cadmium responsive genes in leaves of willow (*Salix caprea* L.) genotypes with different accumulation characteristics. *Environmental Pollution* 178, 121-127.
- Labbé, J.L., Weston, D.J., Dunkirk, N., Pelletier, D.A., Tuskan, G.A. (2014) Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*. *Frontiers in Plant Science* 5, 579.
- Lamy, I., Van Oort, F., Dère, C., Baize, D. (2006) Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European Journal of Soil Science* 57, 731-740.
- Läuchli, A., Bielecki, R.L. (1983) Inorganic plant nutrition. Springer-Verlag.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., Ceulemans, R. (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 131, 485-494.
- Laureysens, I., De Temmerman, L., Hastir, T., Van Gysel, M., Ceulemans, R. (2005) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133, 541-551.
- Lettens, S., Vandecasteele, B., De Vos, B., Vansteenkiste, D., Verschelde, P. (2011) Intra- and inter-annual variation of Cd, Zn, Mn and Cu in foliage of poplars on contaminated soil. *Science of The Total Environment* 409, 2306-2316.

-
- Lingua, G., Franchin, C., Todeschini, V., Castiglione, S., Biondi, S., Burlando, B., Parravicini, V., Torrigiani, P., Berta, G. (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* 153, 137-147.
- Madejón, P., Ciadamidaro, L., Marañón, T., Murillo, J.M. (2012) Long-Term Biomonitoring of Soil Contamination Using Poplar Trees: Accumulation of Trace Elements in Leaves and Fruits. *International Journal of Phytoremediation* 15, 602-614.
- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M., Robinson, B. (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* 132, 145-155.
- Makeschin, F. (1994) Effects of energy forestry on soils. *Biomass and Bioenergy* 6, 63-79.
- Marron, N., Beimgraben, T., Bes de Berc, L. (2012) Cost reduction and efficiency improvement of short rotation coppice. CCREF Final Report, Champenoux.
- MEDD (2006) Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée à l'article R. 214-1 du code de l'environnement. Texte n°15. *Journal Officiel de la République Française*.
- MEDDE (2013) Arrêté du 24 septembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 2910-B de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. Texte n° 10. *Journal Officiel de la République Française*.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., Cornejo, P. (2012a) Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 741-775.
- Meier, S., Borie, F., Curaqueo, G., Bolan, N., Cornejo, P. (2012b) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. *Applied Soil Ecology* 61, 280-287.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schröder, P., Vangronsveld, J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1039-1070.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Schrijver, A.D., Luysaert, S. (2004) Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of The Total Environment* 326, 209-215.
- Météofrance (2016) Données climatiques. <http://www.meteofrance.com/climat/france>. Accessed 2016.01.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., Blaudez, D. (2009) Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 204, 89.
- Mrnka, L., Kuchár, M., Cieslarová, Z., Matějka, P., Száková, J., Tlustoš, P., Vosátka, M. (2012) Effects of Endo- and Ectomycorrhizal Fungi on Physiological Parameters and Heavy Metals Accumulation of Two Species from the Family Salicaceae. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 399-410.
- Nirola, R., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Aryal, R., Correll, R., Naidu, R. (2016) Assessment of metal toxicity and bioavailability in metallophyte leaf litters and metalliferous soils using *Eisenia fetida* in a microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129, 264-272.
- Pottier, M., García de la Torre, V.S., Victor, C., David, L.C., Chalot, M., Thomine, S. (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environmental Pollution* 199, 73-82.
- Pourrut, B., Lopareva-Pohu, A., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Waterlot, C., Bidar, G., Shirali, P., Douay, F. (2011) Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial: Part 2. Influence on plants. *Science of The Total Environment* 409, 4504-4510.
- Pulford, I.D., Watson, C. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* 29, 529-540.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>.

- Rieuwerts, J., Thornton, I., Farago, M., Ashmore, M. (1998) Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation & Bioavailability* 10, 61-75.
- Robinson, B., Mills, T., Petit, D., Fung, L., Green, S., Clothier, B. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227, 301-306.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995) Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nat Biotech* 13, 468-474.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R., Brunner, I. (2005) Contribution of Ectomycorrhizal Fungi to Cadmium Uptake of Poplars and Willows from a Heavily Polluted Soil. *Plant and Soil* 277, 245-253.
- Tricker, P.J., Pecchiari, M., Bunn, S.M., Vaccari, F.P., Peressotti, A., Miglietta, F., Taylor, G. (2009) Water use of a bioenergy plantation increases in a future high CO₂ world. *Biomass and Bioenergy* 33, 200-208.
- van Hullebusch, E.D., Lens, P.N.L., Tabak, H.H. (2005) Developments in Bioremediation of Soils and Sediments Polluted with Metals and Radionuclides. 3. Influence of Chemical Speciation and Bioavailability on Contaminants Immobilization/Mobilization Bio-processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4, 185-212.
- Vandecasteele, B., Lauriks, R., De Vos, B., Tack, F.M. (2003) Cd and Zn concentration in hybrid poplar foliage and leaf beetles grown on polluted sediment-derived soils. *Environ Monit Assess* 89, 263-283.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.
- Verlinden, M.S., Broeckx, L.S., Van den Bulcke, J., Van Acker, J., Ceulemans, R. (2013) Comparative study of biomass determinants of 12 poplar (*Populus*) genotypes in a high-density short-rotation culture. *Forest Ecology and Management* 307, 101-111.

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de deux modalités de phytomanagement testées à grande échelle et sur le long terme

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article. Il a été soumis dans « Science of the Total Environment » en décembre 2017. N'étant pas en adéquation avec les attentes du journal, il fera l'objet de modifications pour une prochaine soumission dans un journal scientifique à comité de lecture.

Le succès de la phytostabilisation aidée repose d'une part sur la performance des plantes, qui doivent être capables d'immobiliser les contaminants dans la rhizosphère, de séquestrer les contaminants dans leurs racines et de réduire leur translocation dans les parties aériennes. La phytostabilisation nécessite également l'implantation d'un couvert végétal dense pour réduire la dispersion des contaminants dans l'environnement ([Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Ainsi, ce mode de gestion devrait limiter l'érosion des sols, améliorer leurs propriétés physico-chimiques, leur activité biologique et donc préserver les services écosystémiques ([Faucon et al., 2017](#)). Parmi les espèces herbacées testées, certaines Poacées (*Deschampsia cespitosa*, *Calamagrostis epigejos*, *Festuca rubra*) peuvent rapidement établir un couvert végétal dense et limiter la translocation d'EPT dans leurs parties aériennes ([Bert et al., 2012b](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Mench et al., 2010](#)). Sur le long terme, des plantes colonisatrices peuvent se développer et être des candidates pertinentes pour la phytostabilisation ([Bert et al., 2012b](#)).

D'autre part, la phytostabilisation des sols nécessite souvent l'utilisation d'amendements biologiques ou chimiques pour réduire la biodisponibilité des EPT ([Kidd et al., 2015](#); [Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Parmi les amendements biologiques, les champignons mycorhiziens peuvent être utilisés pour augmenter la croissance de leur plante hôte en améliorant leur nutrition et leur tolérance à divers stress. Plusieurs études, qui sont principalement basées sur des expérimentations en pots, montrent également que certaines souches de champignons sont capables de séquestrer des EPT et de réduire leur translocation dans les parties aériennes des plantes ([Cabral et al., 2015](#); [Cicatelli et al., 2014](#); [Meier et al., 2012a](#); [Rajkumar et al., 2012](#)). Les résultats obtenus à partir du site A confirment certaines de ces observations car l'inoculation des peupliers s'est avérée efficace pour augmenter leur croissance ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). De plus, la réponse des peupliers à l'inoculation était particulièrement significative pour la rétention du Zn, Cu, Pb et Cr chez le cultivar Skado, mais seulement dans les zones les plus contaminées ([Phanthavongsa et al., 2017](#)). Concernant les amendements chimiques,

les amendements minéraux basiques sont couramment utilisés en agriculture pour établir un milieu plus propice au développement des cultures en augmentant le pH du sol. L'ajout de ce type d'amendement dans le sol devrait permettre l'immobilisation de certains EPT via des processus d'adsorption et la formation de précipités suite à l'augmentation du pH ([Bert et al., 2012b](#); [Mench et al., 1994](#); [O'Day and Vlassopoulos, 2010](#); [Panfili et al., 2005](#)).

En complément, l'utilisation d'espèces ligneuses (ex. saules et peupliers) à croissance rapide et à forte production de biomasse cultivées en TCR/TTCR pourrait renforcer la phytostabilisation des sols contaminés ([Pulford and Watson, 2003](#); [Robinson et al., 2009](#)) et générer des bénéfices économiques via la production de bois énergie ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Ciadamidaro et al., 2017](#); [Enell et al., 2016](#); [Kidd et al., 2015](#)). A notre connaissance, la performance *in situ* de cultures mixtes associant des plantes herbacées et ligneuses n'a pas encore été documentée dans le cadre du phytomanagement à grande échelle. Pourtant, les interactions interspécifiques peuvent compromettre la performance des plantes en termes de recouvrement au sol et de productivité ([Albertsson et al., 2014b](#); [Tian et al., 2017](#)).

Les travaux présentés dans ce chapitre intègrent des résultats de plusieurs années de suivi (2011-2017) des sites phytomanagés A et B décrits dans le chapitre 1. Pour alimenter les retours d'expérience et contribuer à la compréhension des mécanismes de mobilité et de transfert des EPT dans le système sol-plante-microorganismes en conditions réelles, nous nous sommes intéressés à l'efficacité des plantes (*D. cespitosa* ; peupliers I-214 et Skado ; saules Inger et Tordis ; plantes colonisatrices) et des amendements (inocula mycorhiziens et amendement minéral basique) testés *in situ* dans une perspective de phytomanagement. Différents paramètres ont donc été mesurés : taux de recouvrement et de survie des plantes, croissance des arbres en hauteur et en diamètre, diversité floristique, concentrations totales et extractibles en EPT dans le sol et dans les parties aériennes des plantes sélectionnées et colonisatrices. Pour terminer, une analyse préliminaire des risques environnementaux a été réalisée sur la base des concentrations mesurées en Cd et Zn dans les sols et les plantes afin d'évaluer au mieux la pertinence de ce mode de gestion.

Nos résultats confirment l'intérêt d'utiliser la plante herbacée *D. cespitosa* testée sur le site B pour la végétalisation des sols contaminés en EPT. En effet, la forte densité du couvert formé par la plante s'est maintenue pendant plus de 5 ans et de faibles concentrations en Cd, Cu et Pb ont été mesurées dans ses parties aériennes. Pour confirmer son caractère « phytoexcluser » les concentrations en EPT dans les racines seraient à mesurer. L'ajout des amendements biologiques et chimiques sur les sites A et B n'a pas permis de diminuer la fraction extractible de Cd et de Zn dans les sols ni de réduire les concentrations foliaires des plantes colonisatrices, des saules et des

peupliers. Seule une diminution des concentrations en Pb extractible dans le sol B et dans les plantes (*D. cespitosa* et plantes colonisatrices) a été observée, qui peut être partiellement attribuée à l'amendement minéral mais aussi à la présence de *D. cespitosa* en forte densité. Sur le site B, l'inefficacité de l'amendement minéral pourrait s'expliquer par l'utilisation d'une dose trop faible d'amendement mais aussi par la présence de concentrations extractibles en EPT initiales faibles, une hétérogénéité forte de la contamination sur le site et des faibles concentrations foliaires initiales dans les parties aériennes de *D. cespitosa* n'ayant pas permis de mettre en évidence de diminution significative de la mobilité des EPT dans le sol et de la translocation chez cette espèce.

La végétalisation du site A par des plantes colonisatrices était hétérogène avec une dominance de l'espèce *Urtica dioica* (ortie). La végétation était plus éparse sous les peupliers Skado dont la croissance et l'architecture occasionnaient une couverture arborée plus dense. Sur toutes les parcelles (amendées et non amendées), les concentrations mesurées chez *U. dioica* étaient plus élevées en Cd, Pb, Cu et Zn comparées aux mêmes plantes issues de sols non contaminés. Selon les calculs préliminaires de risques basés sur les concentrations mesurées dans les plantes herbacées enrichies en Cd, les risques liés à leur ingestion par les herbivores se sont avérés négligeables. Concernant les saules et les peupliers dédiés à la production d'énergie, de fortes concentrations en Cd et en Zn ont été mesurées dans les feuilles quels que soient les amendements. Ces feuilles enrichies en Cd peuvent représenter un risque pour les herbivores. Les fortes concentrations mesurées dans les feuilles ne présageant pas des concentrations dans les bois, l'utilisation du bois de saule ou de peuplier issu de ces sites en filière énergétique pourrait être envisagée. Une campagne de prélèvement a été réalisée en mars 2017 par le Laboratoire Chrono-Environnement, afin de déterminer les teneurs en métaux dans les biomasses pérennes des peupliers (tronc, écorce, branches). Les données sont en cours d'exploitation. Contrairement aux peupliers très tolérants aux conditions du milieu, une réduction de la croissance et du taux de survie des saules a été mesurée dans les parcelles amendées et non amendées en présence de *D. cespitosa*, liée à une forte compétition souterraine avec *D. cespitosa* et des déséquilibres nutritionnels. Dans une perspective de phytomanagement, la gestion des feuilles enrichies en EPT est préconisée pour éviter la dispersion des contaminants (notamment Cd) dans l'environnement. La surveillance des plantes et de la mobilité des EPT dans le sol reste nécessaire afin d'assurer la maîtrise des risques environnementaux.

3.1. **Article 2 : Long-term assessment of two phytomanagement options in two field trials at a metal-contaminated dredged sediment disposal site**

Phonethip Phanthavongsa ^{a,b}, Michel Chalot ^{b,c}, Nicolas Pucheux ^d, Arnaud Grignet ^a, Nicole Chaumont ^a, Arnaud Papin ^e, Rodolphe Gaucher ^a, Julien Parelle ^f, Valérie Bert ^a

^a INERIS, Clean and Sustainable Technologies and Processes Unit, DRC/RISK, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^b Laboratoire Chrono-environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6249, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

^c Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^d INERIS, Expertise in Toxicology/Ecotoxicology of Substances Unit, DRC/VIVA, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^e INERIS, Analytical Ressources Unit, DRC/RISK, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^f Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

Corresponding author: Valérie Bert

Valerie.bert@ineris.fr

INERIS, Clean and Sustainable Technologies and Processes Unit, DRC/RISK, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

Highlights

- *Deschampsia cespitosa* is a relevant candidate for revegetation
- Cd, Pb and Zn shoot concentrations in some plant colonists was reduced in presence of *D. cespitosa*
- Competition occurred between *D. cespitosa* and willows
- Basic slag amendment reduced Pb availability in soil
- Mycorrhizae and basic slag amendment did not reduce foliar Cd and Zn concentrations of poplars and willows

3.1.1. Abstract

Environmental risk assessment of two phytomanagement options was carried out in two long-term field trials (1 ha) at a metal-contaminated dredged sediment disposal site. Plants and amendments were combined to immobilize Cd, Cu, Pb and Zn in soil, limit their transfers in the plant shoots, and produce valuable biomass, i.e. site A: mycorrhizal fungi, plant colonists and poplars; site B: basic slag, *Deschampsia cespitosa* and willows. After 4 years, *D. cespitosa* formed a dense cover, where it maintained shoot Cd, Cu and Pb at baseline concentrations despite high Zn concentrations. The basic slag reduced soil Pb availability but soil Cd, Cu and Zn availability increased under *D. cespitosa*, in line with a slight decrease of soil pH. Shoot Cd, Pb and Zn concentrations in some plant colonists were reduced in presence of *D. cespitosa*, likely due to rhizosphere interactions. Plant colonists combined with *D. cespitosa* for phytomanagement may therefore not induce environmental risks. Willows were outcompeted by *D. cespitosa* in terms of growth and survival, likely due to its intense root development. Successfully established poplars were more competitive towards native plant colonists. The dominant species *Urtica dioica* can be used for phytomanagement in co-culture with poplars if a denser cover is achieved. Tree mycorrhization and basic slag did not reduce high shoot and foliar Cd and Zn concentrations in some plant colonists and willow and poplar, respectively, which may affect grazers as indicated by the modeling of environmental risks.

Keywords: *Deschampsia cespitosa*, poplar, willow, colonizing plants, metal immobilization, risk management

3.1.2. Introduction

Phytotechnologies emerged as a promising tool to remove or immobilize potentially toxic elements (PTEs) at dredged sediment disposal sites ([Bert et al., 2017a](#); [Bert et al., 2012b](#); [Panfili et al., 2005](#)). Besides risk management, the need to generate economic revenues from biomass production became necessary to improve the viability of such methods leading to the phytomanagement concept ([Conesa et al., 2012](#); [Dubourguier et al., 2001](#); [Evangelou and Deram, 2014](#)). Some biomass processing technologies for the bioenergy sector have been investigated for woody biomass produced on metal-contaminated sites ([Asad et al., 2017](#); [Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Delplanque et al., 2013](#); [Witters et al., 2012](#)). However, phytomanagement is scarcely applied in European countries ([Cundy et al., 2013](#)).

Among the main phytotechnologies, aided phytostabilization aims at reducing the bioavailability and toxicity of soil contaminants using metal(loid)-excluder plants and biological or chemical amendments ([Mench et al., 2010](#)). This option involves retention mechanisms in the rhizosphere and PTE accumulation in plant roots with limited translocation to the shoots ([Mench et al., 2006](#); [Panfili et al., 2005](#)). Consequently, food chain contamination may be prevented as well as the contaminant dispersion through wind erosion and leaching into groundwater ([Vangronsveld et al., 2009](#)). The establishment of a plant cover can also enhance soil biological activity and improve soil properties (fertility and structural stability), limiting soil erosion ([Touceda-González et al., 2017](#)). Maintaining a plant cover is thus crucial to preserve ecosystem processes and services ([Faucon et al., 2017](#)).

Among tested plants, some grass species (e.g. *Deschampsia cespitosa*, *Calamagrostis epigejos*, and *Festuca rubra*) can rapidly provide a dense soil cover and accumulate low root and shoot PTE concentrations ([Bert et al., 2012b](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Mench et al., 2010](#)). As soil conditions evolve, plant colonists may occur and be relevant candidates for phytostabilization ([Bert et al., 2012b](#)). Besides, fast-growing tree species used in short rotation coppice such as willows and poplars, mostly known as leaf Cd/Zn accumulators and Pb/Cu excluders, have been suggested as suitable for phytostabilization notably due to their high biomass production ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Enell et al., 2016](#); [Kidd et al., 2015](#); [Pulford and Watson, 2003](#)). There are few reports on the performance of herbaceous species and trees in an intercropping system for aided phytostabilization at field scale. The need to study grass-tree interactions that may highly impact tree growth and/or the efficiency of the initial plant cover has been highlighted to maximize biomass productivity for bioenergy ([Albertsson et al., 2014a](#); [Tian et al., 2017](#)).

Soil amendments are often necessary to promote the survival and extensive cover of plants and to enhance the reduction of PTE availability, toxicity and transfer in aboveground plant

parts ([Kidd et al., 2015](#); [Mench et al., 2010](#)). Bioaugmentation with mycorrhizal fungi can contribute to the retention of PTEs while increasing nutrient acquisition by their host plants, improving their biomass production ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Meier et al., 2012a](#); [Rajkumar et al., 2012](#)) and enhancing their tolerance to several stresses ([Cabral et al., 2015](#)). The *in-situ* success of mycorrhizal inoculation is however complex as it depends on the fungal strains and associated plant species, site conditions and soil PTE availability ([Audet and Charest, 2007](#); [Foulon et al., 2016a](#); [Foulon et al., 2016b](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)). Other amendments such as mineral-based products have been for long used in agriculture as fertilizers and gained more interests to immobilize PTEs in soils the last few years ([O'Day and Vlassopoulos, 2010](#)). For instance, the industrial by-products “Thomas basic slag” and hydroxyapatite decrease available soil Cd, Pb and Zn as a result of pH increase, precipitation and sorption reactions ([Bert et al., 2012b](#); [Mench et al., 1994](#); [Panfili et al., 2005](#)).

This study aimed at evaluating the efficiency and sustainability of two phytomanagement options set up at field scale using different combinations of plants and amendments. One field trial consisted in a short rotation coppice (SRC) of poplars (clones I-214 and Skado) inoculated with endo- and ectomycorrhizal fungi to limit PTE transfers in their harvestable plant parts ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)). In this case, no herbaceous plant was implemented to cover the soil leading to native species development. The second trial consisted in immobilizing PTEs in soil by combining the incorporation into the topsoil of a basic slag (Optiscor®) with the establishment of a dense plant cover formed by *Deschampsia cespitosa* and strips of willows (clones Inger and Tordis) grown in a very short rotation coppice (VSRRC). The combined use of the grass and Optiscor® was expected to decrease the labile pool of PTEs and to limit their transfer in both *Salix* clones ([Bert et al., 2012b](#)). Poplars and willows were planted to produce biomass for processing technologies ([Bert et al., 2017a](#); [Ciadamidaro et al., 2017](#)).

At both field trials, the long-term efficiency of phytomanagement was assessed through a risk-based management approach addressing: (1) the amendment effects on the availability of Cd, Cu, Pb and Zn in soil and their transfers in selected and colonizing plants; (2) the performance of plants by measuring their cover rates, survival, growth, diversity and capacity to limit PTE accumulation in their shoots, with a focus on plant colonists; (3) and the ecological risks to terrestrial organisms. Although the performance of the poplars and willows (productivity and quality) was not reported in this paper, recommendations were provided for phytomanagement improvement.

3.1.3. Materials and methods

3.1.3.1. Site description

Two field trials (sites A and B) of 1 ha each were set up at a former dredged sediment disposal site that operated between 1978 and 1989 in Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France, France – **Figure 3. 1**). The area was characterized by a temperate climate; mean annual temperatures ranged between 7.1°C and 14.5°C and mean annual precipitation was 743 mm ([Météofrance, 2017](#)). Before the trial implementation, the site A (50°25'47.9" N 3°35'07.8" E) was used for pasture for a few years whereas the site B (50°25'41.1" N 3°35'01.9" E) was no longer exploited by human activities after 1989. At site B, the previous vegetation was a wetland plant community disturbed by the invasive species *Fallopia japonica*. Both sites had moderately calcareous soils and a similar texture characterized by a high silt proportion (**Table 3. 1**). Organic matter content (OM) was 5 times higher at the site B compared with the site A. According to the French canal sediment regulation ([MEDD, 2006](#)) and local concentrations measured in an uncontaminated area near the field sites, total soil Cd, Cu, Pb and Zn exceeded the background values at both sites, the site B being more contaminated than the site A (**Table 3. 1**).

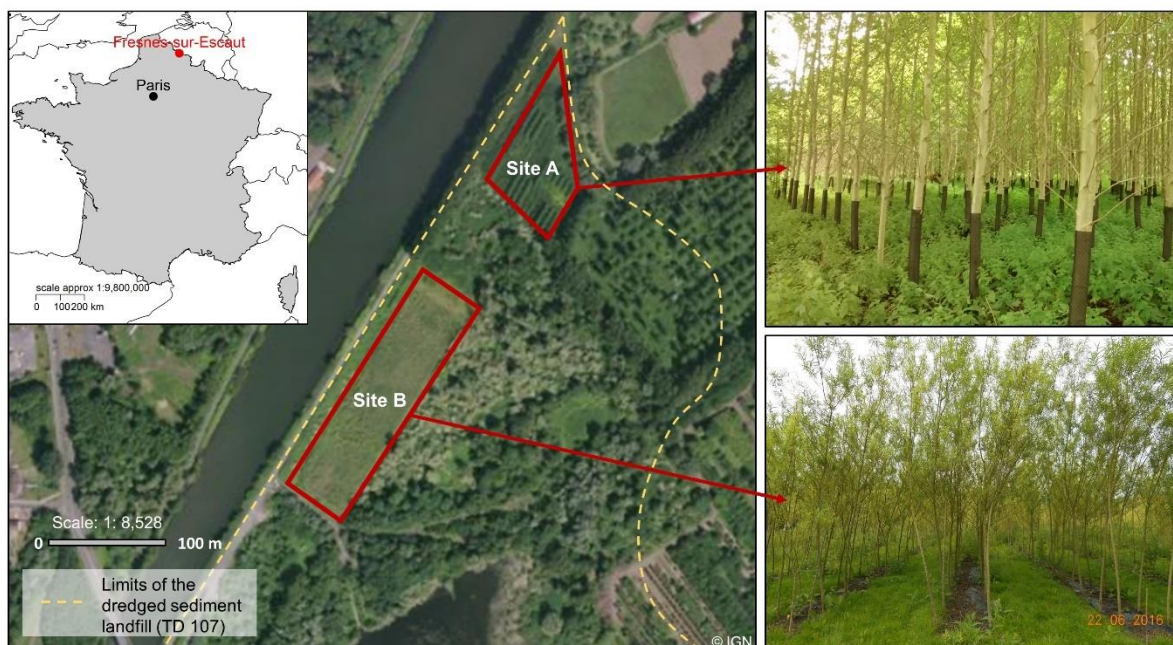


Figure 3. 1 : Location of the two experimental sites A and B. On the right, poplar (top) and willow (bottom) plantations in June 2016.

Table 3. 1 : Main physicochemical properties of the soil samples before planting and sowing (2011) at 0-20 cm depth. Threshold values used to assess the quality of dredged canal sediment (S1; [MEDD \(2006\)](#)) and local values measured in an uncontaminated area near the field sites are indicated for comparison. Values are means \pm SD.

Parameters	Site A	Site B	S1	Local values
Clay (%)	17	13		
Silt (%)	63	66		
Sand (%)	20	15		
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	40 \pm 21	53		
pH (H ₂ O)	7.6 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1		
Total organic carbon (g kg ⁻¹)	33 \pm 13	153		
N (g kg ⁻¹)	3.5 \pm 1.2	4.9		
Organic matter (g kg ⁻¹)	57 \pm 22	307		
C/N	9.2 \pm 0.8	31		
CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)	16 \pm 28	24		
As	19 \pm 5.7	48 \pm 35	30	9.0 \pm 1.0
Cd	11 \pm 17	8.1 \pm 3.5	2	<0.4
Cr	65 \pm 22	109 \pm 65	150	22 \pm 2.6
Cu	79 \pm 33	110 \pm 26	100	20 \pm 2.3
Ni	31 \pm 8.9	59 \pm 37	50	16 \pm 1.9
Pb	541 \pm 1,398	956 \pm 346	100	43 \pm 4.0
Zn	1,506 \pm 856	6,089 \pm 2,635	300	141 \pm 15

3.1.3.2. Experimental design

The site A was set up in April 2011 as described in ([Ciadamidaro et al., 2017](#)) and ([Phanthavongsa et al., 2017](#)). No specific herbaceous plant was sown to stabilize PTEs in soil. Instead, plant colonists were expected to cover the soil after the planting of two fast-growing poplar cultivars, i.e. I-214 (*Populus deltoides* \times *P. nigra*) and Skado (*P. trichocarpa* \times *P. maximowiczii*), selected for their capacity to limit PTEs in, respectively, their leaves and wood and their high biomass productivity ([Bert et al., 2017a](#); [Pottier et al., 2015](#)). The site was divided into 32 plots (12 x 18 m) and 48 unrooted rods of 1.5 m length were planted in each plot following a SRC system (2,200 stems ha⁻¹). Half of the poplar cuttings were inoculated (A-I) or not (A-NI) with a commercial mixture of ecto- and endomycorrhizal fungi (26,000 propagules per tree) ([Ciadamidaro et al., 2017](#)).

At the site B, soil preparation started in October 2011. A basic slag (Optiscor®, Carmeuse France, www.carmeuse.eu) was incorporated into the soil at 9 t ha⁻¹ (0-25 cm depth) 4 days before the sowing of the grass *Deschampsia cespitosa* (cv. *Barcampisia cespitosa*, Grainor S.A., France) at high density (40 g m⁻²) ([Kidd et al., 2015](#)). Optiscor® was mainly composed of 49 % CaO and 5.5 % MgO. This alkaline by-product of the steel industry is usually used by farmers to increase soil pH. Both commercial willow cultivars, i.e. Inger (*Salix triandra* \times *S. viminalis*) and Tordis (*Salix*

schwerinii x *S. viminalis*) x *S. vim.*), were selected for their high biomass productivity since no information was reported about their ability to accumulate PTEs at the time of implementation. In March 2012, the site was divided into 18 amended plots of 33.3 x 16.6 m (B-ADc) and planted with unrooted rods of 2 m length following a VSRC system (11,100 stems ha⁻¹). Four non-amended plots (5 x 5 m) were established on one side of the field with 32 trees in each plot. Two of the non-amended plots were manually-weeded twice a year (B-NA) and the two others were sown with *D. cespitosa* (B-NADc).

3.1.3.3. Soil sampling

At the site A, soil sampling was carried out in June 2015 in the least and the most contaminated areas to study PTE availability (0-20 cm depth). In these areas, 20 soil samples were collected with a hand auger at 20 cm from both inoculated (A-I) and non-inoculated (A-NI) poplars.

At the site B, a geostatistical approach based on the initial total soil Cd was used to select sampling points in the amended plots B-ADc to consider the high heterogeneity of the soil contamination. Soil samples were collected under the grass in June 2013 (n= 105) and June 2016 (n= 99), and at 10 cm from willows in June 2015 (n= 106) to assess the influence of plants and amendments on PTE availability. In each non-amended plot (B-NA and B-NADc), 10 soil samples were collected in June 2013, 2015 and 2016. All soil samples were oven-dried at 40°C until constant weight and ground with a grinder (agate mortar, Retsch RM100).

3.1.3.4. Soil analysis

Total soil Cd, Cu, Pb and Zn were analyzed in the soil samples collected in June 2015 at both sites, according to [Phanthavongsa et al. \(2017\)](#). PTE concentrations in soils were measured using ICP-OES (Agilent 720, Agilent 5100) and ICP-MS for Cd (Agilent 7500). One standard reference material was included for analytical quality control (NIST SRM 2710, Montana soil). For all analyses, recovery rates were 75-96% % for Cd, 73-105 % for Cu, 76-114 % for Pb and 79-118 % for Zn.

Selective extraction of Cd, Cu, Pb and Zn were performed with a 0.01 M Ca(NO₃)₂ solution according to [Phanthavongsa et al. \(2017\)](#), to estimate the plant-available fraction of PTEs in all soil samples. In addition, PTE-extractable concentrations in 16 soil samples collected in October 2011 (before the application of Optiscor®) were also measured, corresponding to the least and the most contaminated samples according to total soil PTE. Eluates were analyzed by ICP-OES (Agilent 720, Agilent 5100) and ICP-MS (Agilent 7500).

Soil pH was measured following the [ISO 10390 \(2005\)](#) standard with 5 g of 2-mm sieved samples and 25 mL of distilled water.

3.1.3.5. Plant cover and diversity

Plant diversity in sites A and B was assessed using 9-m² quadrats. The influence of clone type and soil treatment on plant cover was investigated on the basis of 8 quadrats at the site A (2 quadrats per treatment) and 20 quadrats at the site B (18 quadrats in B-ADc, 2 quadrats in B-NADc). The botanical survey was conducted in June 2015 using a reference book for plant taxonomy ([Streeter, 2011](#)). In each quadrat, total vegetation cover and species relative abundance were recorded following the cover-abundance scale of [Braun-Blanquet \(1964\)](#) and cover percentage approximations ([van der Maarel, 2007](#)). In addition, species richness (S) and diversity indices (Shannon index H', Simpson index D and Pielou's evenness J) were calculated for all treatments using the *vegan* package of R software v. 3.3.3 ([R Core Team, 2017](#)).

Before the site B preparation, the invasive species *F. japonica* was concentrated in two small patches of the field. The total area covered by the plant approximated 1,290 m². The implantation of willows and *D. cespitosa* at high density were expected to limit the regrowth of *F. japonica* by creating shade conditions and restricted space for its roots development. In addition, its shoots were cut twice a year in spring and autumn. The surface area covered by *F. japonica* was assessed each year in spring.

3.1.3.6. Plant sampling

At the site A, leaf samples of 20 inoculated (A-I) and non-inoculated (A-NI) poplars were collected in June 2015, at a height of 3-4 m.

At the site B, the shoots of *D. cespitosa* were collected in June 2013 (n= 105) and 2016 (n= 99) in the amended plots B-ADc. Ten samples were also collected in the non-amended plots B-NADc. In June 2013 and 2014, the shoots of six dominant species (*Symphytum officinale*, *Glechoma hederacea*, *Rubus caesius*, *Urtica dioïca*, *Carduus crispus* and *Arctium lappa*) were collected on the most contaminated areas of B-ADc to evaluate their potential for phytostabilization. In June 2015, willow leaves were collected at a height of 1.50-1.60 m in the plots B-ADc (n= 106), B-NA (n= 10) and B-NADc (n= 10).

In addition, the shoots of the *U. dioïca* colonist found at both sites were collected in June 2016 in the most contaminated areas (based on total soil metals) of the plots A-NI, A-I, B-NADc and B-ADc (n=5).

3.1.3.7. Plant analysis

Plant samples were washed with tap and deionized water before oven-drying at 40°C until constant weight. The dry tissues were ground and 0.5 g DW were digested at 180 °C for 20 min in 10 mL of nitric acid (67%) and 3 mL of ultra-pure water using a microwave digester (Mars Xpress, CEM). After filtration (0.45 µm), the analyses of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Pb, S, and Zn concentrations were performed by ICP-OES (Agilent 720) or ICP-MS (Agilent 7500). A standard reference of plant material (cabbage “NCS ZC 73012”, NACIS) was included for analytical quality control. Recovery rates ranged between 62% and 97% for all the studied elements.

3.1.3.8. Trees survival and growth

During the 2012-2017 growing seasons, willow survival rates were determined in all plots. Mean height and diameter (at 1.30 m) increments were estimated for living trees. In June 2015, the Chlorophyll Content Index (CCI) was measured in willow leaves (n=3 per tree) that had the same exposure to sunlight using a chlorophyll meter (CCM-200 plus). As the CCI are relative indicators of chlorophyll concentration, it was used as an indirect method to evaluate foliar N status ([Pal et al., 2012](#); [Parry et al., 2014](#)). The same leaves were analyzed for trace and major elements.

3.1.3.9. Environmental risk assessment

Two substance-based approaches were used to evaluate the environmental risks related to Cd- and Zn-contaminated soil and plants (secondary poisoning). One method was based on European Commission guidelines ([European Commission, 2003](#)). Risk indices (R) related to the contaminated soils were calculated as the 90th percentile of total soil Cd and Zn concentrations (predicted environmental concentration = PEC_{soil}) to predicted no effect concentrations (PNEC_{soil}) below which adverse effects are not expected to occur in terrestrial organisms (microorganisms, plants and invertebrates). The PNEC_{soil} values used for this study are 1.15 and 26 mg kg⁻¹ DW for Cd and Zn, respectively ([European Commission, 2007, 2010](#)). Risk indices expressing secondary poisoning of mammals were determined using the 90th percentile of measured Cd concentrations in shoots of *D. cespitosa* and *U. dioïca*, tree leaves and bark (PEC_{oral} in FW) and a PNEC_{oral} value of 0.3 mg Cd kg⁻¹ FW ([European Commission, 2007](#)). If the resulting PEC/PNEC ratio is > 1, there is a risk of adverse effects on the studied system. Secondary poisoning assessment with Zn was not considered to be relevant, as this essential element is regulated in several animals ([European Commission, 2010](#)).

The second method was performed using the software program TerraSys^{MC} 1.0 (Sanexen Environmental Services Inc.). The program aimed at estimating risk indices for plants

(herbaceous and woody vegetation) and specific animals (wild rabbit and deer observed at the field sites) exposed to Cd and Zn contaminated soils. Adverse effects may occur on the studied system if $R > 1$. Based on ecotoxicity data embedded in this program software, possible pathways and interactions between the environmental compartments (soil, air, plants and animals) were considered. The conceptual model is represented in **Figure S3. 1**. The calculations were based on total soil Cd and Zn at 20 cm depth (upper limit of the 95% confidence interval on the mean) within a surface of 1 ha and a grazing area of 100 m² for each site. No interaction with the atmosphere (0 mg m⁻³ of Cd and Zn) was considered. The reference values used for the modeling of risks from soil to plants were 4 mg Cd kg⁻¹ and 50 mg Zn kg⁻¹ in soil. Measured concentrations in plants (90th percentile of Cd and Zn concentrations in *D. cespitosa*, *U. dioica*, tree leaves and bark in DW) were used for the calculation of the risk indices to wild rabbit and deer. Main parameters for the calculation of risk indices are reported in **Table S3. 1**. Both methods considered protective exposure scenario (selected concentrations in soil are close to the maximum values and we considered that animals fed exclusively on the contaminated area). Therefore, risk indices are overestimated.

3.1.3.10. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software v. 3.3.3 ([R Core Team, 2017](#)). Normality tests (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Levene's test, tests F) were performed on all data distributions. Student's test or Wilcoxon test were used for the comparison of two means, depending of the normality and homogeneity of the variances. Comparisons of more than two means were carried out using one-way ANOVAs or Kruskal Wallis tests and reported as statistically different at the 0.05 level. Appropriate post-hoc tests were then applied when significant differences were found (Tukey, Kruskal). Pearson's correlation tests were reported as significant with $\alpha = 0.01$.

3.1.4. Results and discussion

3.1.4.1. Effects of phytomanagement on PTE availability in soil

At the site A, Ca(NO₃)₂-extractable concentrations of Cd, Pb and Zn in the plots A-I were stable for 4 years after poplar planting and inoculation whereas extractable Cu concentrations increased (**Table 3. 2**). These extractable PTE concentrations were in the same range as those measured in October 2012 ([Phanthavongsa et al., 2017](#)), indicating that inoculated poplars did not impact the labile pool of Cd, Cu, Pb and Zn in soil after two growing seasons. The increase of extractable Cu concentrations after planting in A-NI and A-I plots may be due to the release of root exudates that solubilized this essential element ([Kabata-Pendias, 2004](#)). Based on total PTE concentrations, extractable fractions were relatively low (< 0.2 %) and ranked in the decreasing

order: Cu > Zn > Cd > Pb. Besides, no significant difference was found between-extractable PTE concentrations in the plots A-NI and A-I, confirming that Cd, Cu, Pb and Zn availability was not impacted by the inoculation. These results were consistent with soil pH values which did not differ between the plots (**Table 3. 2**).

Table 3. 2 : pH and 0.01 M Ca(NO₃)₂-extractable concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in topsoil samples at 20 cm depth ($\mu\text{g kg}^{-1}$ DW) collected in the rhizosphere of poplars (site A), willows and *D. cespitosa* (site B) before (2011) and after soil treatment. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. Values are means \pm SD. Different letters indicate significant differences between the treatments for each site and each year. No letter indicates no difference ($\alpha = 0.05$).

Site	Year	Plant cover	Soil treatment	Cd	Cu	Pb	Zn	pH
A	2011*	-	-	<5	<15	<6	209 \pm 243	7.6 \pm 0.1
	2015	Poplars	A-NI	2.3 \pm 1.4	73 \pm 19	3.0 \pm 1.3	212 \pm 339	7.7 \pm 0.2
			A-I	2.2 \pm 1.3	64 \pm 54	2.3 \pm 2.8	290 \pm 152	7.7 \pm 0.1
	2011	-	-	1.3 \pm 0.5	57 \pm 20	16 \pm 9.9	510 \pm 183	7.3 \pm 0.1
B	2013	Willows, <i>D. cespitosa</i>	B-NA	0.7 \pm 0.3 ^b	44 \pm 21 ^b	12 \pm 3.9	406 \pm 156 ^b	8.2 \pm 0.2
			B-NADc	0.9 \pm 0.5 ^b	58 \pm 10 ^b	18 \pm 15	604 \pm 174 ^a	8.1 \pm 0.1
	2016	Willows, <i>D. cespitosa</i>	B-ADc	1.3 \pm 0.6 ^a	74 \pm 26 ^a	12 \pm 6.4	589 \pm 253 ^a	8.0 \pm 0.2
			B-NA	1.7 \pm 0.3 ^b	35 \pm 62 ^b	13 \pm 26	488 \pm 139 ^b	7.8 \pm 0.1 ^a
	2015	Willows, <i>D. cespitosa</i>	B-NADc	2.5 \pm 0.3 ^a	58 \pm 88 ^{ab}	16 \pm 18	839 \pm 162 ^b	7.6 \pm 0.0 ^b
			B-ADc	2.9 \pm 1.1 ^a	93 \pm 108 ^a	7.6 \pm 7.4	1,000 \pm 462 ^a	7.7 \pm 0.1 ^b
2015	Willows, <i>D. cespitosa</i>	B-NA	1.2 \pm 0.5	42 \pm 21	7.4 \pm 1.9 ^a	653 \pm 365 ^a	8.0 \pm 0.1	
		B-NADc	1.3 \pm 0.3	56 \pm 16	6.8 \pm 3.3 ^a	561 \pm 268 ^{ab}	7.9 \pm 0.1	
			B-ADc	1.3 \pm 0.5	57 \pm 23	3.9 \pm 1.9 ^b	376 \pm 343 ^b	8.0 \pm 0.1

* PTEs concentrations are derived from [Phanthavongsa et al. \(2017\)](#).

At the site B, extractable PTE fractions were also low (< 0.1 % of the respective total soil PTEs), following the decreasing order: Cu > Cd > Zn > Pb (**Table 3. 2**). Ca(NO₃)₂-extractable concentrations of Cd, Pb, Cu and Zn remained steady for one and a half years, after the incorporation of the basic slag into the soil (0.2%) and sowing of the grass *D. cespitosa* (**Table 3. 2**). In parallel, soil pH increased from 7.3 to 8.0 in the amended plots B-ADc as in the non-amended plots (B-NA and B-NADc), contributing to the maintenance of low extractable Cd, Pb and Zn concentrations in soils. We suggest that a natural soil alkalisation occurred in all plots due to the dissolution of carbonates ([Antoniadis et al., 2017](#)) and the formation of metal bearing phases irrespective of the basic slag presence ([Panfili et al., 2005](#)). Between June 2013 and 2016, extractable soil Cd and Zn increased in B-ADc whereas extractable soil Pb was reduced albeit not significantly (**Table 3. 2**). Extractable Cd and Zn concentrations were negatively correlated with soil pH, which decreased from 8.0 to 7.7 ($r_{\text{Cd}} = -0.77$ and $r_{\text{Zn}} = -0.64$; $p < 0.01$). Unexpectedly, in the non-amended plots B-NADc, extractable soil Cd and Zn increased and soil pH decreased at the

same period. As plants release root exudates that can acidify the rhizosphere and solubilize PTEs ([Antoniadis et al., 2017](#); [Kabata-Pendias, 2004](#)), we suggest that *D. cespitosa* enhanced the availability of Cd and Zn after a few years. The release of Zn²⁺ to solution by graminaceous plants was evidenced as a result of zinc sulfide (ZnS) oxidation ([Panfili et al., 2005](#)). These authors also showed that the graminaceous species mainly immobilized Zn as Zn-phosphate by a mechanism that involved the dissolution by plants of phosphate minerals initially contained in the sediment. In our study, the presence of the basic slag to the vegetated soil did not counterbalance the enhanced release of Zn²⁺ from ZnS by *D. cespitosa*. Under willows, soil-extractable concentrations were stable for Cd and Cu in all plots since 2011, whereas extractable soil Pb and Zn decreased significantly in the amended plots B-ADc (**Table 3. 2**).

Although both tested amendments (mycorrhizal fungi and Optiscor®) did not reduce Cd and Cu availability in soil, our study highlighted a decrease in extractable soil Pb and Zn for B-ADc plots combining *D. cespitosa*, willows and Optiscor®. This amendment may have induced the formation of other minerals able to precipitate or adsorb the elements, which then occurred in less soluble forms ([Kumpiene et al., 2008](#); [Panfili et al., 2005](#)). Other physicochemical soil parameters may also interfere in PTE speciation, such as OM, clay minerals and oxides/hydroxides that can retain the elements ([Kabata-Pendias, 2010](#)). In addition, Zn uptake by willows may have reduced the available Zn pool since several *Salix* clones are generally accumulating high foliar Zn concentrations notably at contaminated sites ([Van Slycken et al., 2013](#); [Vandecasteele et al., 2005](#)).

3.1.4.2. Suitability of *D. cespitosa* for phytomanagement (site B)

Plant establishment and survival in metal-contaminated soils are crucial to prevent PTE leaching to groundwater, dispersal of polluted dusts, water erosion and PTE transfers into food chain ([Vangronsveld et al., 2009](#)). Grasses are well-known to produce dense ground cover at various polluted sites with extensive root network ([Mench et al., 2010](#); [Salt et al., 1995](#)). The perennial grass *D. cespitosa* can tolerate high Al, As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn exposures as it naturally colonized industrial and polluted areas ([Coulaud and McNeilly, 1992](#); [Cox and Hutchinson, 1980](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Meharg and Macnair, 1991](#); [Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)). In addition, *D. cespitosa* was claimed as unpalatable for grazers ([Langer and Hill, 1991](#)), probably due to its rough leaves, and thus would be a relevant candidate for phytostabilization. Despite its potential, this perennial grass has been rarely tested for this purpose ([Bert et al., 2012b](#); [Kucharski et al., 2005](#); [Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)).

Here, the establishment of *D. cespitosa* resulted in a full ground cover in 2 weeks. After 4 years, the soil remained densely covered by the grass and some other herbaceous species, which heterogeneously colonized the site (**Table 3. 3**). Despite high total soil PTE, the grass completed

its life cycle as flowering occurred between May and June, without any visible symptom of toxicity. In line with our observations, ([Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)) showed that long-term exposure of *D. cespitosa* roots to high PTE concentrations did not affect the plant growth and survival while mitotic abnormalities occurred. Multiple metal tolerance was shown to operate similarly in various grass species including *D. cespitosa* and result from several metabolic processes, such as an adaptation of PTE uptake system in presence of high concentrations of PTEs in soil, leading to reduced influx of PTEs in plants ([Kabata-Pendias, 2010](#); [Meharg and Macnair, 1991](#)).

In June 2013 (**Figure 3. 2**) and 2016 (data not shown), mean shoot Cd, Cu and Pb concentrations of *D. cespitosa* were close to baseline values found in grasses from uncontaminated sites. In contrast, its shoot Zn concentrations were 5 times higher than baseline values (**Figure 3. 2**) and were not reduced by Optiscor®. Considering that Zn is well regulated in several animals ([European Commission, 2010](#)), we assume that risks associated to the consumption of *D. cespitosa* are negligible even if it is eaten by herbivorous animals such as rabbits and deer ([Alonso and Hartley, 1998](#)). Herbivory impacts on *D. cespitosa* leaves were regularly observed in our field site.

Bioconcentration factors (BCF) *D. cespitosa*, calculated as the ratio of shoot element concentration to total soil element ([Mench et al., 2010](#)), were all below 0.1 in June 2013 and 2016, confirming that this grass limited Cd, Cu, Pb and Zn transfers to its shoots (data not shown). These results confirmed *D. cespitosa* as a metal-excluder, which accumulates Cu and Zn mainly in roots with limited translocation to shoots ([Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)). Therefore, we demonstrate the effective revegetation of the site B soil by *D. cespitosa* after a trajectory of 5 years. In addition, our results suggest its phytoexclusion properties although to confirm that its root metal concentration should be measured.

3.1.4.3. Plant diversity in poplar and willow stands

Depending on objectives, plant diversity can be considered as pivotal for the success of phytomanagement projects because it encompasses different ecological functionalities enabling environmental stability and resilience ([Evangelou and Deram, 2014](#); [Mitchell et al., 2000](#)). In our case, the promotion of plant diversity was not necessary as objectives were reduction of pollutant transfers and exposures and production of a valuable biomass, but it could marginally promote the ecological processes and soil functions. The vegetation under poplars (site A) was only composed of plant colonists since no specific plant was implemented to cover the soil and limit PTE availability (**Table 3. 3**). As plant growth and cover depend on light intensity, the denser foliage of Skado poplars likely reduced plant colonization when compared with I-214 poplars (**Table 3. 3**). The higher proportion of bare ground under the Skado clone (75 %), sometimes

recovered by thin litter, may also be the consequence of negative allelopathic interactions that inhibited herbaceous plant growth because of allelochemicals present in the foliage ([Kohli, 1998](#)).

In June 2015, 18 plant species were identified in the site A plots (**Table 3. 3**). Most of them were ruderal species (e.g. *Galium aparine*, *Arrhenatherum elatius*), forest species (e.g. *Glechoma hederacea*, *Ranunculus repens*) and both such as *Urtica dioica*. Diversity indices (Shannon (H'), Simpson (D) and Pielou's (J) indices) were low in all treatments (**Table 3. 3**), indicating the high abundance of one species, *U. dioica*, a perennial and nitrophilous plant (34.6 to 92.9 % of the total abundance). In fact, *U. dioica* is known as highly competitive, forming dense monospecific stands by means of horizontal rhizomes ([Taylor, 2009](#)). Based on H', D and J values, the highest plant diversity was found in the plots planted with inoculated poplars (Skado and I-214), and to a lesser extent in the plots with non-inoculated I-214 clones, suggesting that mycorrhizal fungi enhanced plant diversity as it was observed in other studies ([Van Der Heijden and Horton, 2009](#)). In contrast, plots with non-inoculated Skado poplars showed the lowest diversity as the plant community was dominated by *U. dioica*, which might be more shade-tolerant compared with the other plant colonists.

At the site B, 30 plant species associated with meadow, forest and ruderal vegetation were identified (**Table 3. 3**). As the B-ADc plots contained more quadrats (18) than B-NADc (2 quadrats), the number of species was higher in the B-ADc treatment (**Table 3. 3**). The selected and perennial grass *D. cespitosa* remained the dominant species in all plots within the 4-year study and ranged between 77.7 and 84.7 % of the total abundance. Consequently, all diversity indices were low (< 1) due to the dominance of *D. cespitosa*. In the amended B-ADc plots, meadow species such as *Symphytum officinale* increasingly spread in open areas while the forest species *G. hederacea* and *R. repens* formed small patches on the whole site. In the B-NADc treatment, 6 to 7 plant species were recorded including the nitrophilous plant *Rubus caesius*, which represented 14 to 19 % of the total abundance.

Depending on the initial plant cover and soil amendments, plant composition may change over time. [Bert et al. \(2012b\)](#) showed that the combination of *D. cespitosa* and a basic slag similar to Optiscor® enabled the establishment of more competitive grasses such as *Calamagrostis epigejos*. Hence, other tolerant and metal-excluder plants like *D. cespitosa* may establish themselves, contributing to the development of a vegetation cover on the contaminated site.

Table 3. 3 : List of plant species identified at the sites A and B in June 2015. Values are mean relative abundance (%). Diversity indices (H': Shannon index; D: Simpson's index; J: Pielou's measure of species evenness) are indicated for each treatment modality (A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows). "L" refers to plants life cycle: A: annual; B: biennial; P: perennial.

Stratum	Site	Family	Species	L	I-214		Skado		Inger		Tordis		
					A-NI	A-I	A-NI	A-I	B-NADc	B-ADc	B-NADc	B-ADc	
	A	Aceraceae	<i>Acer sp.</i>	P			0.15						
	A	Apiaceae	<i>Chaerophyllum temulum</i>	B	0.07	0.05	0.30	0.95					
	A	Araliaceae	<i>Hedera helix</i>	P			0.30	0.95					
	A	Geraniaceae	<i>Geranium dissectum</i>	A		0.05							
	A	Oleaceae	<i>Fraxinus excelsior</i>	P			0.15						
	A	Orchidaceae	<i>Epipactis helleborine</i>	P	0.04	0.02	0.30	0.48					
	A	Poaceae	<i>Agrostis sp.</i>	P			0.30						
	A		<i>Arrhenatherum elatius</i>	P		20.2							
	A		<i>Poa sp.</i>	A/P	0.95	0.05							
	A, B	Asteraceae	<i>Cirsium vulgare</i>	B		0.58				0.06		0.10	
	A, B	Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i>	P			0.15		0.19	7.87	0.26	5.16	
	A, B	Lamiaceae	<i>Glechoma hederacea</i>	P	0.14	3.50	4.01	11.9		6.22		8.94	
	A, B	Poaceae	<i>Holcus lanatus</i>	P		20.2	0.30		0.10	0.03	0.13	0.04	
	A, B	Primulaceae	<i>Anagallis arvensis</i>	A		0.58				0.01			
	A, B	Ranunculaceae	<i>Ranunculus repens</i>	P	0.07	0.07	0.45	0.95		3.52		2.33	
	A, B	Rubiaceae	<i>Galium aparine</i>	A	31.7	20.2	0.30	0.48		0.02	0.13	0.01	
	A, B	Urticaceae	<i>Urtica dioica</i>	P	61.7	34.6	92.9	72.4	0.19	0.18		0.35	
Herbaceous layer	B	Asteraceae	<i>Arctium lappa</i>	B								0.01	
	B		<i>Carduus crispus</i>	B						0.01		0.02	
	B		<i>Eupatorium cannabinum</i>	P						0.01			
	B	Boraginaceae	<i>Myosotis arvensis</i>	A					0.19	0.06		0.08	
	B	Cannabaceae	<i>Humulus lupulus</i>	P						0.01			
	B	Caryophyllaceae	<i>Myosoton aquaticum</i>	P							0.13	0.06	
	B	Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i>	P						0.01		0.03	
	B		<i>Convolvulus sepium</i>	P								0.02	
	B	Cyperaceae	<i>Carex canescens</i>	P						0.02		0.02	
	B	Dipsacaceae	<i>Dipsacus fullonum</i>	B						0.04		0.02	
	B	Fabaceae	<i>Trifolium repens</i>	P						0.27		0.02	
	B	Hypericaceae	<i>Hypericum perforatum</i>	P						1.61		0.01	
	B	Lamiaceae	<i>Lycopus europaeus</i>	P						0.01		0.02	
	B	Plantaginaceae	<i>Veronica arvensis</i>	A								0.02	
	B	Poaceae	<i>Bromus hordeaceus</i>	A							0.01		
	B		<i>Deschampsia cespitosa</i>	P						84.7	79.3	80.1	77.7
	B	Polygonaceae	<i>Fallopia japonica</i>	P							0.02		0.28
	B	Rosaceae	<i>Geum urbanum</i>	P						0.10			
	B		<i>Potentilla sp.</i>	P								0.02	
	B		<i>Rubus caesius</i>	P						14.5	0.66	19.2	4.63
B	Scrophulariaceae	<i>Scrophularia auriculata</i>	P							0.03		0.05	
B		<i>Verbascum nigrum</i>	B							0.03		0.02	
Moss layer	A	Bryophyta (phylum)				5.32	0.07	0.45	11.9				
		Plant cover (%)				85.0	81.0	25.0	25.0	100	100	100	100
		Species richness				8	13	13	8	7	24	6	25
		H'				0.88	1.54	0.38	0.92	0.47	0.84	0.54	0.88
		D				0.52	0.76	0.14	0.45	0.26	0.36	0.32	0.38
		J				0.43	0.60	0.15	0.44	0.24	0.26	0.30	0.27

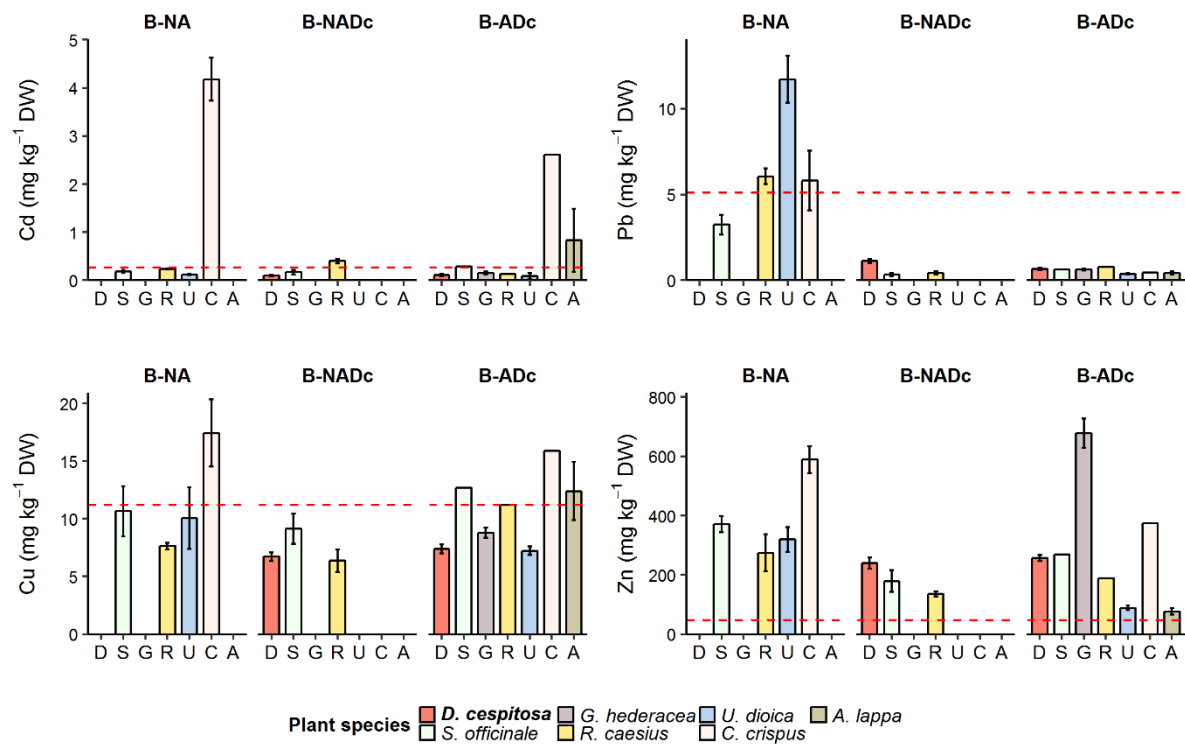


Figure 3. 2 : Concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in the shoots of *D. cespitosa* and plant colonists collected at the site B in June 2013 and 2014, grouped by treatment (B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows). Values are means \pm SE. For each PTE, the red dashed line indicates mean baseline concentrations in herbaceous plants (Kabata-Pendias, 2010).

3.1.4.4. Monitoring of the invasive species *F. japonica*

Among the plant colonists, the invasive species *F. japonica*, which was initially present at the site B, was monitored from the onset of the field trial. It is tolerant to PTEs and can be found on highly contaminated sites, especially near riverbanks (Schnitzler and Muller, 1998). This plant species is a strong competitor with an extensive underground woody rhizome system stimulated by mowing through vegetative reproduction (Brock et al., 1995; Schnitzler and Muller, 1998). In four years, the covered area decreased by 95 % in the B-ADc treatment. Shoot and leaf chlorosis as well as lower height (data not shown) as compared with the same species developing along the riverbanks indicated that *F. japonica* was less vigorous. This invasive species was likely outcompeted by the dense cover formed by *D. cespitosa*, regular mowing conducted twice a year, and finally the shadow made by willows (Dommanget et al., 2015; Kidd et al., 2015; Seiger and Merchant, 1997). *Fallopia japonica* was not recorded at the site A and we expect that the site conditions remain unfavorable to its establishment, since it is not inclined to invade closed environment (Dommanget et al., 2015; Schnitzler and Muller, 1998).

3.1.4.5. Are colonizing plants suitable for phytomanagement?

To ensure environmental risk management, plant colonists must be regularly monitored and analyzed to prevent PTE transfers into the food chain ([Vangronsveld et al., 2009](#)). At the site B, shoot Cd, Cu, Pb and Zn concentrations of plants collected in 2013 and 2014 depended on plant species and soil treatments (**Figure 3. 2**). Among the seven species, *C. crispus* showed the highest concentrations for Cd (2.6-4.19 mg kg⁻¹ DW) in the B-ADc and B-NA plots. Compared with plants from uncontaminated sites ([Kabata-Pendias, 2010](#)), those concentrations were excessive whereas the other plant colonists showed baseline levels. Interestingly, shoot Pb concentrations in plant colonists from the B-ADc and B-NADc plots were far below baseline levels ([Kabata-Pendias, 2010](#)) whereas those from the B-NA plots exhibited higher values, which were close or above baseline levels (**Figure 3. 2**). High shoot Zn concentrations occurred in almost all collected plants as compared with baseline values ([Kabata-Pendias, 2010](#)) and some plants showed higher concentrations in the B-NA plots. As the lowest shoot Pb concentrations were found in both the B-ADc and B-NADc plots with *D. cespitosa* as common species, we suggest that Optiscor® had no effect on shoot Pb concentration for plant colonists. Nevertheless, shoot Pb concentration was significantly reduced for plant colonists in the presence of *D. cespitosa*, suggesting belowground interactions between plants. This could be similar for Zn, even if the results were less clear. One can propose that a high density of *D. cespitosa* may limit uptake and accumulation of Pb and Zn in plant colonists, as already evidenced for wheat ([Ma et al., 2016a](#)). It should be verified that the root systems of colonizing species were constrained in the presence of *D. cespitosa*. Based on soil total PTEs, most plant colonists strongly limited their shoot Cd, Cu, Pb and Zn concentrations (BCF < 0.2). However, *C. crispus* may be considered in a risk management approach due to its high shoot Cd concentration (**Figure 3. 2**; BCF_{Cd} = 0.8).

For *U. dioïca* collected in June 2016 at both sites A and B, plant cover and amendments had significant impacts on its shoot metal concentrations. Compared with *U. dioïca* plants grown in uncontaminated soils ([Bert et al., 2012b](#)), *U. dioïca* plants from our sites exhibited higher shoot Cd, Cu and Zn concentrations (**Figure 3. 3**), although having no consequences on primary plant consumers ([Sinnott et al., 2009](#)). The highest shoot Cd and Pb concentrations for nettle were measured under inoculated and non-inoculated Skado poplars of the site A. Shoot Cd, Pb and Zn concentrations of *U. dioïca* in the A-I plots were twice higher than those in the A-NI plots, suggesting a negative impact of poplar inoculation on its metal accumulation. However, this is not clear whether this is related to an indirect effect of inoculation or to the low plant cover (13 %) as reported in the site B, or both. At the site B, shoot Cu and Zn concentrations of *U. dioïca* were higher in the amended B-ADc plots compared with the B-NADc one, suggesting a negative impact of Optiscor®. No correlation was found between PTE availability and their concentrations in *U.*

dioïca shoots (data not shown). Although the sites A and B differed in phytomanagement options, one can suggest that *D. cespitosa* limited Pb concentration in *U. dioïca* shoots as hypothesized for other plant colonists. This may have also occurred in the case of Cd. Overall, BCF values were all below 0.2, indicating that low translocation from soil to shoots occurred. Given the fact that *U. dioïca* can dominate the plant cover under poplars while maintaining low PTE concentrations in its shoots, we assume that it may be used for phytomanagement if a perennial denser cover is achieved to avoid pollution dispersion.

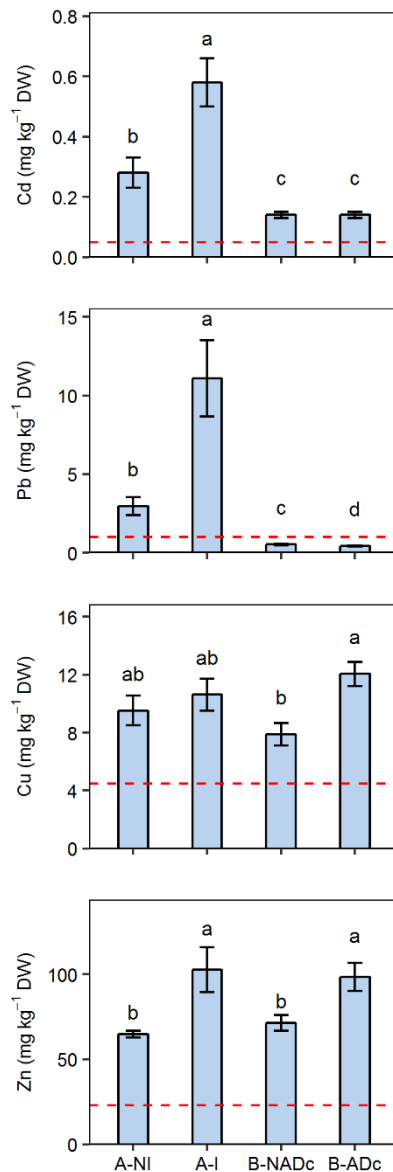


Figure 3. 3 : Concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in the shoots of *U. dioïca* collected at the sites A (under Skado poplars) and B (under Tordis willows) in June 2016, under the different treatments. Values are means \pm SE (n=5). For each metal, the red dashed line indicates shoot baseline concentration for *U. dioïca* plants grown in uncontaminated soils (Bert et al., 2012b). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows.

3.1.4.6. Growth and metal accumulation of poplars and willows

At the site A, the poplar stand presented high survival rates after seven growing seasons and no visible toxicity symptoms were observed. As reported in (Ciadamidaro et al., 2017), the survival rates ranged between 96% and 100 % for both inoculated and non-inoculated clones. Moreover, the inoculation of poplars with mycorrhizal fungi improved the tree growth based on maximum height and trunk diameter (Ciadamidaro et al., 2017). At the site B, the survival rates of willows were more contrasted between the clones and the treatments (Figure 3. 4A). After six growing seasons, the survival rates were 100% for Tordis and 81 % for Inger in the non-amended B-NA plots. In the non-amended B-NA plots, the presence of *D. cespitosa* may affect the survival rates, which decreased to 72% for Tordis and to 31 % for Inger. The survival rates were even lower in the amended B-ADc plots, which continuously decreased from 2012 to 2017, reaching 31% for Tordis and 20% for Inger. Those differences between survival rates pointed out a negative impact of the herbaceous cover on willows, likely enhanced by Optiscor®.

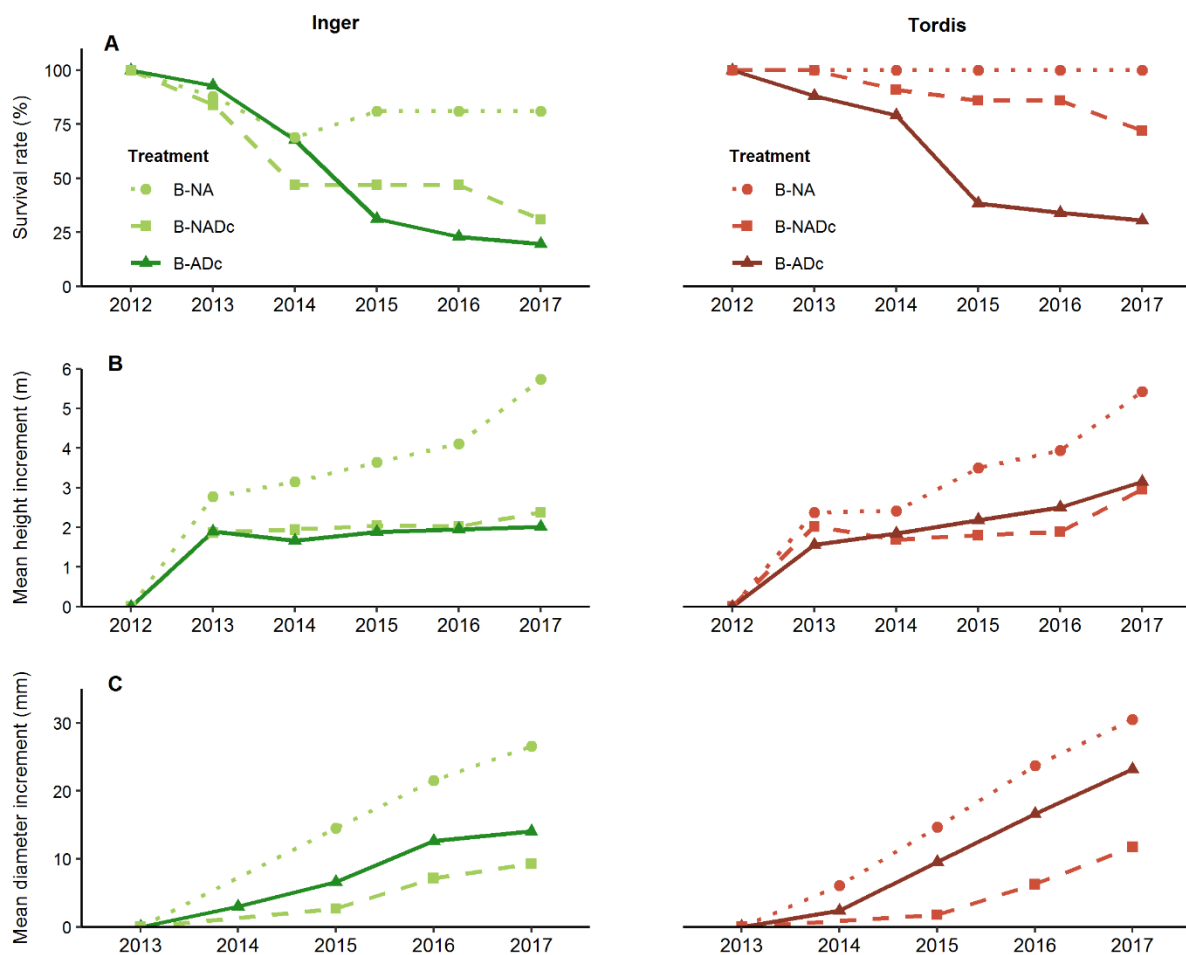


Figure 3. 4 : Survival rates (A), mean height increment (B) and mean diameter increment (C) of the willow clones Tordis and Inger planted in non-amended plots without *D. cespitosa* (B-NA), in non-amended plots with *D. cespitosa* (B-NADc) and amended plots with *D. cespitosa* (B-ADc) over time.

The competition between herbaceous plants and willows (site B) was also demonstrated by measuring tree height increment (**Figure 3. 4B**). It highlighted a better growth of both clones in the B-NA plots, with a height increment of 5.4-5.7 m in five years. The mean height increment of willows was lower in the B-NADc and B-ADc plots, ranging from 2.0 to 3.0 m in five years (**Figure 3. 4B**). Regarding the mean diameter increment (**Figure 3. 4C**), both clones also showed a better growth in the B-NA plots (14-23 mm in 5 years) whereas they showed the lowest growth in the B-NADc ones (9.3-12 mm in 5 years).

Overall, the Tordis clone exhibited a better capacity to tolerate the site conditions as compared with the Inger clone in terms of growth and survival rate. In unpolluted soils, [Albertsson et al. \(2014a\)](#) reported that willow clones including Inger and Tordis were weak competitors towards herbaceous plants, especially during their establishment phase. Their mortality increased and their shoot growth was reduced after one growing season in presence of herbaceous plants. Based on [Kucharski et al. \(2005\)](#), *D. cespitosa* could be hyper competitive with limited growth requirements. We observed that willow root systems were heavily constrained by the *D. cespitosa* root systems (data not shown), thus restraining willow access to nutrients. Negative allelopathic interactions may also explain the altered growth of willows in presence of *D. cespitosa* as demonstrated in several studies involving grasses and trees ([Fales and Wakefield, 1981](#); [Kolb, 1988](#); [Walters and Gilmore, 1976](#)).

Most of the foliar concentrations of macronutrients, i.e. P, K, Ca, Mg and S, for poplars and willows (**Table 3. 4**) were in the range of baseline values found in tree leaves from unpolluted sites ([Ågren and Weih, 2012](#); [Martín-García et al., 2012](#); [Vandecasteele et al., 2004](#)). However, the CCI values of willow leaves differed between the treatments (**Table 3. 4**). For both clones, the CCI values were higher in the B-NA plots than in the B-NADc ones, suggesting a negative impact of *D. cespitosa* on willow nutrient status. The significant differences between CCI values for B-NADc and B-ADc willows showed that Optiscor® improved willow nutrition. As the CCI is usually positively correlated with foliar N ([Pal et al., 2012](#)), we assumed that Optiscor® improved the availability of N in soil, leading to a higher production of chlorophyll in willow leaves.

Table 3. 4 : Foliar nutrients concentrations of poplars and willows. Values are means \pm SD. The ratios show the interactions between the micronutrients Fe, Mn and Zn in tree leaves. “CCI” stands for Chlorophyll Content Index; it indicates the amount of chlorophyll in leaves. Baseline ranges are indicated for comparison ([Ågren and Weih, 2012](#); [Martín-García et al., 2012](#); [Vanbeverem et al., 2016](#); [Vandecasteele et al., 2004](#)). For each clone, different letters between treatments indicate significant differences. No letter indicates no difference ($\alpha=0.05$). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows.

Site	Clone	Treatment	P (mg g ⁻¹)	K (mg g ⁻¹)	Ca (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	S (mg g ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Fe/Mn	Fe/Zn	CCI
A	I-214	A-NI	2.63 \pm 0.36 ^B	21.2 \pm 3.24	25.1 \pm 2.66	3.09 \pm 0.33	5.94 \pm 1.17 ^A	45.6 \pm 6.86	34.6 \pm 9.74	1.39 \pm 0.32	0.14 \pm 0.09	-
		A-I	3.03 \pm 0.49 ^A	23.5 \pm 5.28	24.1 \pm 4.51	2.98 \pm 0.44	4.86 \pm 1.50 ^B	44.6 \pm 7.58	28.4 \pm 10.9	1.69 \pm 0.40	0.12 \pm 0.07	-
	Skado	A-NI	3.38 \pm 0.65	21.8 \pm 2.67	28.4 \pm 5.17	2.59 \pm 0.47	3.94 \pm 0.53 ^b	96.5 \pm 16.0	21.2 \pm 4.81	4.69 \pm 0.92	0.26 \pm 0.09	-
		A-I	3.27 \pm 0.51	21.2 \pm 3.64	29.6 \pm 5.39	2.60 \pm 0.34	5.08 \pm 1.58 ^a	89.9 \pm 8.74	24.8 \pm 4.71	3.72 \pm 0.66	0.27 \pm 0.15	-
Baseline ranges			1.9-6.6	11.2-17.3	10.4-30.8	1.7-3.2	1.6-3.2	55.6-163	21.7-380	0.6	0.7	
B	Inger	B-NA	2.89 \pm 0.68 ^B	14.7 \pm 2.47 ^B	16.3 \pm 11.2	1.85 \pm 0.75	7.37 \pm 3.34	247 \pm 177 ^{AB}	37.3 \pm 25.7	6.48 \pm 0.75 ^{AB}	0.16 \pm 0.05 ^A	11.7 \pm 3.69 ^A
		B-NADc	4.02 \pm 0.68 ^A	16.6 \pm 2.93 ^{AB}	13.2 \pm 3.64	1.83 \pm 0.34	5.68 \pm 1.34	147 \pm 47.0 ^A	18.6 \pm 5.83	7.97 \pm 1.42 ^A	0.11 \pm 0.02 ^{AB}	4.49 \pm 1.05 ^C
		B-ADc	2.86 \pm 0.65 ^B	21.6 \pm 7.77 ^A	15.4 \pm 4.08	1.98 \pm 0.4	5.35 \pm 1.57	95.8 \pm 47.5 ^B	16.7 \pm 8.59	5.92 \pm 2.04 ^B	0.09 \pm 0.04 ^B	6.98 \pm 0.71 ^B
	Tordis	B-NA	3.15 \pm 0.51	16.8 \pm 3.45 ^b	14.8 \pm 4.64	2.11 \pm 0.35	6.16 \pm 1.01	179 \pm 77.2 ^a	46.4 \pm 14.7 ^a	3.82 \pm 0.91	0.10 \pm 0.03 ^a	7.44 \pm 1.13 ^a
		B-NADc	3.84 \pm 0.39	14.4 \pm 3.14 ^b	20.2 \pm 4.83	2.35 \pm 0.53	5.10 \pm 0.67	102 \pm 27.0 ^{ab}	38.5 \pm 10.0 ^a	2.96 \pm 1.57	0.05 \pm 0.02 ^b	5.32 \pm 1.14 ^b
		B-ADc	3.75 \pm 0.9	21.9 \pm 6.27 ^a	19.2 \pm 3.7	2.41 \pm 0.46	6.11 \pm 1.91	80.2 \pm 33.1 ^b	22.7 \pm 8.09 ^b	3.94 \pm 2.10	0.06 \pm 0.03 ^b	7.31 \pm 0.45 ^a
Baseline ranges			2.5-3.7	11-22	13-25	2.1-3.0	2.6-7.3	107-147	33-536	4.0	2.3	

Besides, both *Salicaceae* species exhibited excessive foliar Cd and Zn concentrations (**Figure 3. 5**) whereas foliar Cu and Pb concentrations were in the range of baseline levels ([Madejón et al., 2004](#); [Vandecasteele et al., 2005](#); [Vandecasteele et al., 2004](#)). Copper and Pb would be mainly accumulated in the tree roots as suggested by [Madejón et al. \(2004\)](#) and [Vandecasteele et al. \(2005\)](#). The highest foliar Cd and Zn concentrations were found in the Tordis clone and ranged between 3.2-20 mg Cd kg⁻¹ DW and 774-3113 mg Zn kg⁻¹ DW. The lowest foliar Cd and Zn concentrations occurred in both poplar clones, even if these concentrations also exceeded common concentrations. Willows and poplars generally displayed high foliar Cd and Zn concentrations in moderately and highly polluted sites ([Enell et al., 2016](#); [Laureysens et al., 2004](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#); [Van Slycken et al., 2013](#); [Vandecasteele et al., 2004](#)) and some species such as *S. fragilis* can tolerate more than 80 mg Cd kg⁻¹ DW in leaves with no sign of toxicity ([Vervaeke and Lust, 2001](#)).

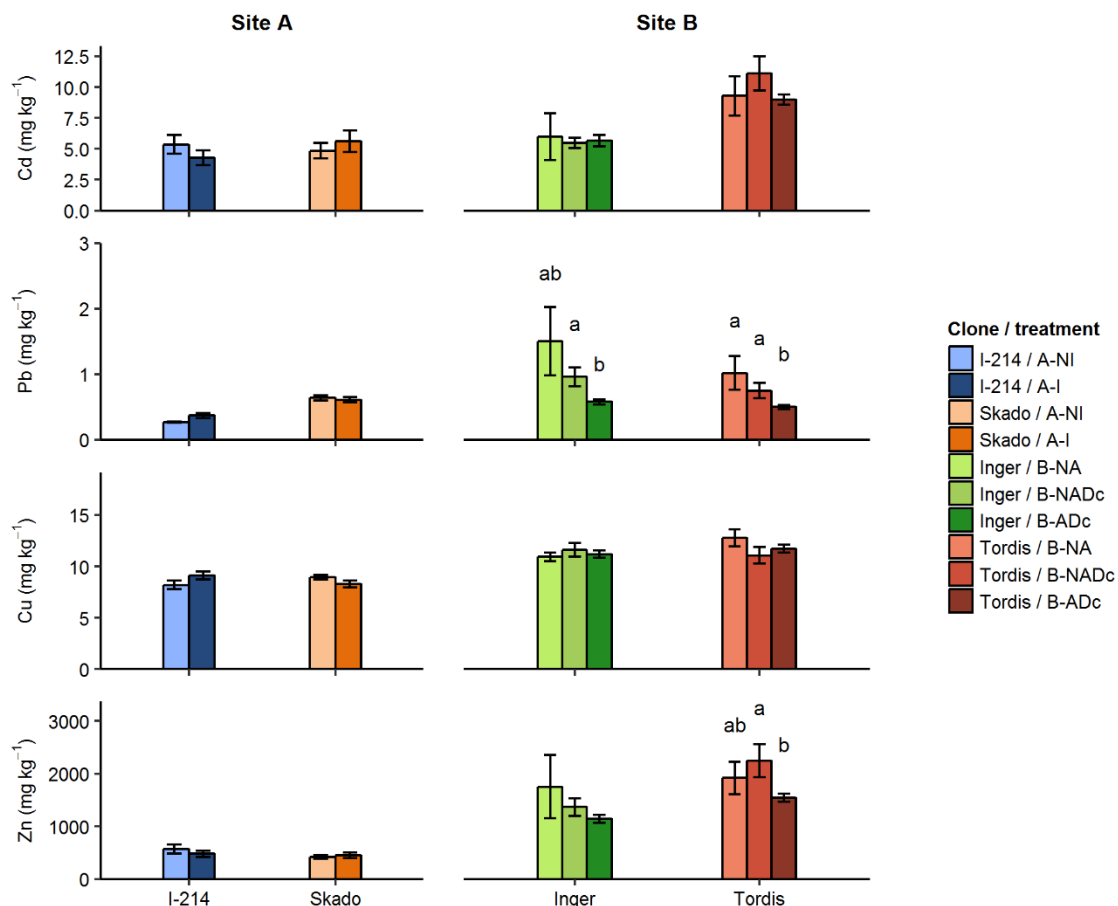


Figure 3. 5 : Foliar Cd, Pb, Cu and Zn concentrations of poplars (I-214, Skado) and willows (Inger, Tordis) in June 2015. Values are means \pm SE. Significant differences between the treatments for each clone are indicated by different letters ($p < 0.05$). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NA: non-amended soil planted with willows; B-NADc: non-amended soil with *D. cespitosa* and willows; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows.

Metal toxicity in plants can result from nutritional imbalance ([Kabata-Pendias, 2010](#)). In this regard, the Fe/Zn ratios (**Table 3. 4**) were low in all cases compared with optimal values ([Ågren and Weih, 2012](#); [Martín-García et al., 2012](#)), indicating that Zn excess may have decreased Fe uptake and foliar concentration. Besides, Cd uptake by poplars and willows might also have reduced the translocation of Fe in their shoots as Cd can inhibit Fe transporters ([Solti et al., 2011](#)). No sign of toxicity was observed on poplars and Tordis willows collected in the B-NA and B-ADc plots. In fact, the Fe/Mn ratios of these trees were in the range of optimal values ([Ågren and Weih, 2012](#); [Martín-García et al., 2012](#)). In contrast, high Fe/Mn ratios may indicate a physiological stress as proposed by [Barrick and Noble \(1993\)](#). Here, despite optimal foliar Fe concentrations ([Ågren and Weih, 2012](#)), the clone Inger from the B-NADc plots presented the highest Fe/Mn ratio (7.97) and lowest CCI values (**Table 3. 4**) hence explaining their limited growth.

At the field scale, the mycorrhizal inoculation of poplars did not decrease foliar Cd and Zn concentrations in contrary to our expectations (**Figure 3. 5**) and results from several pot/greenhouses studies conducted in controlled conditions ([Cabral et al., 2015](#)). However, a positive effect of the inoculation can be found depending on soil contamination levels as previously reported ([Phanthavongsa et al., 2017](#)). The basic slag Optiscor® had no effect on foliar Cd concentration but significantly decreased foliar Zn concentration in the Tordis willows (by 31 %). Interestingly, both willow clones showed lower foliar Pb concentrations in the amended B-ADc plots (**Figure 3. 5**). These results corroborate the decrease of extractable soil Pb in these plots (**Table 3. 2**) despite no significant correlation was found, and suggest a positive effect of Optiscor® on Pb extractable concentrations in soil.

3.1.4.7. Environmental risk assessment

Environmental risk assessment (ERA) is one pillar of a phytomanagement trial as transfers of PTEs into the food chain may occur ([Vangronsveld et al., 2009](#)). [Angelova et al. \(2010\)](#) showed that high total soil Cd ($12.2 \pm 0.24 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) affected the ingestion of Cu and Zn by rabbits, leading to their higher accumulation in some organs. As wild rabbits, deer and herbivory were noticed in the studied areas, risks related to the consumption of *D. cespitosa*, *U. dioica*, tree leaves and bark were assessed for each site.

Based on the $\text{PEC}_{\text{soil}}/\text{PNEC}_{\text{soil}}$ ratios and the use of TerraSys^{MC}, terrestrial organisms (plants, invertebrates and microorganisms) would be highly affected by exposition to total soil Cd and Zn (**Table 3. 5**). As results were similar for all treatments at each site (data not shown), risk indices are only listed for the treated A-I and B-ADc plots. Both ERA methods indicated a risk with mammalian herbivory (**Table 3. 5**). The $\text{PEC}_{\text{oral}}/\text{PNEC}_{\text{oral}}$ ratios specified that eating tree leaves and bark may cause more adverse effects than grazing herbaceous plants while TerraSys^{MC}

confirmed that ingestion of plant parts enriched with Cd and Zn may affect rabbits and deer. Nevertheless, Cd and Zn concentrations in aerial tree parts are expected to decrease with increased biomass production over several growing seasons (Mertens et al., 2006b). In addition, it is unlikely that rabbits and deer would consume large quantities of metal-enriched leaves or bark because deer are quite selective and sample food continuously with respect to nutritional values of their diet (Tixier et al., 1997) and wild rabbits graze mostly grasses (Rogers et al., 1994). Therefore, the restrictive values used in TerraSys^{MC} overestimate the risks regarding the animal diet over the year. Likewise, Enell et al. (2016) showed that risk quotients calculated to assess phytomanagement on brownfields using willows as energy crops were likely overrated by considering tree leaves as the only food for grazers. It is also admitted that bench bioassays used to determine threshold values (i.e. PNEC and values from TerraSys^{MC} dataset) overestimate the risks as compared to field observations (Jensen and Pedersen, 2006). Many uncertainties remain as the impacts of PTEs depend on various factors (plant species and abundance, animal diet, grazing area, etc.) but we cannot exclude a risk of food chain contamination in our field sites according to the risk indices calculated with these preliminary approaches.

Table 3. 5 : Risk indices (R) related to total Cd and Zn in soils and plants, calculated as the PEC/PNEC ratio (method 1) and by the software program TerraSys^{MC} (method 2). A-I: soil planted with inoculated poplars; B-ADc: amended soil with *D. cespitosa* and willows. Risk indices in bold (R > 1) indicate potential adverse effects on the studied system.

Method 1 (PEC/PNEC)	R (Cd)		R (Zn)	
	A-I	B-ADc	A-I	B-ADc
Soil to terrestrial organisms (plants, invertebrates, microorganisms)	10	9.6	87	346
Nettle (<i>U. dioica</i>) to mammals	0.5	0.1	-	-
Grass (<i>D. cespitosa</i>) to mammals	-	0.2	-	-
Tree leaves to mammals	6	8	-	-
Tree bark to mammals	-	11	-	-
Method 2 (TerraSys ^{MC})				
Soil to plants	3.4	1.8	42	118
Plants to wild rabbit	2.0	2.3	1.2	2.8
Plants to deer	3.9	4.8	2.0	5.2

3.1.4.8. Lessons of the field and recommendations

Few studies reported the long-term effects of phytomanagement at field scale from a risk-based point of view. Our field study highlighted the use of the perennial grass *D. cespitosa* as a relevant species for phytomanagement. After 4 years, this grass showed a capacity to tolerate high total soil As and metals (Table 3. 1) and formed a dense cover while preventing food chain contamination by maintaining low PTEs in its shoots (Figure 3. 2). In combination with a metal-

excluder such as *D. cespitosa*, the preservation of relevant plant colonists for phytomanagement or to increase biodiversity may not be an environmental issue, if the hypothesized PTE decrease in the colonist shoots is confirmed. To maintain a dense perennial vegetation and combat against invasive species such as *F. japonica*, regular mowing appeared as an appropriate management practice.

A strong competition between *D. cespitosa* and willows used for bioenergy production at the site B was evidenced, reducing trees growth and survival. The sowing of herbaceous plants a few months after tree establishment may be recommended to promote tree growth and thus reduce competition. Conversely, the poplars showed an optimal growth at the site A and were likely more tolerant than willows to the soil conditions. The dense foliage of Skado poplars limited the growth of plant colonists and soil cover. Revegetation by plant colonists can be constrained by allelopathic interactions. To optimize the intercropping of herbaceous plants and trees, it is necessary to consider belowground and aboveground interspecific interactions. Moreover, to avoid potential regression of the plant cover by tree shade, the period before wood harvest may be adjusted depending on the selected species. Therefore, the investigation of tree-grass interactions over several rotation cycles is required to determine the best management practices for the phytomanagement of contaminated soils.

Despite positive results concerning the lower availability of Pb induced by Optiscor®, the expected impacts of the basic slag on the reduction of both extractable soil Cd, Cu and Zn and foliar concentrations were not reached. Likewise, mycorrhizal inoculation did not reduce extractable soil Cd, Cu and Zn and the translocation of these elements in poplar leaves. As the phytostabilization of contaminated soils should include excluder cultivars to reduce the potential PTE transfer into the food chain, further research is needed to decrease PTE translocation in the aerial parts of trees with more appropriate amendment and this is particularly critical for Cd-enriched tree leaves. Besides, biomass valorization of Zn-enriched shoots (i.e. *D. cespitosa* and plant colonists) should not be excluded since they may be used as Zn-biofortified feed for animals in pastoral agriculture as current supplements ([Anderson et al., 2012](#)). To deepen and confirm potentially environmental risks related to PTEs in A and B sites, an accurate description of the exposure model in TerraSys^{MC} and a more integrative approach as “TRIAD” ([ISO 19204, 2017](#)) incorporating chemical, toxicological and ecological data should be performed.

Supplemental data

Table S3. 1 : Parameters used in the software program TerraSysMC for computing risk indices regarding the animals observed at the field sites. “NOAEL” stands for No Observable Adverse Effect Level.

	Wild rabbit	Deer
Body weight (kg)	1.59	23.7
Type of food and percentage of daily intake	Grass/ nettle (70%) Bark/ tree leaves (30%)	Tree leaves (70%) Grass / nettle (30%)
Daily food intake (kg DW)	0.61	4.63
NOAEL Cd (mg kg day ⁻¹)	0.66	0.34
NOAEL Zn (mg kg day ⁻¹)	110	55.8

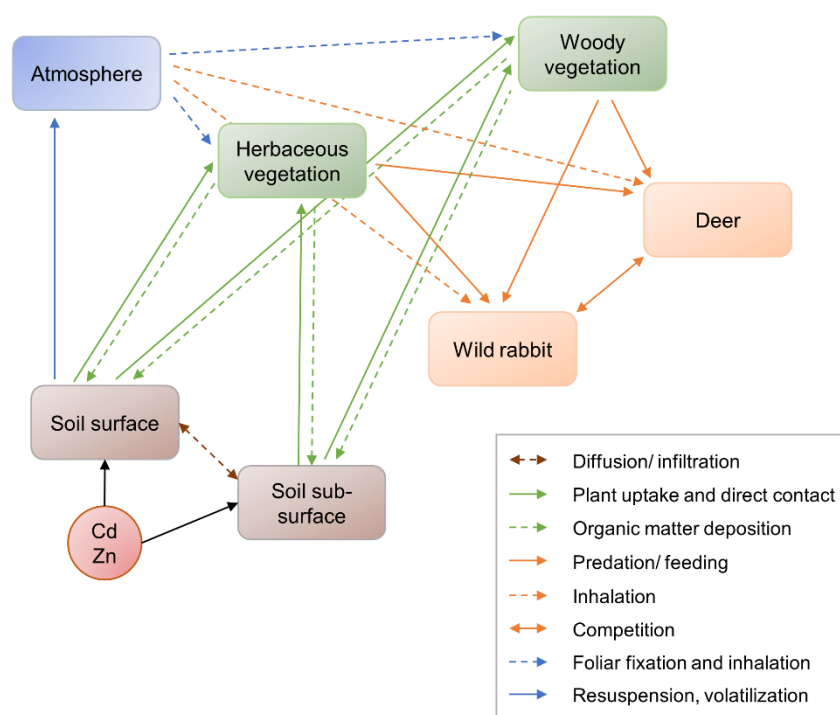


Figure S3. 1 : Conceptual model representing pathways and interactions between the environmental compartments (soil, air, plants and animals) considered in the software program TerraSys^{MC}.

Acknowledgements

This work was supported by national fundings through BIOFILTREE (ANR Programme Blanc International, 2010-INTB-1703-03) and Phytosed 2 (ADEME, 1072C0044 and VNF, 2011/01/02). P. Phanthavongsa was granted through the Demophyto project (ADEME, 1472C0059 and VNF, N°2014 /101/21). The authors thank Francis Guillot, Fabrice Richez, Lucie Rousseaux, Ana Vaz Veiga, Anaïs Buffard and Assiya Cherifi Alaoui for their technical contribution during the sampling campaigns and chemical analyses. The authors are also grateful to Jean-Paul Van Meyel (Carmeuse France) for providing the mineral amendment Optiscor® and his useful advice.

References

- Ågren, G.I., Weih, M. (2012) Plant stoichiometry at different scales: element concentration patterns reflect environment more than genotype. *New Phytologist* 194, 944-952.
- Albertsson, J., Hansson, D., Bertholdsson, N.O., Åhman, I. (2014) Site-related set-back by weeds on the establishment of 12 biomass willow clones. *Weed research* 54, 398-407.
- Anderson, C.W.N., Robinson, B.H., West, D.M., Clucas, L., Portmann, D. (2012) Zinc-enriched and zinc-biofortified feed as a possible animal remedy in pastoral agriculture: Animal health and environmental benefits. *Journal of Geochemical Exploration* 121, 30-35.
- Angelova, V.R., Ivanova, R.V., Todorov, J.M., Ivanov, K.I. (2010) Lead, cadmium, zinc, and copper bioavailability in the soil-plant-animal system in a polluted area. *TheScientificWorldJOURNAL* 10, 273-285.
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S.M., Ok, Y.S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M.N.V., Wenzel, W.W., Rinklebe, J. (2017) Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews* 171, 621-645.
- Asad, M., Menana, Z., Ziegler-Devin, I., Bert, V., Chalot, M., Herzig, R., Mench, M., Brosse, N. (2017) Pretreatment of trace element-enriched biomasses grown on phytomanaged soils for bioethanol production. *Industrial Crops and Products* 107, 63-72.
- Audet, P., Charest, C. (2007) Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 147, 609-614.
- Barrick, K.A., Noble, M.G. (1993) The Iron and Manganese Status of Seven Upper Montane Tree Species in Colorado, USA, Following Long-Term Waterlogging. *Journal of Ecology* 81, 523-531.
- Bert, V., Allemon, J., Sajet, P., Dieu, S., Papin, A., Collet, S., Gaucher, R., Chalot, M., Michiels, B., Raventos, C. (2017) Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. *Biomass and Bioenergy* 96, 1-11.
- Bert, V., Lors, C., Ponge, J.-F., Caron, L., Biaz, A., Dazy, M., Masfaraud, J.-F. (2012) Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* 169, 1-11.
- Bert, V., Seuntjens, P., Dejonghe, W., Lacherez, S., Thuy, H.T.T., Vandecasteele, B. (2009) Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 745-764.
- Braun-Blanquet, J. (1964) *Pflanzensoziologie, Grundzüge der Vegetationskunde*. Springer, Vienna, 1-866.
- Brock, J.H., Child, L.E., Waal, L.D.d., Wade, M., (1995) The invasive nature of *Fallopia japonica* is enhanced by vegetative regeneration from stem tissues. *SPB Academic Publishing, Amsterdam*, 131-139.

-
- Cabral, L., Soares, C.R.F.S., Giachini, A.J., Siqueira, J.O. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1655-1664.
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S., Pascual, C. (2012) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology* 46, 13361-13369.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappellini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., Chalot, M. (2017) Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environmental and Experimental Botany* 139, 48-56.
- Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Schulin, R. (2012) A Critical View of Current State of Phytotechnologies to Remediate Soils: Still a Promising Tool? *The Scientific World Journal* 2012, 173829.
- Coulaud, J., McNeilly, T. (1992) Zinc tolerance in populations of *Deschampsia cespitosa* (Gramineae) beneath electricity pylons. *Plant Systematics and Evolution* 179, 175-185.
- Cox, R.M., Hutchinson, T.C. (1980) Multiple metal tolerances in the grass *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. from the Sudbury smelting area *New Phytologist* 84, 631-647.
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Church, A., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Neu, S., Mench, M., Witters, N., Vangronsveld, J. (2013) Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for “gentle” remediation approaches: The European context. *Journal of Environmental Management* 129, 283-291.
- Delplanque, M., Collet, S., Del Gratta, F., Schnuriger, B., Gaucher, R., Robinson, B., Bert, V. (2013) Combustion of *Salix* used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass and Bioenergy* 49, 160-170.
- Dommanget, F., Breton, V., Forestier, O., Poupart, P., Daumergue, N., Evette, A. (2015) Contrôler des renouées invasives par les techniques de génie écologique: retours d'expérience sur la restauration de berges envahies. *Revue d'écologie* 70, 215-228.
- Dubourguier, H., Petit, D., Deram, A., Logeay, C. (2001) Le phytomanagement, Eléments de synthèse. Pôle de compétence sites et sédiments pollués, Lille, 1-49.
- Enell, A., Andersson-Sköld, Y., Vestin, J., Wagelmans, M. (2016) Risk management and regeneration of brownfields using bioenergy crops. *Journal of Soils and Sediments* 16, 987-1000.
- European Commission (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment, 1-337.
- European Commission (2010) European Union Risk Assessment Report, zinc metal, 1-695.
- European Commission (2007) European Union Risk Assessment Report, cadmium metal and cadmium oxide, European Chemicals Bureau. Institute for Health and Consumer Protection. 1-703.
- Evangelou, M.W., Deram, A. (2014) Phytomanagement: a realistic approach to soil remediating phytotechnologies with new challenges for plant science. *Int J Plant Biol Res* 2, 1023.
- Fales, S.L., Wakefield, R.C. (1981) Effects to Turfgrass on the Establishment of Woody Plants. *Agronomy Journal* 73, 605-610.
- Faucon, M.-P., Houben, D., Lambers, H. (2017) Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. *Trends in Plant Science* 22, 385-394.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Blaudez, D., Chalot, M. (2016a) Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *Fems Microbiology Ecology* 92, 1-13.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., Chalot, M. (2016b) Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Science of The Total Environment* 571, 1230-1240.
- ISO 19204, (2017) Soil quality - Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach).

- Jensen, J., Pedersen, M.B., (2006) Ecological Risk Assessment of Contaminated Soil, in: Albert, L.A., de Voogt, P., Gerba, C.P., Hutzinger, O., Knaak, J.B., Mayer, F.L., Morgan, D.P., Park, D.L., Tjeerdema, R.S., Whitacre, D.M., Yang, R.S.H., Ware, G.W., Nigg, H.N., Doerge, D.R., Gunther, F.A. (Eds.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews. Springer New York, New York, NY, 73-105.
- Kabata-Pendias, A. (2004) Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A. (2010) Trace elements in soils and plants. CRC, Boca Raton, FL, 1-520.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Olga Janssen, J., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M. (2015) Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation* 17, 1005-1037.
- Kohli, R.K., (1998) Allelopathic Interactions in Forestry Systems, in: Sassa, K. (Ed.), Environmental Forest Science: Proceedings of the IUFRO Division 8 Conference Environmental Forest Science, held 19–23 October 1998, Kyoto University, Japan. Springer Netherlands, Dordrecht, 269-283.
- Kolb, T.E. (1988) Allelopathic effects of Kentucky Bluegrass on Northern Red Oak and Yellow-Poplar. *Journal of Arboriculture* 14, 281-283.
- Kucharski, R., Sas-Nowosielska, A., Małkowski, E., Japenga, J., Kuperberg, J.M., Pogrzeba, M., Krzyżak, J. (2005) The use of indigenous plant species and calcium phosphate for the stabilization of highly metal-polluted sites in southern Poland. *Plant and Soil* 273, 291-305.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C. (2008) Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management* 28, 215-225.
- Langer, R.H.M., Hill, G.D. (1991) Agricultural plants. Cambridge University Press, 1-387.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., Ceulemans, R. (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 131, 485-494.
- Ma, X., Zhu, S., Ai, S., Liu, B., Zhang, W., Zhang, Y. (2016) Density-dependent Accumulation of Heavy Metals in Spring Wheat (*Triticum Aestivum*) and the Risk Assessment from Weak Alkaline Soils, Northwest of China. *International Journal of Agricultural Science and Technology* 4, 1-7.
- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M., Robinson, B. (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* 132, 145-155.
- Martín-García, J., Merino, A., Diez, J.J. (2012) Relating visual crown conditions to nutritional status and site quality in monoclonal poplar plantations (*Populus × euramericana*). *European Journal of Forest Research* 131, 1185-1198.
- MEDD (2006) Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée à l'article R. 214-1 du code de l'environnement. Texte n°15. *Journal Officiel de la République Française*, 1-5.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. (1991) The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis capillaris* L. *New Phytologist* 119, 291-297.
- Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. (2015) Physiological and Cytological Responses of *Deschampsia cespitosa* and *Populus tremuloides* to Soil Metal Contamination. *Water, Air, & Soil Pollution* 226, 1-12.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., Cornejo, P. (2012) Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 741-775.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schröder, P., Vangronsveld, J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1039-1070.

-
- Mench, M., Vangronsveld, J., Bleeker, P., Ruttens, A., Geebelen, W., Lepp, N., (2006) Phytostabilisation of metal-contaminated sites, in: Morel, J.-L., Echevarria, G., Goncharova, N. (Eds.), *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. Springer Netherlands, Dordrecht, 109-190.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Didier, V., Clijsters, H. (1994) Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environmental Pollution* 86, 279-286.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Meers, E., Tack, F.M.G. (2006) Seasonal Changes of Metals in Willow (*Salix* sp.) Stands for Phytoremediation on Dredged Sediment. *Environmental Science & Technology* 40, 1962-1968.
- Météofrance (2017). Base de données climatiques. www.meteofrance.fr
- Mitchell, R.J., Auld, M.H.D., Le Duc, M.G., Robert, M.H. (2000) Ecosystem stability and resilience: a review of their relevance for the conservation management of lowland heaths. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3, 142-160.
- O'Day, P.A., Vlassopoulos, D. (2010) Mineral-Based Amendments for Remediation. *Elements (Quebec, Quebec)* 6, 375-381.
- Pal, P.K., Singh, R.D., Prasad, R. (2012) Non-destructive estimation of chlorophyll and nitrogen content in leaf of *Rosa damascena* (Mill). *Soil Science and Plant Nutrition* 58, 604-610.
- Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., Laboudigue, A., Marcus, M.A., Ahamdach, N., Libert, M.-F. (2005) The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 2265-2284.
- Parry, C., Blonquist, J.M., Bugbee, B. (2014) In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell & Environment* 37, 2508-2520.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., Bert, V. (2017) Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environmental and Experimental Botany* 143, 72-81.
- Pottier, M., García de la Torre, V.S., Victor, C., David, L.C., Chalot, M., Thomine, S. (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environmental Pollution* 199, 73-82.
- Pulford, I.D., Watson, C. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* 29, 529-540.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 30, 1562-1574.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rogers, P., Arthur, C., Soriguer, R. (1994) The rabbit in continental Europe. *The European rabbit: the history and biology of a successful colonizer*. Oxford University Press, Oxford, 22-63.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995) Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nat Biotech* 13, 468-474.
- Schnitzler, A., Muller, S. (1998) Ecologie et biogéographie de plantes hautement invasives en Europe: les Renouées géantes du Japon (*Fallopia japonica* et *F. sachalinensis*). *Revue d'écologie* 53, 3-38.
- Seiger, L.A., Merchant, H.C. (1997) Mechanical control of Japanese knotweed (*Fallopia japonica* [Houtt.] Ronse Decraene): effects of cutting regime on rhizomatous reserves. *Natural Areas Journal* 17, 341-345.
- Sinnott, D. E., Hodson, M. E. and Hutchings, T. R. (2009), Food-chain transfer of cadmium and zinc from contaminated *Urtica Dioica* to *Helix Aspersa* and *Lumbricus Terrestris*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 1756–1766.

- Solti, Á., Sárvári, É., Tóth, B., Basa, B., Lévai, L., Fodor, F. (2011) Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 494-498.
- Streeter, D. (2011) *Guide Delachaux des fleurs de France et d'Europe*. Delachaux et Niestlé, 1-704.
- Taylor, K. (2009) Biological Flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *Journal of Ecology* 97, 1436-1458.
- Tian, S., Cacho, J.F., Youssef, M.A., Chescheir, G.M., Fischer, M., Nettles, J.E., King, J.S. (2017) Switchgrass growth and pine-switchgrass interactions in established intercropping systems. *GCB Bioenergy* 9, 845-857.
- Tixier, H., Duncan, P., Scehovic, J., Yant, A., Gleizes, M., Lila, M. (1997) Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry, and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology* 242, 229-245.
- Van Der Heijden, M.G.A., Horton, T.R. (2009) Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97, 1139-1150.
- van der Maarel, E. (2007) Transformation of cover-abundance values for appropriate numerical treatment - Alternatives to the proposals by Podani. *Journal of Vegetation Science* 18, 767-770.
- Van Slycken, S., Witters, N., Meiresonne, L., Meers, E., Ruttens, A., Van Peteghem, P., Weyens, N., Tack, F.M.G., Vangronsveld, J. (2013) Field Evaluation of Willow Under Short Rotation Coppice for Phytomanagement of Metal-Polluted Agricultural Soils. *International Journal of Phytoremediation* 15, 677-689.
- Vandecasteele, B., Meers, E., Vervaeke, P., Vos, B.D., Quataert, P., Tack, F.M.G. (2005) Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere* 58, 995-1002.
- Vandecasteele, B., Quataert, P., De Vos, B., Tack, F.M.G., Muys, B. (2004) Foliar concentrations of volunteer willows growing on polluted sediment-derived sites versus sites with baseline contamination levels. *Journal of Environmental Monitoring* 6, 313-321.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.
- Vervaeke P. and Lust N. (2001) Eindverslag IWT-project: Ecotechnologische behandeling en inrichting van baggerspeciedepots op basis van bebossingstechnieken, IWT nr. 960201, Laboratorium voor Bosbouw, Universiteit Gent, 1-373.
- Walters, D.T., Gilmore, A.R. (1976) Allelopathic effects of fescue on the growth of sweetgum. *Journal of Chemical Ecology* 2, 469-479.
- Witters, N., Mendelsohn, R.O., Van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., Tack, F., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2012) Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study. I: Energy production and carbon dioxide abatement. *Biomass and Bioenergy* 39, 454-469.

CHAPITRE 4 : Impact du phytomanagement sur la mobilité d'EPT dans les sols et sur leur phytotoxicité

La première partie de ce chapitre est présentée sous forme d'un article. Cet article est en préparation et sera prochainement soumis dans un journal scientifique à comité de lecture. Une étude complémentaire est présentée dans la seconde partie du chapitre, consacrée à la détermination de la spéciation des EPT par modélisation géochimique.

Malgré l'utilisation d'amendements, les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 ont montré que les peupliers et les saules avaient des concentrations foliaires élevées en Cd et en Zn, en comparaison avec des valeurs issues de sols non contaminés. D'après les extractions sélectives au nitrate de calcium (0,01 M) réalisées sur des échantillons de sol rhizosphérique, le pool labile de ces éléments n'avait pas été impacté par les amendements. Néanmoins, une diminution des concentrations extractibles en Pb dans la rhizosphère des saules avait été observée sur les parcelles amendées. Les concentrations foliaires en Pb chez le saule étant également plus faibles sur les parcelles amendées, nous avons émis l'hypothèse que l'amendement avait permis de réduire la biodisponibilité du Pb dans le sol. Contrairement au site A où les peupliers se sont développés avec succès, les saules Inger et Tordis sur la partie du site B la plus contaminée, amendée avec l'amendement minéral basique et végétalisée avec *D. cespitosa* ont montré une diminution de croissance après 4 mois d'implantation puis une mortalité accrue sur la durée de la thèse en comparaison des parcelles témoins non amendées et non semées avec la canche cespiteuse. Les tests écotoxicologiques aigus réalisés sur les sols du site B dans le cadre du projet GREENLAND (2011-2014) n'avaient pas mis en évidence de toxicité.

Dans le sol, différents facteurs physico-chimiques et biologiques peuvent influencer le comportement géochimique des EPT. Leur répartition entre les phases liquides et solides du sol dépend notamment du pH, du potentiel redox, de la matière organique dissoute (MOD), de la salinité, des phases solides minérales et organiques et des différents composés biologiques libérés par les végétaux et les microorganismes ([Antoniadis et al., 2017](#); [Centioli et al., 2008](#); [Sauvé et al., 2000](#)). Pour mieux comprendre l'impact de l'amendement sur la mobilité et la biodisponibilité des EPT, nous avons réalisé des extractions séquentielles qui permettent de déterminer leur répartition dans différentes phases solides du sol. En parallèle, des tests de lixiviation en batch à différents pH ont également été réalisés afin de prévoir le comportement géochimique des EPT si le pH du sol venait à changer dans les conditions naturelles ([Cappuyns and Swennen, 2008](#)). Ces méthodes n'étant pas destinées à évaluer la toxicité des contaminants, des tests écotoxicologiques (essais de toxicité chronique sur *Avena sativa* et *Brassica rapa*) ont aussi été réalisés pour évaluer

la qualité des sols. Ces tests complémentaires permettront ainsi de déterminer l'influence des amendements sur la qualité des sols phytomanagés, et de voir si ces tests réalisés en conditions contrôlées pourraient expliquer les observations faites sur le terrain, voire être pertinents pour prédire le comportement des plantes vis-à-vis des contaminants.

Sur le site A, le choix des parcelles s'est porté sur celles qui étaient les plus contaminées sur la base des concentrations totales, et plantées avec le peuplier Skado qui était plus productif que I-214 ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). Les tests réalisés sur ce site avaient pour objectif de comparer les parcelles inoculées et non inoculées. Sur le site B, le choix des parcelles s'est porté sur les parcelles les moins contaminées et les plus contaminées sur la base des concentrations totales. Les saules Tordis ayant montré une meilleure croissance que les saules Inger, seules les parcelles plantées avec le saule Tordis ont été sélectionnées.

Les extractions séquentielles montrent que la répartition des EPT est comparable entre tous les sols. Le Cd et le Zn sont concentrés dans les fractions échangeables et réductibles tandis que le Pb et le Cu sont principalement liés à la fraction oxydable. L'importance de maintenir un pH de 8 a été mise en évidence pour éviter la lixiviation des EPT dans le sol. Les tests écotoxicologiques confirment la toxicité de tous les sédiments testés, quels que soient les traitements. Ces tests ont également révélé que les parcelles les plus phytotoxiques étaient celles du site B non amendées et amendée la plus contaminée. L'étude pointe la nécessité de réaliser des tests avec deux espèces végétales qui présentent des physiologies différentes. Contrairement aux résultats des tests écotoxicologiques, les observations faites sur le terrain n'avaient pas révélé de signes de toxicité pour le peuplier et les espèces colonisatrices. Au contraire, pour le site B, les tests écotoxicologiques confirment l'hypothèse de la toxicité du sol sur la diminution de croissance du saule Tordis.

Le lien avec les observations de terrain n'est pas évident car les plantes sélectionnées pour le phytomanagement sont plus tolérantes aux EPT que les plantes utilisées pour les tests écotoxicologiques. Ces tests devraient être menés avant et après la mise en place des traitements pour évaluer le succès du phytomanagement. Avec des plantes sensibles, ils permettraient d'évaluer l'amélioration de la qualité des sols suite aux traitements.

4.1. Article 3: Metal mobility, availability and phytotoxicity in dredged sediment from a disposal site under different phytomanagement options

Phonethip Phanthavongsa ^a, Nicolas Manier ^b, Pascal Pandard ^b, Nicole Chaumont ^a, Michel Chalot ^{c,d}, Valérie Bert ^a

^a INERIS, Clean and Sustainable Technologies and Processes Unit, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^b INERIS, Expertise and Assays in Ecotoxicology, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

^c Laboratoire Chrono-environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6249, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

^d Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author: Valérie Bert

Valerie.bert@ineris.fr

INERIS, Clean and Sustainable Technologies and Processes Unit, DRC/RISK, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

4.1.1. Abstract

The management of metal-contaminated dredged sediment disposal sites has been considered for decades by means of phytotechnologies. In this framework, two phytomanaged sites contaminated with Cd, Cu, Pb and Zn were set up in northern France using different combinations of plants and amendments. Field-contaminated soils that were subjected to phytomanagement options were studied by chemical (selective and sequential extractions, pH_{stat} test) and ecotoxicological tests to evaluate their influence on soil quality for risks management. Ecotoxicological tests were performed on field-contaminated soils using two higher plants, *Avena sativa* and *Brassica rapa*, with the aim of determining the most relevant endpoints that underline potential hindrances to plant growth. Sequential extractions showed that the amendments did not influence the distribution of PTE in soils. Cd and Zn were mostly associated with the reducible and exchangeable fractions whereas Cu and Pb were mainly bound to the oxidizable fraction. The pH_{stat} tests highlighted the importance to maintain the soil pH to 8 in order to limit metal leaching to groundwater. The ecotoxicological test showed that all phytomanaged soils were phytotoxic, especially the amended and most contaminated soil of one site. These results are in line with field observations since willow growth was altered in the amended and most contaminated areas. As herbaceous plants and poplars from the field did not show toxicity symptoms, we can assume that these plants are more tolerant to soil contamination than willows. To evaluate the success of phytomanagement, the chronic toxicity test is a relevant tool that should be performed before and after the implementation of the treatments.

Keywords: Sequential extraction; leaching test; *Avena sativa*; *Brassica rapa*; Chronic toxicity test

4.1.2. Introduction

Anthropogenic activities such as mining, smelting of metal ores, farming and deforestation are major sources of river pollution across the globe ([Louriño-Cabana et al., 2011](#); [Sundaray et al., 2011](#); [Yang et al., 2009](#)). Consequently, large volumes of sediment have been contaminated with inorganic (metals and metalloids) and organic substances (PAHs, PCBs). In northern France, considerable amount of potentially toxic elements (PTEs) such as Zn, Pb, Cd and Cu were found in sediments because of waste emissions from metallurgical industries ([Huguet et al., 2015](#); [Piou et al., 2009](#)). To maintain and preserve waterways, contaminated dredged sediments have been conventionally deposited on landfill sites in the absence of cost-effective and operational treatments ([Voies navigables de France, 2014](#)). Since a few years, the phytomanagement of PTE-contaminated sediment disposal sites has been proposed as a sustainable option to prevent environmental risks and provide economical revenue with biomass production ([Bert et al., 2009](#); [Evangelou and Deram, 2014](#)).

The efficiency of phytomanagement with the aim of immobilizing PTEs in soils and producing valuable biomass has been investigated at field scale in a few European countries ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Evangelou and Deram, 2014](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#); [Van Slycken et al., 2013](#)). It uses metal tolerant plants and amendments in most cases to decrease PTE availability, mobility and toxicity ([Mench et al., 2010](#)). However, plant growth can be compromised due to metal toxicity, nutrient deficiencies and plant competition ([Albertsson et al., 2014b](#); [Clemens, 2006](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Besides, biological or mineral amendments can positively or negatively impact plant growth and PTEs accumulation in the aboveground parts of plants depending on soil conditions and plant species ([Bert et al., 2012b](#); [Cabral et al., 2015](#); [Le Forestier et al., 2017](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)). As the success of phytomanagement depends on various biotic and abiotic factors, a better understanding of interactions between contaminants, soil, plants and amendments in the field is needed.

Risk assessments related to PTEs in soils require the characterization of their mobile and bioavailable forms ([Sauvé et al., 2000](#)). It can be assumed that dissolved elements are readily available to organisms or leachable into groundwater whereas the fraction bound to soil solids are considered as unavailable and tightly retained ([Sauvé et al., 2000](#)). PTE geochemical behavior can be affected by environmental variables such as soil pH, redox potential, dissolved organic carbon (DOC), salinity and specific metal binding-sites ([Centioli et al., 2008](#)). Numerous studies focus on the characterization of soil, sediment and waste materials before potential reuse or engineering application. In this regard, leaching tests and metal extractions are increasingly used for the prediction of PTE behavior in the environment ([Centioli et al., 2008](#); [Di Bonito et al., 2018](#)). As a complement to chemical tests, ecotoxicological tests are relevant tools to evaluate soil toxicity

([Kumpiene et al., 2014](#); [Marchand et al., 2016a](#); [Marchand et al., 2016b](#); [Quintela-Sabarís et al., 2017](#)). They are commonly performed to assess the toxicity of a specific metal to find the most sensitive endpoint. However, [Mondaca et al. \(2017\)](#) highlighted the importance of using field-contaminated soils for phytotoxicity tests but the co-occurrence of many contaminants may be difficult to address. Moreover, soil physicochemical properties such as pH, redox potential and OM greatly influence metal availability, leading to potential nutrient imbalance in plants.

This study aimed at characterizing PTE mobility in soils and phytotoxicity after 4/5 years of phytomanagement practices applied at two large field sites. We investigated the geochemical distribution of PTEs in soils and their leaching behavior at a range of pH values to predict a potential remobilization of PTEs in soils. Besides, chronic toxicity tests were performed on two higher plants, *Avena sativa* and *Brassica rapa* to evaluate the influence of phytomanagement on soil ecotoxicity.

4.1.3. Materials and methods

4.1.3.1. Site description

Between 2011 and 2012, two phytomanaged sites of 1 ha each (A and B) were set up on a former dredged sediment disposal area in Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France, France). The experimental designs of the site A are detailed in [Ciadamidaro et al. \(2017\)](#) and Phanthavongsa et. al (in prep). Briefly, the management option implemented at this site consisted of a short rotation coppice (SRC) of poplars dedicated to bioenergy purposes (cultivars I-214 and Skado). Half of the poplars were inoculated with ecto- and endomycorrhizal fungi with the aim of reducing PTE availability in soil and their transfer in aboveground parts ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). Colonizing plants and litter covered the soil since no specific herbaceous plant was sown before planting. At the site B, the immobilization of PTEs was expected by the incorporation of a basic mineral amendment (Optiscor®, 9 t ha⁻¹) in the soil, combined with the use of the grass *Deschampsia cespitosa*, a metal excluder able to form dense soil cover ([Kidd et al., 2015](#)). Optiscor® was an alkaline by-product of the steel industry used by farmers to increase soil pH, mainly composed of CaO (49 %) and MgO (5.5 %). Two willow cultivars, Inger and Tordis, were planted in plastic mulch in very short rotation coppice (VSRC) for bioenergy purposes. Previous soil characterizations showed that both sites were mostly contaminated by Cd, Cu, Pb and Zn ([Kidd et al., 2015](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)).

4.1.3.2. Soil sampling

In February 2016, composite topsoil samples (0-20 cm depth) made of 10 subsamples were collected at both sites in eight plots. At the site A, two plots planted with Skado poplars that

showed high productivity ([Ciadamidaro et al., 2017](#)) were selected. Besides, the inoculated Skado poplars limited foliar concentrations of Zn, Cu and Pb after two growing seasons ([Phanthavongsa et al., 2017](#)). The plot A-NI was planted with non-inoculated poplars whereas the plot A-I was planted with inoculated ones.

At the site B, four plots were selected with Tordis willows that showed a better growth on both amended and non-amended plots. The soil sampling was conducted in two non-amended plots (B-NADc, sown with *D. cespitosa*) and two amended plots (B-ADc-M, moderately contaminated soil sown with *D. cespitosa*; B-ADc-H, highly contaminated soil sown with *D. cespitosa*). The soil samples were collected at 20 cm of the trees. Comparison between moderately and highly contaminated soils may provide a better understanding of willow mortality that occurred in the field (Phanthavongsa et al, in prep).

4.1.3.3. Soil characterization

4.1.3.3.1. Physicochemical properties

Physicochemical analyses were performed by an external laboratory (Laboratoire de Touraine, France) for the following parameters: grain size (NF X31-107), total carbonates (CaCO₃; NF ISO 10693), total nitrogen (N; NF ISO 11261), total organic carbon (TOC; NF ISO 14235), OM (NF ISO 14235), cation exchange capacity (CEC; NF X31-130), Olsen phosphorus (P; NF ISO 11263), exchangeable potassium (K₂O), magnesium (MgO) and calcium (CaO) (NF X31-108). Soil pH (H₂O and K₂O) was measured according to the standard [ISO 10390 \(2005\)](#).

Total concentrations of major elements and PTEs (Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Pb and Zn) were extracted using a hydrofluoric acid solution as described in [Phanthavongsa et al. \(2017\)](#). A reference material (SRM 2710; LGC PROMOCHEM) was used to certify the quality of the analyses. The plant-available fractions of Cd, Cu, Pb and Zn in soil samples were extracted using 0.01 M Ca(NO₃)₂ solution. Sixty grams of dried samples, sieved to 2 mm, were shaken (Heidolph Reax 2) with 120 mL of Ca(NO₃)₂ (0.01 M) for 48 h. The soil mixtures were then filtered on filtration units (0.45 µm; Millipore). Eluates were acidified to a pH < 2 for preservation and analyzed by ICP-MS (Agilent 7500).

Sequential extractions aimed at assessing the distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in soil following the procedure of [Quevauviller et al. \(1997\)](#). After sieving with a mesh size of 1 mm, 1 g of dried soil samples was used for the extractions. The procedure was performed in triplicate and targeted four fractions: (F1) exchangeable and bound to carbonates (0.11 M acetic acid); (F2) bound to Fe and Mn oxides (0.1 M hydroxylamine hydrochloride); (F3) bound to organic matter (hydrogen peroxide, pH= 2-3 and 1 M ammonium acetate); (F4) residual fraction (2 mL of nitric

acid (67 %), 6 mL of hydrochloric acid (34 %) and 2 mL of hydrofluoric acid (48 %)). Eluates were then analyzed by ICP-OES (Agilent 720, Agilent 5100) and ICP-MS (Agilent 7500).

4.1.3.3.2. pH-dependent leaching test (pH_{stat})

The pH-dependent leaching test was carried out an automatic titration system (Titroline 7000; Si Analytics) following the standard [NF EN 14997 \(2015\)](#) to investigate the leaching behavior of the contaminated soils under the different treatments. For each modality, eight samples were prepared with 15 g of soil (particle sizes <1 mm) and 150 mL of extraction solution (L/S = 10 L/kg). The extraction solution consisted of deionized water, 1 M HNO₃ or 1 M NaOH to reach pH values ranging from 2 to 12. The pH mixture was kept constant under constant stirring for 48 h at room temperature. After a settling period of 15 min, the mixture was filtered through a 0.45 µm filter membrane. The pH, EC and Eh were measured in the filtrate using a multi parameter analyzer (C861; Consort). The DOC was determined using a TOC analyzer (TOC-V_{CSH}, Shimadzu), major elements and PTEs (Ca, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) were measured by ICP-OES and ICP-MS.

4.1.3.4. Chronic toxicity test

4.1.3.4.1. Growth conditions

A chronic toxicity test was performed to assess the phytotoxicity of the eight selected soil samples (§ 4.1.3.2) following the standard procedure [ISO 22030 \(2011\)](#). Two plant species representing monocotyledonous (*Avena sativa*, var. Gaillette, RAGT2n) and dicotyledonous species (*Brassica rapa* CrGC syn. Rbr; Wisconsin Fast Plants®, Carolina Biological Supply Company) were cultivated on the different soils in a growth chamber (Fitotron®, Weiss Technik company). The photoperiod was set at 16 h of light and 8 h of darkness, with a light intensity at 10,000 lux ± 2,000 lux. Temperatures were kept at 23/18°C (day/night) and humidity at 80 %. Four replicate pots (8.7 x 11.7 cm) for each treatment modality were prepared with about 400 g of 4-mm sieved soil. In each pot, ten uniform seeds were sown before adjusting the soil moisture to 80 % and 60 % water-holding capacity for *A. sativa* and *B. rapa*, respectively. A commercial fertilizer (Flory 9, Euflo company) composed of N (15 %), P (7 %), K (22%) and Mg (6 %) was applied once a week (1 g/L) to avoid growth reduction related to nutrient deficiencies. Pollination was performed by disseminating the pollen on all flowers with a fine brush as long as flowering occurred. Plants were also shaken together to ensure a better pollination. To minimize growth variations within the growth chamber, pots were randomly rearranged twice or three times a week after each watering. The LUFA 2.2 soil (LUFA Speyer) was used as an uncontaminated and control soil.

4.1.3.4.2. Measurements

Growth monitoring was conducted from seedling emergence (for both species) to flowering (*A. sativa*) or ripening (*B. rapa*). Growth stages were determined using Zadocks decimal code ([Zadoks et al., 1974](#)). For both plant species, the number of seedlings was counted in all pots when more than 50 % of the seedlings emerged in the control modality (LUFA). The seedling emergence rates were expressed as a percentage of the mean emergence in the control pots. Dry shoot biomass of both species was measured after 14 days. At the end of the chronic assay, the following plant responses were determined: dry shoot biomass after 40 days for *B. rapa* and 54 days for *A. sativa*, number of immature and ripe pods (*B. rapa*) as well as number of spikelet and anthers (*A. sativa*). For the determination of dry biomass, shoot samples were oven-dried at 75 °C until constant weight.

Shoot element concentrations (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in both species were analyzed to assess the effect of contaminated soils on plant growth. After grinding, 0.5 g of dried samples were digested at 180 °C during 20 min in 10 mL of nitric acid (67%) and 3 mL of ultra-pure water using a microwave digester (Mars Xpress, CEM). The digested samples were filtered to <0.45 µm (Millipore) and acidified to a pH <2 for preservation. Element concentrations were measured by ICP-OES (Agilent 5110) and ICP-MS for Cd and Pb (Agilent 7500). A standard reference material (white cabbage “BCR-679”, Community Bureau of Reference) was included for analytical quality control. Recovery rates were 93 % for Cd, 99 % for Cu, 95 % for Fe, 99 % for Mn and 100 % for Zn. For Pb, no reference value was reported in this material.

4.1.3.5. Data analysis

Statistical analyses were performed using R software, version 3.3.3 ([R Core Team, 2017](#)). Shapiro tests were applied to check the normality of all data distributions. Homoscedasticity was verified using the Levene's test or Bartlett test depending on data distribution. Mean comparisons between the treatment modalities were carried out using one-way ANOVAs (shoot biomass, number of spikelets, number of pods) or Kruskal Wallis tests (seedlings emergence, immature seeds, shoot metal concentrations) and reported as statistically different at the 0.05 level. Appropriate post-hoc tests were then applied when significant differences were found (Tukey, Kruskal). Pearson's correlation tests run on shoot metal concentrations and shoot biomass were reported as significant with $\alpha = 0.01$.

4.1.4. Results and discussion

4.1.4.1. Soil physicochemical properties

All topsoil samples that derived from dredged-sediments were characterized by an alkaline pH close to 8, similar textures with high proportions of silt (45.8-58.6 %) and moderate levels of carbonates that ranged from 3.10 to 8.56 % (**Table 4. 1**). The soils showed high CEC values which were likely due to the high contents of OM (14.1-29.8 %) and clays (23.9-30.2 %), suggesting a high buffer capacity of the soils ([Baize, 2000a](#)). The high C:N ratios (24.9 to 43.7) were typical of European forest soils ([Cools et al., 2014](#)). The total and available concentrations of the macronutrients P, K, Mg and Ca were broadly in the same range for all soils (**Table 4. 1** and **Table 4. 2**). Regarding micronutrients (Cu, Fe, Mn and Zn) and non-essential elements (Cd and Pb), their total concentrations were higher than background levels (Table 2), B-ADc-H being the most contaminated soil (**Table 4. 2**).

Table 4. 1 : Physicochemical characteristics of soils (0-20 cm) under different phytomanagement practices. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; LUFA: control soil.

Site	Site A		Site B			LUFA
	A-NI	A-I	B-NADc	B-ADc-M	B-ADc-H	
Clay < 2 μm (%)	30.2	30.0	23.9	29.2	26.7	8.3
Silt 2-50 μm (%)	49.2	52.2	45.8	46.2	58.6	14.9
Sand 50-2000 μm (%)	20.5	17.8	30.3	24.5	14.8	76.8
Total CaCO_3 (%)	5.04	3.70	3.10	8.56	5.56	Nd
pH (H_2O)	8.0	8.1	8.1	8.2	8.1	Nd
pH (KCl)	7.5	7.5	7.6	7.8	7.5	6.2
TOC (g kg^{-1})	165	173	82.1	129	128	17.3
Total N (g kg^{-1})	4.63	3.97	3.30	3.34	4.61	1.9
OM (%)	28.4	29.8	14.1	22.2	22.0	3.0
C/N	35.6	43.7	24.9	38.6	27.8	9.1
CEC ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	17.6	15.6	18.7	16.3	26.2	9.8
P_{Olsen} (g kg^{-1})	0.56	0.47	0.44	0.26	0.45	Nd
$\text{K}_{\text{exchangeable}}$ (g kg^{-1})	0.37	0.33	0.25	0.22	0.51	Nd
$\text{Mg}_{\text{exchangeable}}$ (g kg^{-1})	0.17	0.12	0.16	0.18	0.26	Nd
$\text{Ca}_{\text{exchangeable}}$ (g kg^{-1})	7.78	7.85	7.82	8.48	9.62	Nd

Nd: Not determined.

Table 4. 2 : Total element concentrations (in DW) in soils (0-20 cm) under different phytomanagement practices. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows). LUFA: control soil for the chronic toxicity tests. Values are means \pm SD (n=3). Different letters indicate significant differences between the treatments ($\alpha= 0.05$).

Site	Treatment	Ca (%)	K (%)	Mg (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	Fe (%)	Mn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
A	A-NI	2.19 \pm 0.82	0.88 \pm 0.15 ^b	3,247 \pm 1131	1,563 \pm 457 ^b	2.77 \pm 0.92 ^c	410 \pm 116	7.2 \pm 0.2 ^b	87 \pm 6.3 ^c	418 \pm 23 ^c	1,707 \pm 451 ^b
	A-I	2.31 \pm 0.22	0.88 \pm 0.17 ^b	4,230 \pm 410	1,850 \pm 151 ^b	3.83 \pm 0.34 ^c	547 \pm 39	6.3 \pm 0.6 ^b	83 \pm 10 ^c	368 \pm 48 ^c	2,120 \pm 207 ^b
B	B-NADc	2.80 \pm 0.88	1.13 \pm 0.08 ^{ab}	3,930 \pm 1,070	2,857 \pm 484 ^{ab}	9.24 \pm 1.93 ^a	790 \pm 182	8.2 \pm 1.9 ^b	108 \pm 1.0 ^b	788 \pm 35 ^b	2,947 \pm 537 ^{ab}
	B-ADc-M	2.18 \pm 0.48	1.11 \pm 0.11 ^a	4,267 \pm 950	1,763 \pm 350 ^b	5.30 \pm 1.21 ^{bc}	547 \pm 110	3.8 \pm 0.2 ^c	85 \pm 4.0 ^c	385 \pm 19 ^c	1,993 \pm 419 ^b
	B-ADc-H	2.79 \pm 1.04	0.94 \pm 0.12 ^{ab}	4,403 \pm 1,430	3,390 \pm 851 ^a	8.56 \pm 1.91 ^{ab}	864 \pm 349	12 \pm 0.7 ^a	151 \pm 11 ^a	1,120 \pm 78 ^a	3,593 \pm 848 ^a
	L-UNC	1.11 \pm 0.14	0.22 \pm 0.03	2,512 \pm 305	1,014 \pm 111	1.84 \pm 0.23	401 \pm 48	< 0.4	20 \pm 2.3	43 \pm 4.0	141 \pm 15
	LUFA	0.24	1.19	1,220	316	0.77	208	<1.25	3.90	21.0	19.8

4.1.4.2. Geochemical distribution of PTEs

All soil samples showed a similar distribution of Cd and Zn in the different fractions (**Figure 4. 1**), indicating that they had an analogous geochemical behavior regardless of the treatments. Cd and Zn were mainly associated with the reducible (40-47 % of their total concentrations) and acid/water soluble fractions (31-41 % of their total concentrations), revealing that the elements were partly bound to Fe-Mn oxyhydroxides (F2) and carbonates (F1) ([Quevauviller, 2007](#)). While important concentrations of Cd and Zn in F2 may be released in anoxic conditions, equivalent concentrations appeared to be easily mobilizable and potentially available to plants ([Rodgers et al., 2015](#)). The highest concentrations of Cd and Zn in F1 were extracted from the most contaminated and amended soil B-ADc-H (**Figure 4. 1** and **Table 4. 2**). Considering $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable concentrations of Cd and Zn in all soils, that represented less than 0.14 % of their total concentrations (**Table S4. 2**), the mobility and availability of both PTEs might be lower than expected. In contaminated dredged-sediments from northern France, [Piou et al. \(2009\)](#) showed that Cd and Zn mobility may change with season cycles as the elements were mostly bound to OM, sulphides and carbonates in winter, and mostly bound to oxyhydroxides in summer after OM mineralization and sulphide oxidation. As the soil samples were collected in winter, PTE distribution may be different during the growing season with the influence of plant root exudates, associated microorganisms, OM mineralization, soil temperature, etc. ([Piou et al., 2009](#)).

Concerning Cu and Pb, a similar distribution was also observed between the treatments, indicating that their availability was not influenced by the amendments (**Figure 4. 1**). Both elements showed a high affinity for OM and/or sulphides as the oxidizable fraction F3 presented 59 to 72 % of their total concentrations in all soils (**Figure 4. 1**). The residual fraction F4, in which metals are strongly bound to minerals ([Rodgers et al., 2015](#)), contained important proportions of both elements that ranged between 23-35 % for Cu and 14-26 % for Pb (**Figure 4. 1**). These concentrations were expected to be higher in the amended plots, as showed in [Le Forestier et al. \(2017\)](#), where the addition of slags increased significantly the non-remobilized Cu fraction. Nevertheless, Cu and Pb exchangeable fractions (F1) were quite low in all soils (2.1-3.5 % for Cu and 0.9-1.5 % for Pb), as well as their $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable fractions which were < 0.20 % for Cu and < 0.002 % for Pb (**Table S4. 2**).

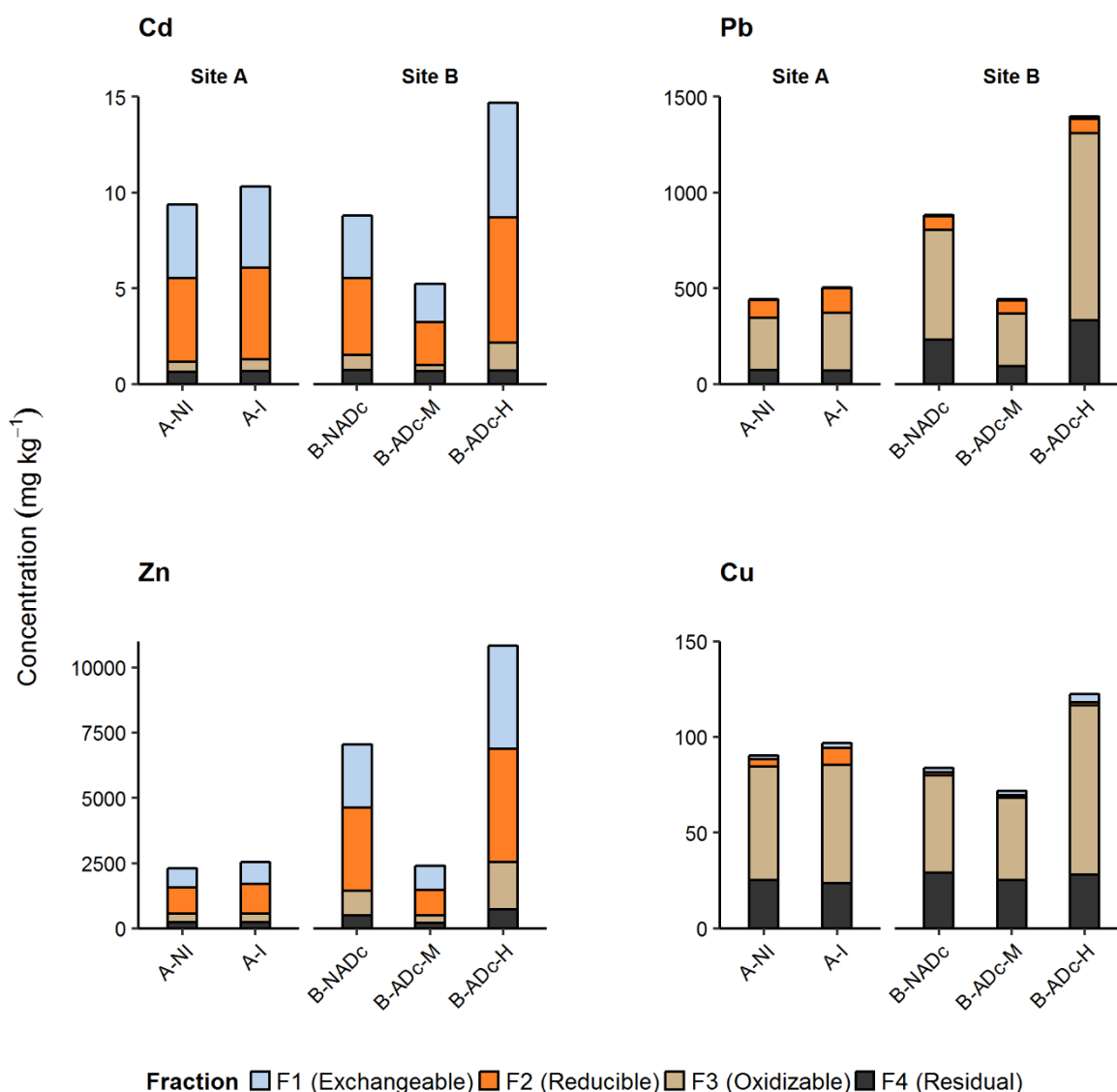


Figure 4. 1 : Distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in soils under different phytomanagement practices at sites A and B (mean values expressed in mg kg⁻¹, n=3). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows.

4.1.4.3. Potential leachability of PTEs

The pH_{stat} curves obtained for Cd, Cu, Pb and Zn showed a similar pattern of leaching regardless of the treatments, indicating that the release of the elements in soil solution was highly pH-dependent (**Figure 4. 2**). The leaching of Cd and Zn was minimal at natural pH values and increased with decreasing pH (from 8 to 2) but also above pH 8. The typical V-shaped curve obtained for Zn (and Cd in a lesser extent) is indicative of solubility-controlling processes such as sorption to OM and oxyhydroxides in soils and sediments ([Centioli et al., 2008](#)). According to the results of sequential extractions, Cd and Zn were substantially bound to Fe-Mn oxyhydroxides and carbonates at pH 8 (**Figure 4. 1**). The dissolution of Cd and Zn complexes appeared to be

higher in the soil B-ADc-H than in the other soils from neutral to acidic conditions (**Figure 4. 2**). Regarding Cu and Pb, the lowest leached concentrations were steady between pH 5 and 8 (**Figure 4. 2**) in all soils, indicating that both elements were weakly influenced by pH. At more alkaline pH values, the increase in metal leaching occurred with increasing DOC concentrations (**Figure 4. 2**), suggesting the formation of DOC-metal complexes known to enhance metal mobility and their bioavailability ([Antoniadis and Alloway, 2002](#); [Centioli et al., 2008](#)).

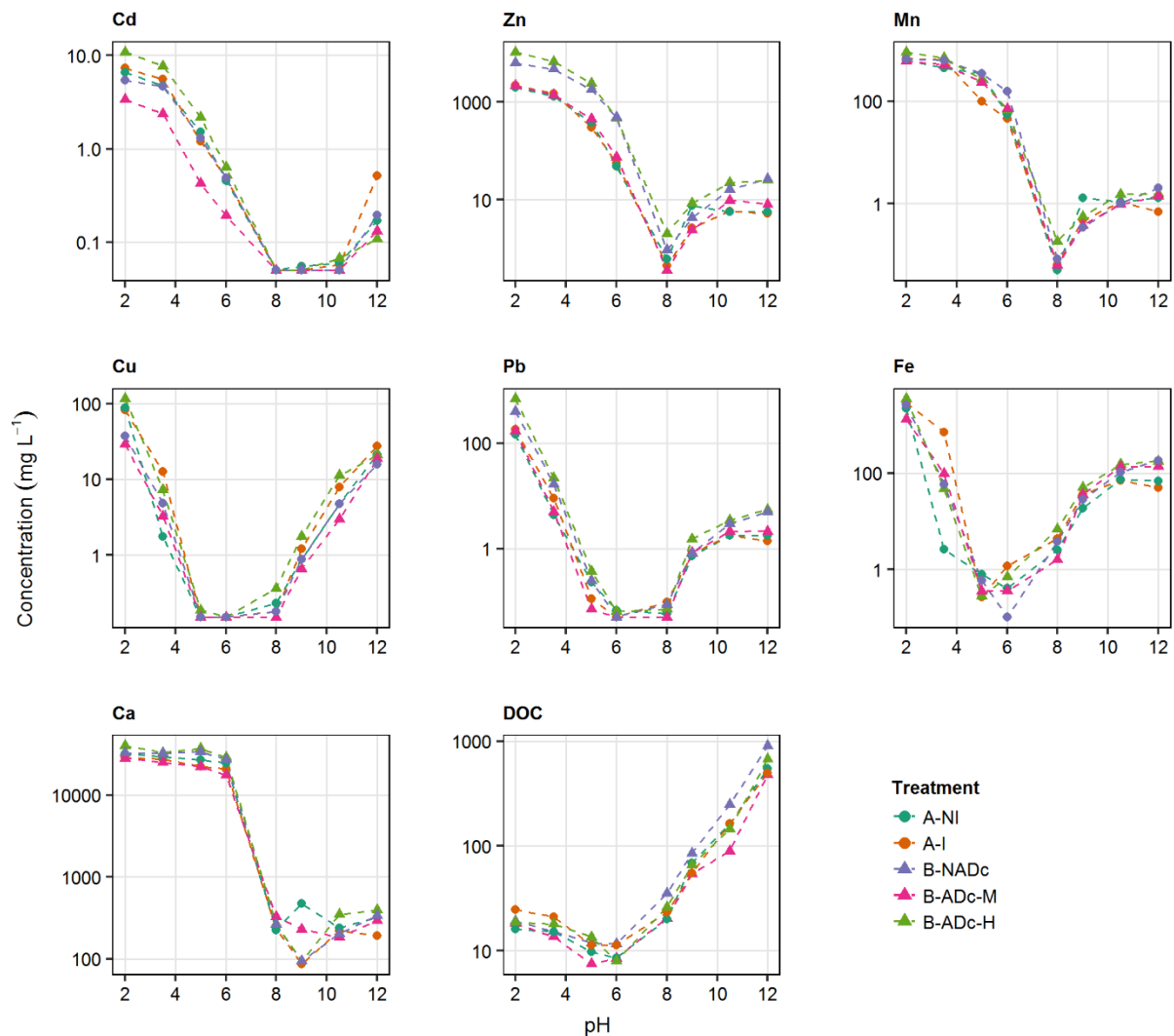


Figure 4. 2 : Leaching of metals and DOC as a function of pH and treatment. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows.

4.1.4.4. Plant responses to phytomanaged soils

4.1.4.4.1. Seedling emergence and shoot dry biomass

Seedling emergence rates ranged between 82-92 % and 90-103 % for *A. sativa* and *B. rapa*, respectively (**Table S4. 1**). No significant difference was detected between the treatments, indicating that PTE concentrations in soils and amendments did not affect seed germination.

Although no visible symptom of toxicity was noticed at the end of the two-week exposure period, plant growth was altered depending on the species and treatments (**Figure 4. 3A** and **Figure 4. 3C**). Regarding *A. sativa*, all plants exhibited a significant growth reduction of 24 to 45 % compared with control plants (LUFA) and the lowest shoot dry biomass was measured in the amended soil B-ADc-M (**Figure 4. 3A**). These results are in accordance with previous tests performed with lettuce plants, of which shoot dry biomass decreased in contaminated and phytomanaged soil collected at the same site B ([Quintela-Sabarís et al., 2017](#)). The shoot biomass of *B. rapa* also decreased in B-ADc-M whereas optimal growth was achieved in the other soils (**Figure 4. 3C**). The plants in B-ADc-M may have been affected by the higher availability of Cu in soils (**Table S4. 2**) as negative correlations were found between $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable Cu in soil and shoot dry biomass at day 14 for both species (**Table S4. 3**). Indeed, Cu is an essential micronutrient for plants but it becomes toxic at excessive levels, leading to growth reduction ([Dučić and Polle, 2005](#)). During the vegetative growth stage, comparisons of plant biomass between amended and non-amended soils of each site did not reveal an improvement of soil conditions for the growth of both species.

During its flowering stage (day 54), *A. sativa* remained affected by all contaminated soils (**Figure 4. 3B**). The plants showed the lowest shoot dry biomass in the non-amended soil B-NADc, which was reduced by half compared with the control one (LUFA). Plants in B-NADc also had a lower biomass production than those from the amended soils B-ADc-M and B-ADc-H, suggesting a positive effect of Optiscor® on soil physicochemical properties and plant growth. Negative correlations between total and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable Cu, Pb and Zn concentrations in soil and shoot dry biomass at day 54 revealed a potential impact of these elements in plant growth. In contrast, *B. rapa* exhibited an optimal growth during the ripening period (day 40) except in B-ADc-H and no visible symptom of nutrient deficiency or toxicity was noticed (**Figure 4. 3D**). The slight but significant reduction of shoot dry biomass in B-ADc-H was more likely related to the high concentrations of Zn, Cu and Pb in soil (**Table S4. 4**). However, all plants that grew in soils from the site B had similar shoot dry biomass indicating no effect of Optiscor® on soil properties and plant growth. As the growth of both species was similar in the soils A-I and A-NI (**Figure 4. 3B** and **Figure 4. 3D**), it is clear that the mycorrhizal inoculation of poplars performed at the site A did not improve soil conditions. However, the necroses were more pronounced on plants

cultivated on the contaminated and non-amended soils B-NADc and A-NI, suggesting a positive effect of the amendments (Table 4. 3).

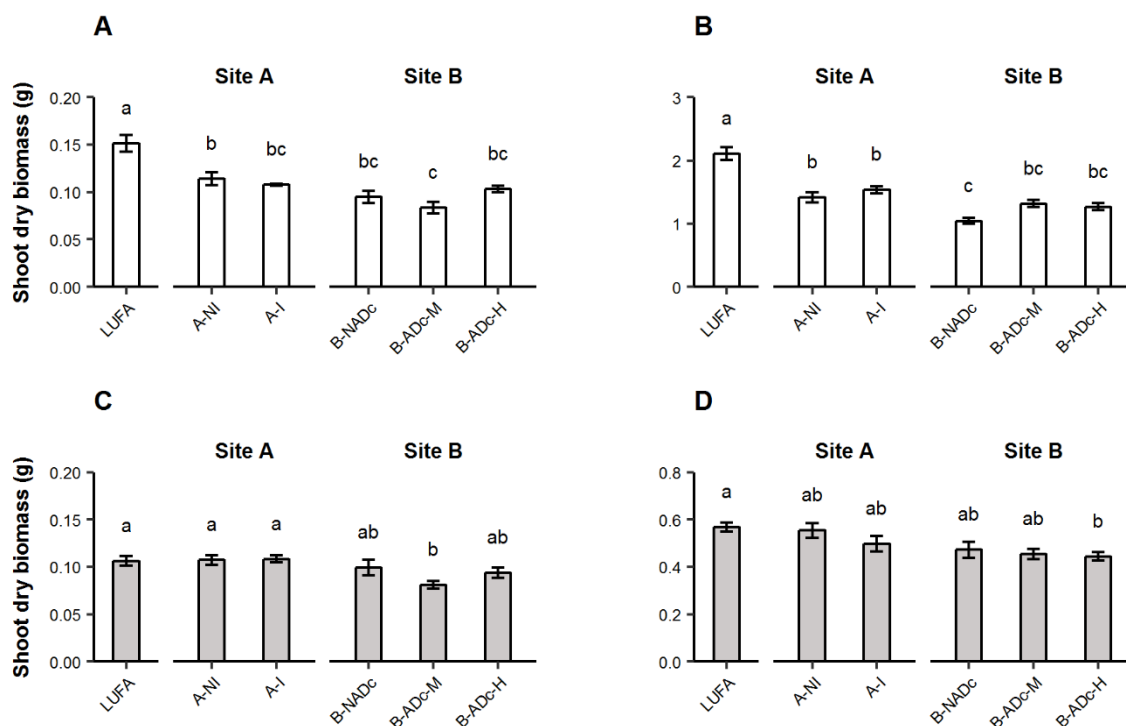


Figure 4. 3 : Shoot dry biomass of *A. sativa* (white bars) and *B. rapa* (grey bars), measured at day 14 (A and C), at day 54 (B) and day 40 (D). Values are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between the treatments ($n=4$; $\alpha = 0.05$). LUFA: control soil; A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows.

Table 4. 3 : Necrosis intensity observed after 34 days. The symbol “-” indicates no necrosis; “+” and “++” indicate the presence of a few or several necroses on the leaves, respectively).

Species	LUFA	A-NI	A-I	B-NADc	B-ADc-M	B-ADc-H
<i>A. sativa</i>	-	++	+	++	+	+
<i>B. rapa</i>	-	-	-	-	-	-

4.1.4.4.2. Reproductive development

The panicle development stage of *A. sativa* was observed 45 days after seedling emergence. After 54 days, the mean number of spikelets decreased in all contaminated soils (Table 4. 4). Compared with the control plants, the number of spikelets was significantly reduced in B-NADc (by 46 %) and B-ADc-H (by 43 %). Pod development stage in *B. rapa* occurred from the 21nd day after seedling emergence in all soils. After 40 days, the total number of pods was low for all plants compared with control ones, indicating that the contaminated soils affected pod development regardless of the treatments (Table 4. 4). Despite high variabilities, plants from B-

ADc-H had less pods but an important proportion of ripe pods, suggesting that high concentrations of PTEs in soils induced the ripening of pods. Conversely, the plants from B-NADc showed the lowest proportion of ripe pods. Total and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -extractable concentrations of Zn in soil were negatively correlated with the number of spikelets and pods (**Table S4. 3**) suggesting the impact of this element on the reproductive development of both species.

Table 4. 4 : Mean number of spikelets (*A. sativa*) and pods (*B. rapa*). The mean number of ripe pods is expressed as a percentage of total pods. LUFA: control soil; A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. Different letters indicate significant differences between the treatments (n= 16, $\alpha= 0.05$).

Treatment	<i>A. sativa</i>	<i>B. rapa</i>	
	Spikelets	Pods	Ripe pods (%)
LUFA	7.4 ± 1.4 ^a	17 ± 7.5 ^a	24
A-NI	5.3 ± 1.2 ^{bc}	10 ± 4.6 ^b	28
A-I	5.8 ± 1.2 ^b	10 ± 4.5 ^b	23
B-NADc	4.0 ± 1.2 ^c	9.2 ± 4.8 ^b	18
B-ADc-M	5.1 ± 1.4 ^{bc}	9.1 ± 6.0 ^b	32
B-ADc-H	4.2 ± 1.0 ^c	6.6 ± 4.5 ^b	31

4.1.4.4.3. Shoot PTEs concentrations

Metal concentrations in plants varied depending on the species and the soil treatments (**Table 4. 5**). Both species had higher concentrations of Cd, Pb, Zn and Fe than control plants regardless of the treatments and lower concentrations of Mn, especially *A. sativa*. Mn is an essential micronutrient involved in several processes such as photosynthesis and adequate contents in plants are required ([Schmidt et al., 2016](#)). Critical Mn levels in the aboveground parts of plants are generally below 10-20 mg kg⁻¹ DW and can result in leaf necrosis regardless of plant species or cultivars ([Schmidt et al., 2016](#); [Shao et al., 2017](#)). Because *A. sativa* presented leaf necrosis (**Table 4. 3**) and insufficient concentrations of Mn in all contaminated soils, we assume that growth reduction was the consequence of Mn deficiency. In addition, the strong and positive correlation between shoot Mn concentrations and shoot dry biomass ($r= 0.82$) confirmed that Mn was a key factor for the growth of *A. sativa*. Soil parameters such as pH and redox potential are known to greatly influence Mn availability ([Schmidt et al., 2016](#)). In our study, pH_{stat} tests revealed that the lowest Mn-extractable concentrations were leached in the soil solution at pH 8 (**Figure 4. 2**), corresponding to the actual pH of all contaminated soils. Consequently, Mn deficiency in *A. sativa* probably occurred because of Mn oxidation in alkaline conditions, reducing the element availability ([Schmidt et al., 2016](#)). Interactions with other elements might have reduced Mn uptake and translocation in shoots. Among metal transporters involved in the uptake of Mn in plants,

ITR1 from the ZRT-IRT-like Protein (ZIP) family has been reported to transport other cations including Fe, Zn and Cd ([Guerinot, 2000](#)).

In *A. sativa*, shoot Cu and Zn concentrations notably reached toxic levels (20-100 and 100-500 mg kg⁻¹ for Cu and Zn, respectively) that may also be responsible for plant growth inhibition ([Dučić and Polle, 2005](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Shoot dry biomass and number of spikelets were strongly and negatively correlated with shoot concentrations of both elements (**Table S4. 4**). Plants that presented the highest concentrations of Cu and Zn were found in the non-amended soil B-NADc, where they showed the most important growth reduction at day 54 (**Figure 4. 3B** and **Table 4. 5**). Although Cu and Zn were potentially more available in the amended soil B-ADc-H (**Table S4. 2**), *A. sativa* limited the translocation of both elements in shoots (**Table 4. 5**), suggesting a positive effect of Optiscor®. In another study, the addition of the same amendment in a sandy soil (1 % DW) was also beneficial for beans by improving the biomass of primary leaves and by decreasing foliar Cu concentrations ([Le Forestier et al., 2017](#)).

In contrast to *A. sativa*, *B. rapa* achieved to maintain sufficient shoot concentrations of Cu in all contaminated soils (**Table 4. 5**) and showed an optimal growth, except in B-ADc-H. Some studies showed that *Brassica* species could tolerate several metals by producing chelating compounds involved in the reduction of metal phytotoxicity ([Jahangir et al., 2008](#); [Mourato et al., 2015](#)). According to correlation tests, the slight decrease of shoot biomass and pod production in B-ADc-H was likely due to an excessive concentration of Zn and to Mn deficiency in the plant (**Table S4. 4**). In this line, [Mourato et al. \(2015\)](#) reported that Cu and Zn exposure reduced the translocation of Mn in shoots of *B. rapa*. While Zn can induce Fe uptake in *Brassica* species to avoid Fe deficiency, an antagonistic relationship between Zn and Mn might have occurred in roots as suggested by [Feigl et al. \(2015\)](#), resulting in the increase of shoot Fe and decrease of Mn uptake and/or translocation in shoots. It is not clear if Optiscor® limited metal accumulation in B-ADc-M since *B. rapa* presented similar concentrations of Pb, Zn and Fe similarly in the amended soil B-ADc-H and non-amended soil B-NADc. The amendment may not be efficient at certain levels of PTEs in soils. Regarding the biological amendment, shoot metal concentration was not reduced in A-I compared to A-I in most cases for both species, suggesting that the treatment had no effect (**Table 4. 5**).

Table 4. 5 : Metal shoot concentrations (mg kg⁻¹ DW) in *A. sativa* (d54) and *B. rapa* (d40). LUFA: control soil; A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. Values are means \pm SD (n= 4). Different letters indicate significant differences between the treatments among each species ($\alpha=0.05$).

Species	Treatment	Cd	Cu	Pb	Zn	Fe	Mn
<i>A. sativa</i>	LUFA	0.03 \pm 0.00 ^E	9.57 \pm 0.99 ^C	0.39 \pm 0.03 ^D	22.6 \pm 12.7 ^D	40 \pm 2.35 ^E	54.9 \pm 7.64 ^A
	A-NI	0.65 \pm 0.05 ^A	16.9 \pm 0.68 ^B	0.73 \pm 0.07 ^C	105 \pm 6.42 ^C	61.2 \pm 4.96 ^D	4.24 \pm 0.27 ^B
	A-I	0.72 \pm 0.07 ^A	16.9 \pm 0.56 ^B	0.68 \pm 0.06 ^C	104 \pm 6.23 ^C	64.9 \pm 4.27 ^{CD}	4.43 \pm 0.13 ^B
	B-NADc	0.40 \pm 0.03 ^C	20.8 \pm 1.48 ^A	1.66 \pm 0.34 ^A	224 \pm 17.2 ^A	155 \pm 41.6 ^A	5.19 \pm 0.15 ^B
	B-ADc-M	0.29 \pm 0.03 ^D	16.6 \pm 1.43 ^B	0.79 \pm 0.16 ^{BC}	104 \pm 5.79 ^C	77.2 \pm 15.0 ^{BC}	4.28 \pm 0.47 ^B
	B-ADc-H	0.54 \pm 0.02 ^B	16.4 \pm 1.22 ^B	0.97 \pm 0.18 ^B	195 \pm 12.8 ^B	84.6 \pm 18.3 ^B	4.10 \pm 0.77 ^B
<i>B. rapa</i>	LUFA	0.30 \pm 0.03 ^d	8.65 \pm 1.58	1.79 \pm 0.68 ^b	37.0 \pm 6.60 ^c	246 \pm 64.0 ^b	54.6 \pm 16.3 ^a
	A-NI	1.92 \pm 0.30 ^a	8.63 \pm 0.37	3.80 \pm 0.35 ^b	160 \pm 12.8 ^b	288 \pm 23.3 ^b	25.3 \pm 4.01 ^b
	A-I	1.86 \pm 0.13 ^a	9.24 \pm 0.99	5.69 \pm 1.19 ^a	169 \pm 20.6 ^b	408 \pm 81.4 ^a	28.2 \pm 3.3 ^b
	B-NADc	0.78 \pm 0.08 ^c	9.17 \pm 0.92	7.57 \pm 2.31 ^a	308 \pm 36.8 ^a	609 \pm 184 ^a	20.7 \pm 3.42 ^b
	B-ADc-M	0.69 \pm 0.06 ^c	8.93 \pm 0.51	5.29 \pm 0.72 ^a	154 \pm 11.6 ^b	435 \pm 79.2 ^a	18.1 \pm 2.01 ^b
	B-ADc-H	1.41 \pm 0.03 ^b	9.27 \pm 0.36	7.11 \pm 2.13 ^a	418 \pm 7.86 ^a	482 \pm 158 ^a	19.0 \pm 1.82 ^b

4.1.5. Conclusion

The phytomanagement of contaminated sites has been considered as a promising option to prevent environmental risks and produce valuable biomass to generate economic opportunities. The use of leaching and extraction tests were used to investigate and predict PTE behavior in soil. The amendments did not reduce PTE mobility and distribution in the tested soils but it appeared that soil pH was a critical parameter that controlled metal availability. Our study highlighted the importance of maintaining a maximum soil pH of 8 to reduce PTE availability but such a measure can also impair micronutrients uptake such as Mn. *A. sativa* and *B. rapa* responded differently to metal exposure and soil physicochemical properties but pointed out the same soils as the most toxic. Among the field-contaminated soils, B-NADc and B-ADc-H from the site B appeared as the most toxic matrices for plants growth when considering all endpoints. Growth reduction occurred earlier in *A. sativa* than in *B. rapa*, which did not show visible toxicity symptoms. *A. sativa* was more sensitive than *B. rapa* for all endpoints whereas *B. rapa* showed a slight reduction of growth and pod production only at the end of the test. For these tested plants, long-term bioassays appeared to be more relevant than short-term bioassays since both species responded differently to soil physicochemical characteristics after their vegetative stage. In addition to Cd, Cu, Pb and Zn potential phytotoxicity, Mn deficiency appeared as the most importance cause of plant growth reduction. Chronic toxicity tests are relevant tools to assess soil quality. Because of the duration of the tests, they could be performed every 3 or 5 years.

Supplemental data

Table S4. 1 : Seedling emergence rates of *A. sativa* and *B. rapa* expressed as a percentage of the mean emergence of control plants (LUFA). A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows. No letter indicates no difference between the treatments (n= 4; $\alpha= 0.05$).

Species	A-NI	A-I	B-NADc	B-ADc-M	B-ADc-H
<i>A. sativa</i>	92 ± 0.16	92 ± 0.05	87 ± 0.16	82 ± 0.18	92 ± 0.10
<i>B. rapa</i>	97 ± 0.06	103 ± 0.00	90 ± 0.26	97 ± 0.06	97 ± 0.06

Table S4. 2 : Concentrations of PTE (mg kg⁻¹ DW) in different soil fractions (0-20 cm) under different phytomanagement practices. A-NI: soil planted with non-inoculated poplars; A-I: soil planted with inoculated poplars; B-NADc: non-amended soil + *D. cespitosa* and willows, B-ADc-M: moderately contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows; B-ADc-H: highly contaminated amended soil + *D. cespitosa* and willows). Values are means ± SD (n=3).

Site	Fraction	Treatment	Cd	Cu	Pb	Zn	
A	Ca(NO ₃) ₂ -extractable	A-NI	0.009 ± 0.000 ^a	0.13 ± 0.11	0.007 ± 0.002	0.73 ± 0.06	
		A-I	0.008 ± 0.000 ^b	0.06 ± 0.03	0.004 ± 0.001	0.62 ± 0.15	
	F1	A-NI	3.85 ± 0.20	1.93 ± 0.21	4.79 ± 1.23	722 ± 48.1	
		A-I	4.26 ± 0.16	2.67 ± 0.33	5.64 ± 1.55	830 ± 101	
	F2	A-NI	4.37 ± 0.25	3.64 ± 1.70	92.5 ± 14.0	998 ± 41.7	
		A-I	4.78 ± 0.34	8.76 ± 2.53	129 ± 15.1	1,129 ± 42.6	
	F3	A-NI	0.51 ± 0.02	59.4 ± 4.28	272 ± 26.2	332 ± 14.1	
		A-I	0.60 ± 0.11	61.9 ± 3.95	300 ± 46.2	346 ± 45.7	
	F4	A-NI	0.64 ± 0.09	25.1 ± 4.23	73.3 ± 14.6	244 ± 82.9	
		A-I	0.69 ± 0.22	23.5 ± 1.62	69.7 ± 3.31	225 ± 49.1	
	B	Ca(NO ₃) ₂ -extractable	B-NADc	0.003 ± 0.00	0.13 ± 0.14	0.007 ± 0.005	1.03 ± 0.12
			B-ADc-M	0.003 ± 0.00	0.17 ± 0.12	0.008 ± 0.004	0.47 ± 0.09
			B-ADc-H	0.006 ± 0.00	0.12 ± 0.13	0.008 ± 0.008	1.44 ± 0.19
		F1	B-NADc	3.27 ± 0.05	2.31 ± 0.08	7.85 ± 0.20	2,410 ± 50.4
			B-ADc-M	2.00 ± 0.11	2.11 ± 0.28	6.58 ± 1.57	929 ± 39.8
			B-ADc-H	5.98 ± 0.25	4.31 ± 0.51	13.3 ± 2.55	3,945 ± 394
F2		B-NADc	4.01 ± 0.06	1.53 ± 0.27	72.0 ± 4.39	3,182 ± 81.1	
		B-ADc-M	2.23 ± 0.06	1.53 ± 0.61	67.6 ± 6.18	968 ± 41	
		B-ADc-H	6.53 ± 0.27	1.60 ± 0.61	74.7 ± 11.1	4,346 ± 172	
F3		B-NADc	0.78 ± 0.05	50.7 ± 1.46	571 ± 10.6	952 ± 28.2	
		B-ADc-M	0.34 ± 0.04	42.8 ± 1.28	273 ± 14.1	272 ± 29.0	
		B-ADc-H	1.45 ± 0.14	88.4 ± 10.6	977 ± 86.1	1,812 ± 110	
F4		B-NADc	0.74 ± 0.13	29.3 ± 4.05	233 ± 36.7	495 ± 39.6	
		B-ADc-M	0.67 ± 0.11	25.4 ± 2.32	94.5 ± 6.67	223 ± 24.1	
		B-ADc-H	0.71 ± 0.37	28.2 ± 11.8	332 ± 231	729 ± 480	

Fractions: F1: exchangeable; F2: reducible; F3: oxidizable; F4: residual.

Table S4. 3 : Significant correlations between soil Ca(NO₃)₂-extractable PTEs concentrations and plant responses at d 40 and d 54, for *B. rapa* and *A. sativa*, respectively ($\alpha= 0.01$).

	Ca(NO ₃) ₂ -extractable concentration					Total concentration				
	Cd	Cu	Pb	Zn	Mn	Cd	Cu	Pb	Zn	Mn
<i>A. sativa</i>										
Shoot dry mass d 14	0.95	-0.65	-0.32	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Shoot dry mass d 54	0.72	-0.51	-0.52	-0.50	Ns	Ns	-0.46	-0.60	-0.59	-0.69
Shoot Cd concentrations (DW)	0.95	-0.85	-0.60	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-0.30
Shoot Cu concentrations (DW)	-0.39	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0.38
Shoot Pb concentrations (DW)	-0.56	Ns	Ns	0.46	Ns	Ns	Ns	0.52	0.56	0.66
Shoot Zn concentrations (DW)	-0.45	Ns	Ns	0.82	Ns	0.70	0.74	0.86	0.87	0.90
Shoot Mn concentrations (DW)	-0.39	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Number of spikelet	0.59	-0.40	-0.59	-0.77	-0.45	-0.63	-0.76	-0.85	-0.82	-0.85
<i>B. rapa</i>										
Shoot dry mass d 14	0.84	-0.78	-0.61	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Shoot dry mass d 40	0.78	Ns	-0.22	-0.39	Ns	-0.23	-0.57	-0.56	-0.70	Ns
Shoot Cd concentrations (DW)	0.99	-0.71	-0.45	Ns	Ns	Ns	-0.11	-0.20	-0.28	Ns
Shoot Cu concentrations (DW)	Ns	Ns	Ns	0.49	Ns	0.44	0.52	0.55	0.74	Ns
Shoot Pb concentrations (DW)	-0.57	Ns	Ns	0.67	Ns	0.54	0.66	0.76	0.88	Ns
Shoot Zn concentrations (DW)	-0.26	Ns	Ns	0.97	Ns	0.91	0.97	1	0.98	Ns
Shoot Mn concentrations (DW)	0.84	-0.80	-0.80	-0.36	Ns	Ns	-0.52	-0.53	-0.51	Ns
Number of pods	0.43	Ns	-0.54	-0.80	Ns	-0.71	-0.93	-0.89	-0.87	Ns

Ns = Not significant

Table S4. 4 : Significant correlations between shoot metal concentrations and plant responses at d 40 and d 54, for *B. rapa* and *A. sativa*, respectively ($\alpha= 0.01$).

	Cd	Cu	Pb	Zn	Mn
<i>A. sativa</i>					
Shoot dry mass d 54	-0.48	-0.86	-0.73	-0.85	0.82
Number of spikelet	-0.43	-0.80	-0.72	-0.83	0.74
<i>B. rapa</i>					
Shoot dry mass d 40	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Number of pods	Ns	Ns	-0.63	-0.70	0.67

Ns = Not significant

Acknowledgments

This work was supported by national fundings through BIOFILTREE (ANR Programme Blanc International, 2010-INTB-1703-03) and Phytosed 2 (ADEME, 1072C0044 and VNF, 2011/01/02). P. Phanthavongsa was granted through the Demophyto project (ADEME, 1472C0059 and VNF, N°2014/101/21). The authors thank Fabrice Richez, Pauline Molina and Vincent Suzza for their technical help during the sampling campaigns.

References

- Albertsson, J., Verwijst, T., Hansson, D., Bertholdsson, N.O., Åhman, I. (2014) Effects of competition between short-rotation willow and weeds on performance of different clones and associated weed flora during the first harvest cycle. *Biomass and Bioenergy* 70, 364-372.
- Antoniadis, V., Alloway, B.J. (2002) The role of dissolved organic carbon in the mobility of Cd, Ni and Zn in sewage sludge-amended soils. *Environmental Pollution* 117, 515-521.
- Baize, D. (2000) *Guide des analyses en pédologie: 2e édition, revue et augmentée*. Editions Quae.
- Bert, V., Lors, C., Ponge, J.-F., Caron, L., Biaz, A., Dazy, M., Masfarau, J.-F. (2012) Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* 169, 1-11.
- Bert, V., Seuntjens, P., Dejonghe, W., Lacherez, S., Thuy, H.T.T., Vandecasteele, B. (2009) Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 745-764.
- Cabral, L., Soares, C.R.F.S., Giachini, A.J., Siqueira, J.O. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1655-1664.
- Centioli, D., Comans, R.N., Gaudino, S., Galas, C., Belli, M. (2008) Leaching tests: useful tools for the risk assessment of contaminated sediments. *Ann Ist Super Sanita* 44, 252-257.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappellini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., Chalot, M. (2017) Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environmental and Experimental Botany* 139, 48-56.
- Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Cools, N., Vesterdal, L., De Vos, B., Vanguelova, E., Hansen, K. (2014) Tree species is the major factor explaining C:N ratios in European forest soils. *Forest Ecology and Management* 311, 3-16.
- Di Bonito, M., Lofts, S., Groenenberg, J.E., (2018) Chapter 11 - Models of Geochemical Speciation: Structure and Applications A2 - Vivo, Benedetto De, in: Belkin, H.E., Lima, A. (Eds.), *Environmental Geochemistry (Second Edition)*. Elsevier, pp. 237-305.
- Dučić, T., Polle, A. (2005) Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 103-112.
- Evangelou, M.W., Deram, A. (2014) Phytomanagement: a realistic approach to soil remediating phytotechnologies with new challenges for plant science. *Int J Plant Biol Res* 2, 1023.
- Feigl, G., Lehotai, N., Molnár, Á., Ördög, A., Rodríguez-Ruiz, M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Erdei, L., Kolbert, Z. (2015) Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of Botany* 116, 613-625.
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465, 190-198.
- Huguet, S., Isaure, M.-P., Bert, V., Laboudigue, A., Proux, O., Flank, A.-M., Vantelon, D., Sarret, G. (2015) Fate of cadmium in the rhizosphere of *Arabidopsis halleri* grown in a contaminated dredged sediment. *Science of The Total Environment* 536, 468-480.

- Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2008) Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *Journal of Plant Physiology* 165, 1429-1437.
- Kabata-Pendias, A. (2010) Trace elements in soils and plants. CRC, Boca Raton, FL [etc.].
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Olga Janssen, J., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M. (2015) Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation* 17, 1005-1037.
- Kumpiene, J., Bert, V., Dimitriou, I., Eriksson, J., Friesl-Hanl, W., Galazka, R., Herzig, R., Janssen, J., Kidd, P., Mench, M., Müller, I., Neu, S., Oustrière, N., Puschenreiter, M., Renella, G., Roumier, P.-H., Siebielec, G., Vangronsveld, J., Manier, N. (2014) Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Science of The Total Environment* 496, 510-522.
- Le Forestier, L., Motelica-Heino, M., Le Coustumer, P., Mench, M. (2017) Phytostabilisation of a copper contaminated topsoil aided by basic slags: assessment of Cu mobility and phytoavailability. *Journal of Soils and Sediments* 17, 1262-1271.
- Louriño-Cabana, B., Lesven, L., Charriau, A., Billon, G., Ouddane, B., Boughriet, A. (2011) Potential risks of metal toxicity in contaminated sediments of Deûle river in Northern France. *Journal of Hazardous Materials* 186, 2129-2137.
- Marchand, L., Lamy, P., Bert, V., Quintela-Sabaris, C., Mench, M. (2016a) Potential of *Ranunculus acris* L. for biomonitoring trace element contamination of riverbank soils: photosystem II activity and phenotypic responses for two soil series. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 3104-3119.
- Marchand, L., Pelosi, C., González-Centeno, M.R., Maillard, A., Ourry, A., Galland, W., Teissedre, P.-L., Bessoule, J.-J., Mongrand, S., Morvan-Bertrand, A., Zhang, Q., Grosbellet, C., Bert, V., Oustrière, N., Mench, M., Brunel-Muguet, S. (2016b) Trace element bioavailability, yield and seed quality of rapeseed (*Brassica napus* L.) modulated by biochar incorporation into a contaminated technosol. *Chemosphere* 156, 150-162.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schröder, P., Vangronsveld, J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1039-1070.
- Mondaca, P., Catrin, J., Verdejo, J., Sauvé, S., Neaman, A. (2017) Advances on the determination of thresholds of Cu phytotoxicity in field-contaminated soils in central Chile. *Environmental Pollution* 223, 146-152.
- Mourato, M.P., Moreira, I.N., Leitão, I., Pinto, F.R., Sales, J.R., Louro Martins, L. (2015) Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus *Brassica*. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 17975-17998.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., Bert, V. (2017) Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environmental and Experimental Botany* 143, 72-81.
- Piou, S., Bataillard, P., Laboudigue, A., Férard, J.-F., Masfarau, J.-F. (2009) Changes in the geochemistry and ecotoxicity of a Zn and Cd contaminated dredged sediment over time after land disposal. *Environmental Research* 109, 712-720.
- Quevauviller, P. (2007) Fractionnement d'éléments pour étude dans l'environnement. *Techniques de l'ingénieur Analyses dans l'environnement : méthodologies base documentaire : TIB382DUO*.
- Quevauviller, P., Rauret, G., López-Sánchez, J.-F., Rubio, R., Ure, A., Muntau, H. (1997) Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of The Total Environment* 205, 223-234.
- Quintela-Sabaris, C., Marchand, L., Kidd, P.S., Friesl-Hanl, W., Puschenreiter, M., Kumpiene, J., Müller, I., Neu, S., Janssen, J., Vangronsveld, J., Dimitriou, I., Siebielec, G., Gałazka, R., Bert, V., Herzig, R., Cundy, A.B., Oustrière, N., Kolbas, A., Galland, W., Mench, M. (2017) Assessing phytotoxicity of trace element-contaminated soils phytomanaged with gentle remediation options at ten European field trials. *Science of The Total Environment* 599-600, 1388-1398.
- Rodgers, K.J., Hursthouse, A., Cuthbert, S. (2015) The Potential of Sequential Extraction in the Characterisation and Management of Wastes from Steel Processing: A Prospective Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 11724-11755.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E. (2000) Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 34, 1125-1131.
- Schmidt, S.B., Jensen, P.E., Husted, S. (2016) Manganese Deficiency in Plants: The Impact on Photosystem II. *Trends in Plant Science* 21, 622-632.

-
- Shao, J.F., Yamaji, N., Shen, R.F., Ma, J.F. (2017) The Key to Mn Homeostasis in Plants: Regulation of Mn Transporters. *Trends in Plant Science* 22, 215-224.
- Sundaray, S.K., Nayak, B.B., Lin, S., Bhatta, D. (2011) Geochemical speciation and risk assessment of heavy metals in the river estuarine sediments—A case study: Mahanadi basin, India. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1837-1846.
- Van Slycken, S., Witters, N., Meiresonne, L., Meers, E., Ruttens, A., Van Peteghem, P., Weyens, N., Tack, F.M.G., Vangronsveld, J. (2013) Field Evaluation of Willow Under Short Rotation Coppice for Phytomanagement of Metal-Polluted Agricultural Soils. *International Journal of Phytoremediation* 15, 677-689.
- Voie navigables de France, (2014) Guide dragage. Voies navigables de France, pp. 1-166.
- Yang, Z., Wang, Y., Shen, Z., Niu, J., Tang, Z. (2009) Distribution and speciation of heavy metals in sediments from the mainstream, tributaries, and lakes of the Yangtze River catchment of Wuhan, China. *Journal of Hazardous Materials* 166, 1186-1194.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research* 14, 415-421.

4.2. Résultats complémentaires : modélisation de la spéciation du Cd, Cu, Pb et Zn dans les sols

4.2.1. Modélisation de la spéciation des métaux via le code géochimique ORCHESTRA

Sur la base de données issues des tests de lixiviation, il est possible de déterminer la nature des phases solides réactives susceptibles de contrôler le relargage des EPT par l'utilisation de modèles géochimiques ([Van der Sloot et al., 2005](#)). Dans le cadre d'une évaluation des risques environnementaux, cette approche est de plus en plus utilisée pour déterminer la spéciation des EPT dans une matrice donnée (sols, sédiments, déchets, etc.) et prédire leur comportement géochimique sur le long terme ([Achard, 2013](#); [Di Bonito et al., 2018](#)). Dans notre étude, la spéciation d'EPT dans les phases solides et liquides des échantillons de sol a été déterminée à l'aide du logiciel LeachXS™ (Energy Research Centre of the Netherlands and Vanderbilt University ; www.leachxs.org). Ce logiciel intègre le code géochimique ORCHESTRA (Objects Representing CHEmical Speciation and TRAnsport models) qui permet d'estimer la répartition des éléments entre différentes phases particulières (matière organique particulaire ou MOP, oxydes/hydroxydes de Fe et Al, argiles, et carbonates) et la matière organique dissoute (MOD) ([Meeussen, 2003](#)). Les paramètres d'entrée et de sortie du modèle sont schématisés sur la **Figure 4.4**.

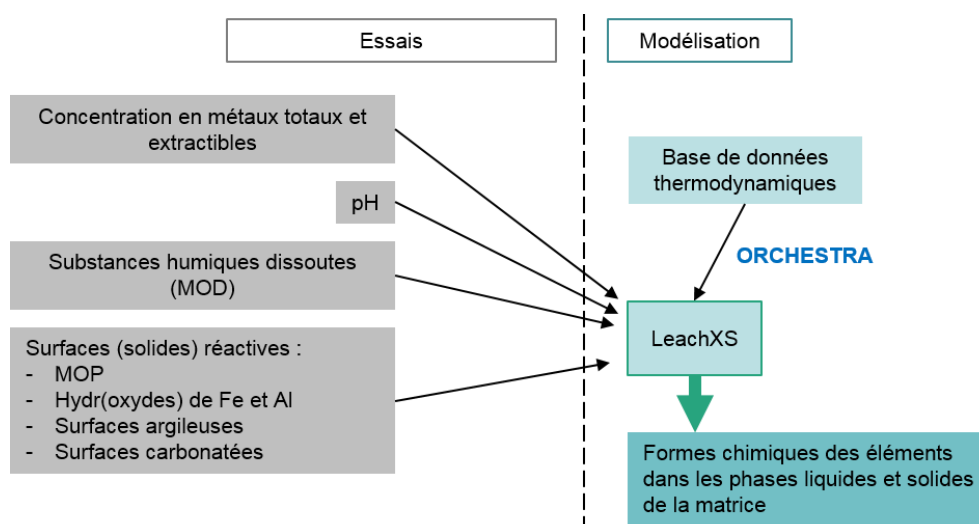


Figure 4.4 : Relation entre les données expérimentales des tests de lixiviation et d'extraction avec la modélisation de la spéciation des EPT.

Il est supposé que tout le carbone organique dissous (COD) en solution est constitué de 20 % d'acides humiques (AH) pour toute la gamme de pH ([Van der Sloot et al., 2005](#)). Seuls les résultats concernant les échantillons de sol **A-NI**, **A-I**, **B-NADc** et **B-ADc-H** (voir paragraphe 4.1.3 pour plus de détails) prélevés en février 2016 sur les deux sites A et B sont reportés. Cette étude

complémentaire devrait permettre d'appuyer les résultats obtenus précédemment et d'évaluer plus finement l'impact du phytomanagement sur le comportement géochimique des EPT.

4.2.2. Acquisition des données d'entrée

Les données d'entrée pour la modélisation de la spéciation des EPT dans les sols sont listées dans le **Tableau 4. 1**.

Les minéraux susceptibles de précipiter avec les EPT ont été obtenus après un premier calcul des indices de saturation (IS) via le logiciel LeachXS™ (**Tableau 4. 2** et **Tableau 4. 3**). Les minéraux ont été sélectionnés pour des IS compris entre -0,3 et 0,3 (valeurs par défaut).

La quantité de MOP est calculée comme la somme des AH et AF extractibles. Le mode opératoire qui a été suivi est celui préconisé par l'INRA de Versailles – Grignon ; l'expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Lamy (PESSAC). Il consiste à ajouter un volume de 30 mL de soude (0,5 M) à 7,5 g de sol sec broyé et tamisé à 2 mm pour séparer dans un premier temps les substances humiques (SH) en solution de l'humine (insoluble). Après 16 h d'agitation et centrifugation (12,000 tr/min pendant 10 min), le surnageant (SH) a été collecté. Une diminution du pH à 1,2 du surnageant avec HCl (6 N) a permis de séparer les AH qui précipitent à pH acide, des AF qui restent en solution quel que soit le pH. Les différentes fractions ont été séparées après 1 h de repos et centrifugation (12,000 tr/min pendant 10 min). Le dosage du carbone du premier extrait (SH) et du second extrait (AF) permettent de calculer les concentrations en AH ($C_{AH} = C_{SH} - C_{AF}$).

Tableau 4. 1 : Données d'entrée pour la modélisation de la spéciation des EPT dans les échantillons de sol.

Paramètres d'entrée	Méthodes d'extraction et/ou d'analyse
Concentrations totales en Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Si et Zn	Extraction à l'acide fluorhydrique (voir paragraphe 2.1.3.2) ; analyse par ICP-OES.
Concentrations extractibles maximales en Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Si et Zn.	Essais de lixiviation à pH statique (voir paragraphe 4.1.3.3.2) ; analyse par ICP-OES.
Concentrations COD	Essais de lixiviation à pH statique (voir paragraphe 4.1.3.3.2) ; analyse au COT-mètre (TOC-V _{CSH} , Shimadzu).
Concentrations en anions : F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ et SO ₄ ²⁻	Essais de lixiviation à pH statique (voir paragraphe 4.1.3.3.2) ; dosage des anions dissous par chromatographie en phase liquide (ISO 10304-1, 2009).
Concentrations en oxydes et hydroxydes de Fe et Al	Extraction des oxydes et hydroxydes de Fe amorphe à l'acide ascorbique (ISO 12782-1, 2012) ; extraction des oxydes et hydroxydes de Fe cristallin au dithionite (ISO 12782-2, 2012) ; extraction des oxydes et hydroxydes d'Al à l'acide oxalique et à l'oxalate d'ammonium (ISO 12782-3, 2012) ; analyse par ICP-OES.
Teneurs en argiles (< 2µm)	NF X31-107 (2003) (Laboratoire de Touraine, France)
COT	ISO 14235 (1998) (Laboratoire de Touraine, France)
Concentrations totales en acides fulviques (AF) et acides humiques (AH)	Extractions à la soude (NaOH) et à l'acide chlorhydrique (HCl) ; analyse au COT-mètre (TOC-V _{CSN} , Shimadzu).
Phases minéralogiques principales	Diffraction des rayons X (Laboratoire LaSalle Beauvais – Esitpa) ; modélisation par ORCHESTRA (via LeachXS™)

Tableau 4. 2 : Minéraux sélectionnés pour la modélisation de la spéciation des métaux avec le logiciel LeachXS™ pour chaque traitement (A-NI ; A-I) du site A.

Minéral	Log(K)	Réaction
A-NI		
Albite[low]	85,3	Albite[low] + 8 H2O -> 6 H+ + 1 Na+ + 3 H2SiO4-2 + 1 Al[OH]4-
Analbite	84,4	Analbite + 8 H2O -> 6 H+ + 1 Na+ + 3 H2SiO4-2 + 1 Al[OH]4-
BaCaSO4[75%Ba]	8,69	BaCaSO4[75%Ba] -> 0.75 Ba+2 + 0.25 Ca+2 + 1 SO4-2
Barite	9,98	Barite -> 1 Ba+2 + 1 SO4-2
Ca2Pb[PO4]2	36,9	Ca2Pb[PO4]2 -> 2 Ca+2 + 2 PO4-3 + 1 Pb+2
Ca3Pb2[PO4]3Cl	63,4	Ca3Pb2[PO4]3Cl -> 3 Ca+2 + 1 Cl- + 3 PO4-3 + 2 Pb+2
Calcite	-8,21	Calcite + 2 H+ -> 1 Ca+2 + 1 H2CO3
CaPb4[PO4]3Cl	78,0	CaPb4[PO4]3Cl -> 1 Ca+2 + 1 Cl- + 3 PO4-3 + 4 Pb+2
ClPyromorphite	84,4	ClPyromorphite -> 1 Cl- + 3 PO4-3 + 5 Pb+2
Faustite	203,7	Faustite + 12 H2O -> 16 H+ + 4 PO4-3 + 1 Zn+2 + 6 Al[OH]4-
Hxyapatite[4]	40,5	Hxyapatite[4] + 1 H+ -> 5 Ca+2 + 1 H2O + 3 PO4-3
Illite[1]	116,3	Illite[1] + 11.2 H2O -> 8.2 H+ + 0.6 K+ + 0.25 Mg+2 + 3.5 H2SiO4-2 + 2.3 Al[OH]4-
Kaolinite	83,5	Kaolinite + 7 H2O -> 6 H+ + 2 H2SiO4-2 + 2 Al[OH]4-
Laumontite	118,0	Laumontite + 8 H2O -> 1 Ca+2 + 4 H2SiO4-2 + 2 Al[OH]4- + 8 H+
Montmorillonite	123,8	Montmorillonite + 10.96 H2O -> 8.58 H+ + 0.485 Mg+2 + 3.81 H2SiO4-2 + 0.22 Fe[OH]4- + 1.71 Al[OH]4-
Muscovite	120,9	Muscovite + 12 H2O -> 8 H+ + 1 K+ + 3 H2SiO4-2 + 3 Al[OH]4-
Plgummite[2]	101,8	Plgummite[2] + 6 H2O -> 7 H+ + 2 PO4-3 + 1 Pb+2 + 3 Al[OH]4-
Plumbogummite	101,8	Plumbogummite + 6 H2O -> 7 H+ + 2 PO4-3 + 1 Pb+2 + 3 Al[OH]4-
A-I		
Albite[low]	85,3	Albite[low] + 8 H2O -> 6 H+ + 1 Na+ + 3 H2SiO4-2 + 1 Al[OH]4-
Analbite	84,4	Analbite + 8 H2O -> 6 H+ + 1 Na+ + 3 H2SiO4-2 + 1 Al[OH]4-
Analcime	59,5	Analcime + 5 H2O -> 1 Na+ + 2 H2SiO4-2 + 1 Al[OH]4- + 4 H+
Anorthite	63,8	Anorthite + 8 H2O -> 1 Ca+2 + 4 H+ + 2 H2SiO4-2 + 2 Al[OH]4-
BaCaSO4[75%Ba]	8,69	BaCaSO4[75%Ba] -> 0.75 Ba+2 + 0.25 Ca+2 + 1 SO4-2
FCO3Apatite	94,4	FCO3Apatite + 2.4 H+ -> 9.316 Ca+2 + 2.48 F- + 1.2 H2CO3 + 0.144 Mg+2 + 0.36 Na+ + 4.8 PO4-3
Illite[1]	116,3	Illite[1] + 11.2 H2O -> 8.2 H+ + 0.6 K+ + 0.25 Mg+2 + 3.5 H2SiO4-2 + 2.3 Al[OH]4-
Kaolinite	83,5	Kaolinite + 7 H2O -> 6 H+ + 2 H2SiO4-2 + 2 Al[OH]4-
Montmorillonite	123,8	Montmorillonite + 10.96 H2O -> 8.58 H+ + 0.485 Mg+2 + 3.81 H2SiO4-2 + 0.22 Fe[OH]4- + 1.71 Al[OH]4-
Muscovite	120,9	Muscovite + 12 H2O -> 8 H+ + 1 K+ + 3 H2SiO4-2 + 3 Al[OH]4-
Plgummite[2]	101,8	Plgummite[2] + 6 H2O -> 7 H+ + 2 PO4-3 + 1 Pb+2 + 3 Al[OH]4-
Plumbogummite	101,8	Plumbogummite + 6 H2O -> 7 H+ + 2 PO4-3 + 1 Pb+2 + 3 Al[OH]4-
Wairakite	113,6	Wairakite + 10 H2O -> 1 Ca+2 + 4 H2SiO4-2 + 2 Al[OH]4- + 8 H+

Tableau 4. 3 : Minéraux sélectionnés pour la modélisation de la spéciation des métaux avec le logiciel Leach XS pour chaque traitement (B-NADc-B-ADc-M) du site B.

Minéral	Log(K)	Réaction
B-NADc		
BaCaSO ₄ [75%Ba]	8,69	BaCaSO ₄ [75%Ba] -> 0.75 Ba ⁺² + 0.25 Ca ⁺² + 1 SO ₄ ⁻²
Barite	9,98	Barite -> 1 Ba ⁺² + 1 SO ₄ ⁻²
Calcite	-8,21	Calcite + 2 H ⁺ -> 1 Ca ⁺² + 1 H ₂ CO ₃
Halloysite	80,2	Halloysite + 7 H ₂ O -> 6 H ⁺ + 2 H ₂ SiO ₄ ⁻² + 2 Al[OH] ₄ ⁻
Illite[1]	116,3	Illite[1] + 11.2 H ₂ O -> 8.2 H ⁺ + 0.6 K ⁺ + 0.25 Mg ⁺² + 3.5 H ₂ SiO ₄ ⁻² + 2.3 Al[OH] ₄ ⁻
Kaolinite	83,5	Kaolinite + 7 H ₂ O -> 6 H ⁺ + 2 H ₂ SiO ₄ ⁻² + 2 Al[OH] ₄ ⁻
Laumontite	118,0	Laumontite + 8 H ₂ O -> 1 Ca ⁺² + 4 H ₂ SiO ₄ ⁻² + 2 Al[OH] ₄ ⁻ + 8 H ⁺
MnHPO ₄ [C]	25,4	MnHPO ₄ [C] -> 1 H ⁺ + 1 Mn ⁺² + 1 PO ₄ ⁻³
Montmorillonite	123,8	Montmorillonite + 10.96 H ₂ O -> 8.58 H ⁺ + 0.485 Mg ⁺² + 3.81 H ₂ SiO ₄ ⁻² + 0.22 Fe[OH] ₄ ⁻ + 1.71 Al[OH] ₄ ⁻
Quartz	25,6	Quartz + 2 H ₂ O -> 2 H ⁺ + 1 H ₂ SiO ₄ ⁻²
B-ADc-M		
Albite[low]	-2,59	Albite[low] + 4 H ⁺ + 4 H ₂ O -> 1 Al ⁺³ + 3 H ₄ SiO ₄ + 1 Na ⁺
BaCaSO ₄ [50%Ba]	7,41	BaCaSO ₄ [50%Ba] -> 0.5 Ba ⁺² + 0.5 Ca ⁺² + 1 SO ₄ ⁻²
BaCaSO ₄ [75%Ba]	8,69	BaCaSO ₄ [75%Ba] -> 0.75 Ba ⁺² + 0.25 Ca ⁺² + 1 SO ₄ ⁻²
Barite	9,98	Barite -> 1 Ba ⁺² + 1 SO ₄ ⁻²
Ca ₂ Pb ₃ [PO ₄] ₃ Cl	70,9	Ca ₂ Pb ₃ [PO ₄] ₃ Cl -> 2 Ca ⁺² + 1 Cl ⁻ + 3 PO ₄ ⁻³ + 3 Pb ⁺²
Ca ₃ Pb ₂ [PO ₄] ₃ Cl	63,4	Ca ₃ Pb ₂ [PO ₄] ₃ Cl -> 3 Ca ⁺² + 1 Cl ⁻ + 3 PO ₄ ⁻³ + 2 Pb ⁺²
Illite [1]	-12,2	Illite[1] + 8 H ⁺ + 2 H ₂ O -> 2.3 Al ⁺³ + 3.5 H ₄ SiO ₄ + 0.6 K ⁺ + 0.25 Mg ⁺²
Kaolinite	-5,73	Kaolinite + 6 H ⁺ -> 2 Al ⁺³ + 1 H ₂ O + 2 H ₄ SiO ₄
Laumontite	-14,5	Laumontite + 8 H ⁺ -> 2 Al ⁺³ + 1 Ca ⁺² + 4 H ₄ SiO ₄
Montmorillonite	-2,67	Montmorillonite + 6.76 H ⁺ + 3.24 H ₂ O -> 1.71 Al ⁺³ + 0.22 Fe ⁺³ + 3.81 H ₄ SiO ₄ + 0.485 Mg ⁺²
Plgummite[2]	32,8	Plgummite[2] + 5 H ⁺ -> 3 Al ⁺³ + 6 H ₂ O + 2 PO ₄ ⁻³ + 1 Pb ⁺²
Plumbogummite	32,8	Plumbogummite + 5 H ⁺ -> 3 Al ⁺³ + 6 H ₂ O + 2 PO ₄ ⁻³ + 1 Pb ⁺²

4.2.3. Résultats

Les valeurs des différents paramètres utilisés pour la modélisation de la spéciation des EPT dans les sols amendés (A-I et B-ADc-H) et non amendés (A-NI et B-NADc) sont présentées dans le **Tableau 4. 4**. Les analyses par DRX ont permis d'identifier la présence de quartz, de feldspaths, de calcite et de minéraux argileux dans tous les échantillons. La répartition du Cd, Cu, Pb et Zn entre les phases liquides et solides des sols est présentée dans les **Figures 4.5 à 4.8**. Pour chaque figure, le graphique de gauche représente la concentration extractible de l'élément en fonction du pH (résultats issus des tests de lixiviation). Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées pour chaque EPT en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associées au COD.

Pour tous les sols amendés ou non, les résultats concernant le relargage du Cd et du Zn est difficilement prédictible (**Figure 4. 5** et **Figure 4. 8**) comparé à celui du Cu et du Pb (**Figure 4. 6** et **Figure 4. 7**). Les points expérimentaux obtenus pour le Cu et le Pb sont en effet plus proches

des données modélisées sur la gamme de pH testée (de 2 à 12). Dans les conditions expérimentales, le relargage du Cd (**Figure 4. 6**) et du Zn (**Figure 4. 8**) est plus faible que les estimations ; certaines phases minérales contrôlant la solubilité de ces éléments n'ont donc pas été identifiées. Un paramétrage plus avancé du modèle est nécessaire pour réduire les incertitudes (ex. concentrations en carbone inorganique, sélection plus large de minéraux potentiellement présents).

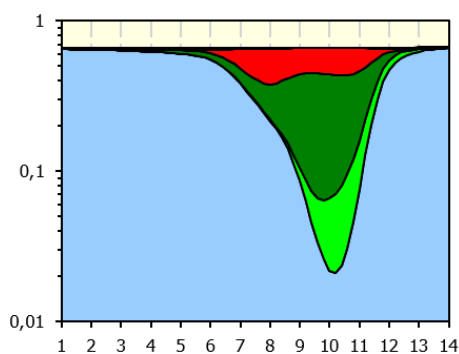
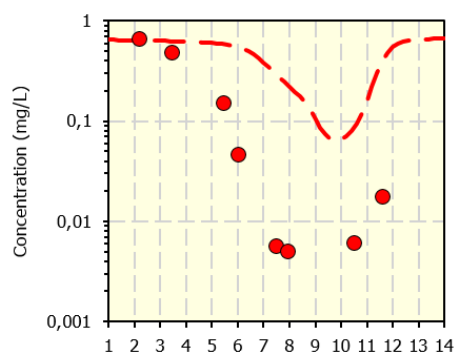
Selon les résultats de modélisation, le Cu est majoritairement associé à la MOP pour les valeurs de pH comprises entre 6 et 9 (**Figure 4. 6**). Il est entièrement solubilisé sous la forme Cu^{2+} aux valeurs de pH inférieures à 2 et supérieures à 12. En milieu alcalin pour des valeurs de pH comprises entre 8 et 10, une importante partie du Cu est complexée à la MOD, notamment sur les sols B-NADc et B-ADc-H. L'influence de l'amendement biologique n'est pas observable de manière significative sur le site A. Concernant le site B, les concentrations en Cu dans la phase soluble sont plus fortes pour le sol amendé B-ADc-H que pour le sol non amendé B-NADc à des valeurs de pH inférieures à 8. Le relargage est probablement dû à une contamination initialement plus forte dans les sols B-ADc-H que B-NADc.

Le Pb est majoritairement associé aux oxydes de Fe, à la MOP et sous forme de phosphates de Pb (seulement pour les sols A-NI, A-I et B-ADc-H) à pH naturel (pH 8) (**Figure 4. 7**). Il se solubilise en milieu acide aux pH inférieurs à 6 et en milieu alcalin aux pH supérieurs à 7 pour les sols du site A et à 10 pour les sols du site B. Le Pb est entièrement solubilisé sous la forme Pb^{2+} aux valeurs de pH inférieures à 3 et supérieures à 12. L'influence de l'amendement biologique n'est pas observable de manière significative sur le site A. Pour le site B, il semble que la présence de l'amendement contribue à la rétention du Pb sous forme de phosphates de Pb. Cependant, cette contribution reste faible par rapport à la rétention du Pb par les oxydes de Fe et la MO.

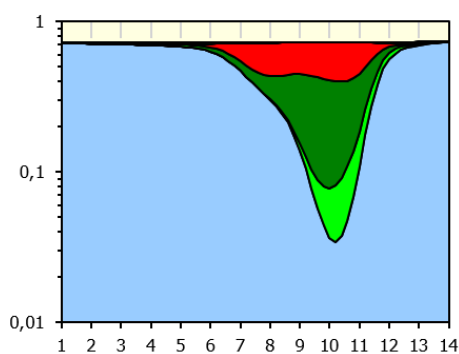
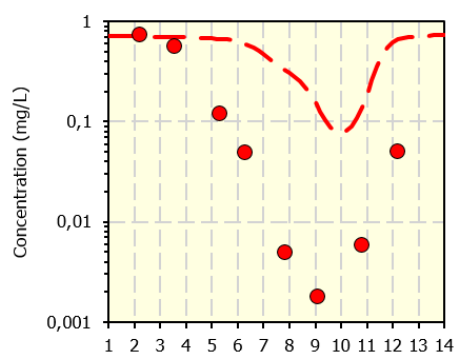
Tableau 4. 4 : Valeurs des paramètres d'entrée (en mg/kg MS) pour la modélisation de la spéciation des EPT. A-NI : sol planté avec des peupliers Skado non inoculés ; A-I : sol planté avec des peupliers Skado inoculés ; B-NADc : sol non amendé planté avec des saules Tordis, en présence de *D. cespitosa* ; B-ADc-H : sol amendé planté avec des saules Tordis, en présence de *D. cespitosa*.

Paramètres	Site A		Site B	
	A-NI	A-I	B-NADc	B-ADc-H
Argiles	302237	300334	239206	266528
COT	165015	173221	82055	127986
AF	4976	3869	3348	4430
AH	5087	3626	3635	4669
Somme des oxydes et hydroxydes de Fe et Al	36401	36411	67250	82601
COD	4890	5432	6683	8938
Concentrations en éléments extractibles				
Al	2446	2694	3674	5121
As	4,829	7,448	12,49	15,35
Ba	182,3	222,3	179,5	301,4
Ca	31942	28952	33771	39923
Cd	6,555	7,298	5,453	10,87
Co	982,9	1092	3,675	515,8
Cr	4,316	4,831	8,326	15,93
Cu	87,82	82,48	37,04	115,2
Fe	2256	2877	2582	3481
Mg	588,4	533,5	724,9	885,5
Mn	627,6	673,4	660,2	903,0
Mo	0,260	0,243	0,245	0,618
Na	8626	15585	16198	12746
Ni	499,5	530,3	12,25	292,7
P	106,3	153,2	266,7	239,3
Pb	147,6	183,1	402,9	692,9
Sb	0,159	0,227	0,167	0,370
Se	0,274	0,256	0,376	0,463
Si	1532	1665	2678	2952
Zn	2004	2215	6354	10604
F ⁻	99,74	108,7	149,8	247,4
Cl ⁻	82,89	380,7	90,68	92,98
Br ⁻	0,987	1,088	0,099	0,991
NO ₃ ⁻	173,7	271,9	231,8	433,6
PO ₄ ³⁻	169,8	170,1	483,5	408,1
SO ₄ ²⁻	95,98	105,7	125,3	172,3

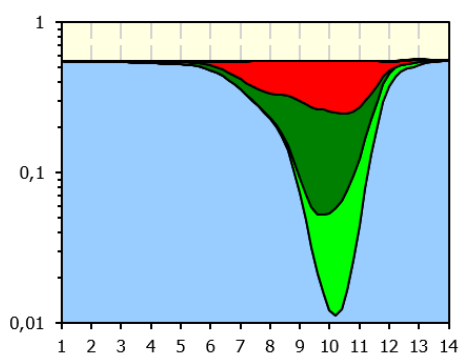
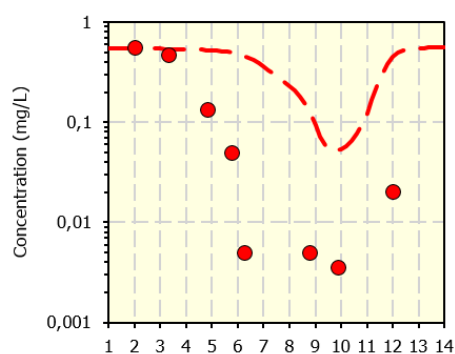
A-NI



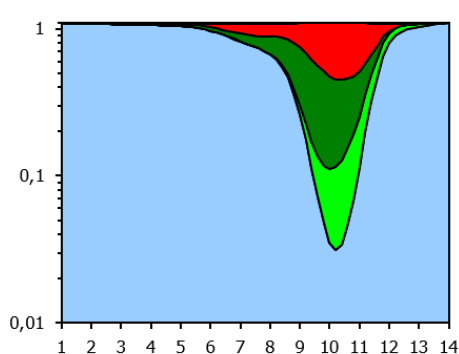
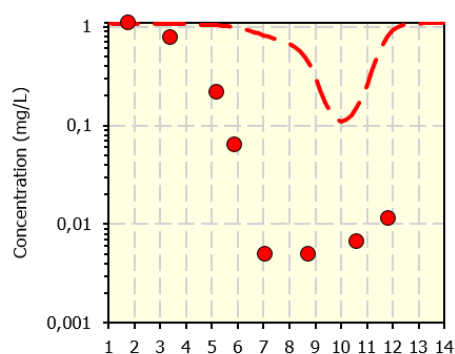
A-I



B-NADc



B-ADc-H



Legend for the stacked area charts:
Clay (light blue)
FeOxide (red)
POM-bound (dark green)
DOC-bound (light green)
Free (blue)

Figure 4. 5 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Cd en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Cd en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associés au COD.

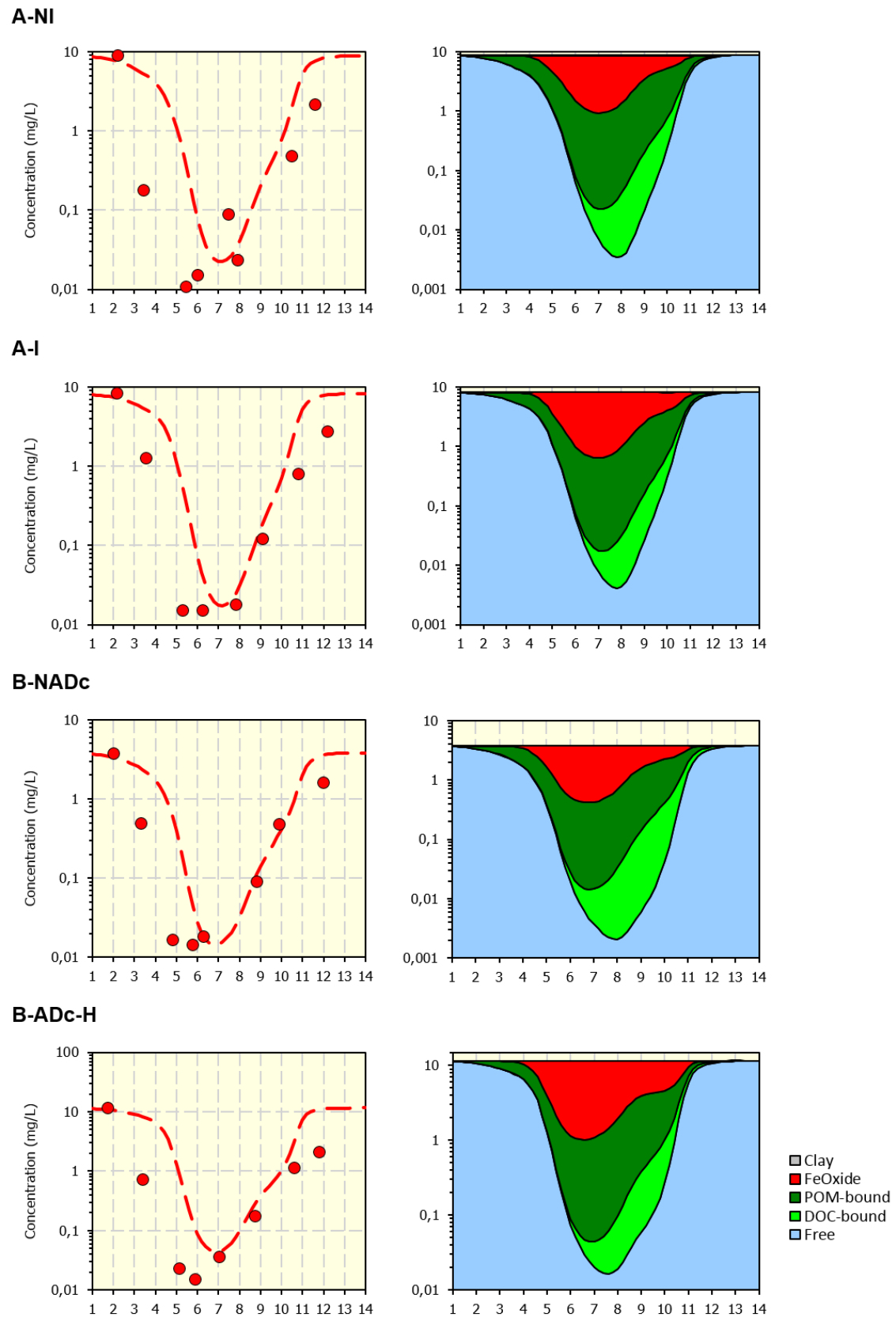
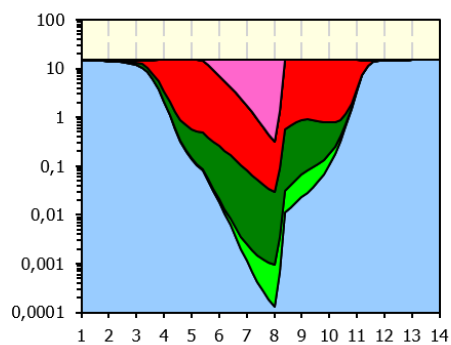
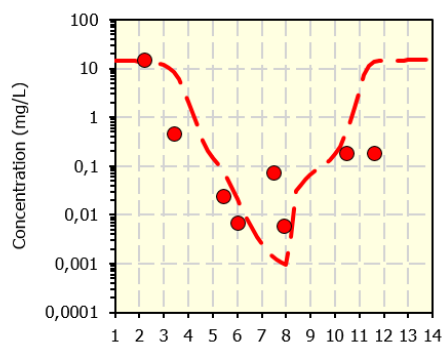
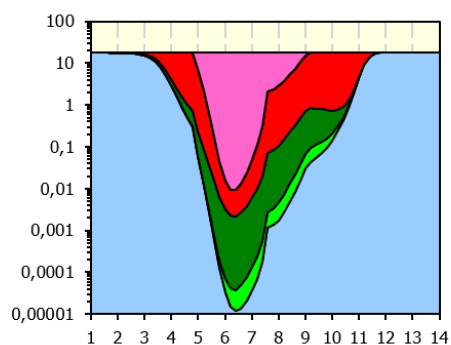
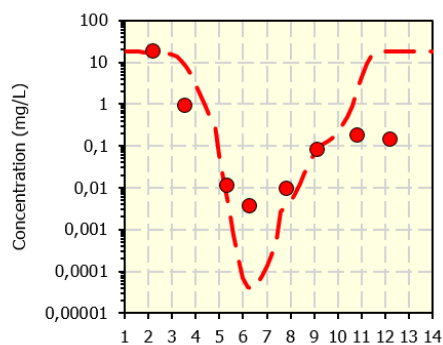


Figure 4. 6 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Cu en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Cu en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associés au COD.

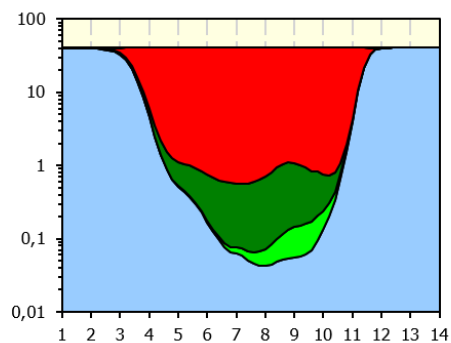
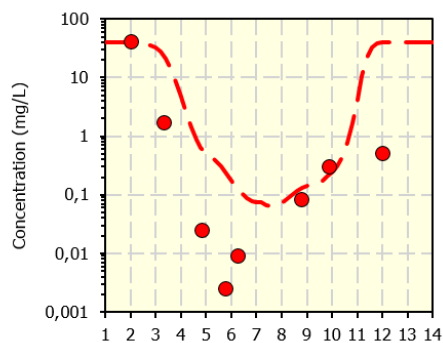
A-NI



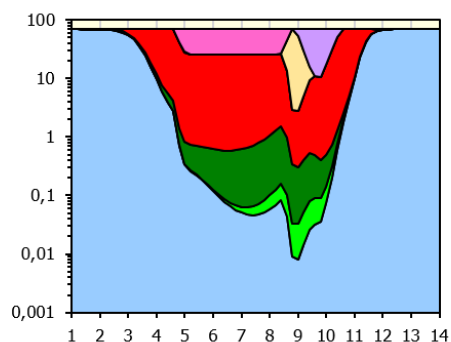
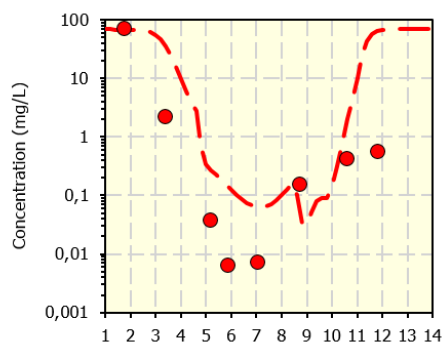
A-I



B-NADc



B-ADc-H



- Plumbogummite
- Ca₃Pb₂[PO₄]₃Cl
- Ca₂Pb₃[PO₄]₃Cl
- Clay
- FeOxide
- POM-bound
- DOC-bound
- Free

Figure 4. 7 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Pb en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Pb en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associés au COD.

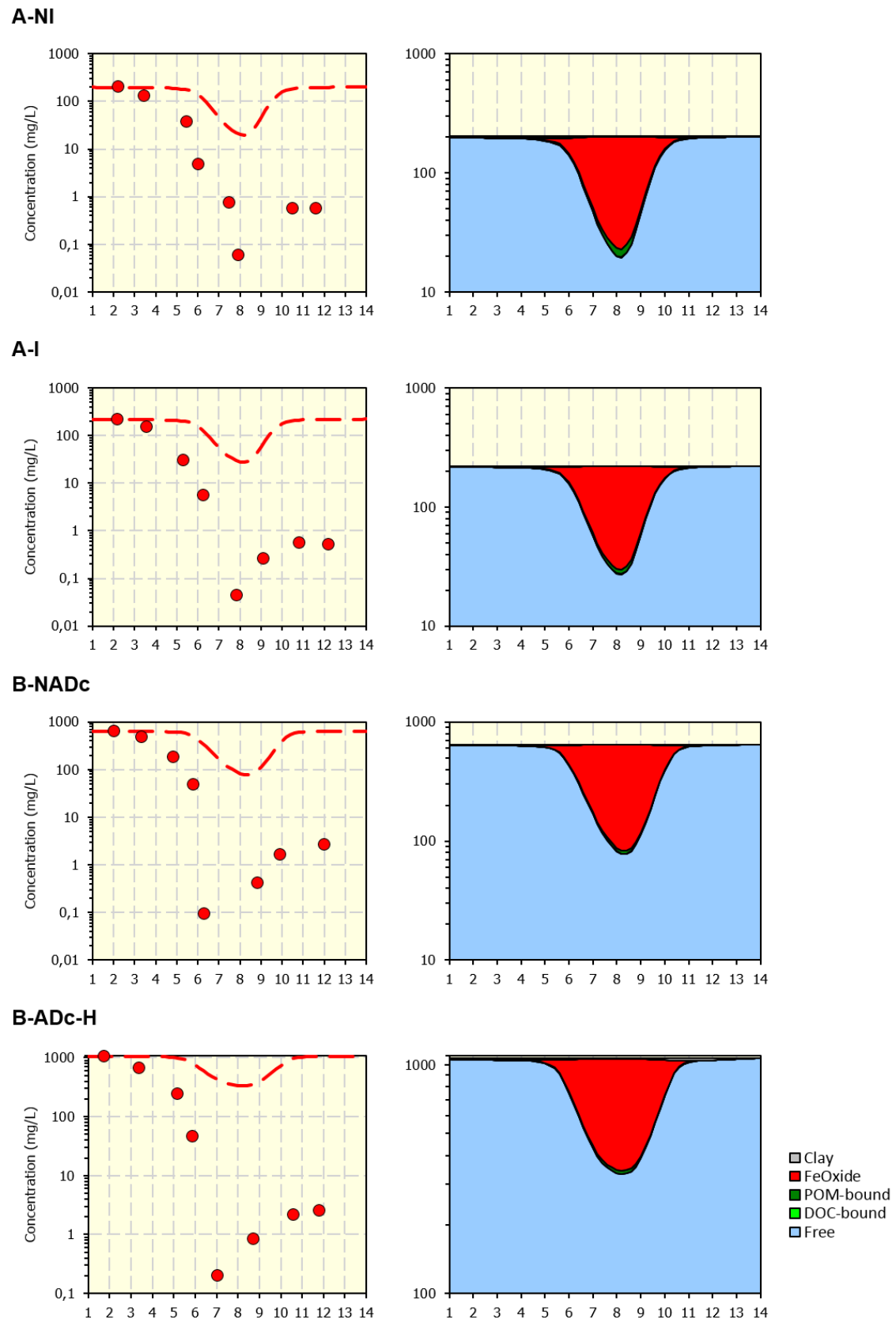


Figure 4. 8 : Le graphique de gauche représente la concentration extractible du Zn en fonction du pH ; les points rouges représentent les concentrations mesurées expérimentalement et les pointillés rouges symbolisent les concentrations modélisées. Sur la droite, le graphique représente les phases porteuses modélisées du Zn en fonction du pH. Dans la phase soluble, les éléments sont sous forme libre (« free ») ou associées au COD.

CHAPITRE 5 : Impact du phytomanagement sur les communautés microbiennes associées aux racines ligneuses et à la rhizosphère

Ce chapitre a été rédigé sous forme d'article. Cet article est en préparation et sera prochainement soumis dans un journal scientifique à comité de lecture.

Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 concernant le site A mettent en évidence une influence significative de l'inoculum mycorhizien sur la translocation du Cd, Cu, Pb et Zn dans les feuilles des peupliers. Cependant, la réduction des transferts s'est révélée variable selon les cultivars, les niveaux de contamination et les périodes de prélèvement. De plus, un accroissement significatif de la biomasse des peupliers Skado a été démontré sur les parcelles ayant reçu l'inoculum ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). Sur le site B, l'apport de l'amendement minéral basique Optiscor® s'est révélé efficace pour réduire la fraction extractible du Pb dans le sol. Une réduction significative des transferts de Zn et de Pb dans les feuilles des saules Tordis a également été démontrée en présence de l'amendement.

Les microorganismes associés aux cultures ligneuses au niveau de la rhizosphère peuvent jouer un rôle déterminant dans la mobilité des EPT dans sol, dans le transfert des EPT dans les parties aériennes des espèces végétales et plus largement dans les processus écologiques qui permettent la résilience des sols ([Cabral et al., 2015](#); [Cicatelli et al., 2014](#); [Rajkumar et al., 2012](#)). Peu d'informations existent concernant l'impact du phytomanagement *in situ* sur la structure et les fonctions des communautés microbiennes du sol. Une étude récente a démontré que la présence d'un couvert ligneux (peupliers cultivés en TCR) a eu un impact significatif sur la richesse et la diversité des communautés microbiennes ([Foulon et al., 2016a](#)). Afin de mesurer l'impact du phytomanagement sur les communautés bactériennes et fongiques associées aux arbres des sites A et B et à la rhizosphère, une technique innovante de séquençage à haut débit de l'ADN microbien (Miseq d'Illumina) a été utilisée. Sur la base des résultats présentés dans les chapitres précédents, des changements dans la richesse, la diversité et la composition des communautés microbiennes sont attendus, notamment en fonction des niveaux de contamination et des amendements.

La richesse des communautés bactériennes a été plus affectée par les amendements que celle des communautés fongiques, dans le sol et dans les racines des peupliers et des saules. Cependant, un moindre impact des amendements sur la diversité des communautés bactériennes et fongiques a été observé. La composition des communautés bactériennes était similaire dans les

racines des peupliers et des saules, tout comme la composition des communautés bactériennes dans les sols associés aux deux espèces ligneuses. Ces résultats indiquent que ces communautés ne sont ni influencées par l'espèce cultivée, ni par la présence des amendements chimiques et biologiques. En revanche, l'étude des compositions des communautés fongiques dans les racines des saules a révélé un impact important du couvert végétal, qui semble avoir favorisé la classe des *Sordariomycetes*. De plus, la diminution de l'abondance des membres de la classe des *Pezizomycetes* en faveur des *Sordariomycetes* témoigne de l'impact des fortes concentrations en EPT dans le sol.

5.1. **Article 4 : Microbial community diversity and composition in phytomanaged soils at field scale**

Phanthavongsa et al.

5.1.1. Abstract

The phytomanagement of metal-contaminated sites may enable soil resilience but little is known about its impact on soil microbial communities. The aim of this study was to investigate the effect of different phytomanagement options on microbial community structure and diversity in roots of poplars (site A) and willows (site B) as well as in the associated rhizosphere. Tree roots and soil samples were collected at the end of the 2nd and 3rd growing season of willows and poplars, respectively. Microbial community structure was determined via Illumina sequencing of bacterial 16S rRNA genes and fungal internal transcribed spacer (ITS) regions. Overall, the fungal communities were more affected by the phytomanagement options than the bacterial communities. The dominating bacterial species in soils (Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria) and roots (Proteobacteria, Actinobacteria) compartments were those already identified in contaminated, phytomanaged soils and poplar roots. The structure and composition of fungal communities were affected by tree species and soil treatments. The Agaricomycetes dominated in root poplar samples at site A. At the site B, the Pezizomycetes and Ascomycota OTUs dominated on untreated willow roots, whereas the presence of *D. cespitosa* or amendment strongly decrease the proportions of these root OTUs. Although the plants that are introduced for site restoration are pre-selected for specific traits, *in situ* success of these plants likely depends on the recruitment of appropriate rhizosphere microorganisms from their new environment. Changing the abiotic or biotic environment of the initial microbial communities might have led to selective pressure, that may in return impact the final microbial assemblages.

Keywords: Phytostabilization; Poplar; Willow; Trace element; Illumina MiSeq sequencing; Microbial diversity.

5.1.2. Introduction

Aided phytostabilization is a risk-based management option that uses metal tolerant plants and amendments to reduce the mobility and availability of contaminants in soils ([Mench et al., 2010](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). In recent years, plant biomass from phytotechnologies has been increasingly investigated to accurately evaluate the sustainability of such strategies, leading to the concept of phytomanagement ([Bert et al., 2017a](#); [Chalot et al., 2012](#); [Ciadamidaro et al., 2017](#); [Conesa et al., 2012](#); [Evangelou and Deram, 2014](#); [Witters et al., 2012](#)). The use of poplars and willows for energy purposes were particularly studied at field scale, on agronomic and risk management aspects ([Enell et al., 2016](#); [Foulon et al., 2016a](#); [Kidd et al., 2015](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)).

However, the re-establishment of belowground interactions is required to ensure a successful restoration and the creation of sustainable plant cover. The study of soil and root microbial communities has, within the past 5 years, relied on the emergence of high-throughput metabarcoding approaches based on 454 ([Op De Beeck et al., 2015](#); [Tedersoo et al., 2014](#)), Ion Torrent ([Zappelini et al., 2015](#)) or Illumina MiSeq ([Durand et al., 2018](#); [Durand et al., 2017](#); [Foulon et al., 2016a](#); [Foulon et al., 2016b](#); [Wu et al., 2015](#)). These studies have revealed significant changes in microbial communities in the rhizosphere soils and plant roots and uncovered dominant species in the rhizosphere and the endosphere of tree species under contaminant stress ([Azarbad et al., 2015](#); [Bell et al., 2015](#); [Yergeau et al., 2015](#); [Zappelini et al., 2015](#)).

In particular, a recent study by [Foulon et al. \(2016a\)](#) revealed that poplar based-phytomanagement of metal-contaminated sites greatly impacted microbial species richness and diversity. To enhance the potential of plants for the phytomanagement of contaminated soils, mycorrhizal fungi have been shown as relevant microorganisms to increase biomass production ([Ciadamidaro et al., 2017](#); [Cicatelli et al., 2014](#)), improve water and nutrient acquisition ([Cabral et al., 2015](#)), limit PTE availability and translocation in harvestable parts ([Cabral et al., 2015](#); [Meier et al., 2012a](#); [Rajkumar et al., 2012](#)). However, the effects of mycorrhizal fungi at field scale appear to greatly depend on soil physicochemical properties, inocula, plant species and cultivars ([Cabral et al., 2015](#); [Phanthavongsa et al., 2017](#)). Besides, mineral-based amendments can limit PTE mobility and availability in soil ([Bert et al., 2009](#); [Kumpiene et al., 2008](#); [O'Day and Vlassopoulos, 2010](#)) but little is known about their effects on microbial communities at field scale. As soil microorganisms play a significant role in ecological processes ([Conrad, 1996](#); [Jeffries et al., 2003](#)), there is a need to investigate possible changes in microbial communities in the rhizosphere under different phytomanagement options.

The present study aimed at investigating the influence of biological and mineral amendments on the diversity and composition of microbial communities at two phytomanaged sites located in northern France. Using Illumina MiSeq sequencing, we tested the hypothesis that both the inoculation of mycorrhizal fungi and incorporation of a basic mineral amendment enhanced microbial species richness and diversity.

5.1.3. Material and methods

5.1.3.1. Study sites

The study was carried out on two field sites of 1 ha each established on a former dredged sediment disposal area (Fresnes-sur-Escaut, France). Different phytomanagement options were applied at both sites as summarized in **Table 5. 1**. The site A was established in April 2011 as described in [Ciadamidaro et al. \(2017\)](#) and [Phanthavongsa et al. \(2017\)](#). Briefly, the management option consisted of a short rotation coppice (SRC) of poplars (I-214 and Skado clones) inoculated with ecto- and endomycorrhizal fungi (26,000 propagules per tree) with the aim of limiting PTE transfers in the aboveground parts of the trees for bioenergy purposes. The site B was established in October 2011 as described in [Kidd et al. \(2015\)](#) and Phanthavongsa et al. (in prep.). At this site, the combination of a basic mineral amendments (Optiscor®; 9 t ha⁻¹) and a perennial grass *Deschampsia cespitosa* aimed at reducing PTE mobility in soils. Two willow clones (Inger and Tordis) planted in very short rotation coppice (VSRC) were used for bioenergy purposes. Both sites were mainly and heterogeneously contaminated with Cd, Cu, Pb and Zn and presented similarities in texture, CaCO₃, pH and total N (**Table 5. 2**). The site B contained higher proportions of organic matter and a higher C:N ratio close to those of forest soils ([Baize, 2000a](#)). In addition, higher total and Ca(NO₃)₂-extractable concentrations of PTEs were noticed at the site B. PTE concentrations for each plot are detailed in **Table 5. 3**.

Table 5. 1 : Description of the phytomanagement options.

Site	Plant	Amendment	Abbreviation
A	SRC of poplars (I-214 and Skado) for biomass production	Poplars inoculated with ecto- and endomycorrhizal fungi	A-I-L, A-I-H
	Native colonizing plants	None	A-NI, A-NI-H
	<i>D. cespitosa</i>	Basic mineral amendment incorporated in soil (Optiscor®; 9 t ha ⁻¹)	B-ADc-M, B-ADc-H
B	VSRC of willows (Inger and Tordis) for biomass production	None	B-NADc
	VSRC of willows (Inger and Tordis) for biomass production	None	B-NA

SRC, short rotation coppice; VSRC, very short rotation coppice. Levels of contamination are based on total PTE concentrations: -L, low contamination; -M, moderate contamination; -H, high contamination.

Table 5. 2 : Soil physicochemical properties (0-20 cm) before the establishment of the sites (2011).

Parameters	Site A	Site B
Clay (%)	17	13
Silt (%)	63	66
Sand (%)	20	15
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	40 ± 21	53
pH _(H2O)	7.6 ± 0.1	7.3 ± 0.1
Total organic carbon (g kg ⁻¹)	33 ± 13	153
N (g kg ⁻¹)	3.5 ± 1.2	4.9
Organic matter (g kg ⁻¹)	57 ± 22	307
C/N	9.2 ± 0.8	31
CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)	16 ± 28	24
Total PTE concentration range (mg kg ⁻¹)		
Cd	0.46-67.1	6.3-15.6
Cu	19.6-126	37.7-193
Pb	40.5-8,154	146-1830
Zn	79.0-2,710	372-12,800
Ca(NO ₃) ₂ -extractable PTE concentrations (µg kg ⁻¹)		
Cd	<5-14.2	0.50-2.03
Cu	<15	29.2-90.3
Pb	<6	4.49-38.5
Zn	<60-770	151-742

Table 5. 3 : Total and Ca(NO₃)₂-extractable concentrations of PTEs in topsoil samples (0-20 cm) collected at the sites A and B before site preparation (2011).

		Cd	Cu	Pb	Zn
		Total PTE concentrations (mg kg ⁻¹)			
A	A-NI-L	0.52	29.3	52.1	172
	A-I-L	0.49	27.8	47.0	137
	A-NI-M	60.1	101	390	2,023
	A-I-M	0.93	62.6	224	1,105
B	B-NA	Nd	Nd	Nd	Nd
	B-NADc	Nd	Nd	Nd	Nd
	B-ADc-M	7.33 ± 0.74	78 ± 20.7	490 ± 192	2,857 ± 1,374
	B-ADc-H	12.0 ± 2.73	140 ± 28.9	1,428 ± 326	8,887 ± 2,282
	UNT	6.52	65.4	335	1600
		Ca(NO ₃) ₂ -extractable PTE concentrations (µg kg ⁻¹)			
A	A-NI-L	<5	<15	<6	<60
	A-I-L	<5	<15	<6	<60
	A-NI-M	<5	<15	<6	278
	A-I-M	<5	<15	<6	234
B	B-NA	Nd	Nd	Nd	Nd
	B-NADc	Nd	Nd	Nd	Nd
	B-ADc-M	1.08 ± 0.51	55.6 ± 23.5	9.02 ± 5.67	441 ± 206
	B-ADc-H	1.39 ± 0.43	57.3 ± 17.4	21.7 ± 9.01	564 ± 154
	UNT	<2	57.4	<2	312

Levels of contamination are based on total PTE concentrations: -L, low contamination; -M, moderate contamination; -H, high contamination. UNT, untreated soil and unplanted soil; Nd, not determined.

5.1.3.2. Sampling procedure

In September 2013, tree root and soil samplings were performed at the two field sites, in amended, non-amended and unplanted plots. After litter removal, the tree fine roots were collected from the upper 20 cm layer of soil, at 50 cm from poplar or willow trunks. For each tree, 3 pseudo-replicates were sampled and mixed to obtain root composites (n= 5). At the same time, soil samples were collected below natural vegetation (untreated soil and unplanted soil: UNT) from the top 20 cm of soil (n= 5). Subsamples were stored at 4° C before DNA extraction. The roots were carefully washed with tap water to remove visible soil, washed with sterile deionized water tree times, and separated from the roots of other plant species by shape and color. The fine roots were then cut off and transferred to Eppendorf tubes and frozen at -20 °C.

5.1.3.3. DNA isolation and amplification

The total DNA was extracted from 500 mg of soil with a PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA) according to the manufacturer's instructions. To isolate microbial DNA from the roots, plant cell lysis was first performed using 100 mg of

lyophilized root samples that were pulverized with 3-mm tungsten carbide beads (Qiagen S.A.S., Courtaboeuf, France) in a Mixer Mill for 3 min at 30 Hz (model MM400; Retsch Inc., Newtown, PA). A solution of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) was added to the mixture to enhance cell lysis ([Durand et al., 2017](#)). Root DNA was then extracted with a PowerSoil® DNA Isolation Kit according to the manufacturer's instructions. DNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis (1%) and quantified with a fluorometer (Qubit® 3.0; Thermo Fisher Scientific Inc.). Equimolar DNA pools were created and adjusted to 10 ng/μl. The sequencing of the V3-V4 domains of 16S rRNA genes and the fungal ITS1 was performed with an Illumina MiSeq platform (Microsynth AG, Switzerland). PCR amplifications were performed with the bacterial primers 341F_ill (5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3') and 802R_ill (5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') and the fungal primers ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') and ITS2 (5'- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC -3').

5.1.3.4. Data analysis

DNA sequence analyses were performed using the software Mothur ([Schloss et al., 2009](#)) and the PIPITS pipeline ([Gweon et al., 2015](#)) for 16S and internal transcribed spacer (ITS) sequences, respectively. The sequences were assigned to operational taxonomic units (OTU) at a 97% similarity level. Taxonomic assignments were performed using the Greengenes database ([DeSantis et al., 2006](#)) for bacteria and the UNITE database ([Kõljalg et al., 2013](#)) for fungi. For comparisons between samples, data sets were normalized using mothur; for each sample, 3,461 and 11,099 reads were randomly selected for bacteria and fungi, respectively. Rarefaction curves were obtained using the R package “vegan” (v 2.4-2) to evaluate the sequencing depth. Richness was estimated by calculating OTU richness and Chao estimator using Mothur calculators ([Schloss et al., 2009](#)). Diversity indices (Shannon index (H') and the inverse of Simpson index ($1/D$)) were calculated using Mothur and Pielou's evenness (J) was calculated using the following equation ([McCune et al., 2002](#)): $J = H' / \ln(S)$ where H' is the Shannon index and S is the observed number of OTUs in a sample.

5.1.3.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software v. 3.3.3 ([R Core Team, 2017](#)). The normality of the data was assessed using the Shapiro test and Bartlett or Levene's tests were used to verify the equality of variances between factor levels. Comparisons between the treatments were performed using the Kruskal-Wallis test at 0.05 significance level.

5.1.4. Results and discussion

5.1.4.1. Microbial community richness and diversity

The number of DNA sequences used for the microbial community analyses are presented in **Table 5. 4**. A total of 6,805 bacterial OTUs and 7,126 fungal OTUs were identified in soil and root samples after subsampling. All rarefaction curves tended to approach a saturation plateau, suggesting that the microbial communities were well represented (**Figure 5. 1**). Based on the richness values (observed and estimated) and diversity indices (**Table 5. 5**), the soil samples were markedly more enriched and diverse in fungal and bacterial OTUs than the tree root samples. These results were also observed in a previous study, where roots of poplars grown in SRC/VSRC were less enriched and less diverse in fungal and bacterial OTUs compared with the associated soils ([Foulon et al., 2016a](#)). Besides, the bacterial communities in Skado poplar roots and soils were more enriched and diverse in OTUs than those of Tordis willows whereas the differences were less pronounced regarding the fungal OTUs (**Table 5. 5**).

Table 5. 4 : Number of raw and effective sequences obtained from 36 DNA root samples and 45 DNA soil samples. Values are means \pm SD.

	Treatment	Bacterial communities		Fungal communities	
		Raw sequences	Effective sequences	Raw sequences	Effective sequences
Root	A-NI-L	10,213 \pm 5,380	8,465 \pm 4,452	74,297 \pm 40,283	63,719 \pm 34,831
	A-I-L	16,452 \pm 5,435	13,075 \pm 4,288	62,675 \pm 7,148	52,407 \pm 7,733
	A-NI-M	13,456 \pm 2,695	11,533 \pm 2,741	142,379 \pm 72,273	117,676 \pm 69,368
	A-I-M	17,349 \pm 10,086	13,762 \pm 8,312	102,900 \pm 28,348	85,276 \pm 20,291
	B-NA	25,549 \pm 13,707	16,078 \pm 8,906	75,302 \pm 20,769	66,173 \pm 17,142
	B-NADc	16,235 \pm 4,834	8,686 \pm 2,330	65,771 \pm 35,657	48,953 \pm 30,042
	B-ADc-M	13,919 \pm 3,734	8,586 \pm 2,348	90,724 \pm 12,520	51,505 \pm 8,325
	B-ADc-H	13,658 \pm 2,826	8,396 \pm 1,741	97,637 \pm 48,470	46,368 \pm 29,861
	A-NI-L	12,128 \pm 9,414	12,122 \pm 9,412	78,191 \pm 28,907	77,337 \pm 28,755
	A-I-L	10,391 \pm 7,453	10,386 \pm 7,453	76,669 \pm 42,082	75,805 \pm 41,652
	A-NI-M	10,055 \pm 2,663	10,048 \pm 2,663	91,426 \pm 24,789	90,330 \pm 24,798
	A-I-M	14,648 \pm 7,635	14,637 \pm 7,636	90,865 \pm 41,598	88,616 \pm 40,834
Soil	B-NA	8,693 \pm 2,064	8,659 \pm 2,052	43,699 \pm 17,762	43,064 \pm 17,565
	B-NADc	14,142 \pm 6,923	14,129 \pm 6,915	65,308 \pm 28,483	64,548 \pm 27,978
	B-ADc-M	16,114 \pm 6,403	16,096 \pm 6,389	77,007 \pm 35,584	76,440 \pm 35,362
	B-ADc-H	22,164 \pm 6,557	22,145 \pm 6,545	57,483 \pm 22,448	56,885 \pm 22,233
	UNT	11,193 \pm 7,063	11,186 \pm 7,060	63,446 \pm 16,231	61,934 \pm 15,465

Levels of contamination are based on total PTE concentrations: -L, low contamination; -M, moderate contamination; -H, high contamination. UNT, untreated soil and unplanted soil; Nd, not determined.

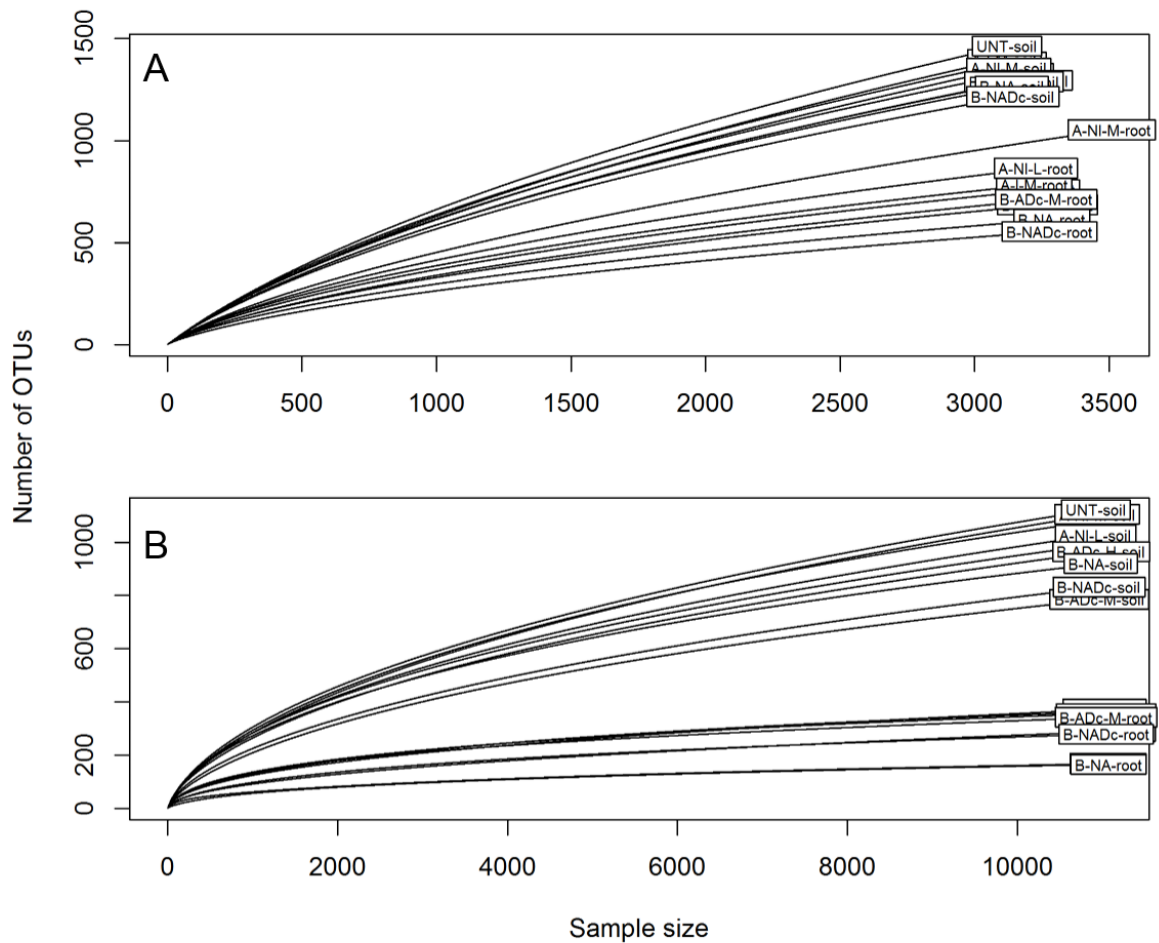


Figure 5. 1 : Rarefaction curves for bacterial (A) and fungal (B) OTUs.

Microbial communities were significantly less enriched in bacterial OTUs in roots of inoculated Skado poplars (**Table 5. 5**), regardless of the levels of PTE contamination (**Table 5. 3**). It is likely that the inoculation of poplars with mycorrhizal fungi affected the endogenous bacterial communities in roots. The inoculated poplars from the less contaminated plot (A-I-L) showed a lower bacterial diversity in roots, suggesting an interaction between the inoculated mycorrhizal fungi and the bacterial communities (**Table 5. 5**). The fungal diversity and richness in poplar roots were not significantly influenced by poplar inoculation, whereas they were strongly impacted (**Table 5. 5**) by the levels of PTEs in soils (**Table 5. 3**). Indeed, the diversity of fungal communities was reduced in the more contaminated areas (**Table 5. 5**). In the rhizosphere, the bacterial communities associated to inoculated poplars showed a higher richness in the plot A-I-M (**Table 5. 5**), indicating a potential impact of mycorrhizal fungi on bacterial communities in the more polluted soils. Soil fungal community richness was not affected by the mycorrhizal inoculation, nor by the concentrations of PTEs in soils.

Concerning Tordis willows, roots and associated soils presented more bacterial OTUs in the amended plot B-ADc-M compared with the non-amended plot B-NADc, indicating a potential effect of Optiscor® (**Table 5. 5**). In addition, it seems that the high concentrations of PTEs decreased the bacterial OTU richness in willow roots in B-ADc-H. Soil fungal community richness was not affected by the amendment Optiscor®, nor the high concentrations of PTEs in soils whereas a higher diversity of fungal communities was noticed in the amended plots B-ADc-M and B-ADc-H.

Most importantly, comparisons between the plots B-NA and B-NADc showed that the presence of the grass *D. cespitosa* in B-NADc significantly increased the fungal community richness and diversity in willow roots. In contrast, bacterial diversity in willow roots was lower in B-NADc. In the rhizosphere, *D. cespitosa* (in B-NADc) decreased the bacterial community richness and diversity, and to a lesser extent, the soil fungal community richness and diversity.

Table 5.5 : Richness and diversity indices of microbial communities based on the number of OTUs. Richness was calculated using the number of OTUs and Chao1 estimators. Values are means \pm SD. Different letters indicate significant differences between the treatments in roots or soil ($p < 0.05$).

				Bacterial communities					Fungal communities				
	Cultivar	Site	Plot	Richness		Diversity			Richness		Diversity		
				Observed	Estimated (Chao1)	H'	1/D	J	Observed	Estimated (Chao1)	H'	1/D	J
Root	Skado	A	A-NI-L	915 \pm 50.1 ^a	1,774 \pm 100 ^a	5.64 \pm 0.15	64.3 \pm 16.7	0.83 \pm 0.02	287 \pm 63.1 ^a	469 \pm 93.8 ^a	2.90 \pm 0.52 ^{ab}	8.30 \pm 2.72 ^{ab}	0.51 \pm 0.08
	Skado		A-I-L	810 \pm 60.3 ^c	1,568 \pm 98.3 ^b	5.33 \pm 0.23	43.9 \pm 11.6	0.80 \pm 0.03	262 \pm 44.8 ^{ab}	398 \pm 52.2 ^{ab}	3.09 \pm 0.44 ^a	10.6 \pm 3.42 ^a	0.55 \pm 0.06
	Skado		A-NI-M	897 \pm 52.2 ^{ab}	1,781 \pm 114 ^a	5.60 \pm 0.11	62.4 \pm 12.4	0.82 \pm 0.01	200 \pm 49.9 ^{bc}	315 \pm 86.3 ^{bc}	2.22 \pm 0.56 ^{bc}	4.64 \pm 2.8 ^b	0.42 \pm 0.09
	Skado		A-I-M	858 \pm 12.9 ^{bc}	1,681 \pm 47.1 ^a	5.56 \pm 0.07	62.9 \pm 8.84	0.82 \pm 0.01	142 \pm 33.5 ^c	250 \pm 54.4 ^c	1.85 \pm 0.75 ^c	4.03 \pm 3.52 ^b	0.37 \pm 0.13
	Tordis	B	B-NA	655 \pm 52.5 ^B	1,296 \pm 108 ^B	4.70 \pm 0.21 ^{AB}	17.2 \pm 4.22 ^A	0.72 \pm 0.02 ^A	144 \pm 27.6 ^B	228 \pm 45.5 ^B	1.28 \pm 0.60 ^C	2.12 \pm 0.89 ^C	0.26 \pm 0.12 ^C
	Tordis		B-NADc	612 \pm 62.6 ^B	1,258 \pm 132 ^B	4.17 \pm 0.37 ^C	9.64 \pm 3.25 ^B	0.65 \pm 0.05 ^B	215 \pm 37.2 ^A	336 \pm 69.6 ^A	2.52 \pm 0.48 ^B	5.96 \pm 3.35 ^B	0.47 \pm 0.08 ^B
	Tordis		B-ADc-M	761 \pm 32.3 ^A	1,563 \pm 56.1 ^A	4.86 \pm 0.19 ^A	16.4 \pm 4.43 ^A	0.73 \pm 0.02 ^A	249 \pm 34.4 ^A	376 \pm 45.9 ^A	3.11 \pm 0.51 ^A	10.9 \pm 5.62 ^A	0.56 \pm 0.08 ^A
	Tordis		B-ADc-H	632 \pm 20.4 ^B	1,262 \pm 20.1 ^B	4.50 \pm 0.21 ^{BC}	13.0 \pm 4.12 ^{AB}	0.70 \pm 0.03 ^{AB}	266 \pm 0.71 ^A	389 \pm 31.1 ^A	3.45 \pm 0.18 ^A	13.6 \pm 0.54 ^A	0.62 \pm 0.03 ^A
Soil	Skado	A	A-NI-L	1,388 \pm 30.1 ^b	2,657 \pm 70.2 ^{bcd}	6.73 \pm 0.04 ^b	529 \pm 36.5 ^a	0.93 \pm 0.00 ^{ab}	801 \pm 54.9 ^a	1,153 \pm 77.8	4.61 \pm 0.31	29.7 \pm 13.9	0.69 \pm 0.04
	Skado		A-I-L	1,407 \pm 30.7 ^b	2,653 \pm 116 ^{cd}	6.75 \pm 0.04 ^b	533 \pm 58.0 ^a	0.93 \pm 0.00 ^{ab}	756 \pm 76.5 ^{abc}	1,096 \pm 125	4.59 \pm 0.21	24.6 \pm 6.00	0.69 \pm 0.02
	Skado		A-NI-M	1,395 \pm 18.4 ^b	2,745 \pm 67.3 ^{ab}	6.68 \pm 0.03 ^c	426 \pm 31.9 ^b	0.92 \pm 0.00 ^c	771 \pm 78.7 ^{ab}	1,075 \pm 95.4	4.55 \pm 0.40	29.4 \pm 14.2	0.68 \pm 0.05
	Skado		A-I-M	1,454 \pm 23.5 ^a	2,879 \pm 69.4 ^a	6.75 \pm 0.04 ^b	452 \pm 37.4 ^b	0.93 \pm 0.00 ^{bc}	767 \pm 109 ^{ab}	1,055 \pm 221	4.72 \pm 0.08	29.4 \pm 4.06	0.71 \pm 0.02
	Tordis	B	B-NA	1,352 \pm 15.2 ^c	2,628 \pm 42.4 ^{cd}	6.57 \pm 0.03 ^d	295 \pm 22.5 ^c	0.91 \pm 0.00 ^d	709 \pm 86.7 ^{abcd}	962 \pm 202	4.72 \pm 0.29	36.4 \pm 15.0	0.72 \pm 0.04
	Tordis		B-NADc	1,304 \pm 17.0 ^e	2,510 \pm 57.7 ^e	6.50 \pm 0.04 ^e	286 \pm 21.3 ^c	0.91 \pm 0.00 ^d	652 \pm 94.7 ^{cd}	942 \pm 163	4.10 \pm 0.56	20.1 \pm 10.9	0.63 \pm 0.08
	Tordis		B-ADc-M	1,343 \pm 11.0 ^{cd}	2,617 \pm 25.9 ^d	6.56 \pm 0.03 ^d	307 \pm 20.4 ^c	0.91 \pm 0.00 ^d	583 \pm 115 ^d	851 \pm 19.0	3.74 \pm 0.91	16.3 \pm 11.9	0.59 \pm 0.13
	Tordis		B-ADc-H	1,327 \pm 16.9 ^d	2,591 \pm 42.3 ^d	6.54 \pm 0.03 ^d	298 \pm 21.1 ^c	0.91 \pm 0.00 ^d	678 \pm 22.4 ^{bcd}	976 \pm 34.9	4.28 \pm 0.46	22.8 \pm 10.1	0.66 \pm 0.07
	None	UNT		1,458 \pm 36.3 ^a	2,788 \pm 186 ^{abc}	6.81 \pm 0.04 ^a	577 \pm 103 ^a	0.93 \pm 0.01 ^a	761 \pm 108 ^{abc}	1,064 \pm 135	4.70 \pm 0.41	37.5 \pm 16.0	0.71 \pm 0.05

Diversity indices are indicated as follows: H', Shannon index; 1/D, inverse Simpson index; J: Pielou's evenness. Levels of contamination are based on total PTE concentrations: -L, low contamination; -M, moderate contamination; -H, high contamination. UNT, untreated soil and unplanted soil; Nd, not determined.

5.1.4.2. Composition of the microbial communities

DNA sequences from soil and root samples were associated with 30 bacterial and 7 fungal phyla (**Figure 5. 2**), 84 bacterial (**Figure 5. 3**) and 24 fungal classes (**Figure 5. 4**). Bacterial communities in root and soil samples were overall quite similar between poplars and willows, indicating that the composition of the bacterial communities was not influenced by the woody species (willow or poplar). Root bacterial communities were mostly dominated by Proteobacteria (44-74 %) and Actinobacteria (11-32 %) as reported in [Foulon et al. \(2016a\)](#) for poplars. In soil samples, bacterial communities were also dominated by Proteobacteria (30-37 %), Actinobacteria (9.6-21%), but Acidobacteria (11-15 %) and Planctomycetes (11-15%) accounted for significant proportions (**Figure 5. 2A**). Alphaproteobacteria was the most abundant bacterial class from the Proteobacteria phylum as the sequences accounted for 30-61 % and 12-19 % of the total sequences in roots and soils, respectively (**Figure 5. 3**). In poplar roots, the relative abundance of Alphaproteobacteria varied slightly between the treatments and levels of soil contamination. In contrast, Alphaproteobacteria were more abundant in willow roots and particularly in the most contaminated plot B-ADc-H, where the lowest proportion of Actinobacteria was found. Besides, the composition of bacterial communities was quite similar in all treated and untreated soils, indicating that bacterial communities were not affected by the biological and mineral amendments (**Figure 5. 3**). In addition to Alphaproteobacteria and Actinobacteria, soil bacterial communities included Betaproteobacteria (7-10%) and Planctomycetia (7-12%) in significant proportions.

In soil and root samples, the fungal communities were dominated by Ascomycota (18-94 % in roots and 27-49 % in soils) and/or Basidiomycota (0.8-65% in roots and 2-31 % in soil samples) (**Figure 5. 2B**). In addition, the Zygomycota phylum occurred in higher proportions in the soil samples (12-31 %) compared with the root samples. At the class level, Pezizomycetes (1.1-88%) and Agaricomycetes (0.8-64%) dominated the root samples whereas Sordariomycetes (9.4-29 %) and Agaricomycetes (1.5-31%) dominated the soil samples (**Figure 5. 4**). The relative abundance of Pezizomycetes was the highest in Tordis willow roots from the plot B-NA and seemed to decrease in presence of *D. cespitosa* and in the more contaminated areas. Conversely, the relative abundance of Sordariomycetes increased in Tordis roots in presence of *D. cespitosa* and in the more contaminated areas. These results suggest that the shifts in root fungal communities was induced by *D. cespitosa* and enhanced by the elevated levels of PTEs in soil. One can hypothesize that the high concentrations of PTEs in the plot B-ADc-H induced a toxicity, leading to a decrease of Pezizomycetes and their replacement by Sordariomycetes. In the rhizosphere, *D. cespitosa* had no clear effect on fungal communities (**Figure 5. 4**). However, the

proportion of Basidiomycota and Ascomycota was similar in the plots B-ADc-H and UNT, suggesting that soil conditions in B-ADc-H did not evolve like the other phytomanaged soils.

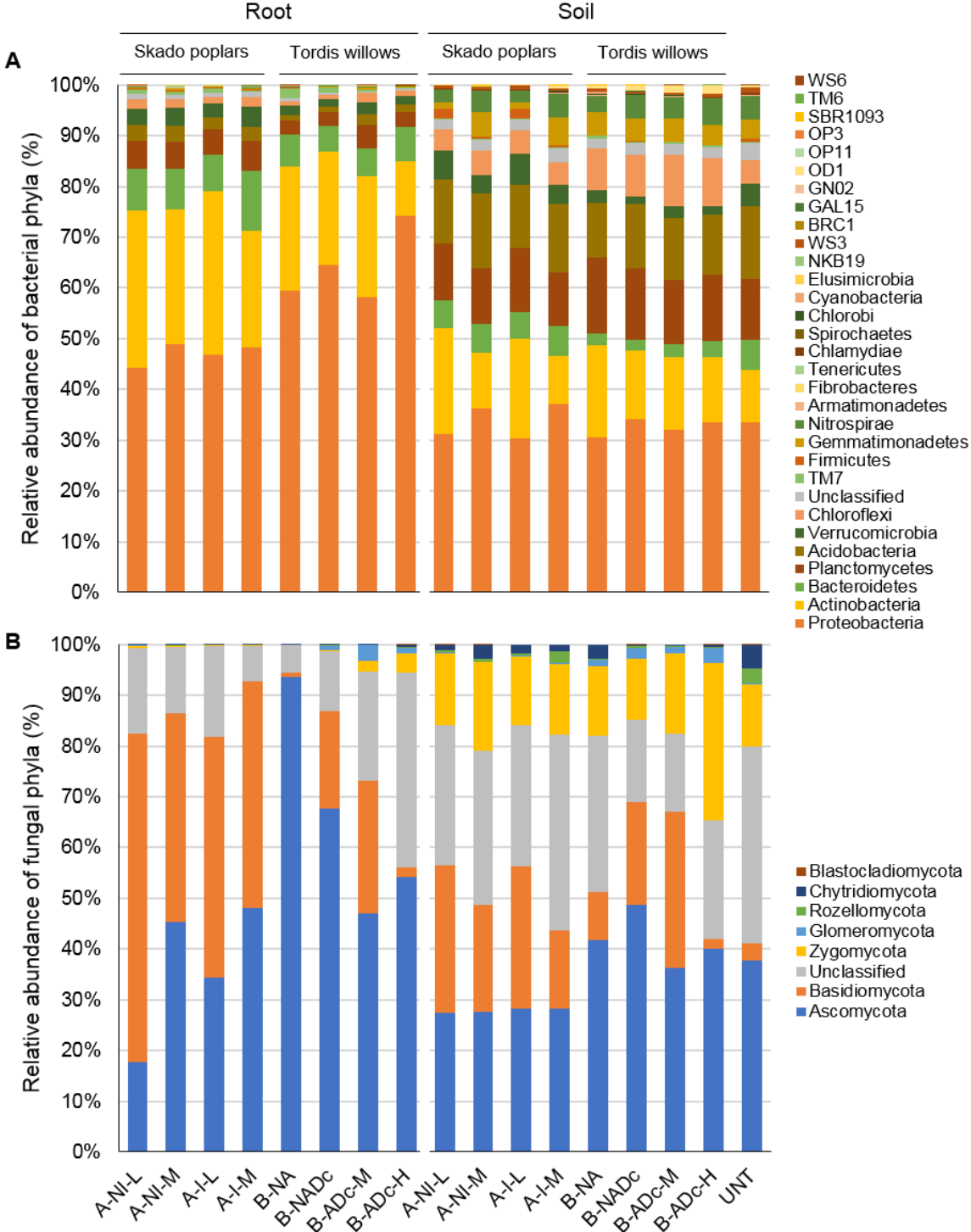


Figure 5. 2 : Relative abundance of bacterial (A) and fungal phyla (B) identified in soils and roots of poplars and willows under different phytomanagement options. See **Table 5. 1** for the abbreviations. “UNT” refers to the untreated and unplanted soil.

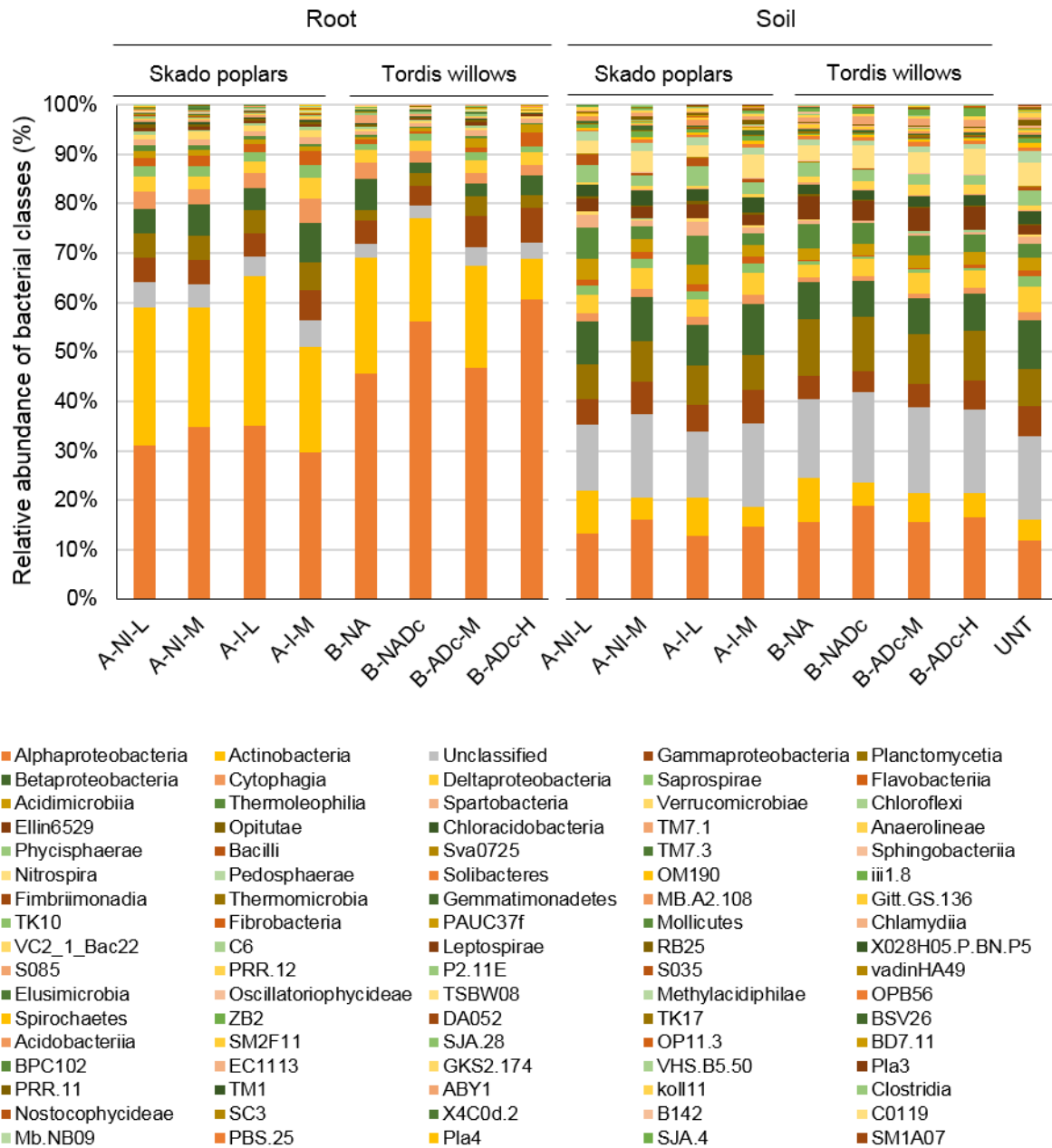


Figure 5. 3 : Relative abundance of bacterial classes identified in soils and roots of poplars and willows under different phytomanagement options. See **Table 5. 1** for the abbreviations. “UNT” refers to the untreated and unplanted soil.

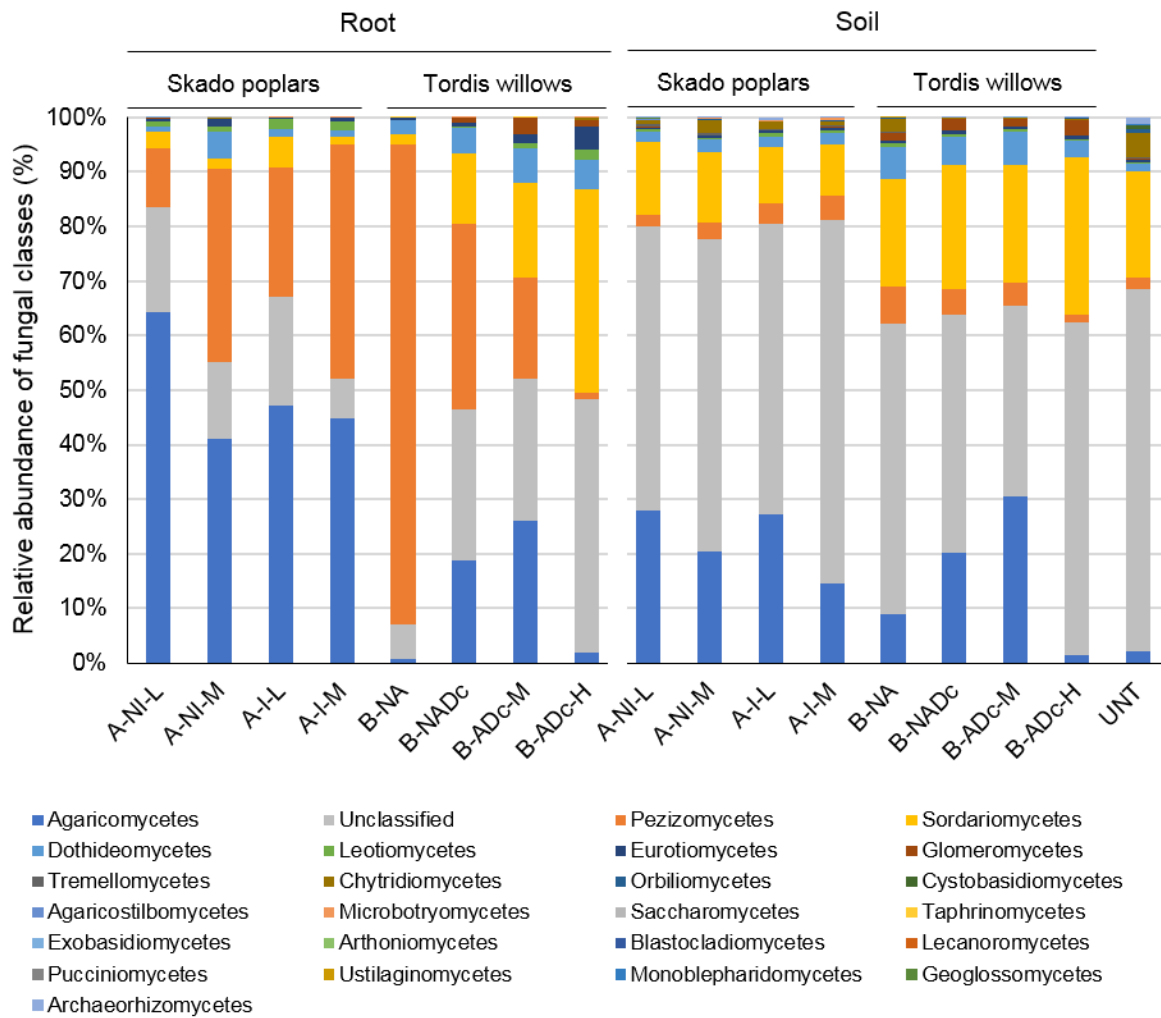


Figure 5. 4 : Relative abundance of fungal classes identified in soils and roots of poplars and willows under different phytomangement options. See **Table 5. 1** for the abbreviations. “UNT” refers to the untreated and unplanted soil.

5.1.5. Conclusion

Overall, the fungal communities were more affected by the phytomanagement options than the bacterial communities. The dominating bacterial species in soils (Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria) and roots (Proteobacteria, Actinobacteria) compartments are those already identified in contaminated, phytomanaged soils and poplar roots ([Durand et al., 2018](#); [Durand et al., 2017](#); [Foulon et al., 2016a](#); [Foulon et al., 2016b](#); [Shakya et al., 2013](#)). The presence of Planctomycetes in most root and soil samples at our site is however intriguing. Planctomycetes can be found in many different types of geographical regions and habitats, such as freshwater, saltwater, acid bog water, cattle manure, garbage dumps, and rice paddies. They have been rarely detected in soil samples, and at least never identified on our phytomanaged soils. The numerous Planctomycetes OTUs probably originated from the dredged sediments that have been loaded on the site.

Conversely, the structure and composition of fungal communities were strongly affected by tree species and soil treatments. Although we have not yet examined into details the contribution of symbiotic (mycorrhizal) OTUs, the Agaricomycetes dominates in root poplar samples at site A, which are probably composed of symbiotic fungi ([Durand et al., 2017](#); [Foulon et al., 2016a](#); [Foulon et al., 2016b](#)). The Pezizomycetes and Ascomycota OTUs dominated on untreated willow (site B) roots, whereas the presence of *D. cespitosa* or amendment strongly decrease the proportions of these root OTUs.

Although the plants that are introduced for site restoration are pre-selected for specific traits (e.g., PTE bioaccumulation or rapid growth in poor soils), *in situ* success of these plants likely depends on the recruitment of appropriate rhizosphere microorganisms from their new environment, as recently highlighted by [Bell et al. \(2015\)](#). Changing the abiotic or biotic environment of the initial microbial communities might led to selective pressure, that may in return impact the final microbial assemblages. This adaptation capacity might facilitate primary production in spite of the high PTE loads ([Krpata et al., 2008](#)).

References

- Azarbad, H., Niklińska, M., Laskowski, R., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., Zhou, J., He, Z., Wen, C., Røling, W.F.M. (2015) Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *Fems Microbiology Ecology* 91, 1-11.
- Baize, D. (2000) Guide des analyses en pédologie : 2e édition, revue et augmentée. Editions Quae.
- Bell, T.H., Cloutier-Hurteau, B., Al-Otaibi, F., Turmel, M.-C., Yergeau, E., Courchesne, F., St-Arnaud, M. (2015) Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Environmental Microbiology* 17, 3025-3038.
- Bert, V., Allemon, J., Sajet, P., Dieu, S., Papin, A., Collet, S., Gaucher, R., Chalot, M., Michiels, B., Raventos, C. (2017) Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. *Biomass and Bioenergy* 96, 1-11.
- Bert, V., Seuntjens, P., Dejonghe, W., Lacherez, S., Thuy, H.T.T., Vandecasteele, B. (2009) Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 745-764.
- Cabral, L., Soares, C.R.F.S., Giachini, A.J., Siqueira, J.O. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1655-1664.
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S., Pascual, C. (2012) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology* 46, 13361-13369.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappellini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., Chalot, M. (2017) Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environmental and Experimental Botany* 139, 48-56.
- Cicatelli, A., Torrigiani, P., Todeschini, V., Biondi, S., Castiglione, S., Lingua, G. (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi as a tool to ameliorate the phytoremediation potential of poplar: biochemical and molecular aspects. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 7, 333-341.
- Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Schulin, R. (2012) A Critical View of Current State of Phytotechnologies to Remediate Soils: Still a Promising Tool? *The Scientific World Journal* 2012, 173829.
- Conrad, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews* 60, 609-640.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. (2006) Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5069-5072.
- Durand, A., Maillard, F., Alvarez-Lopez, V., Guinchard, S., Bertheau, C., Valot, B., Blaudez, D., Chalot, M. (2018) Bacterial diversity associated with poplar trees grown on a Hg-contaminated site: Community characterization and isolation of Hg-resistant plant growth-promoting bacteria. *Science of The Total Environment* 622-623, 1165-1177.
- Durand, A., Maillard, F., Foulon, J., Gweon, H.S., Valot, B., Chalot, M. (2017) Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microbial Ecology* 74, 795-809.
- Enell, A., Andersson-Sköld, Y., Vestin, J., Wagelmans, M. (2016) Risk management and regeneration of brownfields using bioenergy crops. *Journal of Soils and Sediments* 16, 987-1000.
- Evangelou, M.W., Deram, A. (2014) Phytomanagement: a realistic approach to soil remediating phytotechnologies with new challenges for plant science. *Int J Plant Biol Res* 2, 1023.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Blaudez, D., Chalot, M. (2016a) Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *Fems Microbiology Ecology* 92.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., Chalot, M. (2016b) Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Science of The Total Environment* 571, 1230-1240.

- Gweon, H.S., Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D.S., Griffiths, R.I., Schonrogge, K. (2015) PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 973-980.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.-M. (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37, 1-16.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Olga Janssen, J., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M. (2015) Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation* 17, 1005-1037.
- Kõljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G.W., Hartmann, M., Kirk, P.M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B.D., Lücking, R., Martín, M.P., Matheny, P.B., Nguyen, N.H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K.G., Peintner, U., Peterson, M., Põldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J.A., Senés, C., Smith, M.E., Suija, A., Taylor, D.L., Telleria, M.T., Weiss, M., Larsson, K.-H. (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22, 5271-5277.
- Krpata, D., Peintner, U., Langer, I., Fitz, W.J., Schweiger, P. (2008) Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycological Research* 112, 1069-1079.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C. (2008) Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management* 28, 215-225.
- McCune, B., Grace, J.B., Urban, D.L. (2002) Analysis of ecological communities. MjM Software Design.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., Cornejo, P. (2012) Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 741-775.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schröder, P., Vangronsveld, J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1039-1070.
- O'Day, P.A., Vlassopoulos, D. (2010) Mineral-Based Amendments for Remediation. *Elements (Quebec, Quebec)* 6, 375-381.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Rineau, F., Smits, M., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. (2015) Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environmental Microbiology* 17, 2035-2047.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., Bert, V. (2017) Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environmental and Experimental Botany* 143, 72-81.
- R Core Team, (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 30, 1562-1574.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.
- Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z.K., Gunter, L., Labbé, J., Muchero, W., Bonito, G., Vilgalys, R., Tuskan, G., Podar, M., Schadt, C.W. (2013) A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees. *PLOS ONE* 8, 1-12.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., Smith, M.E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., Piepenbring, M., Phosri, C., Peterson, M., Parts, K., Pärtel, K., Otsing, E., Nouhra, E., Njouonkou, A.L., Nilsson, R.H., Morgado, L.N., Mayor, J., May, T.W., Majuakim, L., Lodge, D.J., Lee, S.S., Larsson, K.-H., Kohout, P., Hosaka, K., Hiiesalu, I., Henkel, T.W., Harend, H., Guo, L.-d., Greslebin, A., Grelet, G., Geml, J., Gates, G., Dunstan, W., Dunk, C., Drenkhan, R., Dearnaley, J., De Kesel, A., Dang, T., Chen, X., Buegger, F., Brearley, F.Q., Bonito, G., Anslan, S., Abell, S., Abarenkov, K. (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346.

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.

Witters, N., Mendelsohn, R.O., Van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., Tack, F., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2012) Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study. I: Energy production and carbon dioxide abatement. *Biomass and Bioenergy* 39, 454-469.

Wu, Z., Hao, Z., Zeng, Y., Guo, L., Huang, L., Chen, B. (2015) Molecular characterization of microbial communities in the rhizosphere soils and roots of diseased and healthy *Panax notoginseng*. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 1059-1074.

Yergeau, E., Bell, T.H., Champagne, J., Maynard, C., Tardif, S., Tremblay, J., Greer, C.W. (2015) Transplanting Soil Microbiomes Leads to Lasting Effects on Willow Growth, but not on the Rhizosphere Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 6.

Zappelini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., Greer, C., Chalot, M. (2015) Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biology and Biochemistry* 90, 101-110.

DISCUSSION GENERALE

Pour limiter la dispersion des contaminants dans l'environnement et valoriser économiquement le foncier, le phytomanagement ([Bert et al., 2009](#); [Chalot et al., 2012](#); [Kidd et al., 2015](#); [Mench et al., 2010](#); [Robinson et al., 2009](#)) apparaît comme une voie de valorisation pertinente pour certains terrains de gestion de sédiments de curage, et notamment pour les plus anciens. Au niveau européen, la phytostabilisation (aidée) a fait l'objet de nombreux travaux de recherche et développement dans le cadre de la gestion des sites et sols pollués ([Mench et al., 2010](#); [Mench et al., 2009](#); [Vangronsveld et al., 2009](#)). Cependant, la plupart des travaux ont été conduits en conditions contrôlées (chambre de culture, serre) et sur le court terme, et ne permettent pas de démontrer la performance de la phytostabilisation (aidée) à plus grande échelle ([Kidd et al., 2015](#)). Les essais *in situ* à l'échelle de la parcelle ou du champ sont souvent focalisés sur la sélection d'espèces végétales les plus appropriées en matière de phytostabilisation et de productivité pour une valorisation économique ainsi que sur l'efficacité des amendements testés ([Bert et al., 2012b](#); [Lopareva-Pohu et al., 2011](#); [Pourrut et al., 2011](#); [Touceda-González et al., 2017](#)). Pour connaître un déploiement plus conséquent, la phytostabilisation aidée de sites pollués doit également intégrer divers aspects pratiques, environnementaux et sociaux-économiques ([Cundy et al., 2013](#); [Kidd et al., 2015](#)). Dans ce cadre, mes travaux de thèse contribuent à alimenter les connaissances liées aux risques environnementaux via l'étude des transferts sol-plantes, des interactions avec les microorganismes associés, des expositions et à évaluer la performance de deux modalités de phytomanagement testées à grande échelle.

Performance des plantes, biodiversité et services écosystémiques

La diversité végétale est une composante importante du phytomanagement car les différents traits fonctionnels associés aux communautés végétales peuvent favoriser la stabilité et la résilience des sols ([Evangelou and Deram, 2014](#); [Faucon et al., 2017](#); [Mitchell et al., 2000](#)). Plusieurs études reposent sur l'identification et la sélection de plantes tolérantes aux conditions du milieu à restaurer ([Bes et al., 2010](#); [Pandey et al., 2015](#); [Remon et al., 2005](#)) mais très peu d'entre elles abordent de manière concrète les aspects relatifs à la diversité des plantes, à son évolution, à son rôle et aux risques associés au sein des sites phytomanagés. Le choix des espèces végétales doit être défini suivant l'usage des sites. Dans le cas d'une valorisation économique (ex. production de biomasse non alimentaire), les critères de rentabilité et de productivité orientent la sélection des espèces tandis que dans le cas d'une valorisation écologique du site (ex. aménagement paysager), la biodiversité peut constituer l'objectif principal à atteindre. Dans tous les cas, les risques de contamination de la chaîne alimentaire via les plantes sélectionnées ou colonisatrices doivent être évalués et suivis sur le long terme. Si nécessaire, des mesures de

gestions devront être proposés pour assurer la maîtrise des risques ([Bert et al., 2017b](#); [Bert et al., 2012a](#)).

Après la mise en place des sites phytomanagés A et B, une végétation colonisatrice herbacée s'est progressivement installée de manière pérenne ou temporaire. Pour évaluer le rôle potentiel des espèces dominantes pour le phytomanagement, un inventaire floristique a été réalisé dans le cadre de ma thèse, soit 3 ou 4 ans après la mise en place des sites. Cet inventaire pourrait également contribuer à la sélection d'espèces pérennes tolérantes aux EPT (ex. Poacées) pour d'autres sites contaminés présentant des conditions pédoclimatiques comparables, et notamment dans les projets qui incluent la culture d'espèces ligneuses en TCR/TTCR.

Sur le site A, près de 18 espèces végétales colonisatrices ont été identifiées sous 8 parcelles plantées avec les peupliers Skado et I-214. Le couvert herbacé était caractérisé par une dominance de l'espèce vivace et nitrophile *Urtica dioïca* (ortie). Afin d'évaluer son potentiel pour la végétalisation tout en maîtrisant les risques liés au transfert des EPT dans ses parties aériennes, différents paramètres ont été mesurés : taux de recouvrement, concentrations en EPT dans les parties aériennes et risques environnementaux associés. Les orties sont capables de former des colonies très denses sur des sols riches en azote ([Taylor, 2009](#)) mais son recouvrement sur l'ensemble du site était très hétérogène et plus éparse sous les peupliers Skado, où la luminosité était plus faible. Sous les peupliers Skado de parcelles fortement contaminées, des concentrations élevées en Cd, Cu, Pb et Zn dans les parties aériennes de l'ortie ont été relevées, en comparaison avec des valeurs « ordinaires » ([Bert et al., 2012b](#)). Un risque environnemental lié à cette biomasse enrichie en ETP peut exister et des mesures de gestion seraient à envisager en cas de risque avéré. Il faut noter que ces résultats ne sont pas extrapolables à l'ensemble du site. Il aurait été intéressant de mesurer les concentrations en EPT dans l'ortie sous les peupliers I-214, où le recouvrement de l'ortie est plus dense, et selon un gradient de contamination en EPT pour évaluer la pertinence de la co-culture ortie/peupliers dans un objectif de phytomanagement. Dans des conditions plus favorables à l'ortie, la mise en œuvre d'un système agro-forestier sur site contaminé aux EPT peut être envisagée, combinant la production d'une espèce ligneuse à celle d'une espèce herbacée d'intérêt industriel (fibre). Cette voie de valorisation est étudiée dans le cadre du projet PHYTOFIBER (ADEME-GRAINE) par le laboratoire Chrono-environnement.

Les résultats de 5 années de suivi montrent que l'espèce herbacée *D. cespitosa* semée sur le site B est pertinente pour le phytomanagement de sites pollués aux EPT. Par le maintien d'un recouvrement dense de toutes les parcelles, *D. cespitosa* permet d'éviter le contact direct avec le sol et doit contribuer à la réduction de l'envol des particules contaminées. De plus, à l'exception du Zn, des concentrations faibles en Cd, Cu et Pb ont été mesurées dans ses parties aériennes

([Kabata-Pendias, 2010](#)); le risque de contamination de la chaîne alimentaire via l'ingestion des tissus aériens de cette plante peut être écarté car le métabolisme du Zn est généralement bien régulé chez de nombreux animaux ([European Commission, 2010](#)). Des tontes régulières (2 fois par an) avaient été réalisées pour maintenir un couvert dense car l'absence d'entretien ne permettait pas de conserver l'espèce ([Bert et al., 2012b](#)). L'inventaire floristique a permis d'identifier près de 30 espèces tolérantes aux EPT sur l'ensemble du site, la majorité étant des espèces pérennes. L'analyse de quelques espèces colonisatrices prélevées sur les parcelles amendées (*Symphytum officinale*, *Glechoma hederacea*, *Rubus caesius*, *U. dioïca*, *Carduus crispus* et *Arctium lappa*) a montré que les concentrations en Cd, Pb et Cu chez la plupart de ces espèces n'excédaient pas les concentrations en EPT habituellement mesurées chez des plantes herbacées ([Kabata-Pendias, 2010](#)). L'espèce *C. crispus* s'était démarquée par de fortes concentrations en Cd dans ses parties aériennes. Des mesures de gestion devront être étudiées pour les plantes présentant un risque environnemental. De plus, une réduction importante des concentrations en Pb chez ces plantes colonisatrices a été mise en évidence en présence de *D. cespitosa*. Cette réduction des transferts pourraient être liée au système racinaire dense de *D. cespitosa* et à sa capacité à accumuler le Pb dans ses racines ou/et à la production de MO complexant le Pb qui rendrait le Pb moins biodisponible ([Kucharski et al., 2005](#); [Ma et al., 2016a](#)). Par conséquent, le maintien des espèces colonisatrices non accumulatrices est envisageable pour améliorer les services écosystémiques du milieu grâce à une biodiversité plus riche. De plus, il faut souligner que l'entretien du couvert herbacé a fortement contribué à la diminution de la propagation de l'espèce invasive *F. japonica* qui était initialement présente sur le site. La présence des saules peut aussi expliquer la réduction de croissance de *F. japonica*, qui devient moins compétitrice lorsque la luminosité est plus faible. Sa propagation est donc moins probable sur le site A ([Dommanget et al., 2015](#); [Schnitzler and Muller, 1998](#)).

Cependant, nous avons mis en évidence une forte compétition entre *D. cespitosa* et les saules. En effet, sur les parcelles enherbées amendées ou non amendées, une forte réduction de la croissance et du taux de survie des deux cultivars a été observée sur 5 années de suivi. Plusieurs études permettent d'appuyer ces effets négatifs liés à une compétition interspécifique, qui affecte majoritairement les jeunes arbres ([Albertsson et al., 2014a](#); [Albertsson et al., 2014b](#); [Collet et al., 1999](#); [Frochot et al., 1986](#)). Ces études soulignent une compétition pour l'eau et les nutriments mais également la capacité de certaines espèces herbacées (ex. *Deschampsia flexuosa* L.) à diminuer la croissance des arbres par l'exsudation racinaire de substances allélopathiques ([Albertsson et al., 2014a](#); [Frochot et al., 1986](#)). Il serait donc intéressant de mesurer l'ampleur de cette interaction allélopathique pour confirmer l'impact biochimique de *D. cespitosa* sur les saules. La co-culture en TCR/TTTCR est également un facteur peu favorable à la croissance des saules car

leur densité reste inférieure à celle des espèces herbacées, et leur capacité à utiliser l'eau du sol peut ainsi se retrouver limitée ([Albertsson et al., 2014b](#)). La mesure du potentiel hydrique foliaire du saule Tordis sur une partie des parcelles amendées et non amendées en juillet 2015 (**Annexe 1**) n'avait pas révélé de contrainte hydrique significative associée à la présence du couvert herbacé. Cependant, le potentiel hydrique des saules avait tendance à diminuer au cours de la journée en présence du couvert herbacé. Nos résultats auraient peut-être été plus significatifs sur les parcelles les plus contaminées, aux endroits où la mortalité des saules était la plus élevée. De plus, les saules avaient été soumis à une forte prédation de la part d'herbivores (chevreuils, lapins, chrysomèles) qui a certainement contribué à l'affaiblissement de leur développement, comme déjà rapporté dans une autre étude au champ avec les cultivars Inger et Tordis ([Albertsson et al., 2014a](#)). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude mettant en évidence de telles interactions sur des sites contaminés phytomanagés. Dans un objectif de valorisation de la biomasse ligneuse en bois énergie, nos résultats montrent que la co-culture *D. cespitosa*/TTCR de saule est difficilement envisageable si les différentes interactions négatives évoquées ne sont pas limitées. Dans ce système de culture, la sélection des cultivars de saule devrait donc inclure des critères de résistance aux espèces herbacées et à l'herbivorie.

Sur le site A, le faible recouvrement au sol des espèces herbacées peut non seulement s'expliquer par un manque de luminosité mais également par la présence de substances allélopathiques produites par les peupliers et présentes dans les feuilles ([Kohli, 1998](#)). Cette inhibition de la croissance des espèces herbacées pourrait ainsi avoir favorisé celle des arbres. Il faut également noter qu'aucune espèce herbacée n'avait été semée au moment de la plantation et qu'un débroussaillage avait été réalisé durant les deux premières années pour limiter une éventuelle compétition avec les peupliers. De plus, ces derniers se sont avérés très tolérants aux fortes concentrations d'EPT dans le sol ; pendant plus de 6 ans, le taux de survie des deux cultivars était proche de 100 % et aucun signe de toxicité n'a été observé. L'inoculation des peupliers par des champignons mycorhiziens a amélioré de façon significative leur croissance ([Ciadamidaro et al., 2017](#)). Cependant, comme chez les saules, des concentrations foliaires élevées en Cd et en Zn ont été mesurées chez les peupliers, comparées à celles mesurées dans les peupliers provenant de sols non contaminés ([Madejón et al., 2004](#); [Vandecasteele et al., 2003](#)). Le risque environnemental est particulièrement élevé pour les feuilles de peupliers enrichies en Cd qui peuvent être toxiques pour les animaux et être transféré dans la chaîne alimentaire ([Angelova et al., 2010](#); [Kabata-Pendias, 2010](#)). Pour éviter le retour au sol des EPT après la tombée des feuilles en automne, la gestion des feuilles s'avère indispensable. Les teneurs en ETP dans les biomasses ligneuses (tronc, branches) valorisables sont en cours d'analyse au laboratoire Chrono-environnement et devraient permettre de renseigner sur le risque lié à leur valorisation dans des filières énergétiques, par exemple. Par ailleurs, une autre espèce a été plantée en 2011 dans le

cadre du programme BIOFILTREE (l'aulne) sur le site A. Les mesures des teneurs en ETP dans ses feuilles permettent d'ores et déjà de confirmer son intérêt en phytomanagement comme espèce non accumulatrice de métaux (Ciadamidaro et al., résultats non publiés). Elle pourrait être une alternative intéressante à l'utilisation d'espèces accumulatrices de la famille des Salicacées.

Les micro-organismes associés aux plantes jouent un rôle déterminant dans la mobilité des EPT dans sol, dans le transfert des EPT dans les parties aériennes des espèces végétales et plus largement dans les processus écologiques qui permettent la résilience des sols ([Cabral et al., 2015](#); [Cicatelli et al., 2014](#); [Rajkumar et al., 2012](#)). Une étude récente a démontré que le phytomanagement basé sur l'utilisation du peuplier avait un impact significatif sur la richesse et la diversité des communautés microbiennes, et ces phénomènes s'étaient accompagnés d'une diminution des concentrations extractibles en Cd et Zn ainsi que d'une amélioration de la fertilité du sol ([Foulon et al., 2016a](#)). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude rapportant l'effet d'amendements sur les structures et les fonctions des communautés microbiennes de sites phytomanagés. Par l'utilisation de l'approche métabarcoding, nous avons exploré la richesse et la diversité des communautés microbiennes en présence et en absence d'amendements. Cette approche ne permet pas de confirmer que les champignons mycorhiziens introduits sont effectivement présents sur les racines inoculées. En effet, il n'est à ce jour pas possible de suivre le devenir de souches introduites, et notamment parce que celles-ci ne sont pas caractérisées génétiquement. Les marqueurs génétiques étudiés à ce jour ne sont pas suffisamment discriminants pour différencier des espèces introduites de celles présentes sur le site d'étude. Des travaux sont en cours sur la possibilité d'utiliser des marqueurs génétiques plus stringents (marqueurs mitochondriaux) pour suivre le devenir d'isolats mycorhiziens au cours du temps. Nos résultats montrent que les amendements biologiques et chimiques ont très peu influencé la richesse, la diversité et la composition des communautés microbiennes dans les racines ligneuses et les sols associés. Néanmoins, l'étude de la composition des communautés fongiques dans les racines des saules a révélé un impact important du couvert végétal et de la pollution. Une étude plus approfondie devra être réalisée sur le rôle écologique des communautés fongiques dominantes identifiées sur les parcelles très polluées (*Sordariomycetes*) et présentant une couverture herbacée (*Agaricomycetes*).

Performance des amendements

L'apport d'un consortium de champignons mycorhiziens

Le rôle des champignons mycorhiziens dans la croissance, la tolérance et l'accumulation d'EPT dans les tissus des peupliers sur sols contaminés a souvent été démontré en pots dans des conditions contrôlées, mais rarement au champ ([Baum et al., 2002](#); [Cicatelli et al., 2014](#); [Colpaert et al., 2011](#); [Mrnka et al., 2012](#)). En fonction des espèces végétales, les données de la littérature montrent des résultats contradictoires. En effet, les champignons mycorhiziens peuvent augmenter ([Cicatelli et al., 2014](#); [Sell et al., 2005](#)) ou réduire ([Bojarczuk and Kieliszewska-Rokicka, 2010](#); [Mrnka et al., 2012](#)) le transfert des EPT vers les parties aériennes de leur plante hôte. Sur le site A, l'apport d'un consortium de champignons ecto- et endomycorhiziens lors de la plantation des peupliers en 2011, avait pour objectif, de par son effet « filtre biologique », de limiter le transfert des EPT vers les parties aériennes de leurs plantes hôtes et accroître leur productivité pour la production de bois énergie. En accord avec des études conduites en pots sur l'effet des mycorhizes chez les peupliers ([Cicatelli et al., 2014](#); [Salehi et al., 2016](#)), l'inoculum mycorhizien testé *in situ* s'est montré efficace pour accroître de façon significative la productivité des peupliers Skado et I-214 ([Ciadamidaro et al., 2017](#)).

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer un effet positif de l'amendement biologique sur les transferts en EPT chez ces peupliers. Plus précisément, l'inoculation de champignons mycorhiziens a permis de réduire le transfert du Zn, Cu, Cr et Pb dans leurs feuilles, mais seulement chez le cultivar Skado dans les sols les plus contaminés, à la fin de la 2^{ème} saison de croissance en octobre 2012 ([Phanthavongsa et al., 2017](#)). Ces résultats pourraient être liés aux champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui sont capables d'immobiliser les EPT dans les sols très contaminés via la libération de glomalines (glycoprotéines) dans le sol ([Audet and Charest, 2007](#); [González-Chávez et al., 2004](#)). Une augmentation des concentrations foliaires en EPT chez certains peupliers inoculés (I-214 ou Skado) a également été observée ; cette augmentation pourrait être liée à la présence de micro-organismes qui augmentent la biodisponibilité des EPT par la sécrétion d'acides organiques complexant à la fois les éléments essentiels et non essentiels ([Rajkumar et al., 2012](#)). Au cours de la 5^{ème} saison de croissance des peupliers (juin 2015), le cultivar Skado inoculé a montré des concentrations foliaires plus élevées en Cd par rapport aux peupliers non inoculés sur les parcelles les plus contaminées tandis que les concentrations foliaires en Cu et Pb restaient moins élevées avec l'inoculation (**Annexe 2**). Chez les peupliers I-214 inoculés, une diminution significative des concentrations foliaires en Cd, Zn et Pb a été observée sur les parcelles les plus contaminées alors que les différences étaient moins contrastées à la fin de la 2^{ème} saison de croissance. Il est cependant difficile de comparer ces variations dans les concentrations foliaires car les campagnes d'échantillonnage n'ont pas été

réalisées à la même saison (octobre 2012 / juin 2015). L'incidence de la date de prélèvement sur les teneurs en ETP dans les feuilles de peupliers a été mise en évidence dans une étude récente ([Pottier et al., 2015](#)). Aucune corrélation entre les concentrations extractibles en ETP dans le sol et leurs concentrations foliaires n'a pu être clairement établie du fait des interactions complexes entre les plantes et leurs micro-organismes associés. Les concentrations foliaires étaient plus fortes dans les parcelles riches en EPT et en nutriments, ce qui suggérait une influence importante des propriétés physico-chimiques des sols sur le comportement des peupliers inoculés ou non. Près de 5 ans après l'inoculation des peupliers, les résultats des tests de lixiviation, d'extraction séquentielle et de modélisation géochimique ont montré que la mobilité et la spéciation du Cd, Cu, Pb et Zn n'étaient pas influencées par l'amendement biologique.

Les résultats obtenus *in situ* soulignent l'importance d'une caractérisation précise des propriétés physico-chimiques des sols pour optimiser la réduction des transferts. Afin de réduire les risques liés aux fortes concentrations en Cd et Zn dans les feuilles, de nouvelles souches fongiques et bactériennes devraient être étudiées, car certaines souches bactériennes pourraient stimuler l'activité des champignons mycorhiziens ([Labbé et al., 2014](#)). Par ailleurs, les souches mycorhiziennes utilisées dans cette étude en 2011 étaient celles commercialisées par les sociétés Agronutrition et Symbiom, et n'avaient pas été sélectionnées spécifiquement pour leur caractère de tolérance aux EPT. Depuis, de nombreuses souches endo- et ectomycorhiziennes ont été isolées des sites d'étude dans le cadre du projet BIOFILTREE ([Lacercat-Didier et al., 2016](#)) et certaines souches caractérisées pour leur potentiel de phytostimulation (Berthelot et al, 2018, sous presse). Des essais de terrain pourraient dès lors être envisagés.

L'amendement minéral basique Optiscor®

L'incorporation d'un amendement minéral basique (TBS), dans un sol contaminé par les ETP a été testée dans des expérimentations en pot et sur le terrain. Un effet significatif sur le pH du sol avait été observé et il était attendu une immobilisation des ETP (notamment Cu, Cd et Zn) par des processus de précipitation et de complexation avec les constituants de l'amendement ([Bert et al., 2012b](#); [Le Forestier et al., 2017](#); [Panfili et al., 2005](#)). Par ces mécanismes, les études menées en pot et en parcelles avec un sédiment de curage excavé contaminé par Cd, Zn et Cu avaient en effet démontré que l'amendement TBS réduisait de façon significative les fractions en EPT extractibles en absence comme en présence de végétation ([Bert et al., 2003](#); [Bert et al., 2012b](#); [Panfili et al., 2005](#)). Ces mêmes études avaient de plus rapporté une diminution significative des concentrations foliaires en Zn et en Cd chez plusieurs espèces de poacées dont *D. cespitosa* ([Bert et al., 2003](#); [Bert et al., 2012b](#)).

Sur le site B, testé en conditions réelles de terrain, l'amendement minéral basique (Optiscor®) proche dans sa composition du TBS testé dans les études citées précédemment a permis une augmentation significative du pH sur le court terme ([Kidd et al., 2015](#)). A l'échelle du champ, les fractions en ETP extractibles sous le couvert végétal étaient faibles par rapport aux concentrations totales mais aucune diminution significative n'a été observée pour le Cd, Cu et Zn. Au contraire, une augmentation des concentrations extractibles en Cd et en Zn avait été observée sous le couvert herbacé. Positivement corrélée avec une diminution de pH, l'augmentation de ces concentrations pourrait être attribuée à une acidification naturelle de la rhizosphère par des exsudats racinaires, et notamment par des acides organiques ([Antoniadis et al., 2017](#); [Kidd et al., 2009](#)). Les tests de lixiviation, réalisés 4 ans après l'incorporation de l'amendement dans le sol, ont confirmé l'influence majeure du pH sur la mobilité de ces deux éléments, quels que soient les traitements. De plus, aucun changement de spéciation n'a été relevé dans les sols, suggérant que l'amendement n'a pas eu d'effet sur le long terme. De même, l'amendement n'a eu aucun effet sur la spéciation et la mobilité du Cu. La réduction des fractions extractibles en Pb observée sur les parcelles amendées serait plutôt liée à la formation de composés stables avec la MO. Il faut noter que la dose d'amendement épanchée sur le site B était faible (0,2 % MS) par rapport aux doses utilisées dans d'autres études (1 % à 5 % MS) ayant montré des résultats significatifs ([Bert et al., 2012b](#); [Le Forestier et al., 2017](#); [Panfili et al., 2005](#)). La dose d'amendement utilisée (0,2 % MS soit 9 t/ha) résulte d'un compromis entre pratiques agricoles (1 à 1,5 t/ha), de la faisabilité technique de l'épandage (3 passages maximum de l'épandeur pour éviter le tassement du sol), des contraintes réglementaires (respect de la norme [NF U44-001 \(2009\)](#) qui impose des teneurs en éléments à ne pas dépasser, notamment en Cr), de la viabilité économique de l'opération, du développement des végétaux (optimum de croissance des saules pH < 8 ; certains nutriments comme le Fe et le Mn deviennent moins disponibles à pH basique ([Dučić and Polle, 2005](#); [Morrissey and Guerinot, 2009](#))) et des résultats d'expérimentation en pot de détermination de l'effet d'un produit sur le pH d'un sol ([NF EN 14984 \(2006\)](#) ; méthode B).

Sur les parcelles amendées et non amendées, les concentrations en EPT dans les parties aériennes de *D. cespitosa* sur les deux années de suivi (juin 2013 et 2016) étaient comparables à celles de plantes herbacées issues de sols non contaminés ([Kabata-Pendias, 2010](#)). Ces résultats, en accord avec des études réalisées à l'échelle de la parcelle (projet PHYTOSED) et du site (projet PHYTOSED 2), confirment le caractère tolérant et non accumulateur de *D. cespitosa* ([Mehes-Smith and Nkongolo, 2015](#)). L'analyse des concentrations en EPT dans les parties aériennes des espèces herbacées colonisatrices dominantes n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'Optiscor®. Concernant les saules, de fortes concentrations foliaires en Cd et Zn ont été mesurées sur toutes les parcelles amendées et non amendées 1 an et 3 ans après la plantation (juin 2013 et 2015). Néanmoins, une diminution importante des concentrations foliaires en Cd, Pb et Zn entre

juin 2013 (projet PHYTOSED 2) et juin 2015 a été observée chez les deux cultivars, notamment sur les parcelles amendées. Les plus faibles concentrations foliaires en EPT mesurées en 2015 peuvent être dues à un effet « dilution » avec la croissance des arbres ([Mertens et al., 2006b](#)) mais un effet amendement ne peut être écarté étant donné les fortes diminutions des concentrations en EPT comparées à celles des parcelles non amendées. Les cultivars commerciaux Inger et Tordis avaient été sélectionnés pour leur forte productivité et leur capacité à résister à la rouille. Même si de nombreuses espèces du genre *Salix* sont capables d'accumuler de fortes concentrations en EPT dans leurs parties aériennes ([Van Slycken et al., 2013](#); [Vandecasteele et al., 2003](#)) une diminution des concentrations foliaires était attendue par l'immobilisation des EPT grâce à l'amendement. La dose épandue était peut-être insuffisante pour réduire la biodisponibilité des EPT dans le sol et les transferts vers les feuilles. A cette dose cependant, une diminution du taux de survie des saules avait été observée en présence de l'Optiscor®, suggérant que la modification de certaines conditions physico-chimiques (ex. pH) causée par l'amendement n'a pas été favorable à leur développement.

Dans les conditions de mon étude, il n'a pas été possible de mettre en évidence l'effet de l'amendement sur la diminution de la mobilité des éléments traces, en particulier du Zn et du Cd, et sur la diminution des concentrations foliaires de la canche et des saules, malgré l'augmentation de pH constatée après l'épandage qui semblait suggérer l'efficacité court terme de l'amendement. Des concentrations extractibles faibles, une hétérogénéité forte de la pollution, des concentrations foliaires de la canche cespiteuse initiales faibles et un pouvoir tampon très fort du sédiment pourraient pour partie expliquer ce résultat. La recherche d'un amendement plus approprié qui conserve le pH actuel pour éviter la lixiviation des EPT peut être envisagée pour améliorer la croissance des saules et limiter le transfert des EPT dans leurs parties aériennes.

Evaluation de la qualité des sols

Pour garantir le succès du phytomanagement à l'échelle du champ et sur le long terme, une évaluation basée sur les risques initiaux et résiduels est recommandée ([Kumpiene et al., 2014](#); [Quintela-Sabarís et al., 2017](#)). Plusieurs méthodes chimiques et écotoxicologiques ont été proposées dans le cadre du projet européen GREENLAND, qui s'est appuyé sur l'étude de 7 sites phytomanagés sur le long terme ([Kumpiene et al., 2014](#)). Les auteurs préconisent au minimum une estimation de la biodisponibilité des ETP par des extractions sélectives au nitrate d'ammonium NH_4NO_3 (1 M) en complément du test « Plantox » sur le haricot ([Vangronsveld and Clijsters, 1992](#)) qui comprend une mesure des activités enzymatiques liées au stress oxydant.

Trois mois après la plantation des plançons de saule sur le site B, le taux de survie sur l'ensemble de la parcelle amendée avait été estimé à 99 %. La plupart des saules Inger et Tordis s'étaient bien développés mais certains d'entre eux ont commencé à présenter un feuillage chlorosé, surtout au niveau des zones les plus contaminées par les EPT (sur la base des concentrations totales). Ce phénomène s'est accentué au cours de l'été durant la première saison de croissance (présence de nécroses) mais n'avait pas affecté les saules des parcelles témoins (B-NA) qui n'avaient pas été semées avec *D. cespitosa* ([Phanthavongsa, 2012](#)). Plusieurs hypothèses avaient alors été émises : compétition avec la canche pour l'eau et les nutriments, phytotoxicité du sol, faible activité biologique du sol (rapport C/N élevé) et remobilisation des EPT suite au travail du sol pendant la préparation du dispositif. Pour tester l'hypothèse d'une toxicité liée au sol contaminé, plusieurs essais écotoxicologiques ont été menés sur différents organismes terrestres tels que le test de germination avec *Brassica rapa* ([ISO 11269-2, 2005](#)) et le test d'évitement des vers avec *Eisenia fetida* ([ISO 17512-1, 2008](#)). Cependant, ces tests aigus n'avaient pas indiqué de toxicité vis-à-vis des organismes testés sur les échantillons de sol non amendés et amendés qui présentaient les plus fortes concentrations totales en Cd et Zn ([Rousseaux, 2013](#)). Dans le cadre du projet GREENLAND (2011-2014, FP7-KBBE-266124, Gentle remediation of trace element contaminated land), plusieurs tests de toxicité aiguë conduits sur des échantillons de sol du site B n'avaient pas montré de phytotoxicité. Le test Plantox réalisé avec le haricot avait indiqué que le sol avant épandage de l'amendement était légèrement toxique tandis que le sol après épandage était non toxique, suggérant le succès de la phytostabilisation aidée. Le test Plantox réalisé avec la laitue avait révélé une diminution significative de la biomasse de la laitue au bout de 48 jours sur des sols amendés alors que l'efficacité photosynthétique de la plante n'avait pas été impactée ([Quintela-Sabarís et al., 2017](#)). Les tests de toxicité aiguë sont réalisés sur une durée très courte par rapport au temps de génération de l'organisme et ne permettent pas de mettre en évidence les effets des polluants sur le long terme et à d'autres stades plus avancés du cycle de vie des organismes.

Les saules ayant présenté des chloroses et nécroses au bout de quelques mois, nous avons choisi de mettre en œuvre, dans le cadre de mon projet de thèse, un test de toxicité chronique normalisé ([ISO 22030, 2011](#)) qui semblait davantage approprié. En effet, les tests de toxicité chronique permettent de mettre en évidence des effets de polluants dans des conditions expérimentales plus proches de la réalité et prenant en compte des critères d'effets plus sensibles tel que la croissance ou la reproduction, et donc à plus long terme. Ce test de toxicité chronique permet d'étudier les effets des polluants entre le stade de germination et le stade de reproduction de deux plantes de physiologies différentes, *Avena sativa* (monocotylédone) et *Brassica rapa* CrGC syn. Rbr (dicotylédone). L'acquisition, le transport et l'accumulation des EPT chez les plantes dicotylédones et monocotylédones s'opèrent de manière différente chez les deux types de plantes ; à la différence des dicotylédones, les monocotylédones peuvent par exemple accroître la biodisponibilité du Fe, Zn, Cu et Cd par la sécrétion de phytosidérophores ([Palmer and Guerinot, 2009](#); [Schenkeveld et al., 2014](#)). Des différences au niveau de leur sensibilité à ces métaux pouvaient donc être attendues. A notre connaissance, ces tests n'ont jamais été mis en œuvre pour évaluer la performance du phytomanagement ; ils peuvent en effet être contraignants en termes de place, de suivi et de temps.

Les tests chroniques réalisés dans le cadre de ma thèse ont permis de conclure à une toxicité de tous les sols testés provenant des sites phytomanagés A et B et confirment les résultats du test Plantox avec la laitue, réalisé précédemment sur le site B. Le site A n'avait pas fait l'objet d'étude écotoxicologique jusqu'alors. Cependant, ces résultats ne permettent pas de faire un lien direct avec les observations de terrain puisque l'espèce herbacée *D. cespitosa* (site B) et les peupliers (site A) ont présenté une croissance optimale depuis le début des expérimentations au champ et aucun signe de toxicité n'avait été relevé sur les espèces colonisatrices. Les essais ont démontré une sensibilité différente des deux espèces testées *A. sativa* et *B. rapa*, *A. sativa* ayant développé des symptômes de toxicité de manière plus précoce que *B. rapa*. L'utilisation de ces deux espèces dans les tests de toxicité chronique est donc pertinente pour évaluer la phytotoxicité des sols contaminés comme souligné dans l'étude de ([Mondaca et al., 2017](#)). Les sols les plus contaminés (B-ADc-H) se sont montrés plus toxiques vis-à-vis de la plante la plus sensible *A. sativa* ; ce résultat suggère donc que le sol amendé issu des parcelles les plus contaminées serait plus phytotoxique pour les saules que pour *D. cespitosa*. D'autres cultivars de saules, plus tolérants aux conditions du site B, auraient peut-être été plus pertinents sur les zones les plus polluées. Les tests réalisés ne permettent pas d'isoler les polluants comme facteurs uniques car les propriétés physico-chimiques des sols peuvent également influencer la croissance des plantes. En effet, l'analyse des concentrations en éléments traces et majeurs dans les parties aériennes d'*A. sativa* et *B. rapa* a montré une forte carence en Mn pouvant être liée au pH élevé des sols ([Dučić and](#)

[Polle, 2005](#)). Cette carence n'explique pas l'état des saules car ils n'ont pas montré de carence en Mn, mais plutôt un déséquilibre dans les concentrations en Fe et Mn (chapitre 3). Par ailleurs, au printemps 2017, un test réciproque a été mis en place avec les peupliers et les saules en présence ou en absence de *D. cespitosa* sur les sites A et B afin de voir si les peupliers pouvaient se développer sur le sol de la zone la plus contaminée du site B, et inversement si les saules pouvaient se développer sur le sol du site A.

Nos résultats suggèrent que ces tests pourraient être efficacement mis en œuvre avant la mise en place des dispositifs de phytomanagement pour une sélection anticipée d'espèces végétales, les effets potentiellement toxiques de la matrice étant étudiés sur un cycle complet de croissance. En effet, si les tests révèlent une toxicité du sol aux derniers stades de croissance des plantes, la recherche de plantes plus tolérantes devra être envisagée tandis que l'absence de toxicité permettra une sélection plus large d'espèces. Pour évaluer l'efficacité du phytomanagement sur la qualité des sols, ces tests pourraient également être utilisés comme un outil de suivi sur le long terme.

Afin de mieux caractériser les sols étudiés et de connaître les formes chimiques des métaux qui pourraient être responsables de la toxicité des sols, des extractions chimiques (sélectives et séquentielles), des tests de lixiviation à pH statique ainsi que la détermination de la spéciation du Cd, Cu, Pb et Zn par modélisation géochimique ont été réalisés. L'utilisation de ces différentes approches en complément des tests écotoxicologiques est à ce jour novatrice dans le domaine du phytomanagement. Pour tous les sols testés des sites A et B (amendés et non amendés), les extractions séquentielles ont démontré que le Cd et le Zn, fortement associés à la fraction échangeable, étaient plus mobilisables que le Cu et le Pb qui étaient majoritairement associés à la fraction oxydable. En complément, les résultats issus de la modélisation basée sur les tests de lixiviation devaient permettre de définir plus précisément les différentes formes chimiques des EPT. Les résultats concernant le Cd et le Zn n'étant pas fiables comparés aux données expérimentales, certains paramètres du modèle devront être affinés concernant les propriétés physico-chimiques des sols (ex. concentrations en carbone inorganique, sélection plus large de minéraux potentiellement présents). Néanmoins, les résultats de lixiviation ont montré que le relargage du Zn avait tendance à être plus important dans le sol le plus contaminé (B-ADc-H) et non amendé (B-NADc) à pH naturel (pH 8). Les plus fortes concentrations en Zn extractibles dans ces sols pourraient avoir contribué à la diminution de croissance des plantes testés en laboratoire (*A. sativa* étant la plus impactée). En accord avec les résultats des extractions séquentielles, le Cu et le Pb sont apparus majoritairement associé à la MO d'après les sorties du modèle géochimique. Ces deux éléments ont en effet une forte affinité avec la MO, notamment avec les acides humiques ([Centioli et al., 2008](#); [Tack et al., 1996](#)). Les concentrations en EPT relarguées

dans le sol étant minimales à pH 8, le maintien de ce pH est primordial pour éviter des risques de lixiviation importants. Cependant, les concentrations mesurées dans les lixiviats n'ont pas pu être comparées à celles issues de sols non contaminés. Il est possible que les concentrations lixiviées soient plus importantes que dans des sols non contaminés.

Evaluation des risques environnementaux (ERE)

Pour aller plus loin dans l'évaluation du potentiel des plantes sélectionnées et colonisatrices pour le phytomanagement, des calculs de risques environnementaux ont été réalisés selon deux approches différentes et complémentaires généralement utilisées par des bureaux d'études environnementalistes. Les quotients de risques (R) étaient basés sur une méthode classique de calcul ($R = \text{PEC}/\text{PNEC}$) et sur l'utilisation du logiciel TerraSys^{MC} (Sanexen Services Environnementaux inc.) qui est peu ou pas utilisé par la communauté scientifique. A ce jour, il existe très peu d'études sur les risques environnementaux associés aux plantes utilisées en phytomanagement ([Enell et al., 2016](#)). Nos résultats montrent que, contrairement aux espèces herbacées (*D. cespitosa* et espèces colonisatrices), les feuilles des Salicacées enrichies en Cd et en Zn peuvent effectivement conduire à une contamination de la chaîne alimentaire. Cependant, les paramètres utilisés dans les calculs de risques se placent dans un scénario majorant et ne reflètent pas forcément la réalité. Le régime alimentaire des animaux considérés était par exemple très limité (*D. cespitosa* ou *U. dioïca* et feuilles et/ou écorces de saules ou feuilles de peuplier). Cette étude préliminaire pourrait être affinée avec l'approche « triade », plus intégrative, qui se base sur une batterie de mesures chimiques, écotoxicologiques et écologiques ([Enell et al., 2016](#); [Jensen and Pedersen, 2006](#)). De plus, l'ERE pourrait également constituer un outil d'aide à la décision pertinent et opérationnel car les données générées pourraient permettre la sélection des meilleurs cultivars selon leur capacité à accumuler les EPT.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le suivi de ces deux essais de phytomanagement sur un ancien terrain de gestion de sédiments de curage pollués par des métaux et métalloïdes constitue une des rares études conduites en conditions réelles et sur le long terme. Nous avons relevé une forte complexité des interactions entre les EPT, les plantes et leurs micro-organismes associés du fait de nombreux facteurs biotiques (compétition interspécifique, prédation) et abiotiques (contamination multiple des sols, hétérogénéité spatiale de la contamination). Mes travaux de thèse ont permis de révéler le potentiel de certaines combinaisons de plantes et d'amendements testées *in situ* mais aussi leurs limites. L'utilisation de champignons mycorhiziens pour réduire le transfert d'EPT dans les parties aériennes des peupliers s'est montrée plus efficace dans les zones les plus contaminées. Cependant les effets de cet amendement biologique étaient également variables selon la période étudiée et selon les cultivars. Les mécanismes liés aux effets de cet amendement n'ont pas pu être éclairés par la détermination de la mobilité et la spéciation des EPT dans le sol. L'étude des molécules produites par les réseaux mycéliens ou les plantes hôtes (métallothionéine, glomaline, etc.) pourrait permettre de mieux appréhender les mécanismes. Les résultats étant seulement basés sur 8 parcelles, il sera intéressant d'étudier les effets de l'inoculation à une échelle plus globale, après la récolte de tous les arbres. Même si la plantation des peupliers est un succès du fait de leur forte tolérance aux EPT, le faible taux de recouvrement du sol par la végétation colonisatrice peut conduire à la dispersion des contaminants dans l'environnement (envol des particules de sol, lixiviation). L'ouverture du milieu arboré par la réduction des cycles de rotation pourrait favoriser le développement des espèces herbacées ; cette solution pourrait être envisagée si elle n'affecte pas la rentabilité de la production de biomasse.

Sur le long terme, l'amendement minéral basique Optiscor® incorporé dans le sol n'a pas permis de modifier la spéciation des métaux ni de diminuer leur mobilité au niveau de la rhizosphère des saules. Néanmoins, nous avons confirmé la pertinence de l'espèce herbacée *D. cespitosa* pour le phytomanagement de sites pollués aux EPT. Le maintien d'espèces herbacées colonisatrices est envisageable mais leur suivi sur le long terme est nécessaire pour éviter le développement d'espèces accumulatrices d'EPT qui peuvent représenter un risque environnemental. La diminution de la croissance et du taux de survie des saules qui ont été observés pendant les 5 années de suivi peut constituer un frein à la valorisation de la biomasse ligneuse. Plusieurs facteurs ont pu être mis en évidence dont la phytotoxicité du sol, une compétition avec le couvert herbacé et des déséquilibres nutritionnels certainement provoqués par l'absorption de fortes concentrations en EPT. Pour optimiser la croissance et la productivité

des plantes utilisées en phytomanagement, l'étude des interactions entre les plantes herbacées et les arbres est donc primordiale.

Pour évaluer l'efficacité du phytomanagement de manière plus globale, une des perspectives de mes travaux de thèse serait d'étudier les bénéfices économiques de la valorisation potentielle de la biomasse ligneuse dans différentes filières. Cela nécessite la prise en compte de la durée totale de la culture. Les feuilles des saules et des peupliers, enrichies en Cd et en Zn, devraient également faire l'objet de mesures de gestion pour réduire les risques environnementaux. L'utilisation des feuilles d'arbres en chimie verte est envisageable ; selon les premiers résultats obtenus à partir des feuilles de saules récoltées sur le terrain, l'extraction du Zn pourrait servir à la fabrication d'éco-catalyseurs (Projet ANR-PHYTOCHEM). Par ailleurs, la valorisation de la biomasse herbacée (*D. cespitosa* et plantes colonisatrices) pourrait apporter des bénéfices économiques supplémentaires. Pour les plantes enrichies en Zn, leur utilisation pour la fabrication de compléments alimentaires pour les animaux d'élevage peut être une filière de valorisation pertinente. La présence et la dominance de l'ortie sous couvert du clone de peuplier I-214 sur le site A, de même que sur d'autres sites étudiés dans le cadre du projet BIOFILTREE, permet d'envisager la mise en œuvre d'un système agro-forestier sur site contaminé aux EPT, combinant la production d'une espèce ligneuse à celle d'une espèce herbacée d'intérêt industriel (fibre).

Mes travaux de thèse ont permis de capitaliser des connaissances sur le phytomanagement d'un ancien terrain de gestion de sédiments contaminés par le Zn, Cd, Cu et Pb. Les connaissances acquises illustrent la complexité des interactions liées aux facteurs environnementaux. Il sera nécessaire d'approfondir les études technico-économiques en intégrant à la fois les itinéraires techniques et les filières de valorisation de la biomasse pour définir les meilleures options possibles pour ce terrain. Certaines modalités testées pourraient être extrapolées à d'autres anciens terrains de gestion gérés par VNF, voire à d'autres sols pollués en fonction des usages futurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achard, R., (2013) Dynamique des contaminants inorganiques dans les sédiments de dragage. Rôle spécifique de la matière organique. Thèse de doctorat. Université du Sud Toulon Var, pp. 1-183.
- Ågren, G.I., Weih, M. (2012) Plant stoichiometry at different scales: element concentration patterns reflect environment more than genotype. *New Phytologist* 194, 944-952.
- Agrobränsle, (2006) *Agrobränsle Willow Varieties*, p. 1.
- AIRELE, (2010) Evaluation quantitative des risques sur la santé humaine - TD n°107 de Fresnes-sur-Escaut (59) - Subdivision de Valenciennes. FB/HN 10 03 046 – v02, pp. 1-71.
- Alary, C., Lemiere, B., Haouche, L. (2011) Granulométrie et contamination comparées des sédiments des voies navigables en Wallonie et nord de la France, enjeu pour la valorisation. *Mines et Carrières*, 25-33.
- Albertsson, J., Hansson, D., Bertholdsson, N.O., Åhman, I. (2014a) Site-related set-back by weeds on the establishment of 12 biomass willow clones. *Weed research* 54, 398-407.
- Albertsson, J., Verwijst, T., Hansson, D., Bertholdsson, N.O., Åhman, I. (2014b) Effects of competition between short-rotation willow and weeds on performance of different clones and associated weed flora during the first harvest cycle. *Biomass and Bioenergy* 70, 364-372.
- Alonso, I., Hartley, S.E. (1998) Effects of nutrient supply, light availability and herbivory on the growth of heather and three competing grass species. *Plant Ecology* 137, 203-212.
- Anderson, C.W.N., Robinson, B.H., West, D.M., Clucas, L., Portmann, D. (2012) Zinc-enriched and zinc-biofortified feed as a possible animal remedy in pastoral agriculture: Animal health and environmental benefits. *Journal of Geochemical Exploration* 121, 30-35.
- Andersson-Sköld, Y., Bardos, P., Chalot, M., Bert, V., Crutu, G., Phanthavongsa, P., Delplanque, M., Track, T., Cundy, A.B. (2014) Developing and validating a practical decision support tool (DST) for biomass selection on marginal land. *Journal of Environmental Management* 145, 113-121.
- Angelova, V.R., Ivanova, R.V., Todorov, J.M., Ivanov, K.I. (2010) Lead, Cadmium, Zinc, and Copper Bioavailability in the Soil-Plant-Animal System in a Polluted Area. *TheScientificWorldJOURNAL* 10.
- Antoniadis, V., Alloway, B.J. (2002) The role of dissolved organic carbon in the mobility of Cd, Ni and Zn in sewage sludge-amended soils. *Environmental Pollution* 117, 515-521.
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S.M., Ok, Y.S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M.N.V., Wenzel, W.W., Rinklebe, J. (2017) Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews* 171, 621-645.
- Asad, M., Menana, Z., Ziegler-Devin, I., Bert, V., Chalot, M., Herzig, R., Mench, M., Brosse, N. (2017) Pretreatment of trace element-enriched biomasses grown on phytomanaged soils for bioethanol production. *Industrial Crops and Products* 107, 63-72.
- Audet, P., Charest, C. (2007) Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 147, 609-614.
- Azarbad, H., Niklińska, M., Laskowski, R., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., Zhou, J., He, Z., Wen, C., Röling, W.F.M. (2015) Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *Fems Microbiology Ecology* 91, 1-11.
- Baize, D. (2000a) *Guide des analyses en pédologie: 2e édition, revue et augmentée*. Editions Quae.
- Baize, D. (2000b) Teneurs totales en «métaux lourds» dans les sols français: résultats généraux du programme ASPITET. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA*, 39-54.

Barrick, K.A., Noble, M.G. (1993) The Iron and Manganese Status of Seven Upper Montane Tree Species in Colorado, USA, Following Long-Term Waterlogging. *Journal of Ecology* 81, 523-531.

BASIAS, (2017) Base de données des anciens sites industriels et activités de service. <http://www.georisques.gouv.fr/dossiers/basias/donnees#>.

BASOL, (2017) Base de données sur la pollution des sols. <http://basol.developpement-durable.gouv.fr>.

Baum, C., Stetter, U., Makeschin, F. (2002) Growth response of *Populus trichocarpa* to inoculation by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in a pot and a field experiment. *Forest Ecology and Management* 163, 1-8.

Baum, S., Bolte, A., Weih, M. (2012) Short Rotation Coppice (SRC) Plantations Provide Additional Habitats for Vascular Plant Species in Agricultural Mosaic Landscapes. *BioEnergy Research* 5, 573-583.

Bécart, D., Pavageau, P., Vivant, D., (1997) Suivi de la qualité des sédiments - Bilan de synthèse des analyses effectuées entre 1994 et 1997 (par canal). VNF - Direction Régionale de Lille

Bell, T.H., Cloutier-Hurteau, B., Al-Otaibi, F., Turmel, M.-C., Yergeau, E., Courchesne, F., St-Arnaud, M. (2015) Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Environmental Microbiology* 17, 3025-3038.

Bell, T.H., Joly, S., Pitre, F.E., Yergeau, E. (2014) Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends in Biotechnology* 32, 271-280.

Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Guinet, F., Blaudez, D., Chalot, M. (2007) Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytologist* 174, 151-158.

Berg, B., Ekbohm, G., Söderström, B., Staaf, H. (1991) Reduction of decomposition rates of scots pine needle litter due to heavy-metal pollution. *Water, Air, and Soil Pollution* 59, 165-177.

Bert, V., Allemon, J., Sajet, P., Dieu, S., Papin, A., Collet, S., Gaucher, R., Chalot, M., Michiels, B., Raventos, C. (2017a) Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. *Biomass and Bioenergy* 96, 1-11.

Bert, V., Douay, F., Faure, O., Cadière, F., (2017b) Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués (Nouveaux résultats de recherche et démonstration). ADEME. Ed. ADEME Collection Expertises. ISBN : 979-10-297-0786-5., pp. 1-68.

Bert, V., Girondelot, B., Marseille, F., Laboudigue, A. (2003) Phytostabilization of metal rich dredged sediments. *Phytoremediation inventory, COST Action 837 View*. Ed: T. Vanek and JP Schwitzguébel. ISBN 80-86241-19-X. p67.

Bert, V., Hadj-Sahraoui, A., Leyval, C., Fontaine, J., Ouvrard, S., (2012a) Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués. Etat de l'art et guide de mise en œuvre. ADEME/INERIS. Ed. EDP sciences. ISBN : 978-2-7598-0805-2., pp. 1-86.

Bert, V., Lors, C., Ponge, J.-F., Caron, L., Biaz, A., Dazy, M., Masfarau, J.-F. (2012b) Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* 169, 1-11.

Bert, V., Seuntjens, P., Dejonghe, W., Lacherez, S., Thuy, H.T.T., Vandecasteele, B. (2009) Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 745-764.

Berteau, I., Martin, S., Vassiliadis, A. (1993) Le curage des cours d'eau lorsque les sédiments contiennent des éléments-traces toxiques. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA* 20, 27-35.

Bes, C.M., Mench, M., Aulen, M., Gaste, H., Taberly, J. (2010) Spatial variation of plant communities and shoot Cu concentrations of plant species at a timber treatment site. *Plant and Soil* 330, 267-280.

- Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P. (2007) Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147, 546-553.
- Bissonnette, L., St-Arnaud, M., Labrecque, M. (2010) Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial. *Plant and Soil* 332, 55-67.
- Blaudez, D., Chalot, M. (2011) Characterization of the ER-located zinc transporter ZnT1 and identification of a vesicular zinc storage compartment in *Hebeloma cylindrosporum*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 496-503.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., Chalot, M. (2003) Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and Is an Oligomeric Vacuolar Zinc Transporter with an Essential Leucine Zipper Motif. *The Plant Cell* 15, 2911-2928.
- Boer, J.L., Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P. (2014) Nickel-dependent metalloenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 544, 142-152.
- Boisson, J., Mench, M., Sappin-Didier, V., Solda, P., Vangronsveld, J. (1998) Short-term in situ immobilization of Cd and Ni by beringite and steel shots application to long-term sludged plots. *Agronomie* 18, 347-359.
- Bojarczuk, K., Kieliszewska-Rokicka, B. (2010) Effect of Ectomycorrhiza on Cu and Pb Accumulation in Leaves and Roots of Silver Birch (*Betula pendula* Roth.) Seedlings Grown in Metal-Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 207, 227-240.
- Bolan, N.S., Park, J.H., Robinson, B., Naidu, R., Huh, K.Y., (2011) Chapter four - Phytostabilization: A Green Approach to Contaminant Containment, in: Donald, L.S. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 145-204.
- Bothe, H., Słomka, A. (2017) Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology* 219, 45-61.
- Bourdon, A., (2011) Etude de la faisabilité technico-économique de la phytostabilisation aidée couplée à une valorisation de biomasse. Rapport de stage INERIS.
- Braun-Blanquet, J. (1964) *Pflanzensoziologie, Grundzüge der Vegetationskunde*. Springer, Vienna.
- Brock, J.H., Child, L.E., Waal, L.D.d., Wade, M., (1995) The invasive nature of *Fallopia japonica* is enhanced by vegetative regeneration from stem tissues. SPB Academic Publishing, Amsterdam, pp. 131-139.
- Cabral, L., Soares, C.R.F.S., Giachini, A.J., Siqueira, J.O. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1655-1664.
- Cambier, P., Mench, M., (1998) Contamination des sols par les métaux lourds et autres éléments traces, Sols: interface fragile. INRA-Editions, pp. 161-172.
- Cambier, P., Schwartz, C., Van Oort, F. (2009) Contaminations métalliques des agrosystèmes et écosystèmes péri-industriels. Editions Quae.
- Cappuyns, V., Swennen, R. (2008) The application of pHstat leaching tests to assess the pH-dependent release of trace metals from soils, sediments and waste materials. *Journal of Hazardous Materials* 158, 185-195.
- Castiglione, S., Todeschini, V., Franchin, C., Torrigiani, P., Gastaldi, D., Cicatelli, A., Rinaudo, C., Berta, G., Biondi, S., Lingua, G. (2009) Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: A large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environmental Pollution* 157, 2108-2117.
- Centioli, D., Comans, R.N., Gaudino, S., Galas, C., Belli, M. (2008) Leaching tests: useful tools for the risk assessment of contaminated sediments. *Ann Ist Super Sanita* 44, 252-257.

Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S., Pascual, C. (2012) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology* 46, 13361-13369.

Churchland, C., Grayston, S.J. (2014) Specificity of plant-microbe interactions in the tree mycorrhizosphere biome and consequences for soil C cycling. *Frontiers in Microbiology* 5.

Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappelini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., Chalot, M. (2017) Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environmental and Experimental Botany* 139, 48-56.

Cicatelli, A., Lingua, G., Todeschini, V., Biondi, S., Torrigiani, P., Castiglione, S. (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Annals of Botany* 106, 791-802.

Cicatelli, A., Torrigiani, P., Todeschini, V., Biondi, S., Castiglione, S., Lingua, G. (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi as a tool to ameliorate the phytoremediation potential of poplar: biochemical and molecular aspects. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 7, 333-341.

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

Collet, C., Frochet, H., Ningre, F. (1999) Développement de jeunes chênes soumis à une compétition souterraine. *Revue forestière française* 51, 298-308.

Colombano, S., Saada, A., Guerin, V., Bataillard, P., Bellenfant, G., Beranger, S., Hube, D., Blanc, C., Zornig, C., Girardeau, I., (2010) Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices. Rapport final BRGM-RP-58609-FR, pp. 1-399.

Colpaert, J.V., Wevers, J.H.L., Krznaric, E., Adriaensen, K. (2011) How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science* 68, 17-24.

Colzi, I., Rocchi, S., Rangoni, M., Del Bubba, M., Gonnelli, C. (2014) Specificity of metal tolerance and use of excluder metallophytes for the phytostabilization of metal polluted soils: the case of *Silene paradoxa* L. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 10960-10969.

Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Schulin, R. (2012) A Critical View of Current State of Phytotechnologies to Remediate Soils: Still a Promising Tool? *The Scientific World Journal* 2012, 173829.

Conrad, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews* 60, 609-640.

Cools, N., Vesterdal, L., De Vos, B., Vanguelova, E., Hansen, K. (2014) Tree species is the major factor explaining C:N ratios in European forest soils. *Forest Ecology and Management* 311, 3-16.

Coulaud, J., McNeilly, T. (1992) Zinc tolerance in populations of *Deschampsia cespitosa* (Gramineae) beneath electricity pylons. *Plant Systematics and Evolution* 179, 175-185.

Cox, R.M., Hutchinson, T.C. (1980) Multiple metal tolerances in the grass *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. from the Sudbury smelting area *New Phytologist* 84, 631-647.

CREFF, (2012) Guide technique - Taillis à courte et à très courte rotation. Rapport du projet CREFF, pp. 1-42.

Crowley, D. (2008) Impacts of Metals and Metalloids on Soil Microbial Diversity and Ecosystem Function. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal* 8, 6-11.

Cundy, A.B., Bardos, R.P., Church, A., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Neu, S., Mench, M., Witters, N., Vangronsveld, J. (2013) Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for "gentle" remediation approaches: The European context. *Journal of Environmental Management* 129, 283-291.

- Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Gréville, F., Férard, J.-F., Masfarau, J.-F. (2009) Changes in plant communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* 77, 376-383.
- Delplanque, M., (2010) Etude de la faisabilité technico-économique pour l'application de la phytostabilisation aidée à l'échelle d'un site de dépôt de sédiments contaminés avec valorisation de la biomasse. Rapport de stage INERIS, pp. 1-73.
- Delplanque, M., Collet, S., Del Gratta, F., Schnuriger, B., Gaucher, R., Robinson, B., Bert, V. (2013) Combustion of *Salix* used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass and Bioenergy* 49, 160-170.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. (2006) Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5069-5072.
- Di Bonito, M., Lofts, S., Groenenberg, J.E., (2018) Chapter 11 - Models of Geochemical Speciation: Structure and Applications A2 - Vivo, Benedetto De, in: Belkin, H.E., Lima, A. (Eds.), *Environmental Geochemistry* (Second Edition). Elsevier, pp. 237-305.
- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M., Schulín, R., Robinson, B.H. (2008) Trace element accumulation in woody plants of the Guadamar Valley, SW Spain: A large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution* 152, 50-59.
- Dommanget, F., Breton, V., Forestier, O., Poupart, P., Daumergue, N., Evette, A. (2015) Contrôler des renouées invasives par les techniques de génie écologique: retours d'expérience sur la restauration de berges envahies. *Revue d'écologie* 70, 215-228.
- Doré, C., Varoquaux, F. (2006) Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Editions Quae.
- Dubourguier, H., Petit, D., Deram, A., Logeay, C. (2001) Le phytomanagement, Eléments de synthèse. Pôle de compétence sites et sédiments pollués, Lille.
- Dučić, T., Polle, A. (2005) Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 103-112.
- Dupraz, C., Liagre, F. (2008) Agroforesterie: des arbres et des cultures. France Agricole Editions.
- Durand, A., Maillard, F., Alvarez-Lopez, V., Guinchart, S., Bertheau, C., Valot, B., Blaudez, D., Chalot, M. (2018) Bacterial diversity associated with poplar trees grown on a Hg-contaminated site: Community characterization and isolation of Hg-resistant plant growth-promoting bacteria. *Science of The Total Environment* 622-623, 1165-1177.
- Durand, A., Maillard, F., Foulon, J., Gweon, H.S., Valot, B., Chalot, M. (2017) Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microbial Ecology* 74, 795-809.
- Enell, A., Andersson-Sköld, Y., Vestin, J., Wagelmans, M. (2016) Risk management and regeneration of brownfields using bioenergy crops. *Journal of Soils and Sediments* 16, 987-1000.
- Ernst & Young, (2012) Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et eaux souterraines pollués en France – Synthèse des données 2010. Rapport final ADEME, 1-114.
- European Commission, (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment, pp. 1-337.
- European Commission, (2007) European Union Risk Assessment Report, cadmium metal and cadmium oxide, European Chemicals Bureau. Institute for Health and Consumer Protection, pp. 1-703.
- European Commission, (2010) European Union Risk Assessment Report, zinc metal pp. 1-695.
- Evangelou, M.W., Deram, A. (2014) Phytomanagement: a realistic approach to soil remediate phyto-technologies with new challenges for plant science. *Int J Plant Biol Res* 2, 1023.

-
- Evangelou, M.W.H., Deram, A., Gogos, A., Studer, B., Schulin, R. (2012) Assessment of suitability of tree species for the production of biomass on trace element contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 209–210, 233-239.
- Fales, S.L., Wakefield, R.C. (1981) Effects to Turfgrass on the Establishment of Woody Plants. *Agronomy Journal* 73, 605-610.
- Faucon, M.-P., Houben, D., Lambers, H. (2017) Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. *Trends in Plant Science* 22, 385-394.
- Feigl, G., Lehotai, N., Molnár, Á., Ördög, A., Rodríguez-Ruiz, M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Erdei, L., Kolbert, Z. (2015) Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of Botany* 116, 613-625.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Cabral, D., Salgado, M.A. (2008) Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment* 136, 267-275.
- Fernández-Calviño, D., Arias-Estévez, M., Díaz-Raviña, M., Bååth, E. (2011) Bacterial pollution induced community tolerance (PICT) to Cu and interactions with pH in long-term polluted vineyard soils.
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *The Indian journal of medical research* 128, 501-523.
- Foulon, J., Zappelini, C., Durand, A., Valot, B., Blaudez, D., Chalot, M. (2016a) Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *Fems Microbiology Ecology* 92.
- Foulon, J., Zappelini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., Chalot, M. (2016b) Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Science of The Total Environment* 571, 1230-1240.
- Frangi, J.P., Richard, D. (1997) Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Science of The Total Environment* 205, 71-79.
- Frochot, H., Picard, J., Dreyfus, P. (1986) La végétation herbacée, obstacle aux plantations. *Revue Forestière Française*, 1986, 3, fascicule thématique " Production des plants forestiers et plantations".
- Gallet, C., Pellissier, F. (2002) Interactions allélopathiques en milieu forestier. *Revue forestière française* 54, 567-576.
- Garbaye, J. (2013) *La symbiose mycorhizienne : une association entre les plantes et les champignons*. Editions Quae.
- Garbaye, J., Courrier, G., Masar, L., (1980) Nutrition minérale et production des peupliers «Robusta» et «I-214» en populiculture traditionnelle dans le nord du bassin parisien, *Annales des Sciences Forestières*. EDP Sciences, pp. 159-172.
- Garcia, L., Welchen, E., Gonzalez, D.H. (2014) Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* 19, Part B, 269-274.
- Garg, N., Aggarwal, N. (2011) Effects of Interactions Between Cadmium and Lead on Growth, Nitrogen Fixation, Phytochelatin, and Glutathione Production in Mycorrhizal *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Journal of Plant Growth Regulation* 30, 286-300.
- Garg, N., Aggarwal, N. (2012) Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. *Plant Growth Regulation* 66, 9-26.
- Giachetti, G., Sebastiani, L. (2006) Development and chromium uptake in hybrid poplars cultivated on substrate polluted with industrial slags. *Advances in Horticultural Science* 20, 193-198.

- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389-1414.
- González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., Nichols, K.A. (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130, 317-323.
- González-Oreja, J.A., Rozas, M.A., Alkorta, I., Garbisu, C., (2008) Dendroremediation of Heavy Metal Polluted Soils, *Reviews on Environmental Health*, p. 223.
- Grisson, C. (2015) Combining phytoextraction and ecocatalysis: a novel concept for greener chemistry, an opportunity for remediation. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5589-5591.
- Guérard, N., Barthélémy, D., Cabanettes, A., Courdier, F., Trichet, P. (2001) Influence de la compétition herbacée sur la croissance et l'architecture de jeunes Chênes rouges d'Amérique (*Quercus rubra* L.) en plantation. *Annals of Forest Science* 58, 395-410.
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465, 190-198.
- Gweon, H.S., Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D.S., Griffiths, R.I., Schonrogge, K. (2015) PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 973-980.
- Harmsen, J. (2007) Measuring Bioavailability: From a Scientific Approach to Standard Methods All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. *Journal of environmental quality* 36, 1420-1428.
- Hodson, M.E. (2004) Heavy metals - geochemical bogey men? *Environmental Pollution* 129, 341-343.
- Hooda, P. (2010) Trace elements in soils. John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
- Hugenholtz, P. (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3, reviews0003.0001-reviews0003.0008.
- Huguet, S., Isaure, M.-P., Bert, V., Laboudigue, A., Proux, O., Flank, A.-M., Vantelon, D., Sarret, G. (2015) Fate of cadmium in the rhizosphere of *Arabidopsis halleri* grown in a contaminated dredged sediment. *Science of The Total Environment* 536, 468-480.
- INERIS, (2006) Eléments traces métalliques - Guide méthodologique - Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01a. INERIS, pp. 1-138.
- Isaure, M.-P., Laboudigue, A., Manceau, A., Sarret, G., Tiffreau, C., Trocellier, P., Lamble, G., Hazemann, J.-L., Chateigner, D. (2002) Quantitative Zn speciation in a contaminated dredged sediment by μ -PIXE, μ -SXRF, EXAFS spectroscopy and principal component analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 1549-1567.
- Isaure, M.-P., Manceau, A., Geoffroy, N., Laboudigue, A., Tamura, N., Marcus, M.A. (2005) Zinc mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 1173-1198.
- ISO 10304-1 (2009) Qualité de l'eau - Dosage des anions dissous par chromatographie des ions en phase liquide - Partie 1 : dosage du bromure, chlorure, fluorure, nitrate, nitrite, phosphate et sulfate.
- ISO 10390, (2005) Qualité du sol -- Détermination du pH.
- ISO 11269-2, (2005) Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 2: Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.

ISO 11348-3, (2007) Qualité de l'eau - Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) - Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées.

ISO 12782-1, (2012) Qualité du sol - Paramètres pour la modélisation géochimique de la lixiviation et de la spéciation des constituants des sols et des matériaux - Partie 1 : extraction des oxydes et hydroxydes de fer amorphe à l'acide ascorbique.

ISO 12782-2 (2012) Qualité du sol - Paramètres pour la modélisation géochimique de la lixiviation et de la spéciation des constituants des sols et des matériaux - Partie 2: Extraction des oxydes et hydroxydes de fer cristallin avec le dithionite.

ISO 12782-3, (2012) Qualité du sol - Paramètres pour la modélisation géochimique de la lixiviation et de la spéciation des constituants des sols et des matériaux - Partie 3 : extraction des oxydes et hydroxydes d'aluminium à l'acide oxalique et à l'oxalate d'ammonium.

ISO 14235, (1998) Qualité du sol - Dosage du carbone organique par oxydation sulfochromique.

ISO 17402, (2011) Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol.

ISO 17512-1, (2008) Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).

ISO 19204, (2017) Soil quality - Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach).

ISO 20666, (2009) Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Brachionus calyciflorus* en 48 h.

ISO 22030, (2011) Qualité du sol - Méthodes biologiques - Toxicité chronique sur les plantes supérieures.

Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2008) Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *Journal of Plant Physiology* 165, 1429-1437.

Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., Haq, Q.M.R. (2015) Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 29592-29630.

Järup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182.

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.-M. (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37, 1-16.

Jensen, J., Pedersen, M.B., (2006) Ecological Risk Assessment of Contaminated Soil, in: Albert, L.A., de Voogt, P., Gerba, C.P., Hutzinger, O., Knaak, J.B., Mayer, F.L., Morgan, D.P., Park, D.L., Tjeerdema, R.S., Whitacre, D.M., Yang, R.S.H., Ware, G.W., Nigg, H.N., Doerge, D.R., Gunther, F.A. (Eds.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*. Springer New York, New York, NY, pp. 73-105.

Jug, A., Makeschin, F., Rehfuss, K.E., Hofmann-Schielle, C. (1999) Short-rotation plantations of balsam poplars, aspen and willows on former arable land in the Federal Republic of Germany. III. Soil ecological effects. *Forest Ecology and Management* 121, 85-99.

Julien, P.Y. (2010) *Erosion and sedimentation*. Cambridge University Press.

Kabata-Pendias, A. (2004) Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.

Kabata-Pendias, A. (2010) *Trace elements in soils and plants*. CRC, Boca Raton, FL [etc.].

- Kalra, Y. (1998) Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C. (2009) Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 67, 243-259.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Olga Janssen, J., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M. (2015) Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation* 17, 1005-1037.
- Kohli, R.K., (1998) Allelopathic Interactions in Forestry Systems, in: Sassa, K. (Ed.), *Environmental Forest Science: Proceedings of the IUFRO Division 8 Conference Environmental Forest Science*, held 19–23 October 1998, Kyoto University, Japan. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 269-283.
- Kolb, T.E. (1988) Allelopathic effects of Kentucky Bluegrass on Northern Red Oak and Yellow-Poplar. *Journal of Arboriculture* 14, 281-283.
- Kõljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G.W., Hartmann, M., Kirk, P.M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B.D., Lücking, R., Martín, M.P., Matheny, P.B., Nguyen, N.H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K.G., Peintner, U., Peterson, M., Põldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J.A., Senés, C., Smith, M.E., Suija, A., Taylor, D.L., Telleria, M.T., Weiss, M., Larsson, K.-H. (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22, 5271-5277.
- Konlechner, C., Türktaş, M., Langer, I., Vaculík, M., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., Hauser, M.-T. (2013) Expression of zinc and cadmium responsive genes in leaves of willow (*Salix caprea* L.) genotypes with different accumulation characteristics. *Environmental Pollution* 178, 121-127.
- Krpatá, D., Peintner, U., Langer, I., Fitz, W.J., Schweiger, P. (2008) Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycological Research* 112, 1069-1079.
- Kucharski, R., Sas-Nowosielska, A., Małkowski, E., Japenga, J., Kuperberg, J.M., Pogrzeba, M., Krzyżak, J. (2005) The use of indigenous plant species and calcium phosphate for the stabilization of highly metal-polluted sites in southern Poland. *Plant and Soil* 273, 291-305.
- Kumpiene, J., Bert, V., Dimitriou, I., Eriksson, J., Friesl-Hanl, W., Galazka, R., Herzig, R., Janssen, J., Kidd, P., Mench, M., Müller, I., Neu, S., Oustriere, N., Puschenreiter, M., Renella, G., Roumier, P.-H., Siebielec, G., Vangronsveld, J., Manier, N. (2014) Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Science of The Total Environment* 496, 510-522.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C. (2008) Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management* 28, 215-225.
- Labbé, J.L., Weston, D.J., Dunkirk, N., Pelletier, D.A., Tuskan, G.A. (2014) Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*. *Frontiers in Plant Science* 5, 579.
- Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E., Chalot, M., Blaudez, D. (2016) New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrhiza* 26, 657-671.
- Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 39-46.
- Lamy, I., Van Oort, F., Dère, C., Baize, D. (2006) Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European Journal of Soil Science* 57, 731-740.
- Langer, R.H.M., Hill, G.D. (1991) *Agricultural plants*. Cambridge University Press.
- Läuchli, A., Bielecki, R.L. (1983) *Inorganic plant nutrition*. Springer-Verlag.

-
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., Ceulemans, R. (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 131, 485-494.
- Le Forestier, L., Motelica-Heino, M., Le Coustumer, P., Mench, M. (2017) Phytostabilisation of a copper contaminated topsoil aided by basic slags: assessment of Cu mobility and phytoavailability. *Journal of Soils and Sediments* 17, 1262-1271.
- Lesven, L., Lourino-Cabana, B., Billon, G., Recourt, P., Ouddane, B., Mikkelsen, O., Boughriet, A. (2010) On metal diagenesis in contaminated sediments of the Deûle river (northern France). *Applied Geochemistry* 25, 1361-1373.
- Lettons, S., Vandecasteele, B., De Vos, B., Vansteenkiste, D., Verschelde, P. (2011) Intra- and inter-annual variation of Cd, Zn, Mn and Cu in foliage of poplars on contaminated soil. *Science of The Total Environment* 409, 2306-2316.
- Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., Louwagie, G., (2014) Progress in the management of contaminated sites in Europe. European Commission - Joint Research Centre - Institute for Environment and Sustainability, Luxembourg, pp. 1-68.
- Lignoguide, (2013) Guide d'aide au choix des cultures lignocellulosiques. RMT Biomasse, pp. 1-211.
- Lingua, G., Franchin, C., Todeschini, V., Castiglione, S., Biondi, S., Burlando, B., Parravicini, V., Torrigiani, P., Berta, G. (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* 153, 137-147.
- Lions, J., Guérin, V., Bataillard, P., van der Lee, J., Laboudigue, A. (2010) Metal availability in a highly contaminated, dredged-sediment disposal site: Field measurements and geochemical modeling. *Environmental Pollution* 158, 2857-2864.
- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., Cuypers, A. (2017) Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Lopareva-Pohu, A., Pourrut, B., Waterlot, C., Garçon, G., Bidar, G., Pruvot, C., Shirali, P., Douay, F. (2011) Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial: Part 1. Influence on soil parameters and metal extractability. *Science of The Total Environment* 409, 647-654.
- Louriño-Cabana, B., Lesven, L., Charriau, A., Billon, G., Ouddane, B., Boughriet, A. (2011) Potential risks of metal toxicity in contaminated sediments of Deûle river in Northern France. *Journal of Hazardous Materials* 186, 2129-2137.
- Ma, X., Zhu, S., Ai, S., Liu, B., Zhang, W., Zhang, Y. (2016a) Density-dependent Accumulation of Heavy Metals in Spring Wheat (*Triticum Aestivum*) and the Risk Assessment from Weak Alkaline Soils, Northwest of China. *International Journal of Agricultural Science and Technology* 4, 7.
- Ma, Y., Oliveira, R.S., Freitas, H., Zhang, C. (2016b) Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Madejón, P., Ciadamidaro, L., Marañón, T., Murillo, J.M. (2012) Long-Term Biomonitoring of Soil Contamination Using Poplar Trees: Accumulation of Trace Elements in Leaves and Fruits. *International Journal of Phytoremediation* 15, 602-614.
- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M., Robinson, B. (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* 132, 145-155.
- Makeschin, F. (1994) Effects of energy forestry on soils. *Biomass and Bioenergy* 6, 63-79.
- Marchand, L., Lamy, P., Bert, V., Quintela-Sabaris, C., Mench, M. (2016a) Potential of *Ranunculus acris* L. for biomonitoring trace element contamination of riverbank soils: photosystem II activity and phenotypic responses for two soil series. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 3104-3119.

- Marchand, L., Pelosi, C., González-Centeno, M.R., Maillard, A., Ourry, A., Galland, W., Teissedre, P.-L., Bessoule, J.-J., Mongrand, S., Morvan-Bertrand, A., Zhang, Q., Grosbellet, C., Bert, V., Oustrière, N., Mench, M., Brunel-Muguet, S. (2016b) Trace element bioavailability, yield and seed quality of rapeseed (*Brassica napus* L.) modulated by biochar incorporation into a contaminated technosol. *Chemosphere* 156, 150-162.
- Marron, N., Beimgraben, T., Bes de Berc, L. (2012) Cost reduction and efficiency improvement of short rotation coppice. CCREP Final Report, Champenoux.
- Martín-García, J., Merino, A., Díez, J.J. (2012) Relating visual crown conditions to nutritional status and site quality in monoclonal poplar plantations (*Populus × euramericana*). *European Journal of Forest Research* 131, 1185-1198.
- McCune, B., Grace, J.B., Urban, D.L. (2002) Analysis of ecological communities. MjM Software Design.
- McGrath, S.P., Zhao, F.-J. (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 277-282.
- MEDD, (2006) Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée à l'article R. 214-1 du code de l'environnement. Texte n°15. Journal Officiel de la République Française.
- MEDDE (2013) Arrêté du 24 septembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 2910-B de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. Texte n° 10. Journal Officiel de la République Française.
- MEEM, (2017) Introduction à la méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués. Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, pp. 1-27.
- Meeussen, J.C.L. (2003) ORCHESTRA: An Object-Oriented Framework for Implementing Chemical Equilibrium Models. *Environmental Science & Technology* 37, 1175-1182.
- Meharg, A.A. (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycological Research* 107, 1253-1265.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. (1991) The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis capillaris* L. *New Phytologist* 119, 291-297.
- Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. (2015) Physiological and Cytological Responses of *Deschampsia cespitosa* and *Populus tremuloides* to Soil Metal Contamination. *Water, Air, & Soil Pollution* 226, 1-12.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., Cornejo, P. (2012a) Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 741-775.
- Meier, S., Borie, F., Curaqueo, G., Bolan, N., Cornejo, P. (2012b) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. *Applied Soil Ecology* 61, 280-287.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schröder, P., Vangronsveld, J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1039-1070.
- Mench, M., Schwitzguébel, J.-P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S. (2009) Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 876.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Bleeker, P., Ruttens, A., Gebelen, W., Lepp, N., (2006) Phytostabilisation of metal-contaminated sites, in: Morel, J.-L., Echevarria, G., Goncharova, N. (Eds.), *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 109-190.

-
- Mench, M., Vangronsveld, J., Didier, V., Clijsters, H. (1994) Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environmental Pollution* 86, 279-286.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Lepp, N., Geebelen, W., Bleeker, P. (2007) Use of Soil amendments to attenuate trace element exposure: sustainability, side effects, and failures.
- Mendez, M.O., Maier, R.M. (2008) Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments— An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives* 116, 278-283.
- Mertens, J., Springael, D., De Troyer, I., Cheyns, K., Wattiau, P., Smolders, E. (2006a) Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environmental Microbiology* 8, 2170-2178.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Meers, E., Tack, F.M.G. (2006b) Seasonal Changes of Metals in Willow (*Salix* sp.) Stands for Phytoremediation on Dredged Sediment. *Environmental Science & Technology* 40, 1962-1968.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Schrijver, A.D., Luysaert, S. (2004) Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of The Total Environment* 326, 209-215.
- Météofrance, (2016) Données climatiques. <http://www.meteofrance.com/climat/france>.
- Météofrance, (2017) Données climatiques. <http://www.meteofrance.com/climat/france>.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., Blaudez, D. (2009) Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 204, 89.
- Mitchell, R.J., Auld, M.H.D., Le Duc, M.G., Robert, M.H. (2000) Ecosystem stability and resilience: a review of their relevance for the conservation management of lowland heaths. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3, 142-160.
- Mondaca, P., Catrin, J., Verdejo, J., Sauvé, S., Neaman, A. (2017) Advances on the determination of thresholds of Cu phytotoxicity in field-contaminated soils in central Chile. *Environmental Pollution* 223, 146-152.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., Chalot, M. (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8, 107-107.
- Morrissey, J., Guerinot, M.L. (2009) Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chemical reviews* 109, 4553-4567.
- Mourato, M.P., Moreira, I.N., Leitão, I., Pinto, F.R., Sales, J.R., Louro Martins, L. (2015) Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus *Brassica*. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 17975-17998.
- Mouvet, C., Piantone, P., (2008) Sédiments, groupe de réflexion usage et gestion. Rapport final, BRGM/RP-59859-FR, pp. 1-360.
- Mrnka, L., Kuchár, M., Cieslarová, Z., Matějka, P., Száková, J., Tlustoš, P., Vosátka, M. (2012) Effects of Endo- and Ectomycorrhizal Fungi on Physiological Parameters and Heavy Metals Accumulation of Two Species from the Family Salicaceae. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 399-410.
- NF EN 14984 (2006) Amendements minéraux basiques - Détermination de l'impact d'un produit sur le pH du sol - Méthode par incubation du sol - Norme annulée le 03/09/2016.
- NF EN 14997, (2015) Caractérisation des déchets - Essais de comportement à la lixiviation - Influence du pH sur la lixiviation avec contrôle continu du pH.
- NF U44-001, (2009) Amendements minéraux basiques - Dénominations et spécifications.
- NF X31-107 (2003) Qualité du sol - Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol - Méthode à la pipette.

- Nirola, R., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Aryal, R., Correll, R., Naidu, R. (2016) Assessment of metal toxicity and bioavailability in metallophyte leaf litters and metalliferous soils using *Eisenia fetida* in a microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129, 264-272.
- O'Day, P.A., Vlassopoulos, D. (2010) Mineral-Based Amendments for Remediation. *Elements* (Quebec, Quebec) 6, 375-381.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Rineau, F., Smits, M., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. (2015) Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environmental Microbiology* 17, 2035-2047.
- Pal, P.K., Singh, R.D., Prasad, R. (2012) Non-destructive estimation of chlorophyll and nitrogen content in leaf of *Rosa damascena* (Mill). *Soil Science and Plant Nutrition* 58, 604-610.
- Palmer, C., Guerinot, M.L. (2009) A Question of Balance: Facing the challenges of Cu, Fe and Zn Homeostasis. *Nature chemical biology* 5, 333-340.
- Pandey, V.C., Prakash, P., Bajpai, O., Kumar, A., Singh, N. (2015) Phytodiversity on fly ash deposits: evaluation of naturally colonized species for sustainable phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 2776-2787.
- Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., Laboudigue, A., Marcus, M.A., Ahamdach, N., Libert, M.-F. (2005) The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 2265-2284.
- Parry, C., Blonquist, J.M., Bugbee, B. (2014) In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell & Environment* 37, 2508-2520.
- Pavel, P.-B., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Diacu, E., Barbu, C.H. (2014) Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis* × *giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Science of The Total Environment* 479-480, 125-131.
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M., Blaudez, D., Chalot, M., Sanders, D. (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8532-8537.
- Phanthavongsa, P., (2012) La phytostabilisation aidée de sédiments de curage contaminés par les métaux : pérennité et gestion. Rapport de stage M2.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., Bert, V. (2017) Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environmental and Experimental Botany* 143, 72-81.
- Piou, S., Bataillard, P., Laboudigue, A., Férard, J.-F., Masfaraud, J.-F. (2009) Changes in the geochemistry and ecotoxicity of a Zn and Cd contaminated dredged sediment over time after land disposal. *Environmental Research* 109, 712-720.
- Pollard, A.J., Reeves, R.D., Baker, A.J.M. (2014) Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* 217-218, 8-17.
- Polle, A., Douglas, C. (2010) The molecular physiology of poplars: paving the way for knowledge-based biomass production. *Plant Biology* 12, 239-241.
- Pottier, M., García de la Torre, V.S., Victor, C., David, L.C., Chalot, M., Thomine, S. (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environmental Pollution* 199, 73-82.
- Pourret, O., Bollinger, J.-C. (2018) "Heavy metal" - What to do now: To use or not to use? *Science of The Total Environment* 610, 419-420.

Pourrut, B., Lopareva-Pohu, A., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Waterlot, C., Bidar, G., Shirali, P., Douay, F. (2011) Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial: Part 2. Influence on plants. *Science of The Total Environment* 409, 4504-4510.

Prasad, M.N.V. (2001) *Metals in the environment: analysis by biodiversity*. CRC Press.

Pulford, I.D., Watson, C. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* 29, 529-540.

Quevauviller, P. (2007) Fractionnement d'éléments pour étude dans l'environnement. *Techniques de l'ingénieur Analyses dans l'environnement : méthodologies base documentaire : TIB382DUO*.

Quevauviller, P., Rauret, G., López-Sánchez, J.-F., Rubio, R., Ure, A., Muntau, H. (1997) Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of The Total Environment* 205, 223-234.

Quintela-Sabaris, C., Marchand, L., Kidd, P.S., Friesl-Hanl, W., Puschenreiter, M., Kumpiene, J., Müller, I., Neu, S., Janssen, J., Vangronsveld, J., Dimitriou, I., Siebielec, G., Gałazka, R., Bert, V., Herzig, R., Cundy, A.B., Oustrière, N., Kolbas, A., Galland, W., Mench, M. (2017) Assessing phytotoxicity of trace element-contaminated soils phytomanaged with gentle remediation options at ten European field trials. *Science of The Total Environment* 599–600, 1388-1398.

R Core Team, (2015) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

R Core Team, (2017) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 30, 1562-1574.

Rasmussen, L.D., Sørensen, S.J. (2001) Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *Fems Microbiology Ecology* 36, 1-9.

Rastogi, G., Sani, R.K., (2011) *Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment*, in: Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J. (Eds.), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer New York, New York, NY, pp. 29-57.

RECORD, (2017) Impacts écologiques de sédiments pollués extraits et déposés en milieux terrestres. *Etat des connaissances et évaluation des risques pour les écosystèmes*. n°14-1023/1A, pp. 1-308.

Reddy, M.S., Kour, M., Aggarwal, S., Ahuja, S., Marmeisse, R., Fraissinet-Tachet, L. (2016) Metal induction of a *Pisolithus albus* metallothionein and its potential involvement in heavy metal tolerance during mycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology* 18, 2446-2454.

Remon, E., Bouchardon, J.L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J.C., Faure, O. (2005) Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137, 316-323.

Rieuwerts, J., Thornton, I., Farago, M., Ashmore, M. (1998) Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation & Bioavailability* 10, 61-75.

Robinson, B., Mills, T., Petit, D., Fung, L., Green, S., Clothier, B. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227, 301-306.

Robinson, B.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Schulin, R. (2009) The Phytomanagement of Trace Elements in Soil. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28, 240-266.

Rodgers, K.J., Hursthouse, A., Cuthbert, S. (2015) The Potential of Sequential Extraction in the Characterisation and Management of Wastes from Steel Processing: A Prospective Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 11724-11755.

- Rogers, P., Arthur, C., Soriguer, R. (1994) The rabbit in continental Europe. The European rabbit: the history and biology of a successful colonizer. Oxford University Press, Oxford, 22-63.
- Rousseaux, L. (2013) Evaluation de l'efficacité et de la pérennité de la phytostabilisation aidée couplée à une valorisation de la biomasse produite en filière bois-énergie. Rapport de stage M2.
- Ruttens, A., Boulet, J., Weyens, N., Smeets, K., Adriaensen, K., Meers, E., Van Slycken, S., Tack, F., Meiresonne, L., Thewys, T., Witters, N., Carleer, R., Dupae, J., Vangronsveld, J. (2011) Short Rotation Coppice Culture of Willows and Poplars as Energy Crops on Metal Contaminated Agricultural Soils. *International Journal of Phytoremediation* 13, 194-207.
- Salehi, A., Tabari, M., Goltapeh, E., Shirvany, A., Mirzaei, J. (2016) Effect of mycorrhizal inoculation on black and white poplar in a lead-polluted soil.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995) Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nat Biotech* 13, 468-474.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E. (2000) Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 34, 1125-1131.
- Schenkeveld, W.D.C., Oburger, E., Gruber, B., Schindlegger, Y., Hann, S., Puschenreiter, M., Kraemer, S.M. (2014) Metal mobilization from soils by phytosiderophores – experiment and equilibrium modeling. *Plant and Soil* 383, 59-71.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.
- Schmidt, S.B., Jensen, P.E., Husted, S. (2016) Manganese Deficiency in Plants: The Impact on Photosystem II. *Trends in Plant Science* 21, 622-632.
- Schneider, G. (2001) Le curage des sédiments des cours d'eau. *Courrier de l'environnement de l'INRA*, 146-147.
- Schnitzler, A., Muller, S. (1998) Ecologie et biogéographie de plantes hautement invasives en Europe: les Renouées géantes du Japon (*Fallopia japonica* et *F. sachalinensis*). *Revue d'écologie* 53, 3-38.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241.
- Science Communication Unit, (2013) Science for Environment Policy In-depth Report: Soil Contamination: Impacts on Human Health. Report produced for the European Commission DG Environment. University of the West of England, Bristol University of the West of England, Bristol pp. 1-29.
- Seiger, L.A., Merchant, H.C. (1997) Mechanical control of Japanese knotweed (*Fallopia japonica* [Houtt.] Ronse Decraene): effects of cutting regime on rhizomatous reserves. *Natural Areas Journal* 17, 341-345.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R., Brunner, I. (2005) Contribution of Ectomycorrhizal Fungi to Cadmium Uptake of Poplars and Willows from a Heavily Polluted Soil. *Plant and Soil* 277, 245-253.
- Selosse, M.A., Le Tacon, F. (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* 13, 15-20.
- Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z.K., Gunter, L., Labbé, J., Muchero, W., Bonito, G., Vilgalys, R., Tuskan, G., Podar, M., Schadt, C.W. (2013) A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees. *PLOS ONE* 8, 1-12.

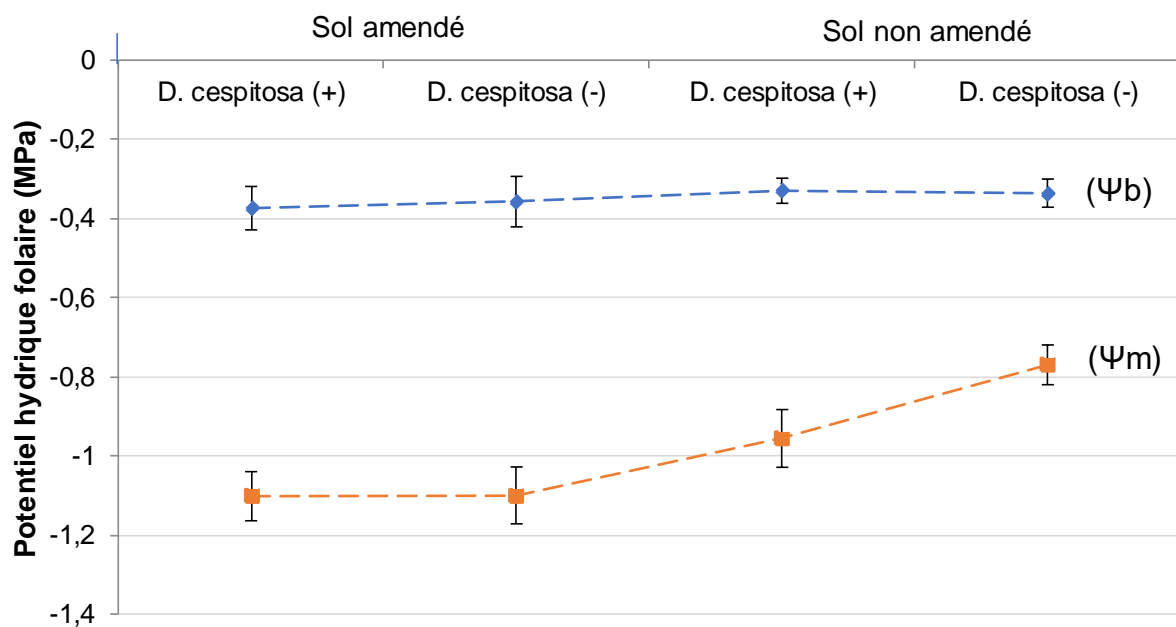
-
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31, 739-753.
- Shao, J.F., Yamaji, N., Shen, R.F., Ma, J.F. (2017) The Key to Mn Homeostasis in Plants: Regulation of Mn Transporters. *Trends in Plant Science* 22, 215-224.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P. (2009) Phytomining: A review. *Minerals Engineering* 22, 1007-1019.
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J., Teste, F.P. (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26, 39-60.
- Singh, S.P., Tack, F.M., Verloo, M.G. (1998) Land disposal of heavy metal contaminated dredged sediments: a review of environmental aspects. *Land Contamination & Reclamation* 6, 149-158.
- Sinnett, D.E., Hodson, M.E., Hutchings, T.R. (2009) Food-chain transfer of cadmium and zinc from contaminated *Urtica dioica* to *Helix Aspersa* and *Lumbricus Terrestris*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1756-1766.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M., Smith, F.A. (2011) Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology* 156, 1050.
- Smith, S.E., Read, D. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* Third ed. Academic Press, London.
- Solti, Á., Sárvári, É., Tóth, B., Basa, B., Lévai, L., Fodor, F. (2011) Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 494-498.
- Stephens, S.R., Alloway, B.J., Carter, J.E., Parker, A. (2001) Towards the characterisation of heavy metals in dredged canal sediments and an appreciation of 'availability': two examples from the UK. *Environmental Pollution* 113, 395-401.
- Streeter, D. (2011) *Guide Delachaux des fleurs de France et d'Europe*. Delachaux et Niestlé.
- Sundaray, S.K., Nayak, B.B., Lin, S., Bhatta, D. (2011) Geochemical speciation and risk assessment of heavy metals in the river estuarine sediments—A case study: Mahanadi basin, India. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1837-1846.
- Tack, F.M., Callewaert, O.W.J.J., Verloo, M.G. (1996) Metal solubility as a function of pH in a contaminated, dredged sediment affected by oxidation. *Environmental Pollution* 91, 199-208.
- Taylor, K. (2009) Biological Flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *Journal of Ecology* 97, 1436-1458.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., Smith, M.E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., Piepenbring, M., Phosri, C., Peterson, M., Parts, K., Pärtel, K., Otsing, E., Nouhra, E., Njouonkou, A.L., Nilsson, R.H., Morgado, L.N., Mayor, J., May, T.W., Majuakim, L., Lodge, D.J., Lee, S.S., Larsson, K.-H., Kohout, P., Hosaka, K., Hiiesalu, I., Henkel, T.W., Harend, H., Guo, L.-d., Greslebin, A., Grelet, G., Geml, J., Gates, G., Dunstan, W., Dunk, C., Drenkhan, R., Dearnaley, J., De Kesel, A., Dang, T., Chen, X., Buegger, F., Brearley, F.Q., Bonito, G., Anslan, S., Abell, S., Abarenkov, K. (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346.
- Tian, S., Cacho, J.F., Youssef, M.A., Chescheir, G.M., Fischer, M., Nettles, J.E., King, J.S. (2017) Switchgrass growth and pine-switchgrass interactions in established intercropping systems. *GCB Bioenergy* 9, 845-857.
- Tixier, H., Duncan, P., Scehovic, J., Yant, A., Gleizes, M., Lila, M. (1997) Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry, and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology* 242, 229-245.
- Torquebiau, E. (2007) *L'agroforesterie: des arbres et des champs*. L'Harmattan.

- Touceda-González, M., Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, Á., Rodríguez-Garrido, B., Trasar-Cepeda, C., Mench, M., Puschenreiter, M., Quintela-Sabarís, C., Macías-García, F., Kidd, P.S. (2017) Aided phytostabilisation reduces metal toxicity, improves soil fertility and enhances microbial activity in Cu-rich mine tailings. *Journal of Environmental Management* 186, Part 2, 301-313.
- Tricker, P.J., Pecchiari, M., Bunn, S.M., Vaccari, F.P., Peressotti, A., Miglietta, F., Taylor, G. (2009) Water use of a bioenergy plantation increases in a future high CO₂ world. *Biomass and Bioenergy* 33, 200-208.
- Van Damme, A., Degryse, F., Smolders, E., Sarret, G., Dewit, J., Rudy, S., Manceau, A. (2010) Zinc speciation in mining and smelter contaminated overbank sediments by EXAFS spectroscopy.
- 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., Mulligan, D.R. (2015) Agromining: Farming for Metals in the Future? *Environmental Science & Technology* 49, 4773-4780.
- Van Der Heijden, M.G.A., Horton, T.R. (2009) Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97, 1139-1150.
- van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.-A., Sanders, I.R. (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205, 1406-1423.
- van der Maarel, E. (2007) Transformation of cover-abundance values for appropriate numerical treatment - Alternatives to the proposals by Podani. *Journal of Vegetation Science* 18, 767-770.
- Van der Sloot, H., Van Zomeren, A., Dijkstra, J., Meeussen, J., Comans, R., Scharff, H., (2005) Prediction of the leaching behaviour of waste mixtures by chemical speciation modelling based on a limited set of key parameters, Tenth International Waste Management and Landfill Symposium, Sardinia, Italy. Report ECN-RX-05-164, Environmental Sanitary Engineering Centre, Cagliari. Energy Research Centre of the Netherlands, Petten, www.ecn.nl.
- van Hullebusch, E.D., Lens, P.N.L., Tabak, H.H. (2005) Developments in Bioremediation of Soils and Sediments Polluted with Metals and Radionuclides. 3. Influence of Chemical Speciation and Bioavailability on Contaminants Immobilization/Mobilization Bio-processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4, 185-212.
- Van Slycken, S., Witters, N., Meiresonne, L., Meers, E., Ruttens, A., Van Peteghem, P., Weyens, N., Tack, F.M.G., Vangronsveld, J. (2013) Field Evaluation of Willow Under Short Rotation Coppice for Phytomanagement of Metal-Polluted Agricultural Soils. *International Journal of Phytoremediation* 15, 677-689.
- Vanbeveren, S.P.P., Gebauer, R., Plichta, R., Volařík, D., Ceulemans, R. (2016) Nutrients and energy in proleptic branches and leaves of poplar under a short-rotation coppice. *Biomass and Bioenergy* 85, 271-277.
- Vandecasteele, B., De Vos, B., Tack, F.M.G. (2002) Cadmium and Zinc uptake by volunteer willow species and elder rooting in polluted dredged sediment disposal sites. *Science of The Total Environment* 299, 191-205.
- Vandecasteele, B., Lauriks, R., De Vos, B., Tack, F.M. (2003) Cd and Zn concentration in hybrid poplar foliage and leaf beetles grown on polluted sediment-derived soils. *Environ Monit Assess* 89, 263-283.
- Vandecasteele, B., Meers, E., Vervaeke, P., Vos, B.D., Quataert, P., Tack, F.M.G. (2005) Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere* 58, 995-1002.
- Vandecasteele, B., Quataert, P., De Vos, B., Tack, F.M.G., Muys, B. (2004) Foliar concentrations of volunteer willows growing on polluted sediment-derived sites versus sites with baseline contamination levels. *Journal of Environmental Monitoring* 6, 313-321.
- Vangronsveld, J., Clijsters, H. (1992) A biological test system for the evaluation of metal phytotoxicity and immobilization by additives in metal contaminated soils. In: Merian E, Haerdi W, editors. *Metal compounds in environment and life*, 4 (interrelation between chemistry and biology). Northwood: Science and Technology Letters. 117-25.

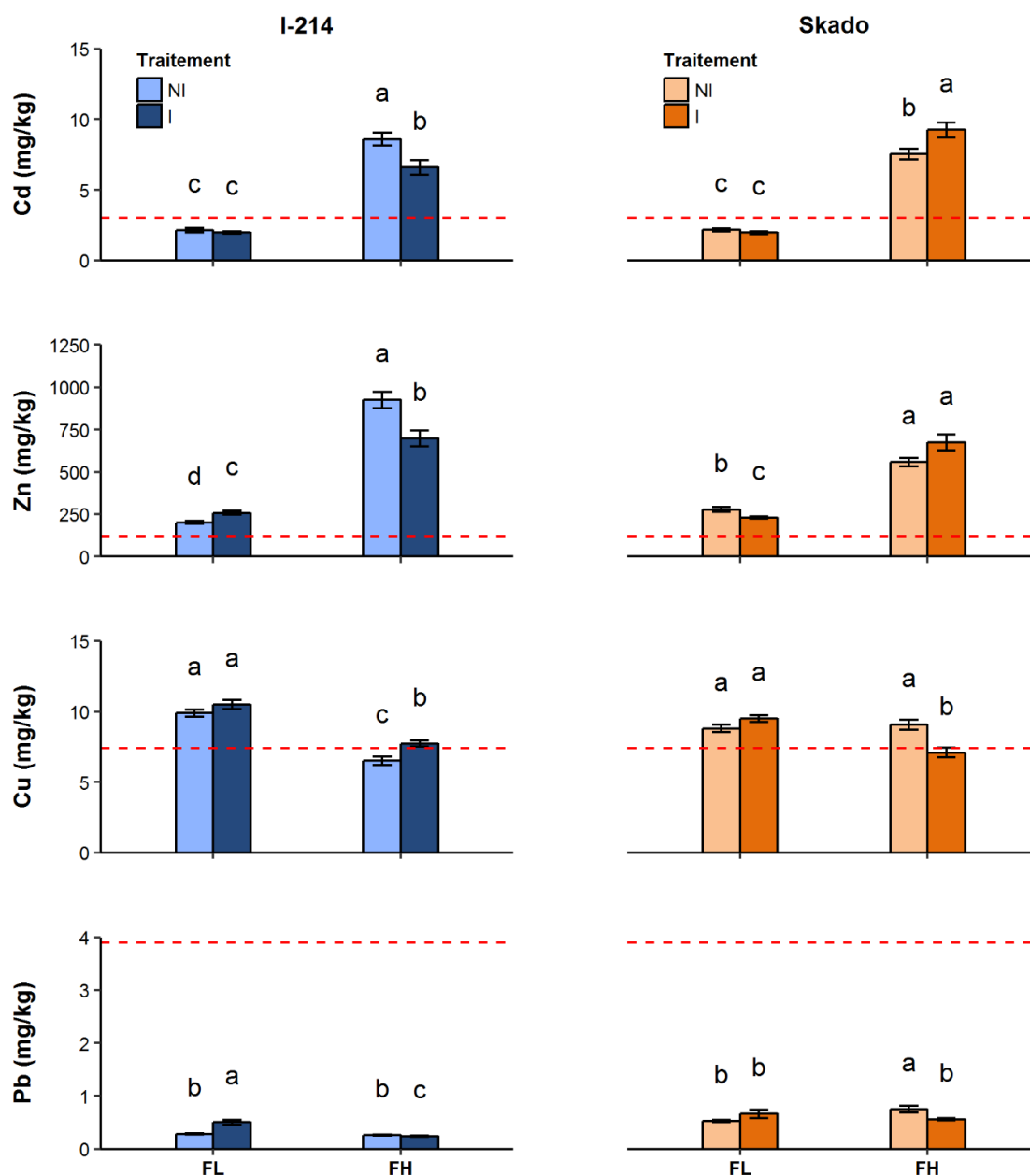
-
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.
- Verlinden, M.S., Broeckx, L.S., Van den Bulcke, J., Van Acker, J., Ceulemans, R. (2013) Comparative study of biomass determinants of 12 poplar (*Populus*) genotypes in a high-density short-rotation culture. *Forest Ecology and Management* 307, 101-111.
- Vervaeke, P., Lust, N. (2001) Eindverslag IWT-project: Ecotechnologische behandeling en inrichting van baggerspeciedepots op basis van bebouwingstechnieken, IWT nr. 960201, Laboratorium voor Bosbouw, Universiteit Gent. 1-373.
- Vezzani, F.M., Anderson, C., Meenken, E., Gillespie, R., Peterson, M., Beare, M.H. (2018) The importance of plants to development and maintenance of soil structure, microbial communities and ecosystem functions. *Soil and Tillage Research* 175, 139-149.
- Voies navigables de France, (2009) Schéma Directeur Régional des Terrains de Dépôt - Direction régionale Nord - Pas-de-Calais (modifié en juin 2014). Voies navigables de France, pp. 1-72.
- Voies navigables de France, (2014) Guide dragage. Voies navigables de France, pp. 1-166.
- Voies navigables de France, (2018) Le dragage et la gestion des sédiments sous contrôle. http://www.vnf.fr/vnf/content.vnf?action=content&occ_id=31667&son_id=31669.
- Waldron, K.J., Rutherford, J.C., Ford, D., Robinson, N.J. (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460, 823-830.
- Walters, D.T., Gilmore, A.R. (1976) Allelopathic effects of fescue on the growth of sweetgum. *Journal of Chemical Ecology* 2, 469-479.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578-6583.
- Witters, N., Mendelsohn, R.O., Van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., Tack, F., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2012) Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study. I: Energy production and carbon dioxide abatement. *Biomass and Bioenergy* 39, 454-469.
- Wu, Z., Hao, Z., Zeng, Y., Guo, L., Huang, L., Chen, B. (2015) Molecular characterization of microbial communities in the rhizosphere soils and roots of diseased and healthy *Panax notoginseng*. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 1059-1074.
- Yang, Z., Wang, Y., Shen, Z., Niu, J., Tang, Z. (2009) Distribution and speciation of heavy metals in sediments from the mainstream, tributaries, and lakes of the Yangtze River catchment of Wuhan, China. *Journal of Hazardous Materials* 166, 1186-1194.
- Yergeau, E., Bell, T.H., Champagne, J., Maynard, C., Tardif, S., Tremblay, J., Greer, C.W. (2015) Transplanting Soil Microbiomes Leads to Lasting Effects on Willow Growth, but not on the Rhizosphere Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research* 14, 415-421.
- Zappellini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., Greer, C., Chalot, M. (2015) Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biology and Biochemistry* 90, 101-110.
- Zhang, C., Yu, Z.-g., Zeng, G.-m., Jiang, M., Yang, Z.-z., Cui, F., Zhu, M.-y., Shen, L.-q., Hu, L. (2014) Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. *Environment International* 73, 270-281.

ANNEXES

Annexe 1 : Potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_b) et minimum (Ψ_m) mesuré chez les saules Tordis le 8 juillet 2015. Les mesures ont été réalisées dans les parcelles amendées et non amendées, en présence (+) ou en absence (-) de l'espèce herbacée *D. cespitosa*. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type (n= 5). Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements ($p < 0,05$).



Annexe 2 : Concentrations moyennes en EPT (mg/kg MS) mesurées en juin 2015 dans les feuilles de peupliers inoculés (I) ou non (NI), plantés sur des sols peu contaminés (FL) ou très contaminés (FH). Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard (n= 10). Les lignes rouges en pointillées représentent les concentrations foliaires moyennes « ordinaires » chez des peupliers issus de sols non contaminés (Madejón et al., 2004 ; Vandecasteele et al., 2003). Pour chaque cultivar, des différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$).



Etude de deux modalités de phytomanagement testées sur un terrain de gestion de sédiments contaminés par des métaux et métalloïdes

Mots clés : phytostabilisation aidée, peuplier, saule, *Deschampsia cespitosa*, plantes colonisatrices, microorganismes.

Résumé : Le phytomanagement est un mode de gestion de sites et sols pollués émergent qui inclut la valorisation de la biomasse produite. Pour alimenter les retours d'expérience en conditions réelles et sur le long terme, deux essais de phytomanagement de 1 ha chacun (sites A et B) ont été mis en place à Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France) en 2011/2012 sur un terrain de gestion de sédiments de curage contaminés par des éléments potentiellement toxiques ou EPT (Cd, Cu, Pb et Zn). Dans ce contexte, les travaux de thèse réalisés sur ces sites avaient pour objectifs d'étudier : (1) la dynamique et la performance des espèces végétales sélectionnées (*Deschampsia cespitosa*, peupliers Skado et I-214, saule Tordis et Inger), des plantes colonisatrices et envahissantes, (2) l'effet des amendements (inoculum de champignons mycorrhiziens, amendement minéral basique) sur la mobilité des EPT dans le sol, sur l'accumulation des EPT dans les parties aériennes des plantes et impact sur la diversité microbienne des sols et des racines ligneuses.

L'efficacité de l'espèce herbacée *D. cespitosa* pour le phytomanagement du site B a été démontrée. Tolérante aux conditions du site, cette plante a présenté de faibles concentrations en Cd, Cu et Pb dans ses parties aériennes et a formé un couvert dense et pérenne. La végétalisation du site A par des plantes colonisatrices était hétérogène avec une dominance de l'espèce *Urtica dioica*.

Sur les parcelles amendées et non amendées, les concentrations mesurées chez *U. dioica* étaient plus élevées en Cd, Pb, Cu et Zn comparées aux mêmes plantes issues de sols non contaminés. Selon les calculs préliminaires de risques basés sur les concentrations mesurées dans les plantes herbacées enrichies en Cd et Zn, les risques liés à leur ingestion par les herbivores se sont avérés négligeables.

Concernant les saules et les peupliers dédiés à la production d'énergie, de fortes concentrations en Cd et en Zn ont été mesurées dans les feuilles quels que soient les amendements. Ces feuilles peuvent représenter un risque pour les herbivores. Contrairement aux peupliers très tolérants aux conditions du milieu, une réduction de la croissance et du taux de survie des saules a été mesurée sur les parcelles amendées et non amendées en présence de *D. cespitosa*, liée à une forte compétition souterraine avec *D. cespitosa*. L'utilisation de tests écotoxicologiques a permis d'identifier d'autres facteurs dont la phytotoxicité du sol. Par ailleurs, aucun effet des amendements biologiques et chimiques n'a été observé sur la mobilité et la spéciation des EPT après 4 ou 5 années de phytomanagement. Leur effet sur le transfert des EPT était très variable en fonction des espèces, des niveaux de pollution et du temps. L'étude des communautés microbiennes dans les racines ligneuses a révélé un impact de la végétation herbacée et de la pollution mais aucun effet lié aux amendements n'a été observé.

Study of two phytomanagement options tested at a dredged-sediment disposal site contaminated with metals and metalloids

Keywords: aided phytostabilization, poplar, willow, *Deschampsia cespitosa*, plant colonists, microorganisms.

Abstract: Phytomanagement is an emerging approach that includes plant biomass valorization for the management of polluted soils and sites. To evaluate the long-term performance of this strategy at field scale, two phytomanaged sites of 1 ha each (sites A and B) were implanted in Fresnes-sur-Escaut (Hauts-de-France) in 2011/2012 at a dredged-sediment disposal site contaminated with potentially toxic elements or PTE (Cd, Cu, Pb et Zn). The thesis work is based on the study of the two sites with the following objectives: (1) study the dynamics of selected plants (*Deschampsia cespitosa*, Skado and I-214 poplars, Tordis and Inger willows), colonizing plants and invaders, (2) study the efficiency of amendments (mycorrhizal fungi inoculum, basic mineral amendment) on sediment PTE mobility, on aerial plant parts PTE accumulation and on the microbial diversity in soils and tree roots.

The efficiency of the grass *D. cespitosa* for phytomanagement at the site B has been highlighted. The plant was tolerant to the site conditions, had low concentrations of Cd, Cu and Pb in shoots and formed a dense and perennial plant cover. At the site A, the herbaceous plant cover formed by plant colonists was heterogeneous with a dominance of the species *Urtica dioica*.

In amended and non-amended plots, *U. dioica* showed higher concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn than the same plants from uncontaminated soils. According to risk calculations based on Cd and Zn concentrations, there was no risk related to the ingestion of these herbaceous plants by herbivorous animals. Concerning poplars and willows dedicated to energy production, high Cd and Zn concentrations were found in their leaves regardless of the amendments. These leaves may pose a risk for herbivorous animals. Unlike poplars which were very tolerant to the site conditions, willows showed a reduction of growth and survival rate in the amended and non-amended plots sown with *D. cespitosa*, because of belowground competition with *D. cespitosa*. Ecotoxicological tests revealed that soil phytotoxicity was also responsible of the willow growth reduction. Besides, the biological and chemical amendments had no significant effect on PTE mobility and speciation in soils after 4 or 5 years of phytomanagement. Their effects on PTE transfers in plants varied depending on the species, levels of pollution and time. The study of microbial communities in tree roots revealed that the herbaceous cover and soil pollution had a significant impact on microbial composition whereas the amendments did not affect the microbial communities.