



**HAL**  
open science

# Fonctionnement et performances du système agroforestier peuplier ortie en contexte de phytomanagement

Loic Yung

► **To cite this version:**

Loic Yung. Fonctionnement et performances du système agroforestier peuplier ortie en contexte de phytomanagement. Science des sols. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCD026 . tel-03738068

**HAL Id: tel-03738068**

**<https://theses.hal.science/tel-03738068v1>**

Submitted on 25 Jul 2022

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
FRANCHE COMTE  
PREPAREE A L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
ÉCOLE DOCTORALE N°554 « ENVIRONNEMENT SANTE »**

**LABORATOIRE CHRONO-ENVIRONNEMENT -- UMR 6249 CNRS**

Thèse en vue de l'obtention du titre de docteur en

**« BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ECOLOGIE »**

**FONCTIONNEMENT ET PERFORMANCES  
DU SYSTEME AGROFORESTIER PEUPLIER ORTIE EN  
CONTEXTE DE PHYTOMANAGEMENT**

Présentée et soutenue publiquement à Montbéliard par

**Loïc YUNG**

Le 23 janvier 2020

**Membres du jury :**

Vera SLAVEYKOVA (Professeure, UNIGE - F.-A FOREL)	Présidente du jury
Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI (Professeure, ULCO - UCEIV)	Rapporteur
Hervé JACTEL (Directeur de Recherche, INRA – BIOGECO)	Rapporteur
Frédérique CADIERE (Responsable scientifique, ADEME)	Examineur
Michel CHALOT (Professeur, UBFC – LCE)	Directeur de thèse
Geneviève CHIAPUSIO (MCF, USMB – CARTEL)	Encadrant
Coralie BERTHEAU-ROSSEL (MCF, UBFC – LCE)	Encadrant
Thierry GISSINGER (Responsable programme Environnement, FdF)	Invité
David CAZAUX (Environmental remediation manager, INOVYN)	Invité



# REMERCIEMENTS

---

Moi qui pensais avoir fait le plus compliqué en rédigeant ce manuscrit, me voilà en difficulté devant la dernière étape, et pas des moindres... les remerciements. Il est vrai que je ne suis pas le meilleur pour exprimer mes sentiments, mais pour cette fois, je vais me rompre à cet exercice et faire de mon mieux tant il y a à faire et que cela me tient à cœur !

Je souhaiterais tout d'abord remercier l'ADEME et la Fondation de France qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans des conditions confortables *via* leur soutien financier.

Merci également à Gudrun Bornette pour m'avoir permis de mener mes recherches au sein du Laboratoire Chrono Environnement.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse, Anissa Lounes-Hadj Sahraoui et Hervé Jactel pour avoir eu la lourde tâche d'expertiser en détail la concrétisation de ces trois années de recherche, ainsi que Vera Slaveykova, Frédérique Cadière et Thierry Gissinger pour avoir également accepté de juger mon travail de thèse. Merci également à Nicolas Marron pour son suivi tout au long de cette aventure.

Il est maintenant temps d'exprimer toute ma gratitude envers les personnes qui auront contribué à faire de moi le chercheur et l'homme que je suis aujourd'hui, et qui, par la même occasion auront participé de près ou de loin à ce manuscrit. C'est maintenant que ça se gâte... mais je vais tenter de trouver les mots justes pour chacun(e) d'entre vous.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mon directeur de thèse, Michel Chalot, qui m'aura soutenu de l'éclosion jusqu'à aujourd'hui, en passant par les moments où j'aurais pu y laisser quelques plumes. Michel, merci de m'avoir fait confiance et d'avoir fait de moi le chercheur que je suis aujourd'hui. Pour moi, ton côté passionné, ton dynamisme et ton efficacité, couplés à ta bienveillance et ta simplicité font de toi un chercheur modèle. Aujourd'hui, je repartirais les yeux fermés pour quelques années de recherche avec toi.

Je souhaite également à remercier ma codirectrice de thèse, Geneviève Chiapusio. Merci Geneviève pour ton soutien tant moral que professionnel et tes conseils toujours avisés, ta bonne humeur et ton goût pour la convivialité manqueront à Montbéliard !

Je tiens à remercier chaleureusement mon encadrante de thèse, Coralie Bertheau-Rossel. Un grand merci Coralie pour ta bienveillance, ta rigueur et ta persévérance, merci d'avoir dépensé autant d'énergie pour moi... Grace à toi, j'ai pu découvrir et plonger dans le monde merveilleux des bêtes. Je crois qu'on peut dire que pour ton premier encadrement de thèse, tu as relevé le défi haut la main.

Un grand merci à David Cazaux, mon ancien maître de stage à Inovyn, mais également un collègue en or ! Merci pour les souvenirs ensemble, autour d'une fondue franc-comtoise ou d'un apéro... Pour te remercier d'être présent pour ce grand moment, je t'accompagnerai le jour où tu te décideras à présenter tes inventions au concours Lépine (pas celle inventée avec ton pote Colombano !). J'en profite pour remercier également Cédric Marion pour sa disponibilité à toute épreuve afin de me permettre l'accès au « terrain de jeu ».

Je souhaite également remercier l'ensemble de la fine équipe de Montbéliard qui a grandement contribué à ce que la thèse se passe dans une atmosphère agréable. Merci à notre MacGyver à frisettes, Marie-Laure Toussaint, pour m'avoir formé à l'HPLC en plus d'avoir résolu

tous mes problèmes techniques. Merci à Philippe Binet pour qui l'humour n'a d'égal que sa culture (et sa passion pour la Bretagne). Merci à Guillaume Bertrand de m'avoir appris ce qu'était une méduse emballée dans du papier aluminium. Merci à Régine et Pierre-Emmanuel pour leur gentillesse et leur bonne humeur au quotidien.

Merci aux « intermittents du spectacle » que j'ai eu l'occasion de côtoyer au cours de ma thèse ou au préalable. Merci à Cyril, notre alsacien préféré, toujours irréprochable dans son travail et dans la tenue de son calendrier des pots ! Merci à Alexis, mon poto de bureau, de terrain (contaminé ou pelouse) ou de soirées, ces années avec toi étaient vraiment un plaisir ! François, ou le stagiaire qui voulait être doctorant à la place du doctorant, dommage que tu sois si bon chercheur, tu aurais pu devenir un grand joueur de freestyle fléchette. Guillaume, les moments décompressions étaient toujours mémorables avec toi, j'espère qu'aujourd'hui tu t'éclates dans ce que tu fais. Abdou, merci pour ta sympathie au quotidien et pour m'avoir fait découvrir la saveur des cacahuètes Tchadiennes. José, nos discussions étaient toujours un plaisir. Merci à Fabien, le brasseur, pour ses excellentes bières !

Je me dois également de remercier mon armée de stagiaires sans qui boucler cette thèse en 3 ans n'aurait pas été possible. Merci aux entomo Anaïs Colin, Léonie Berthold, Alexandre Peter et Alex Ponçot pour les heures passées sous la loupe. Merci à Estelle Gromaire et Yohann Boisson pour leur aide pour des analyses environnementales.

Merci à la nouvelle promotion de 2019 de m'avoir changé les idées pour cette période difficile de fin de thèse. Avec vous à la relève, l'avenir ne s'annonce pas triste à Montbéliard... Merci Chloé pour tes précieux conseils en stats et ta bonne humeur, on a bien fait de faire une entorse à nos principes en t'accueillant dans notre bureau. Valentin, merci pour ta gentillesse et ta spontanéité qui me fera toujours mourir de rire. Si tu ne succombes pas à la mayonnaise, je suis sûr que tu feras une très bonne thèse. Flavien, le mec qui porte la chapka mieux que personne et qui se roule par terre quand il perd à Fifa, reste comme tu es, c'est vraiment agréable de travailler avec toi !

Un grand merci à mes amis de la fac qui ont été les premiers à me donner goût au milieu universitaire. Malgré la distance ou même des chemins de vie différents, je crois qu'on peut dire que 10 ans plus tard, la « clique » n'a pas pris une ride et que notre complicité est toujours intacte !

Lisa, je tiens à te remercier tout particulièrement pour ce que tu m'as apporté au quotidien pendant cette thèse. Merci de toujours avoir été présente même quand mon ordi devenait trop présent et merci pour la relecture de ce manuscrit. Cette thèse m'a permis de te rencontrer et rien que pour ça, elle en valait la peine...

Merci à ma famille, vous avez fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Maman, papa, c'est à vous que je dois toute ma reconnaissance... Merci de votre soutien sans faille, merci d'avoir fait mon bonheur depuis toujours et merci pour tout. Vous m'avez assuré des conditions optimales pour mener à bien ce projet, je n'aurais pas pu rêver mieux. C'est à vous que je dédie cette thèse.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>CONTEXTE DE LA THESE.....</b>	<b>11</b>
<b>1 Introduction : Synthèse Bibliographique .....</b>	<b>15</b>
1.1 Les sites et sols pollués en France .....	17
1.1.1 Les notions de fond pédogéochimique, contamination et pollution.....	18
1.1.2 La contamination des sols en Europe.....	19
1.1.3 Les friches industrielles contaminées en France .....	21
1.1.4 Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués (SSP) .....	23
1.2 Exposition des écosystèmes terrestres aux ETM .....	33
1.2.1 Définition des ETM.....	34
1.2.2 Comportement des ETM dans les sols .....	34
1.2.3 Transfert des ETM vers les végétaux .....	36
1.2.4 Exposition des micro-organismes aux ETM .....	41
1.2.5 Exposition des insectes aux ETM .....	43
1.3 Gestion durable et valorisation des sols pollués par les végétaux.....	51
1.3.1 Les phytotechnologies appliquées aux SSP .....	52
1.3.2 De la Phytoremédiation au phytomanagement.....	63
1.3.3 L'utilisation de systèmes agroforestiers en contexte de phytomanagement.....	71
1.4 Description de l'espèce modèle : <i>Urtica dioïca</i> L.....	79
1.4.1 Généralités.....	80
1.4.2 Phylogénie de l'ortie .....	80
1.4.3 Aire de répartition .....	81
1.4.4 Habitat .....	81
1.4.5 Morphologie.....	82
1.4.6 Reproduction .....	84
1.4.7 Composition phytochimique de l'ortie.....	85
1.4.8 Ecologie de l'ortie .....	88
1.4.9 Potentiel de valorisation de l'ortie.....	93
1.5 Problématique et objectifs du travail de thèse.....	99
<b>2 Fonctionnement de l'agrosystème ortie-peuplier au niveau rhizosphérique : cas d'une contamination aux Cd, Pb, Zn, Cu .....</b>	<b>101</b>
2.1 Présentation du site expérimental .....	103
2.1.1 Localisation et origine de la pollution.....	103
2.1.2 Description du dispositif expérimental.....	104
2.1.3 Traitements étudiés .....	105
2.1.4 Description des sols.....	106
2.1.5 Travaux préalablement réalisés .....	107
2.2 Etude de la viabilité d'une association peuplier-ortie en mésocosme .....	109
2.2.1 Préambule.....	109
2.2.2 Contexte et objectifs.....	109
2.2.3 Matériel et méthodes .....	110
2.2.4 Résultats .....	114
2.2.5 Discussion et conclusion .....	122
2.3 Influence de la contamination sur les micro-organismes fongiques de l'agrosystème .....	125
2.3.1 Préambule.....	125
2.3.2 Contexte .....	125
2.3.3 Démarche .....	125
2.3.4 Caractérisation des communautés fongiques par barcoding environnemental.....	126
2.3.5 Présentation de l'article et des principaux résultats.....	130
2.4 Interactions chimiques et réponse métabolique aux facteurs environnementaux .....	151
2.4.1 Préambule.....	151
2.4.2 Contexte .....	151

2.4.3	Démarche .....	152
2.4.4	Mise au point du protocole d'extraction des composés phénoliques racinaires .....	152
2.4.5	Approche par métabolomique ciblée.....	155
2.4.6	Présentation de l'article et des principaux résultats.....	157
<b>3</b>	<b>Performances écologiques et exposition de l'agrosystème ortie-peuplier et de l'entomofaune associée au mercure .....</b>	<b>173</b>
3.1	Présentation du site expérimental .....	175
3.1.1	L'usine INOVYN (Tavaux) : procédé à l'origine d'une contamination au Hg.....	175
3.1.2	Historique des rejets en Hg par une approche dendrochimique .....	176
3.1.3	Description du dispositif expérimental.....	184
3.1.4	Description des sols.....	185
3.1.5	Travaux préalablement réalisés .....	185
3.2	Contribution du peuplier et de l'ortie à la restauration écologique.....	187
3.2.1	Préambule.....	187
3.2.2	Contexte .....	187
3.2.3	Elaboration des protocoles et mise en œuvre des inventaires .....	188
3.2.4	Présentation de l'article et des principaux résultats.....	191
3.3	Exposition au mercure de l'agrosystème et de l'entomofaune associée .....	213
3.3.1	Préambule.....	213
3.3.2	Contexte .....	213
3.3.3	Démarche .....	214
3.3.4	Analyses du mercure total et du MeHg .....	214
3.3.5	Présentation de l'article .....	217
<b>4</b>	<b>Potentiel de valorisation de l'ortie issue de friches industrielles contaminées .....</b>	<b>237</b>
4.1	Préambule .....	239
4.2	Contexte.....	239
4.3	Démarche .....	239
4.4	Le projet PHYTOFIBER .....	240
4.5	Présentation de l'article et des principaux résultats .....	242
4.6	Perspective de travail : la parcelle PHYTOFIBER .....	260
4.6.1	Choix des variétés cultivées .....	262
4.6.2	Préparation du sol et plantation.....	262
4.6.3	Suivi de la parcelle .....	264
4.6.4	Futur de la parcelle et pistes d'amélioration.....	267
<b>5</b>	<b>Discussion Générale et Conclusions .....</b>	<b>269</b>
5.1	Combiner l'agroforesterie et le phytomanagement, quels sont les enjeux ?.....	271
5.1.1	Une approche innovante.....	271
5.1.2	Une démarche reposant principalement sur des sites expérimentaux .....	271
5.1.3	Le peuplier assure un environnement favorable au développement de l'ortie .....	273
5.2	La rhizosphère, un compartiment charnière pour le fonctionnement de l'agrosystème.....	275
5.2.1	L'interface rhizosphérique : un lieu d'interactions tripartites complexes entre les plantes et les micro-organismes associés.....	275
5.2.2	La nature de ces interactions complexes reste à appréhender .....	277
5.3	L'ortie et le peuplier, une combinaison performante pour le phytomanagement des sites contaminés par les ETM. ....	279
5.3.1	L'ortie, une plante excluante adaptée à la phytostabilisation des sites contaminés .....	279
5.3.2	L'ortie et le peuplier, des espèces ingénieurs pour la restauration écologique.....	279
5.3.3	L'ortie et sa biodiversité ne sont pas les acteurs principaux de la dissémination des ETM .....	281
5.3.4	Une co-culture ortie-peuplier est-elle adaptée à la production de biomasse ?.....	283
5.3.5	Pour être productif, ce dispositif nécessite d'être façonné .....	284
	CONCLUSION GENERALE.....	286
	REFERENCES.....	288

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Sites expérimentaux en cours d'exploitation et gérés par le LCE portant sur des essais de phytomanagement à grande échelle, mis en place dans le cadre de programmes (inter)nationaux....	13
Tableau 2. Référentiel utilisé dans le cadre de la méthodologie nationale SSP pour les métaux et métalloïdes dans les sols, ces valeurs sont issues de l'étude ASPITET réalisée par l'INRA. ....	29
Tableau 3. Relations entre les quantités de métaux essentiels et non essentiels, et les capacités d'hyperaccumulation d'une plante, d'après Greger, (1999). ....	40
Tableau 4. Effets sur les invertébrés terrestres résultant d'une exposition aux ETM, concentrations exprimées en mg/kg, d'après la revue réalisée par (Dar et al., 2019). ....	50
Tableau 5. Principaux projet de Phytomanagement ayant été réalisés à des échelles terrain sur des sites contaminés aux ETM en France, entre 2000 et 2019. Ce tableau n'inclut pas les projets Européen récents s'appuyant sur certains de ces mêmes dispositifs expérimentaux. ....	56
Tableau 6. Types d'amendement communément utilisés selon les contaminants en présence, d'après (Bert, 2012). ....	62
Tableau 7. Potentiel positif (+) ou négatif (-) des différentes plantes pour la phytoremédiation, basé sur leur tolérance et leur capacité à accumuler les ETM, d'après (Evangelou et al., 2015). ....	65
Tableau 8. Filières de valorisation pour la biomasse issue de phytostabilisation et de phytoextraction (ADEME, 2012) ....	67
Tableau 9. Principaux effets positifs et négatifs engendrés par l'agroforesterie dans un contexte de production de biomasse végétale, d'après (Batish, 2008). ....	73
Tableau 10. Exemple de systèmes agroforestiers basés sur des TCR de ligneux et d'autres cultures, pouvant se décliner en contexte de phytomanagement, d'après Garrett and Buck, (1997). ....	77
Tableau 11. Composition des feuilles d'ortie (par rapport à une masse sèche) d'après Adhikari et al., (2016) ....	86
Tableau 12. Composés phénoliques (mg/g MS) contenus dans des extraits d'ortie, repris de (Kregiel et al., 2018). ....	87
Tableau 13 : Principaux habitats incluant l'ortie en tant qu'espèce indicatrice/caractéristique ainsi que les autres espèces constitutives de ces habitats, d'après les cahiers d'habitat NATURA2000, le Prodrome des Végétations de France (PVF) de l'INPN et la base de données European Nature Information System (EUNIS). ....	89
Tableau 14. Filières de valorisation explorées pour les différentes parties de l'ortie, adapté de (Di Virgilio et al., 2015). ....	94
Tableau 15. Principaux projets financés depuis 1999 au niveau national ou international et portant sur la culture et/ou la valorisation de l'ortie. ....	98
Tableau 16. Principaux paramètres physico-chimiques (moyennes) des sols de Fresnes-sur-Escaut et Tavaux (Assad et al. 2016). ....	106
Tableau 17. Concentrations moyennes (mg/kg) des principaux ETM présents dans les 4 placettes retenues pour la parcelle de Fresnes-sur-Escaut (F- et F+) (adapté de Assad et al. 2016). ....	107
Tableau 18. Principaux paramètres physico-chimiques (moyennes) du sol de la lagune de dépôt de sédiment sur laquelle la parcelle de Tavaux a été installée (Assad et al. 2016). ....	185
Tableau 19. Caractéristiques du dispositif expérimental PHYTOFIBER installé sur la lagune de stockage de sédiments de Tavaux ....	261
Tableau 20. Etat des lieux du taux de survie des peupliers et de leur état de santé à l'issue de la première année de plantation ....	265





# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1. Sites expérimentaux en cours d'exploitation et gérés par le LCE montrant la dominance de l'ortie sous les dispositifs TCR de peuplier. Photos prises en 2015 soit 4 ans après la plantation des arbres. ....	14
Figure 2. Nombre de sites potentiellement contaminés dans 16 pays appartenant à l'Agence Européenne de l'Environnement en 2017 .....	19
Figure 3. Pourcentage d'occurrence de 8 groupes de polluants retrouvés dans les sols et les eaux souterraines en Europe (données de 2011 tirées de EEA (2017)). ....	20
Figure 4. Pourcentage d'implication de différentes activités dans la contamination des sols en France, d'après EEA, (2017). ....	21
Figure 5. Pourcentage d'occurrence des principaux types de polluants dans 95 projets de réhabilitation de friches, d'après Chateau et al. (2018). ....	22
Figure 6. Localisation des sites et sols pollués appelant une action des pouvoirs publics, répertoriés par BASOL. Représentation effectuée via le site internet Infoterre du BRGM. ....	23
Figure 7. Présentation des 6 étapes intégrées au guide méthodologique de la démarche REFRINDD. ....	26
Figure 8. Principaux éléments constitutifs du schéma conceptuel de la politique nationale SSP. ....	27
Figure 9. Distribution des ETM dans les différentes fractions d'un sol, d'après Baize, (1997). ....	35
Figure 10. Potentiel de bioaccumulation des différents ETM par les plantes, calculé à partir du ratio entre la concentration en élément dans la plante et celle du sol, adapté de Kabata-Pendias, (2011). ....	37
Figure 11. Concentration en ETM dans les tissus de diverses plantes en fonction de leur concentration en solution. ....	39
Figure 12. Schéma illustrant les symbioses entre plantes et champignons mycorhiziens (ectomycorhizes et endomycorhizes), d'après McNear Jr (2013). ....	42
Figure 13. Exposition au Hg total (THg) de la faune typiquement associée à des rizières proches d'un site minier (A) et d'un site contrôle (B), mettant en avant l'importance du niveau trophique des espèces dans l'accumulation du THg, d'après Abeysinghe et al., (2017). ....	44
Figure 14. Relations entre les teneurs en Hg total (THg, a) et en méthyl-Hg (MeHg, b) et le niveau trophique, déterminé par $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ , d'arthropodes issus d'une forêt tempérée. Le facteur de magnification trophique correspond à la pente de la droite de régression Y (Rodenhouse et al., 2019). ....	45
Figure 15. Exemple d'imagerie élémentaire pour S, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu et Zn de cellules issues de l'intestin moyen et des tubules de Malpighi de la coccinelle <i>Chrysolina pardalina</i> , le noir fait référence à des concentrations élevées en élément dans ces tissus, d'après Przybyłowicz et al., (2003). ....	48
Figure 16. Différences en terme de facteurs de bioaccumulation entre des larves (avant avoir mué) et des adultes (après avoir mué) de <i>Chrysolina pardalina</i> consommant des feuilles de <i>Berkheya coddii</i> , dans le cadre d'une expérience en conditions contrôlées Przybyłowicz et al., (2003). ....	49
Figure 17. Schéma de l'échantillonnage, de l'analyse et du traitement de données relatif au phytoscreening et à la dendrochimie illustrant l'intérêt de ces outils pour fournir des renseignements sur les contaminations actuelles et historiques. ....	53
Figure 18. Nombre d'article sur le thème de la phytoremédiation depuis 1993, basé sur le nombre de sorties à partir du terme « phytoremediation » sur Web of Science. ....	55
Figure 19. Représentation schématique du phytomanagement et de ses intérêts selon Burges et al., (2018). ....	64
Figure 20. Abondance des arthropodes auxiliaires (Miridae (M), Anthocoridae (A), araignées (S), parasitoïdes (P)) collectés en présence (gauche) et absence (droite) d'adventices dans des plantations de peuplier Tordis et Gudrun. Les noms en gras indiquent que l'insecte a été identifié comme un prédateur important des œufs de <i>P. vulgatissima</i> (Stephan et al., 2016). ....	74
Figure 21. Voies d'entrée possibles des substances allélopathiques dans les dispositifs agroforestiers à partir des plantes allélopathiques, d'après Islam and Kato-Noguchi, (2013) adapté de Chick and Kielbaso, (1998). ....	76
Figure 22. Distribution de l'espèce <i>Urtica dioica</i> en Europe, d'après Jalas and Suominen (1988), repris dans Taylor (2009). ....	81
Figure 23. Optimums écologiques de l'ortie en terme de conditions climatiques et des caractéristiques du sol, d'après le site internet tela-botanica.org .....	82

Figure 24. Planche de la grande ortie ( <i>Urtica dioica</i> L.) présentant la morphologie générale, les fleurs mâles et femelles ainsi que les graines et les fruits (A), rhizome d'ortie comprenant des ramifications composées de racines fines (B) et les trichomes de l'ortie localisé sur sa tige (C). .....	83
Figure 25. Photographie d'un peuplement monospécifique d'ortie dioïque, localisé en bordure de la peupleraie installée sur la lagune de sédiments chlore-alkali localisée à Tavaux (Jura). Photo : L.Yung.....	85
Figure 26. Espèces d'insectes communément hébergées par l'ortie dioïque, <i>Aglais urticae</i> (A), <i>Coccinella septempunctata</i> (B), <i>Phyllobius pomaceus</i> (C), <i>Nabis</i> sp. (D) et <i>Microlophium carnosum</i> (E). Photos A, B, C, E : L. Yung.....	92
Figure 27. Observation au microscope d'une coupe transversale de tige d'ortie (A) avec un zoom sur les fibres végétales. ....	95
Figure 28. Présentation du site expérimental de dépôt de sédiments de Fresnes-sur-Escaut, situé en bordure du canal de l'Escaut dans le nord de la France. ....	103
Figure 29. Présentation de la parcelle expérimentale de Fresnes-sur-Escaut et des 4 placettes de peuplier retenues, à savoir FI4, FI30, FS5 et FS31 (numérotation des placettes d'après Phanthavongsa et al., 2017).....	105
Figure 30. Détail du fragment amplifié ITS1 au sein de l'ADN ribosomique de champignon avec la position relative des amorces, nombre de séquences de chaque sous-unité déjà disponibles dans les bases de données (Bellemain et al., 2010).....	126
Figure 31. Photographie d'un gel d'électrophorèse après migration. Présence du marqueur de taille (MT) sur la gauche, suivi de 5 échantillons différents puis du témoin négatif (T-) et du témoin positif contenant de l'ADN de champignons (T+). ....	128
Figure 32. Schéma récapitulatif des différentes étapes de traitement des données générées par le séquençage haut débit. Les étapes colorées avec des numéros bleus sont les étapes d'assemblage, suivi des étapes de nettoyage et de filtration en vert et de l'assignement taxonomique en orange.....	129
Figure 33. Exemple de courbe d'étalonnage à l'acide gallique utilisée pour le dosage colorimétrique des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu .....	153
Figure 34. Moyennes (n = 4) ± écart-types en phénols totaux (mg/g MS GAE) mesurés dans un pool de rhizomes d'ortie (Tavaux - O.Rz), de racines fines d'ortie (Tavaux - O.Rf), de racines fines de peuplier (Tavaux - P.Rf) et de sol (Fresnes), à partir de plusieurs protocoles d'extraction. ....	154
Figure 35. Etapes réalisées pour l'identification et la quantification des composés phénoliques issus d'extraits racinaires de peuplier et d'ortie par une approche de métabolomique ciblée .....	155
Figure 36. Exemple de chromatogrammes obtenus suite à l'analyse des échantillons QC de peuplier à Nancy (en haut) et des échantillons QC d'ortie à Lyon par UHPLC-UV. ....	157
Figure 37. Présentation du site expérimental de Tavaux, situé sur une lagune de stockage de sédiments chlore-alkali appartenant à l'industrie INOVYN, située à Saint-Symphorien-sur-Saône (est de la France). .....	175
Figure 38. Présentation de la parcelle expérimentale de Tavaux et des 6 placettes de peuplier retenues, à savoir TS1, TS2, TS3 (cultivar Skado avec une faible densité d'ortie) et TI1, TI2, TI3 (cultivar I214 avec une forte densité d'ortie). La photographie prise en juin 2017 témoigne de la différence de développement du peuplier I214 par rapport aux Skado. ....	184
Figure 39. Présentation du modèle de piège polytrap® utilisé, et d'un piège après confection et installation. ..	190
Figure 40. Présentation de l'Analyseur de Mercure Avancé (AMA) 254. ....	214
Figure 41. Structuration du projet PHYTOFIBER selon 4 lots et présentation des tâches associées à chacun ..	241
Figure 42. Schéma des modalités de culture pour la parcelle PHYTOFIBER installée sur la lagune de stockage de sédiments de Tavaux.....	261
Figure 43. Présentation des plantules d'ortie « Roville » plantées sur la parcelle PHYTOFIBER, après multiplication en serre par le Lycée agricole de Roville-aux-Chênes.....	262
Figure 44. Vue aérienne de la lagune INOVYN et de l'emplacement sélectionné pour l'installation de la parcelle PHYTOFIBER.....	263
Figure 45. Panorama du secteur sélectionné pour l'installation de la parcelle PHYTOFIBER après travaux de fauche et de préparation du sol .....	264
Figure 46. Visuel de la parcelle PHYTOFIBER après plantation de l'ortie, en mai 2018, sur laquelle on peut voir de nombreux rhizomes de phragmites .....	264
Figure 47. Visuel de la parcelle PHYTOFIBER après colonisation par la végétation indigène, en juin 2018. ..	266
Figure 48. Visuel de la parcelle PHYTOFIBER après fauchage de la végétation indigène, en juin 2018. ....	266
Figure 49 : Principales fonctions écologiques de l'agrosystème peuplier-ortie et services écosystémiques associés, liste des services écosystémiques repris du programme EFES (Tibi and Therond, 2017). ....	287

# ABBREVIATIONS

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AM	Arbuscual Mycorrhizal (fungi) (champignons mycorrhiziens à arbuscules)
ASPITET	Apports d'une Stratification Pédologique à l'Interprétation des Teneurs en Eléments Traces
BAC	Biological Absorption Coefficient (coefficient d'absorption biologique)
BAF	BioAccumulation Factor (facteur de bioaccumulation)
BMF	BioMagnification Factor (facteur de biomagnification)
BRGM	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
BSAF	Biota-Soil Accumulation Factor (facteur d'accumulation biota-sol)
BTEX	Benzène, Toluène, Éthylbenzène, Xylène
CEC	Capacité d'Echange Cationique
COHV	Composés Organiques Halogénés Volatils
CRM	Certified Reference Material (matériel de référence certifié)
DDAF	Direction départementale de l'Agriculture et de la Forêt
DSE	Dark Septate Endophyte (Endophyte brun septé)
DL	Detection Limit (limite de détection)
DRIR	Direction régionale de l'industrie de la recherche et de l'environnement
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
EEA	Agence Européenne de l'Environnement
EFESE	Evaluation Française des Ecosystèmes et des Services Ecosystémiques
Eh	Potentiel rédox
EM	Ectomycorhizes
ETM	Elément(s) Trace(s) Métallique(s)
FPGN	Fond pédogéochimique naturel
GAE	Galic Acid Equivalent (Equivalent Acide Gallique)
GISFI	Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles
GRO	Gentle Remediation Options (options de remédiation douces)
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCT	Hydrocarbures totaux
IBG-DCE	Indice Biologique Gobal – Directive Cadre Eau
IBGN	Indice Biologique Global Normalisé
ICPE	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement
IEM	Interprétation de l'Etat des Milieux
ITS	Internal Transcribed Spacer (espace interne transcrit )
MeHg	méthylmercure
MO	Matière organique
NGS	Next Generation Sequencing (séquençage de nouvelle génération)
ONF	Office Nationale des Forêts
OPIE	Office Insectes Environnement
OTUs	Operational Taxonomic Units (unités taxonomiques opérationnelles)
pb	paires de bases
PCB	Polychlorobiphényles
PGPR	Plant Growth Promoting Bacteria (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes)
PVC	PolyChlorure de Vinyle
PVF	Prodrome des végétations de France décliné
QL	Quantification Limit (limite de quantification)
SAF	Système AgroForestier
SSP	Sites et Sols Pollués
TCR/SRC	Taillis à Courtes Rotations / Short rotation coppice
THg	Total Mercury (mercure total)
UDA	<i>Urtica dioica</i> agglutinine
VNF	Voies Navigables de France



# CONTEXTE DE LA THESE

Ce projet de thèse, co-financé par l'ADEME (programme thèse 2016) et la Fondation de France (programme Agroforesterie Tempérée 2016), comporte à la fois des questions de recherche fondamentale et une dimension appliquée, reliée à des thématiques majeures situées au cœur des préoccupations de ces deux organismes financeurs. En effet, depuis 1990, l'une des missions de l'ADEME consiste en la mise en œuvre des politiques publiques en matière de préservation des sols et de régulation de leur niveau de pollution sur l'ensemble du territoire Français. La Fondation de France est, quant-à-elle, engagée depuis 2011 dans le développement d'un modèle agricole respectueux de l'environnement : l'agroforesterie.

Mes travaux de thèse se sont déroulés au Laboratoire Chrono Environnement (LCE) UMR 6249, unité mixte UBFC et CNRS. Ils s'intègrent dans le thème écosystème-contaminants-santé (ECOS) du laboratoire et plus particulièrement dans la thématique du phytomanagement des sols contaminés, coordonnée par le Pr. Michel Chalot. Au sein de cette thématique particulièrement dynamique depuis plus de 13 ans, de nombreux projets de recherches adossés à des thèses se sont succédés. Parmi eux, le projet ANR PHYTOPOP a jeté les bases d'une utilisation potentielle du peuplier en taillis à courtes rotations (TCR) dans une stratégie de phytostabilisation de sols contaminés par les éléments traces métalliques (ETM). Le projet ANR Blanc international BIOFILTREE reposait sur l'utilisation ciblée de deux espèces modèles, le peuplier et l'aulne en culture mixte dans le cadre de programmes de revégétalisation de sites pollués. Ces projets ont permis l'implantation de parcelles expérimentales sur différents sites contaminés localisés dans l'Est et le Nord de la France.

*Tableau 1. Sites expérimentaux en cours d'exploitation et gérés par le LCE portant sur des essais de phytomanagement à grande échelle, mis en place dans le cadre de programmes (inter)nationaux.*

Programme (financeur)	Localisation et type de sol	Contamination	Essence plantées	Type de plantation	Surface	Colonisation par l'ortie
<b>PHYTOPOP 2007-2011 (ANR)</b>	Pierrelaye (95) sableux	Contamination du sol par les ETM liée à l'épandage d'eaux usées	14 clones de peupliers	TCR (2000 t/ha) et TTCR (8000 t/ha)	3 ha	Oui (cas du TCR)
<b>BIOFILTREE 2011-2014 (ANR International)</b>	Pierrelaye (95) sableux	Contamination du sol par des ETM liée à l'épandage d'eaux usées	2 clones de peupliers + aulnes intercalés	TCR (2000 t/ha)	1 ha	oui
	Tavaux (39) limoneux	Lagune issue de dépôts de sédiments contaminés par le mercure			1 ha	oui
	Fresnes-sur-Escaut (59) Argileux	Ancien terrain de dépôt de sédiments, pollué par des ETM			1 ha	oui

A l'issue de 3 à 4 années de culture, un phénomène commun à l'ensemble de ces parcelles expérimentales a pu être constaté : l'ortie domine très nettement la strate herbacée sous les peupliers (Figure 1). Ce phénomène, de par son caractère spontané et notable, a suscité l'intérêt des chercheurs impliqués dans cette thématique et a conduit à l'élaboration d'un projet de recherche visant à comprendre le fonctionnement de ce dispositif ainsi qu'à identifier et optimiser le potentiel de valorisation de l'ortie.



Figure 1. Sites expérimentaux en cours d'exploitation et gérés par le LCE montrant la dominance de l'ortie sous les dispositifs TCR de peuplier. Photos prises en 2015 soit 4 ans après la plantation des arbres.

Mon projet de thèse a été l'initiateur de cette dynamique autour de l'ortie, et s'intéresse au phytomanagement selon une approche novatrice axée sur l'agroécologie et l'agroforesterie. Pour cela, il fait intervenir de nombreuses disciplines, pour certaines jamais développées au LCE dans un contexte de phytomanagement, reposant sur l'expertise de mes superviseurs à savoir le Dr. Coralie Bertheau-Rossel pour le volet entomologique, le Dr. Geneviève Chiapusio pour le volet écologie chimique et le Prof. Michel Chalot pour le volet écologie microbienne.

Au cours de cette thèse (octobre 2016 – janvier 2020), le projet national PHYTOFIBER (appel à projet GRAINE de l'ADEME, 2017 - 2020) ainsi que le projet Européen NETFIB (SusCrop- ERA-NET, 2019 - 2021) ont été initiés, et permettront de poursuivre ce projet au travers de plus amples collaborations.

# Chapitre 1

## Introduction : Synthèse Bibliographique



Les sites et sols pollués en France



Exposition des écosystèmes terrestres aux ETM



Gestion durable et valorisation des sols pollués par les végétaux



Description de l'espèce modèle : *Urtica dioïca* L.



Là où les altérations géologiques et biologiques de la surface de la Terre ont été très lentes, les changements introduits/stimulés par l'Homme se sont accumulés extrêmement rapidement ces 100 dernières années. Bien que l'impact de l'Homme sur son environnement remonte à la période néolithique, les problèmes de dégradation des écosystèmes dus à la pollution se sont aggravés rapidement au cours des dernières décennies du XXe siècle. Ainsi, ces changements ont conduit à une dégradation et à un déséquilibre des différentes sphères qui composent notre planète. La pollution de l'environnement, en particulier par les éléments trace métalliques (ETM), est l'un des facteurs contribuant à la dégradation des biotopes, regroupés dorénavant sous le terme « d'anthroposphère » (Kabata-Pendias, 2011). Cette pollution actuelle aux ETM est liée au développement de nos sociétés industrielles et à l'utilisation de métaux. La consommation de métaux a augmenté de 300% au cours des 50 dernières années et les relargages anthropogéniques d'ETM tels que Pb, Hg, Zn, Cd, Cu et Cr ont été multipliés par trois, depuis le début de l'ère industrielle (Nriagu, 1996). De plus, les ETM ont une importance écologique, biologique et/ou sanitaire majeure en raison de leur mobilité entre les composantes de la biosphère et de leur toxicité. Au cours de l'évolution et de la vie, certains organismes ont su s'adapter aux modifications de leur environnement et ont développé une biochimie et une physiologie en étroite relation avec leur milieu. Néanmoins, le rythme actuel des perturbations des niches écologiques empêche la plupart des espèces de s'adapter convenablement, entraînant une extinction massive des espèces, avec un taux 100 fois supérieur au taux d'extinction naturel pour les vertébrés (Ceballos et al., 2015).

Cette synthèse bibliographique a pour objectifs de replacer mes travaux de thèse dans la problématique nationale liée aux pollutions par les ETM et de faire un état des lieux des connaissances scientifiques relatives à l'impact des ETM sur les écosystèmes terrestres et aux techniques basées sur les végétaux pour les maîtriser. Afin de répondre à cela, cette synthèse sera structurée en 4 parties : i) les sites et sols pollués en France, ii) exposition des écosystèmes terrestres aux ETM, iii) gestion durable et valorisation des sols pollués par les végétaux, iv) description de l'espèce modèle : *Urtica dioïca* L..

## 1.1 Les sites et sols pollués en France

**activites** (10) anthropiques (3) apport (3) BASOL (3) BTEX (3)  
 chimiques (4) COHV (3) concentration (3)  
**contamination** (27) COURS (4)  
 d'activites (3) donnees (3) eaux (3) EEA (6) **elements** (9)  
 entraine (4) estimer (4) ETMs (5) Europe (6) fond (4)  
**France** (13) **friches** (14) identifiées (3)  
**industrielles** (15) L'Europe (3) lesquels (3) local (4)  
 localises (3) miniere (4) naturel (5) nombre (3) partir (3) pays (3)  
 pedogeochimique (3) **polluants** (7) **pollution** (12)  
 presence (3) principaux (3) quantite (4) recensement (4) region (3) rehabilitation (3)  
 retrouve (3) **sites** (25) **sols** (17) SOURCES (4) susceptibles (3)  
 teneur (3) types (3) ZONE (4)

### 1.1.1 Les notions de fond pédogéochimique, contamination et pollution

De nombreux éléments pouvant être considérés comme polluants sont retrouvés naturellement dans les sols à des teneurs généralement faibles, à ces concentrations dites « naturelles », peuvent s'ajouter des quantités liées aux activités humaines. Les éléments lithogéniques correspondent à la fraction directement héritée de la lithosphère. De la même manière, les éléments pédogéniques sont également d'origine lithogénique, mais leur concentration et distribution dans les couches du sol ont été modifiées par des processus liés à la pédogénèse. En raison d'une pédogénèse variable selon les milieux, il n'existe pas un unique fond pédogéochimique, mais une multitude, un à chaque site, utilisé comme valeur de référence pour estimer les apports en éléments anthropiques. Ainsi, [Baize \(1997\)](#) a proposé le « fond pédogéochimique naturel local » (FPGN) comme étant la concentration naturelle d'une substance dans un horizon de sol, résultant de l'évolution géologique et pédologique, à l'exclusion de tout apport anthropique.

Les éléments anthropiques sont quant à eux déposés dans les sols en conséquence directe ou indirecte des activités humaines entraînant des enrichissements. Premièrement, il est important de définir les termes « contamination » et « pollution », souvent employés confusément l'un pour l'autre. L'académie des sciences ([Bourelrier & Berthelin, 1998](#)) a défini le terme de « contamination » d'un site comme un apport d'éléments, issus de l'extérieur, entraînant une élévation de la teneur originelle, sans indication des conséquences sur le comportement des organismes vivants présents sur ou à proximité du site. Le sol d'un site est considéré comme contaminé par un élément lorsque la teneur de cet élément est significativement supérieure à la concentration naturellement retrouvée dans le sol du secteur étudié, correspondant au FPGN ([Citeau et al., 2008](#)). En revanche, la pollution désigne l'accumulation d'un composé en quantité telle qu'elle peut induire un danger pour les organismes vivants ou compromettre l'usage qui est habituellement fait du milieu récepteur ([Kabata-Pendias, 2011](#)). Ainsi, le terme de pollution concerne l'ensemble des sites pour lesquels une requalification n'est possible qu'en passant par une étape de remédiation des éléments présents en excès dans le milieu. Dans le cas des éléments métalliques issus de l'activité minière, [Bowen \(1979\)](#) a suggéré que lorsque le taux d'exploitation minière d'un élément dépasse son taux naturel par un facteur de 10 ou plus, l'élément peut potentiellement être considéré comme un polluant. Le statut de « site contaminé » regroupe quant à lui un plus vaste panel de sites, comprenant notamment les surfaces situées en aval de sources de pollution et soumises à des retombées atmosphériques accumulées au cours des années voire des décennies ou encore certaines zones urbaines situées à proximité de grands axes routiers. Dans le cas de ces sites contaminés, seules des analyses environnementales peuvent révéler la présence d'un élément en quantité significativement plus élevée que le FPGN.

### 1.1.2 La contamination des sols en Europe

L'importante quantité de sous-produits et l'utilisation généralisée de produits chimiques au cours des dernières décennies ont entraîné des contaminations des sols en Europe. Des dépôts non autorisés de déchets, l'utilisation non adaptée de substances dangereuses dans le cadre de procédés industriels ou commerciaux ainsi que certains accidents constituent les principales sources de contamination des sols (EEA, 1998).

Sur la base des rapports de 27 pays adhérents à l'Agence Européenne de l'Environnement (EEA), environ 1 170 000 sites potentiellement contaminés ont été identifiés en 2017, ce qui correspond à 45% de l'ensemble de l'Europe. D'après leurs données, une moyenne de 4,2 sites potentiellement contaminés est déclarée pour 1 000 habitants et environ 5,7 sites présentent une contamination avérée pour 10 000 habitants (EEA, 2017). Une extrapolation provisoire à l'ensemble de l'Europe donne une estimation du nombre total de sites potentiellement contaminés de 2,5 millions, dont environ 14% (340 000 sites) susceptibles d'être sévèrement pollués et nécessitant par conséquent des mesures de remise en état. Parmi ces sites, environ un tiers a déjà été identifié comme contaminé et environ 15% ont été restaurés. Avec plus de 40 000 sites potentiellement contaminés, la France se place en troisième position derrière la Belgique et le Royaume-Uni (Figure 2).

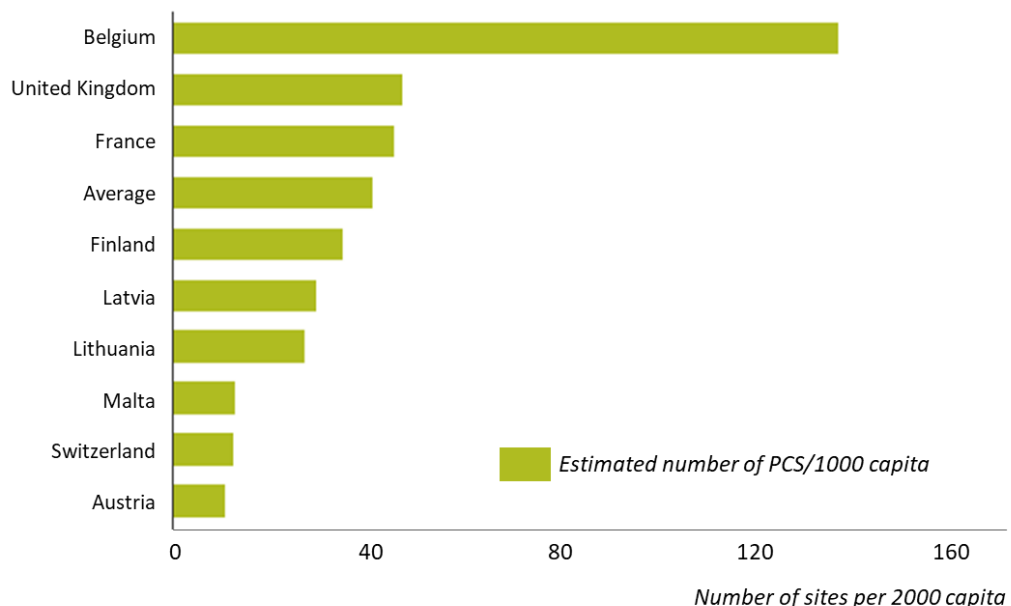


Figure 2. Nombre de sites potentiellement contaminés dans 16 pays appartenant à l'Agence Européenne de l'Environnement en 2017

En Europe, les activités de production sont à l'origine de 60% des contaminations, contre 32% pour les activités de service. Les activités minières représentent d'importantes sources de

contamination dans certains pays. L'industrie métallurgique serait un contributeur majeur au niveau local en République yougoslave de Macédoine, en France et en Slovaquie, à l'origine de plus de 20% des contaminations des sols. *A contrario*, les industries du textile, du cuir, du bois et du papier ont généralement une importance mineure en ce qui concerne la contamination des sols au niveau local. Parmi les activités de service, les stations-service sont les sources de contamination les plus fréquemment signalées en Europe (15%) (EEA, 2017).

La Figure 3 présente la contribution des différentes classes de contaminants dans les sols et les eaux souterraines en Europe, à partir de données datant de 2011. Dans la mesure où ces chiffres n'ont que peu évolués entre 2006 et 2011, on peut estimer qu'il en est de même entre 2011 et 2019 (EEA, 2017). Ainsi les ETM et les huiles minérales (*i.e.*, hydrocarbures issus de la distillation du pétrole) représentent plus de 50% des contaminations en Europe.

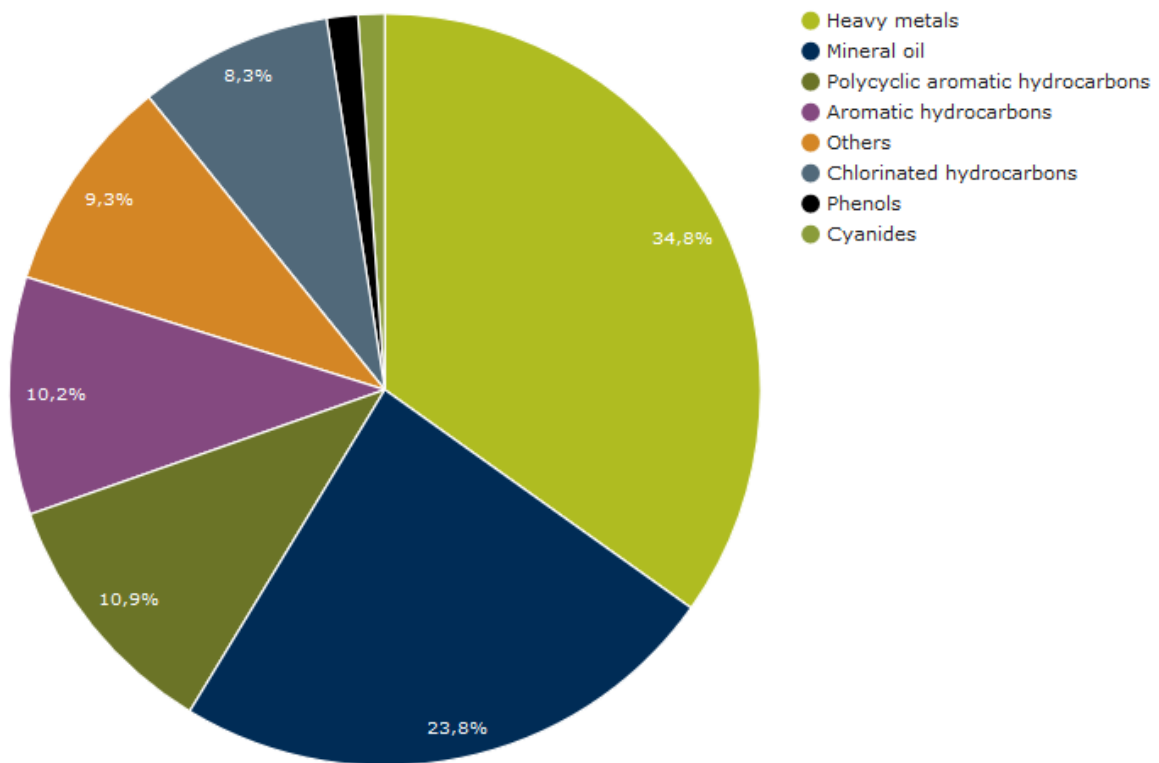


Figure 3. Pourcentage d'occurrence de 8 groupes de polluants retrouvés dans les sols et les eaux souterraines en Europe (données de 2011 tirées de EEA (2017)).

### 1.1.3 Les friches industrielles contaminées en France

Selon la définition du journal officiel de la République française, une zone de friche est un ensemble de terrains laissés à l'abandon, sur lesquels peuvent subsister des installations ou des dépôts liés à des activités passées, et qui sont susceptibles de présenter des risques de pollution (Limasset et al., 2015).

C'est à partir des années 1970, lors du changement de paradigme économique ayant entraîné une désindustrialisation progressive de l'Europe, que la France, tout comme de nombreux pays Européens, a vu l'émergence d'espaces délaissés, qualifiés de friches industrielles. En France, près de 80% des pollutions connues actuellement ont été engendrées par des activités industrielles et de commerce (Figure 4). Ces cas de pollution sont souvent dus à d'anciennes pratiques sommaires d'élimination des déchets, mais aussi à des fuites ou à des épandages de produits chimiques, accidentels ou non (EEA, 2017).

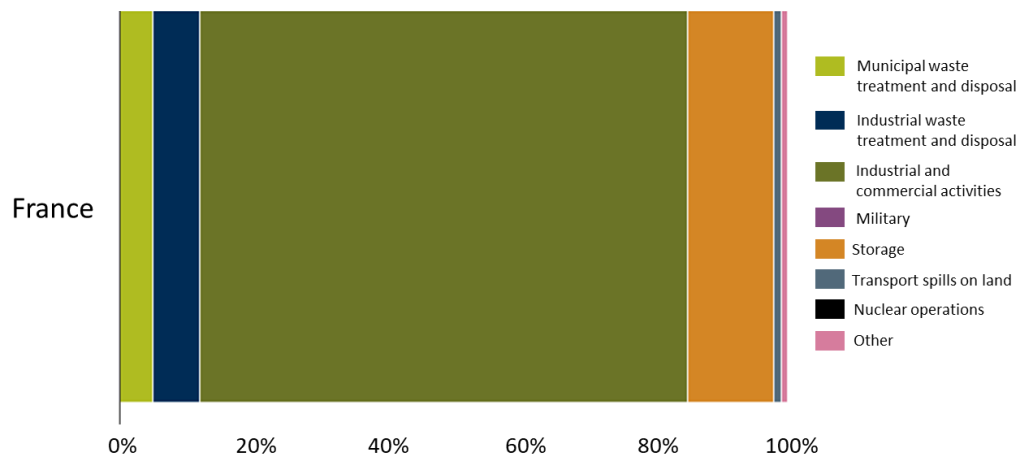


Figure 4. Pourcentage d'implication de différentes activités dans la contamination des sols en France, d'après EEA, (2017).

En France, les friches industrielles sont recensées sur les bases de données BASIAS et BASOL, toutes deux créées par le ministère de l'Écologie du Développement Durable et de l'Énergie. BASIAS recense l'ensemble des sites industriels du territoire Français, abandonnés ou non, susceptibles d'engendrer une pollution de l'environnement. BASOL conserve la mémoire de plusieurs milliers de sites et sols pollués ou contaminés, appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. En 2019, plus de 7077 sites font l'objet d'un référencement dans BASOL en raison d'une pollution des sols ou des eaux souterraines avérée. Parmi les 4250 sites sur lesquels une intervention a été réalisée, 3300 restent soumis à une restriction d'usage en raison de leur passif. On estime aujourd'hui que près de 1000 sites font l'objet d'une intervention en cours et près de 2000 restent en attente d'évaluation et de réhabilitation.

D'après un rapport publié par l'ADEME (Chateau et al., 2018) en 2018, se basant sur 95 opérations récentes (2010-2016) de réhabilitation de friches industrielles, les principaux types de polluants rencontrés sont les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les Hydrocarbures totaux (HCT) et les ETM avec respectivement 73%, 89% et 78% d'occurrence (Figure 5). Dans la majorité des cas, les friches industrielles sont concernées par des pollutions multiples.

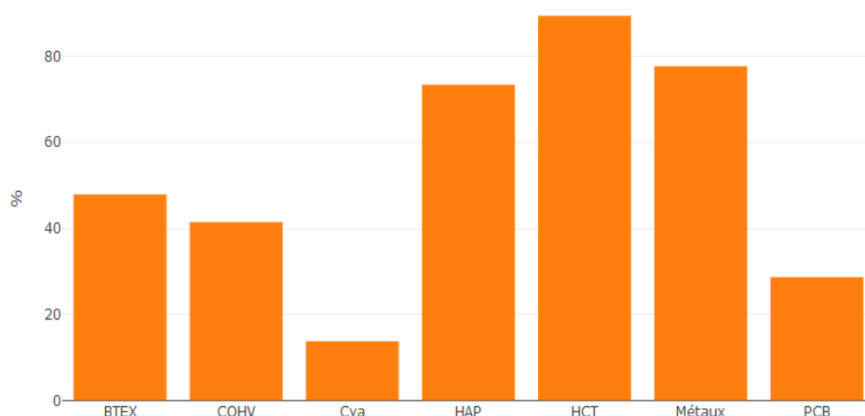


Figure 5. Pourcentage d'occurrence des principaux types de polluants dans 95 projets de réhabilitation de friches, d'après Chateau et al. (2018).

Les BTEX (Benzène, Toluène, Éthylbenzène, Xylène), Composés Organiques Halogénés Volatils (COHV) et Polychlorobiphényles (PCB) sont également bien représentés puisqu'ils sont retrouvés dans environ 1/3 des friches pour les PCB et presque 1/2 pour les BTEX et COHV. Les cyanures totaux sont les polluants les moins présents avec une occurrence de 14%. En 2018, des impacts sur les eaux souterraines ont été identifiés dans 25 projets et concernent principalement des pollutions organiques (HCT, HAP, COHV et BTEX). De plus, la majorité des sites présentent entre 2 et 5 groupes de polluants différents (Chateau et al., 2018), ce qui est particulièrement le cas pour les ETM. Cette multi-pollution des sites, qui témoigne de la succession d'activités ou de multi-activités ayant existé sur les sites reconvertis, est un critère important à prendre en compte pour le choix des techniques de dépollution employées.

L'ensemble du territoire situé en France métropolitaine est concerné par la présence de friches industrielles (Figure 6). La fréquence de présence des polluants est directement liée à l'activité (ou la succession d'activités) du site plutôt qu'à sa localisation géographique. Toutefois, cinq zones se démarquent de par leur densité de friches industrielles, il s'agit i) de la zone allant de l'Est de France, jusqu'au Nord pas de Calais, en passant par le bassin parisien (activités chimiques, textiles, métallurgiques et minières) ii) la région de Lyon (activités chimiques et d'équipement), iii) les Alpes (métallurgie), iv) la région de Bordeaux (Pétrochimie) et enfin v) le littoral méditerranéen (pétrochimie). Les sites présentant le plus grand nombre de pollutions multiples sont localisés dans

les régions du Nord pas de Calais, centre de la France (incluant l’Ile de France), de Normandie, de Lorraine et d’Auvergne Rhône Alpes en lien avec leur important passé industriel.

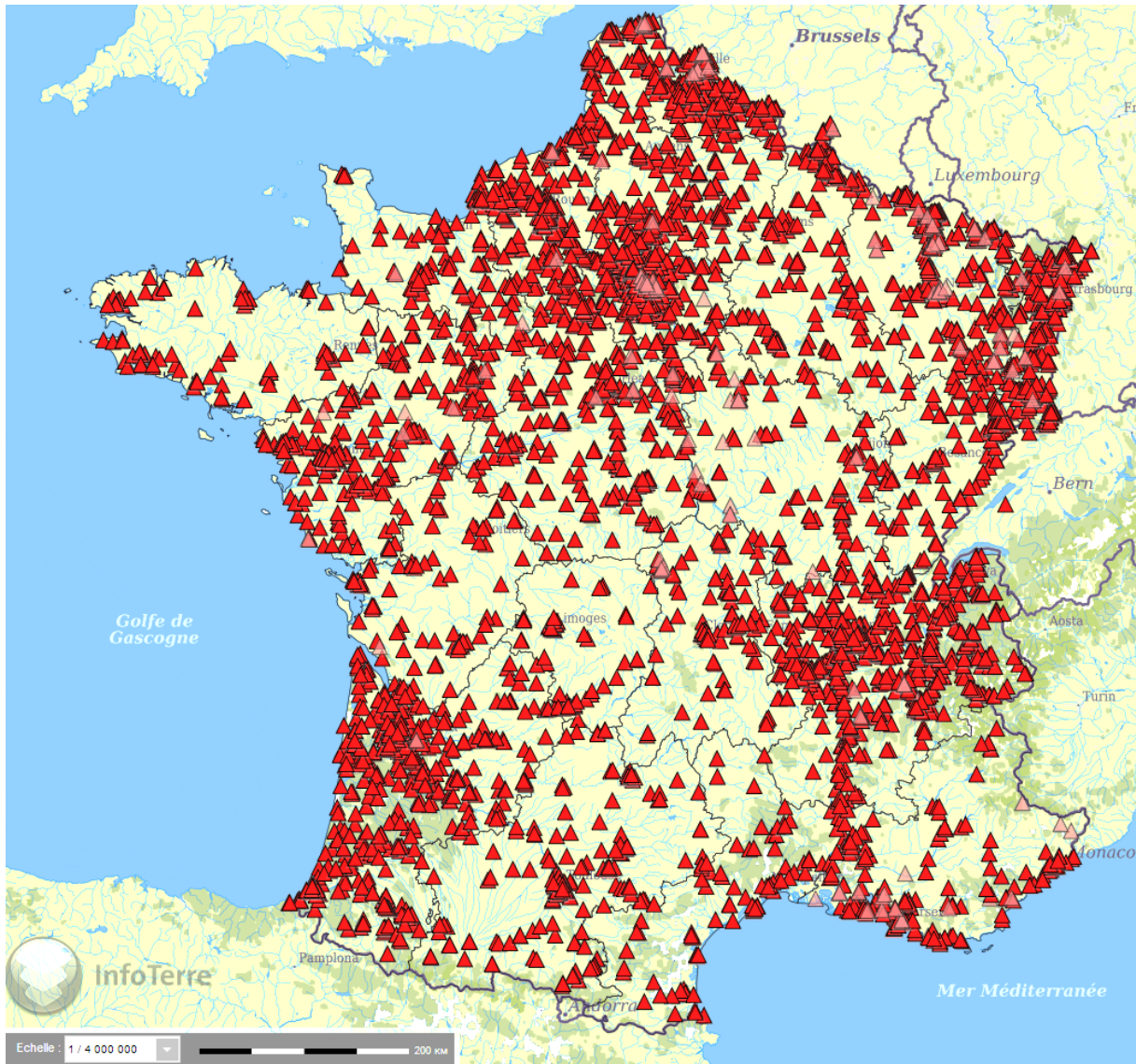


Figure 6. Localisation des sites et sols pollués appelant une action des pouvoirs publics, répertoriés par BASOL. Représentation effectuée via le site internet InfoTerre du BRGM.

#### 1.1.4 Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués (SSP)

La pression démographique associée au développement urbain génère une pression foncière devenue progressivement une préoccupation majeure des agglomérations urbaines, obligeant les politiques à reconsidérer l’ensemble du territoire. Ce phénomène a ainsi conduit à l’élaboration d’une politique de réhabilitation et de reconversion des espaces délaissés, et notamment des friches industrielles potentiellement polluées.



#### 1.1.4.1 Contexte

Depuis la fin des années 1990, la France s'est engagée dans l'amélioration de la qualité de son environnement. Elle a ainsi adopté en 2004 une Charte de l'environnement faisant de l'accès à un environnement sain une priorité pour tous. Ces dernières années, les importantes mutations de l'industrie entraînant des arrêts d'exploitation et par conséquent de nombreux sites à revaloriser couplée à une demande foncière forte en raison d'une pression démographique urbaine de plus en plus pesante ont conduits les autorités à reconsidérer leur politique nationale de gestion de l'état des sols. Suivant les avancées des autres pays dans ce domaine, la politique de réhabilitation et de traitement des sites s'est infléchie à la fin des années 1990 vers une politique de gestion des risques en fonction de l'usage. Cette politique de gestion des sites et sols pollués s'est d'abord fondée sur l'important travail de recensement des sites effectué par les bases de données BASIAS et BASOL.

Elle s'est traduite en 2007 par l'élaboration de la méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués, actualisée en 2017 ([Direction générale de la Prévention des Risques, 2017](#)). La méthodologie de gestion des sites et sols pollués (SSP) concerne tous les sites présentant potentiellement des problématiques de pollution des sols et/ou des eaux souterraines, ces sites relevant ou non de la réglementation des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE). Depuis 2010, l'ADEME contribue au renouvellement urbain par le soutien à la reconversion des friches polluées pour la création de logements, d'activité économique et d'équipements publics. Ces projets permettent de requalifier des secteurs délaissés pour leur donner un nouvel usage. Entre 2010 et 2017, ce sont ainsi plus de 125 projets qui ont été lauréats des appels à projets "travaux de dépollution pour la reconversion des friches" ([Chateau et al., 2018](#)).

#### 1.1.4.2 Politique nationale de gestion des SSP

La politique nationale de gestion des SSP est une politique de gestion des risques suivant l'usage des milieux. Elle engage à définir les modalités de suppression des pollutions au cas par cas, compte tenu des techniques disponibles et de leurs coûts économiques. Le maintien de pollution résiduelle sur un site est lié à sa compatibilité avec l'usage retenu (*e.g.*, industriel, résidentiel, ...) et, si nécessaire, assorti des conditions de maîtrise de leur impact sanitaire ou environnemental. Les démarches de gestion mises en place s'appuient sur les principes suivants : i) prévenir les pollutions futures, ii) mettre en sécurité les sites nouvellement découverts, iii) connaître, surveiller et maîtriser les impacts, iv) traiter et réhabiliter en fonction de l'usage puis pérenniser cet usage et v) garder la mémoire. S'appuyant sur l'examen et la gestion du risque sanitaire envers les populations plus que sur des niveaux prédéfinis de pollution des sols, cette politique a conduit les pouvoirs publics à communiquer sur les actions de réhabilitations entreprises (BASOL), mais aussi à fixer des usages

des sols compatibles avec les pollutions résiduelles après traitement du site ou, si nécessaire, à établir des interdictions ou des restrictions d'usage en cas d'incompatibilité.

La méthodologie nationale de gestion des SSP repose sur des outils de gestion (*i.e.*, schéma conceptuel, Interprétation de l'état des Milieux, plan de gestion, etc) évolutifs selon les résultats obtenus. L'identification de l'origine et de l'étendue des pollutions doit être fondée sur des diagnostics et des analyses fiables reposant préférentiellement sur des mesures directes dans les milieux exposés plutôt que des modélisations. Les meilleures options en terme de techniques de réhabilitation et la remédiation doivent être identifiées au regard du diagnostic de l'état du milieu, des usages futurs et des contraintes d'application, et ce, au cas par cas selon les sites. Une étape finale d'ingénierie de dépollution complète ce processus de prise de décision. Finalement, la gestion des SSP impose de conserver la mémoire des pollutions au travers d'une intégration dans les bases de données préalablement présentées et, depuis 2014, dans les SIS (Secteurs d'Information sur les Sols), élaborés dans le cadre de la loi ALUR afin de permettre un meilleur accès à l'information.

Ces récentes dispositions s'ajoutent aux politiques actuelles de prévention des pollutions et de surveillance de l'environnement autour des ICPE. Toute exploitation industrielle ou agricole susceptible de créer des risques ou de provoquer des pollutions ou nuisances, notamment pour la sécurité et la santé des riverains, a le statut d'« installation classée ». Les activités relevant de la législation des installations classées sont énumérées dans une nomenclature qui les soumet à un régime d'autorisation ou de déclaration en fonction de l'importance des risques ou des inconvénients qui peuvent être engendrés. De plus, en cas d'apparition de pollution des sols sur un site en cours d'exploitation, le principe de réparation relevant de la directive 2010/75/UE relative aux émissions industrielles, dite directive IED est également retenu dans un objectif de rétablissement de l'état des sols suivant la situation antérieure.

#### *1.1.4.3 Reconversion des friches industrielles : démarche REFRINDD*

La reconversion des friches industrielles, en particulier celles de grande étendue ou celles présentant des difficultés de gestion, doit intégrer des objectifs multiples, *via* une approche conjointe de réhabilitation et de réaménagement nécessitant des dispositions spécifiques par rapport aux sites pollués classiques. Pour cette raison, la politique nationale de gestion des SSP intègre un volet spécifique à la reconversion de ces friches, reposant sur le « Guide technique pour les Aménageurs » du ministère du développement durable et de l'ADEME (2009-2013) et plus récemment sur la démarche REFRINDD (Limasset et al., 2015). Le projet REFRINDD a développé et mis à disposition des décideurs une démarche de gestion intégrée en accord avec les principes du développement durable. Elle a été élaborée dans le cadre d'un partenariat de projet de recherche et

développement, cofinancée par l'ADEME et réunissant urbanistes, experts et chercheurs en gestion de sites et sols pollués. Elle est le résultat de nombreux échanges de divers acteurs français impliqués dans des projets de requalification de friches industrielles.

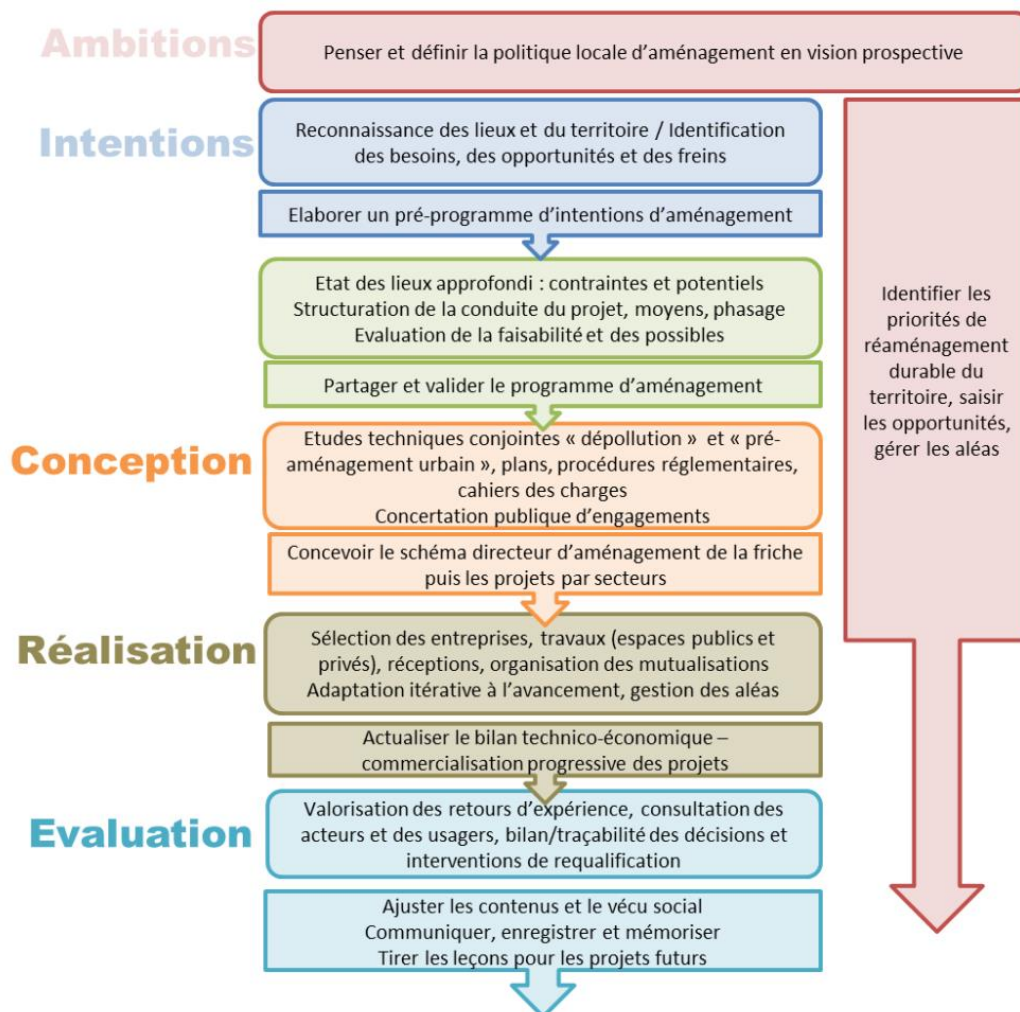


Figure 7. Présentation des 6 étapes intégrées au guide méthodologique de la démarche REFRINDD.

La démarche REFRINDD comprend un guide méthodologique intégrant les six étapes présentées dans la Figure 7. La mise en place de la méthodologie est accompagnée d'un prototype d'outil destiné à aider les opérateurs de projet dans la prise de décision en matière de scénarios de réaménagement les plus durables possibles à l'échelle d'une friche. Il permet, étape par étape, d'évaluer et identifier les contraintes et retombées environnementales, économiques et sociales associées à un projet de requalification à différents stades du réaménagement de la friche. L'identification de ces contraintes et la comparaison de différents scénarios de réhabilitation ou de réaménagement sont proposées à partir d'analyses multicritères (AMC). Cet outil est une interface informatique développée sous le logiciel Excel (Limasset et al., 2015).

#### 1.1.4.4 L'élaboration du schéma conceptuel pour l'analyse de l'état des milieux

La première étape proposée par la méthodologie nationale de gestion des SSP propose la construction d'un schéma conceptuel s'appuyant sur la collecte d'informations à partir de recherches documentaires, de constats de terrain, d'enquêtes auprès des utilisateurs du site ainsi que de diagnostics et études spécifiques réalisées sur place (études faune et flore, dossier Loi sur l'Eau, étude géotechnique) Figure 8. Le schéma conceptuel va permettre d'établir un bilan factuel de l'état des milieux du site contaminé, en vue d'appréhender les relations entre les sources de pollution, les voies de transfert et les enjeux à protéger.

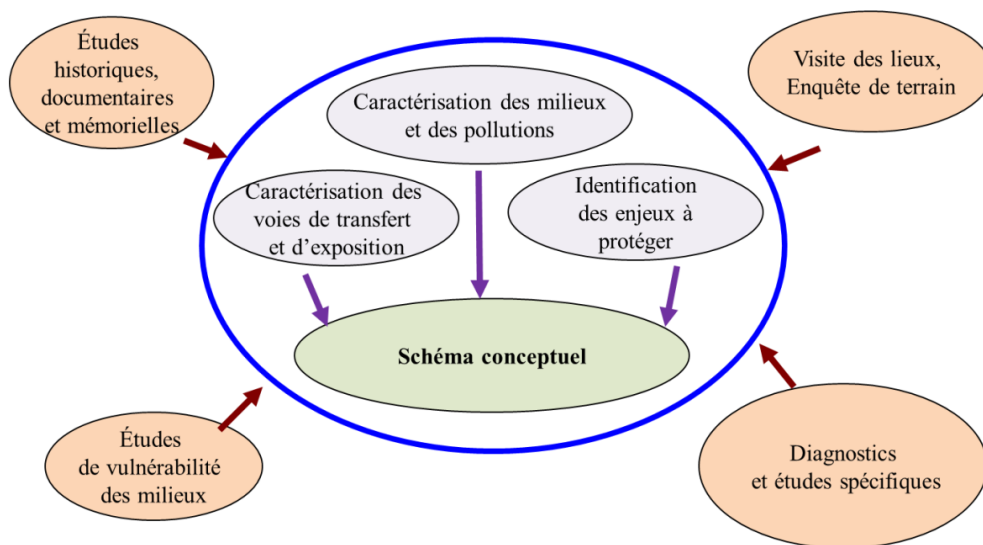


Figure 8. Principaux éléments constitutifs du schéma conceptuel de la politique nationale SSP.

#### 1.1.4.5 Les outils de caractérisation des sols contaminés

La caractérisation des sols contaminés à l'aide d'analyses physico-chimiques, bien qu'essentielle, ne permet pas toujours de connaître le comportement des polluants dans les milieux impactés, leurs transferts dans les chaînes trophiques, ou leurs effets sur les organismes terrestres. Il est donc préconisé de compléter cette caractérisation avec d'autres informations telles que celles apportées par les indicateurs biologiques. En effet, ceux-ci permettent de renseigner sur i) les interactions des contaminants avec le milieu, leur biodisponibilité et leurs transferts vers les premiers maillons de la chaîne trophique, ii) les effets des polluants sur des organismes du sol et par conséquent sur l'état biologique de celui-ci (en tant que diagnostic initial ou encore après une opération de remédiation) et iii) le choix d'un usage actuel ou futur d'un sol dégradé (*e.g.*, réaménagement d'une friche urbaine en parc urbain). Certains outils biologiques considèrent les organismes à l'échelle des populations et permettent notamment d'identifier des modifications/adaptations de ces communautés (*e.g.*, étude des communautés de la faune du sol) et d'appréhender des changements à long terme dans les écosystèmes. La connaissance des fonctions

biologiques assurées par les organismes du sol (*e.g.*, fonction habitat, fonction recyclage des nutriments, capacité de rétention, potentiel d'atténuation naturelle fortement liée aux activités microbiennes,) permet d'améliorer la prise de décision lors de la restauration des sols et de la reconquête des friches.

Parmi l'ensemble de ces techniques, des indicateurs biologiques tels que les indices IBG-DCE (Indice Biologique Global – Directive Cadre Eau) et IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) reposant sur des organismes intégrateurs permettent d'appréhender la disponibilité des polluants et ainsi leur impact sur les milieux. Les outils de biologie moléculaire permettant de caractériser ou identifier les populations microbiennes des sites contaminés sont également dans la politique nationale des SSP. Cette approche permet notamment de comprendre les mécanismes microbiens en jeu et ainsi d'évaluer si un traitement par bioremédiation est envisageable ou si la dégradation biotique est effective. Cet outil peut contribuer à la sélection des différentes options de traitements possibles.

#### *1.1.4.6 La démarche d'Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM)*

Différentes circonstances peuvent conduire à la réalisation d'une démarche d'Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM) et notamment la découverte de pollutions dans des milieux exposés (présence d'enjeux) ou encore dans une situation où les autorités souhaitent évaluer l'impact d'une ICPE en fonctionnement sur les différents milieux.

La mise en œuvre des modalités appropriées de gestion et de communication est de la responsabilité du maître d'ouvrage (entreprises privées, collectivités locales), cependant, l'administration et notamment l'ARS peut apporter son soutien lorsque celui-ci est nécessaire. La démarche IEM est exclusivement dédiée aux aspects sanitaires. Les dégradations des milieux sont analysées au regard des conséquences sanitaires potentielles et des enjeux préalablement identifiés. Cette démarche a pour objectif de distinguer :

- les milieux (d'exposition) qui ne nécessitent aucune action particulière, c'est-à-dire ceux qui permettent une libre jouissance des usages constatés sans exposer les populations à des niveaux de risques excessifs ;
- les milieux (d'exposition) qui peuvent faire l'objet d'actions simples de gestion pour rétablir la compatibilité entre l'état des milieux d'exposition et leurs usages constatés ;
- les milieux (ou les situations) qui nécessitent la mise en œuvre d'un plan de gestion. La zone concernée devient alors un site au sens du plan de gestion.

Le principe est de contrôler par des mesures *in-situ* l'état des milieux et de comparer les résultats avec des valeurs de références (*e.g.*, FPGN local, valeurs données par l'ANSES pour les denrées alimentaires, etc). Dans le cas d'une problématique liée à des ETM dans les sols, le

référentiel utilisé provient de l'étude ASPITET de l'INRA (Tableau 2), tenant compte uniquement des concentrations totales et non de la spéciation des éléments.

Tableau 2. Référentiel utilisé dans le cadre de la méthodologie nationale SSP pour les métaux et métalloïdes dans les sols, ces valeurs sont issues de l'étude ASPITET réalisée par l'INRA.

Les gammes de valeurs présentées ci-dessous mg/kg. Les numéros entre parenthèses renvoient à des types de sols effectivement analysés, succinctement décrits et localisés ci-dessous.			
Métaux et Métalloïde	Gamme de valeurs couramment observées dans les sols "ordinaires" de toutes granulométries	Gamme de valeurs observées dans le cas d'anomalies naturelles modérées	Gamme de valeurs observées dans le cas de fortes anomalies naturelles
As	1,0 à 25,0	30 à 60 (1)	60 à 284 (1)
Cd	0,05 à 0,45	0,70 à 2,0 (1)(2)(3)(4)	2,0 à 46,3 (1)(2)(4)
Cr	10 à 90	90 à 150 (1)(2)(3)(4)(5)	150 à 3180 (1)(2)(3)(4)(5)(8)(9)
Co	2 à 23	23 à 90 (1)(2)(3)(4)(8)	105 à 148 (1)
Cu	2 à 20	20 à 62 (1)(4)(5)(8)	65 à 160 (8)
Hg	0,02 à 0,10	0,15 à 2,3	
Ni	2 à 60	60 à 130 (1)(3)(4)(5)	130 à 2076 (1)(4)(5)(8)(9)
Pb	9 à 50	60 à 90 (1)(2)(3)(4)	100 à 10180 (1)(3)
Se	0,10 à 0,70	0,8 à 2,0 (6)	2,0 à 4,5 (7)
Tl	0,10 à 1,7	2,5 à 4,4 (1)	7,0 à 55,0 (1)
Zn	10 à 100	100 à 250 (1)(2)	250 à 11426 (1)(3)

(1) zones de "métallotectes" à fortes minéralisations (à plomb, zinc, barytine, fluor, pyrite, antimoine) au contact entre bassins sédimentaires et massifs cristallins. Notamment roches liasiques et sols associés de la bordure nord et nord-est du Morvan (Yonne, Côte d'Or).

(2) sols argileux développés sur certains calcaires durs du Jurassique moyen et supérieur (Bourgogne, Jura).

(3) paléosols ferrallitiques du Poitou ("terres rouges").

(4) sols développés dans des "argiles à chailles" (Nièvre, Yonne, Indre).

(5) sols limono-sableux du Pays de Gex (Ain) et du Plateau Suisse.

(6) "bornais" de la région de Poitiers (horizons profonds argileux).

(7) sols tropicaux de Guadeloupe.

(8) sols d'altération d'amphibolites (région de La Châtre - Indre).

(9) matériaux d'altération d'amphibolites (région de La Châtre - Indre).

Dans les grandes métropoles, des valeurs de références spécifiques ont été établies, on parle alors de fonds pédo-géochimiques anthropisés pour des sols urbanisés et industriels. Ces données sont utilisées comme valeur d'analyse de la situation, en complément des données ASPITET. Des mesures particulières ont été établies pour le Pb en raison de ses effets toxiques sur la santé (plombémies) démontrés pour des concentrations dans le sang inférieures à 100 µg/L. Il est ainsi préconisé d'adopter une politique de réduction des expositions au plus bas niveau possible, avec pour objectif une plombémie inférieure à 40 µg/L pour 98% de la population.

Le processus de la démarche IEM peut conclure de la compatibilité entre l'état des milieux et les usages constatés au moment de l'étude. Dans ce cas, des mesures de surveillances et de

pérennité des usages peuvent être mises en place. Il est néanmoins nécessaire d'élaborer un plan de gestion lorsque les pollutions identifiées ne sont pas maîtrisées. Lorsque la démarche conclut à l'incompatibilité avec les usages, un plan de gestion devra être élaborée après que des mesures sanitaires, environnemental ou restrictives de maîtrise des risques soit prises afin d'améliorer rapidement l'état des milieux exposés.

#### 1.1.4.7 *Le plan de gestion*

Le plan de gestion est généralement mis en œuvre dans différentes situations pour lesquelles il est encore possible d'agir sur l'état des milieux et/ou d'en adapter les usages (*e.g.*, cessation d'activité d'une ICPE, ou lors de projets de réhabilitation d'anciens sites industriels). Ce document d'orientation vise à établir les différents scénarios de dépollution dans un objectif de remédiation total des sources de pollution. Dans ce contexte, l'outil permet :

- De mieux délimiter les sources de pollution à partir d'outils adaptés
- De définir des objectifs de réhabilitation en tenant compte des caractéristiques du site
- D'obtenir des bilans coûts-avantages étayés
- De proposer des scénarios de gestions adaptés et validés par des essais de faisabilité si nécessaire

Ce document présente ainsi l'ensemble de ces résultats ainsi que les mesures de surveillance et de contrôle à mettre en œuvre pour s'assurer de l'efficacité des mesures de gestion retenues.

#### 1.1.4.8 *Le traitement et la gestion des pollutions*

Selon la méthodologie, les processus de gestion doivent tenir compte des perspectives de développement durable et se baser sur un bilan environnemental global. En effet, l'objectif est d'atteindre le meilleur niveau de protection de l'Homme et des écosystèmes tout en évitant de mobiliser des ressources disproportionnées au regard des enjeux à protéger. Les techniques de réhabilitation des sols pollués sont classées en quatre catégories :

- Les techniques de confinements, consistant simplement à isoler les contaminants pour éviter les fuites vers les écosystèmes à proximité de la source ;
- les traitements physiques, qui utilisent des fluides, présents dans les sols ou injectés, comme vecteur pour entrainer la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser ;
- les traitements chimiques pour dégrader les polluants ou les transformer en des composés moins toxiques ou plus facilement biodégradables ;
- les traitements thermiques, qui utilisent de la chaleur pour éliminer le polluant ou le rendre inerte.
- les traitements biologiques dans lesquels des micro-organismes et/ou des plantes contribuent à immobiliser ou à dégrader les polluants du sol ;

Elles se distinguent par leur mode de mise en œuvre : techniques *ex-situ* (hors site et sur site) ou *in-situ*. Les traitements hors sites consistent à enlever les terres polluées et à les traiter dans

des installations extérieures au site (*e.g.*, centre de désorption, thermique, biocentre, etc.). Les traitements sur site consistent à traiter les terres polluées après leur excavation dans une installation présente sur le site et finalement les traitements *in-situ* consistent à traiter les terres polluées en place sans passer par l'étape d'excavation (*e.g.*, venting).

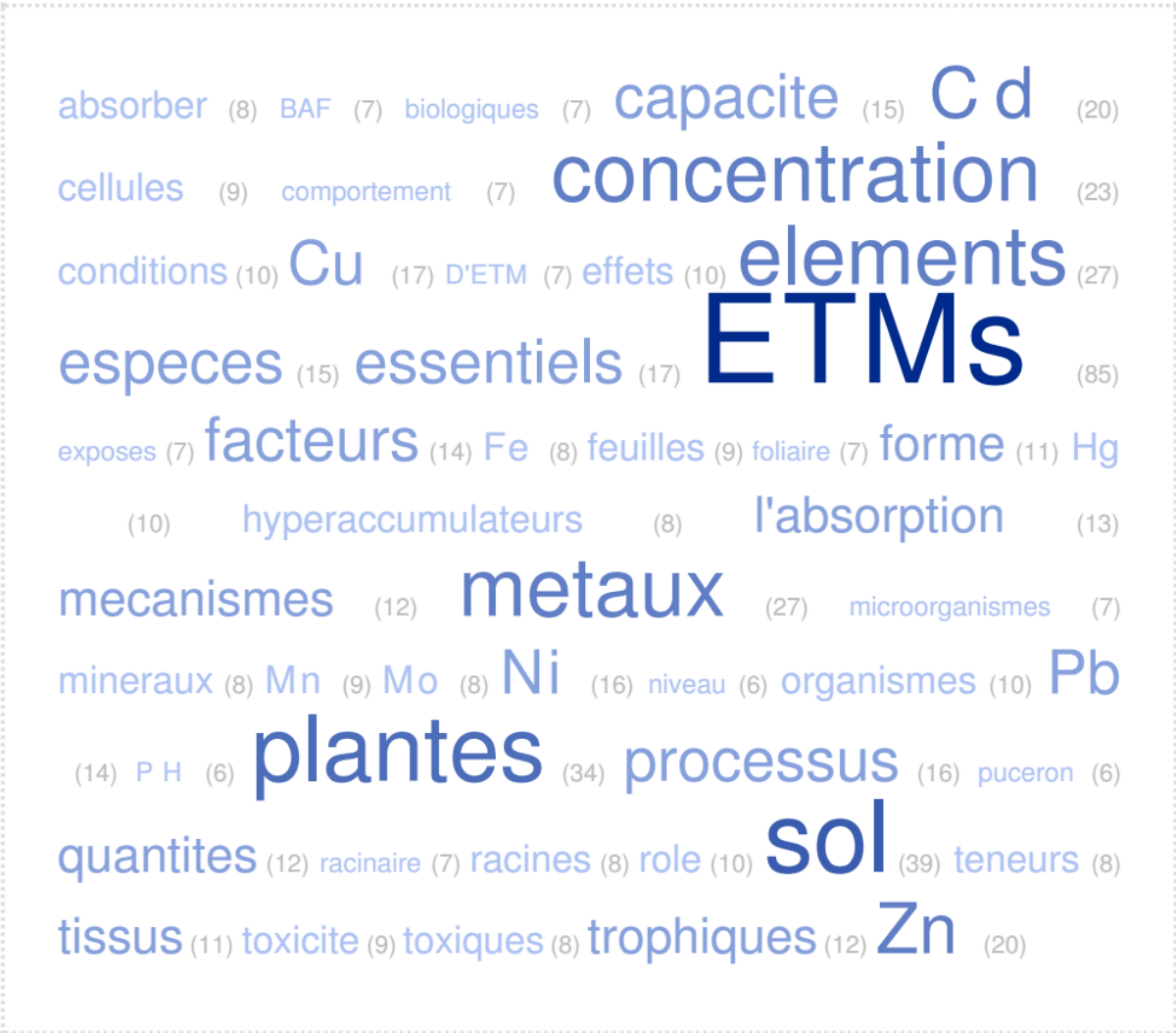
Le choix de la méthode de gestion de la pollution (dépollution/confinement) et des techniques à mettre en œuvre doit être défini au regard de nombreux critères liés à la nature du terrain et des polluants présents, ainsi que des futurs usages prévus. L'ADEME a développé avec le Bureau de recherches géologiques et minières (BRGM) un outil d'aide à la décision : SelecDEPOL afin de faciliter le choix de ces techniques pour les maîtres d'ouvrage, aménageurs, administrations et professionnels de la dépollution. Cet outil interactif de présélection des techniques de dépollution oriente, en fonction de différents paramètres (*e.g.*, polluants en présence, matrice à dépolluer, mode d'application des techniques, etc.) vers les techniques de dépollution disponibles, reconnues ou émergentes, les plus adaptées. L'outil donne accès à des documents décrivant les différentes techniques ainsi que les paramètres susceptibles de limiter la faisabilité et les performances de ces dernières.

Bien qu'il soit préconisé de favoriser les traitements *in-situ* ou sur site quelle que soit la nature du polluant afin de limiter la production et le transport de déchets, l'évacuation des terres reste majoritaire dans les opérations de dépollution. Les récents rapports de l'ADEME portant sur les 102 projets de renouvellement urbain et de reconversion des friches polluées rapportent que les techniques *in-situ* comme le venting/bioventing (utilisés dans seulement 7% des opérations) ou la phytoremédiation (3%) apparaissent comme étant encore faiblement représentées. Ces techniques montrent toutefois une forte émergence ces dernières années, encouragées par l'actuelle politique de gestion des friches industrielles. La difficulté d'utiliser ces techniques réside dans le faible retour d'expériences mis à disposition ainsi que des coûts d'étude avant travaux les plus importants. Ainsi, au stade du plan de gestion, sélectionner une méthode avec un faible retour d'expérience augmente les risques et les incertitudes liées à la dépollution.





## 1.2 Exposition des écosystèmes terrestres aux ETM



### 1.2.1 Définition des ETM

Les éléments traces sont les 68 éléments minéraux constituant de la croûte terrestre, dont la concentration est pour chacun d'eux inférieure à 0.1%. Ces micro éléments ne représentent que 0.6% de la composition chimique de la croûte terrestre, alors que les 12 éléments majeurs représentent 99.4% (Baize, 1997). Parmi eux, certains éléments (*i.e.*, cadmium (Cd), cobalt (Co), chrome (Cr), cuivre (Cu), manganèse (Mn), mercure (Hg), nickel (Ni), plomb (Pb), thallium (Tl) et zinc (Zn)) appartiennent au groupe des métaux, ce qui leur vaut l'appellation d'éléments traces métalliques (ETM). Certains de ces ETM (*e.g.*, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Ni) sont indispensables au fonctionnement des processus biologiques des micro-organismes, plantes et animaux : ce sont les oligo-éléments (Welch and Shuman, 1995). Ils peuvent néanmoins s'avérer toxiques pour ces mêmes formes de vie lorsque les teneurs atteignent certains seuils (*e.g.*, Cu, Zn). Il en va de même pour d'autres ETM dont le caractère indispensable n'est pas démontré (*e.g.*, Cd, Hg et Pb).

### 1.2.2 Comportement des ETM dans les sols

Les ETM d'origine anthropique peuvent atteindre le sol de surface, où leur devenir va principalement dépendre de ses propriétés chimiques et physiques, mais également de la spéciation de ces éléments. La persistance des ETM dans le sol est beaucoup plus longue que dans d'autres compartiments de la biosphère et leur élimination complète est pratiquement impossible. Bien que les ETM accumulés dans les sols puissent s'épuiser progressivement par lessivage, absorption par les plantes ou érosion, leur temps de séjour dans les sols est particulièrement variable et pour beaucoup, de l'ordre du millier d'années. Dans le cas de sols en climat tempéré, on peut estimer les temps de séjour suivants : Cd : 75-380 ans ; Hg, 500-1000 ans et pour l'Ag, Cu, Ni, Pb, Se, et Zn : 1000-3000 ans (Bowen, 1979). Ces temps de séjour sont notamment influencés par la typologie de sol et les conditions climatiques locales (Sumner, 1999).

Les auteurs s'accordent sur le fait que la mobilité des ETM, au même titre que leur biodisponibilité et leur toxicité dépend davantage de leurs formes chimiques et des conditions du milieu plutôt que de leur concentration (Degryse et al., 2009; Reddy et al., 1995). Les ETM étant considérés comme non volatils, excepté le Hg dont le point d'ébullition est à 357°C, leur mobilité dans le sol est principalement définie par leur solubilité dans la phase aqueuse et leur complexation avec les différents constituants du sol (Figure 9). Alors que certains resteront complexés à la matière organique (MO), fixés à des minéraux ou encore incorporés dans les être-vivants sous forme de complexes, limitant la possibilité de transfert entre les compartiments du sol, d'autres, simplement adsorbés sur des argiles, des oxydes (Fe, Mn) ou des carbonates de calcium, seront plus à même d'être mobilisés entre les différents compartiments (Ge et al., 2000).

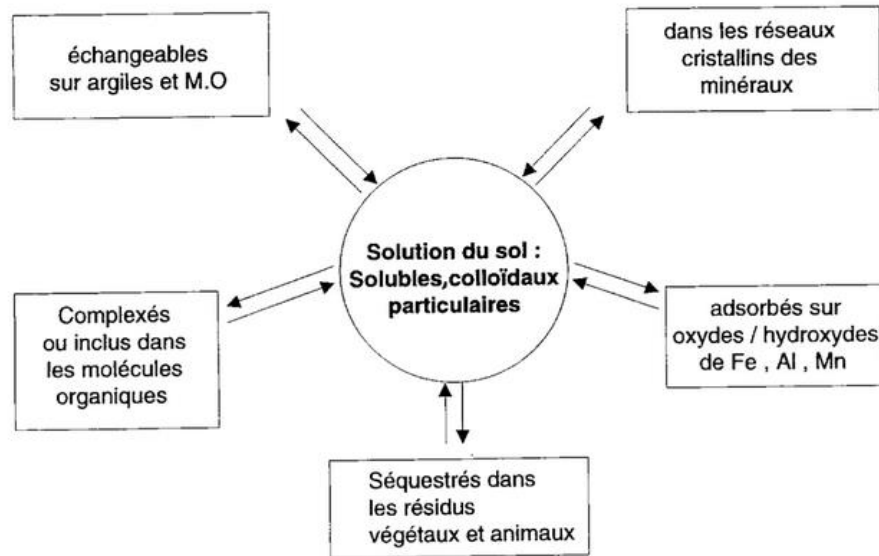


Figure 9. Distribution des ETM dans les différentes fractions d'un sol, d'après Baize, (1997).

Les principaux paramètres conditionnant le mouvement des ETM sont le pH, le potentiel redox (Eh) et le type de MO. A partir de ces paramètres, plusieurs modèles et équations ont été proposés pour simuler et prédire le comportement des ETM en milieu terrestre (Carrillo-González et al., 2006; Sauvé et al., 1998; Selim et al., 2001). D'autres facteurs liés au sol, tels que la Capacité d'Echange Cationique (CEC), les carbonates, les oxydes hydratés de Fe et de Mn, les minéraux argileux et les fractions granulométriques fines jouent également un rôle important dans le comportement des ETM. Dans des conditions naturelles, le pH du sol se situe le plus souvent entre 5 et 7, et le Eh entre 400 et 2200 mV, excepté pour les sols ennoyés où l'état de réduction est élevé. Les ions sont généralement les plus mobiles lorsque le pH et le Eh se trouvent dans les gammes basses.

Parmi les différentes formes que peuvent prendre les ETM en solution, la forme ionique libre est la plus facilement assimilable par les organismes (García et al., 2005). Lorsque les éléments sont stables sous forme cationique (cas de la plupart des ETM : Cu, Pb, Hg, Ni...), leur solubilité diminue lorsque le pH augmente (Lemière et al. 2001). La spéciation est particulièrement importante pour le Cr, pour lequel la forme hexavalent (chrome VI) est bien plus hydrosoluble que son homologue le chrome III et par conséquent plus biodisponible et potentiellement toxique.

Au niveau de la phase solide du sol, l'adsorption est l'un des phénomènes primordiaux définissant le comportement des ETM dans les sols. Ils peuvent être de deux types : processus d'adsorption physiques ou chimiques. Les éléments adsorbés par des processus physiques sont retenus par des liaisons faibles de type Van der Waals, pouvant être facilement rompues en cas de changements physico-chimiques. Dans le cas d'une adsorption chimique, des liaisons covalentes

difficilement réversibles retiennent les molécules. Ce type d'adsorption concerne principalement les oxydes de Fe, d'Al et de Mg ainsi que la MO. L'affinité des ETM pour les constituants du sol est fortement liée aux propriétés électrochimiques (CEC) des minéraux. Certains minéraux argileux, comme la montmorillonite, l'imogolite ou la vermiculite présentent la capacité de sorption la plus élevée (Tan, 2010).

### 1.2.3 Transfert des ETM vers les végétaux

En raison de leur aptitude à se développer dans des sols très variés, y compris pollués, les végétaux sont susceptibles d'être exposés à d'importantes quantités d'ETM. De plus, leur position à la base des chaînes trophiques en fait des vecteurs potentiels de polluants vers les échelons trophiques supérieurs. La principale voie d'exposition des plantes aux ETM se fait par leur milieu de croissance et notamment *via* la solution nutritive du sol (Kabata-Pendias, 2011). C'est à partir de cette solution qu'ils vont puiser, *via* les racines, les oligo-éléments nécessaires à leur métabolisme autotrophe (Rascio and Navari-Izzo, 2011). Une entrée des ETM par voie atmosphérique *via* les feuilles, a également été mise en évidence (revue par Shahid et al., (2017)).

#### 1.2.3.1 Absorption racinaire

L'absorption des ETM par les racines peut être à la fois passive (*i.e.*, diffusion des ions de la solution du sol directement vers l'endoderme radiculaire *via* des canaux) ou active (*i.e.*, *via* des transporteurs nécessitant de l'énergie métabolique), avec toutefois des controverses pour certains ETM. De manière générale, lorsque la concentration en cations dans la solution du sol est faible (<0,5  $\mu\text{M}$ ), il a été montré qu'une absorption active prédominait, alors qu'à des concentrations plus élevées (>0,1 mM), l'absorption est dominée par les processus passifs (Tarradellas et al., 1996). De plus, les mécanismes d'assimilation varient en fonction de l'élément considéré. Le Pb et le Ni sont préférentiellement absorbés passivement par des protéines de type porine, tandis que l'absorption du Cu, Mo et Zn est généralement active (Kabata-Pendias, 2011). Toutefois, en cas de perturbations des propriétés biologiques et structurelles des cellules racinaires, l'ensemble des ETM sont susceptibles d'être absorbés passivement.

L'assimilation des ETM par les plantes est influencée, en plus des propriétés physiologiques inhérentes à la plante, par les caractéristiques du sol précédemment présentées, et principalement le pH, l'Eh, le régime hydrique, la teneur en argile, la CEC et la concentration des autres ETM, définissant l'activité ionique des éléments en solution. Les ETM adsorbés sur les minéraux argileux (surtout la montmorillonite et l'illite) ont tendance à être plus biodisponibles que ceux fixés par les oxydes ou absorbés par les micro-organismes. Les micro-organismes tels que les champignons

associés aux racines fines des plantes présentent également un rôle primordial dans les processus d'absorption des éléments, en façonnant les conditions physico-chimiques de la rhizosphère *via* des exsudats racinaires. Ces exsudats regroupent divers composés organiques (*e.g.*, acides aminés, carboxylates, composés phénoliques, etc.) contrôlant la complexation des cations et des oxyanions et jouant ainsi un rôle clé dans divers processus se produisant dans la rhizosphère : (i) variation des conditions de pH et d'Eh, (ii) mobilité des nutriments et (iii) formation de complexes stables (Hinsinger et al., 2006).

Malgré les nombreux facteurs déterminant la disponibilité des ETM pour les plantes, il est possible de comparer les éléments entre eux. Ainsi, les éléments tels que Cd, Zn, Hg et Cu sont relativement facilement assimilables, tandis que Fe, Cr et Mn sont peu disponibles pour les plantes (Figure 10).

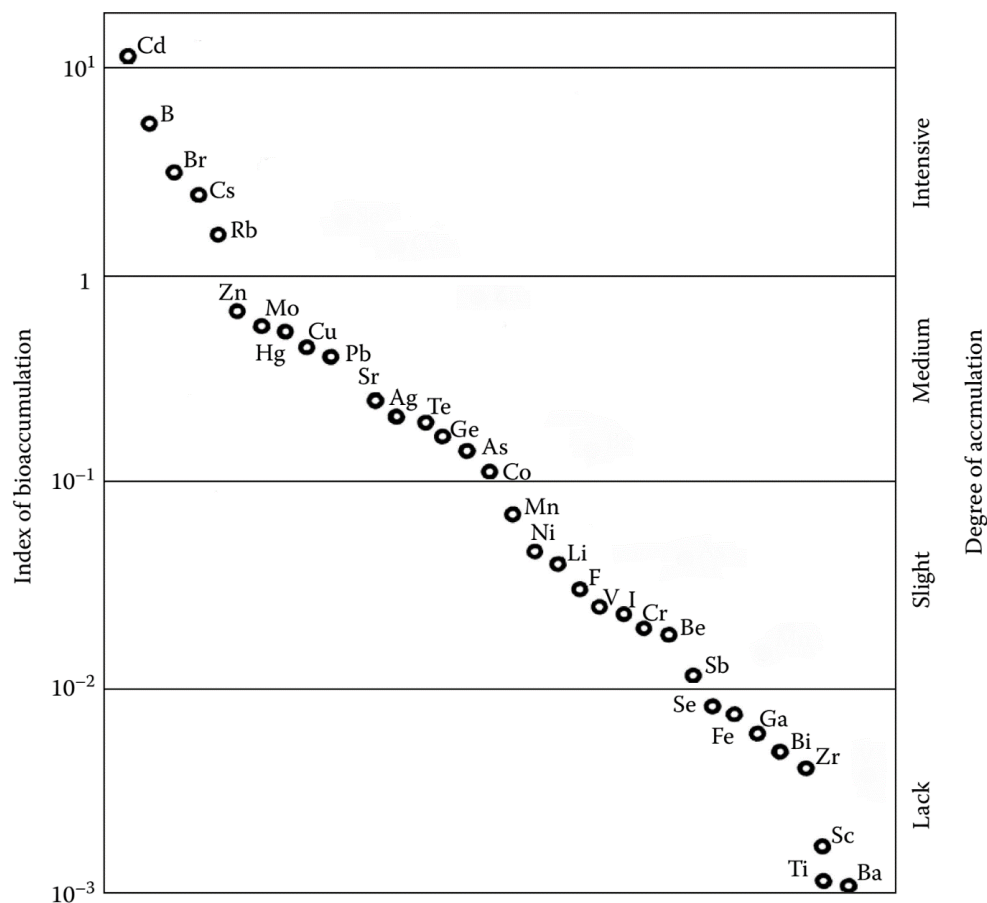


Figure 10. Potentiel de bioaccumulation des différents ETM par les plantes, calculé à partir du ratio entre la concentration en élément dans la plante et celle du sol, adapté de Kabata-Pendias, (2011).

### 1.2.3.2 Absorption foliaire et transfert

En plus de l'absorption racinaire, les organes aériens des plantes et notamment les feuilles peuvent également absorber les ETM en agissant comme des structures équipées de mécanismes d'absorption de ces éléments (Shahid et al., 2017). Ce mode de transfert a fait l'objet de peu de recherches comparativement à l'absorption racinaire. Les ETM d'origine atmosphérique s'attachent à des particules atmosphériques (Eqani et al., 2016) et se déposent à la surface des feuilles où ils vont pouvoir s'accumuler (Xiong et al., 2014b). Les plantes se développant près de mines et de fonderies ou dans les zones urbaines présentent généralement des concentrations foliaires accrues en ETM (Schreck et al., 2013). L'absorption foliaire a été principalement évaluée pour les ETM ayant des rôles essentiels dans les réactions métaboliques et biochimiques des plantes (*i.e.*, Fe, Cu, Mn et Zn) (Fageria et al., 2009; Wojcik, 2004). En ce qui concerne les éléments potentiellement toxiques, cette voie d'entrée concerne le Pb (Salim et al., 1993; Schreck et al., 2013), le Cd (Tudoreanu and Phillips, 2004), le Cr (Levi et al., 1973) l'As (Xiong et al., 2014a) et le Hg (Assad et al., 2016).

L'absorption des éléments au niveau de la surface foliaire se fait principalement par des canaux situés entre les cellules subsidiaires et les cellules de garde de la membrane cuticulaire ou de la paroi cellulaire épidermique (ectodesmata). D'autres structures telles que les stomates, les fissures au niveau de la cuticule, les lenticelles et les pores aqueux ont été montrées comme impliquées dans ces processus d'absorption (Fernandez and Brown, 2013). La morphologie de la surface des feuilles est également un facteur important impliqué dans la rétention des particules atmosphériques, favorable à leur absorption. En effet, Uzu et al., (2010) ont notamment démontré l'implication de structures telles que les trichomes ou encore de la cire épicuticulaire.

### 1.2.3.3 Transport dans la plante

Les ETM, une fois absorbés, sont généralement séquestrés au niveau des racines où ils vont pouvoir être détoxifiés par chélation dans le cytoplasme, stockés dans les vacuoles ou piégés dans l'environnement apoplastique liés aux acides organiques exsudés, de sorte qu'ils n'interfèrent pas ou peu avec des processus physiologiques essentiels (Hall, 2002; Hossain et al., 2012; Watanabe and Osaki, 2002). Ces mécanismes permettent de limiter considérablement la translocation des ETM vers les organes de surface, protégeant ainsi les tissus foliaires, et en particulier les cellules photosynthétiques métaboliquement actives, des dommages causés par les ETM. Toutefois, ces mécanismes n'empêchent pas totalement la translocation des ETM. Le transport des ions dans les tissus et organes végétaux implique de nombreux processus : i) mouvement dans le xylème, ii) mouvement dans le phloème, iii) stockage, accumulation et iv) immobilisation (Welch and Shuman, 1995). D'après ce dernier, le transport des ETM dans les plantes supérieures dépend des

caractéristiques des tissus vasculaires (*i.e.*, xylème et phloème) ainsi que de l'intensité de la transpiration. Il est généralement admis que les éléments i) Ag, B, Li, Mo et Se sont facilement transloqués des racines aux parties aériennes, ii) Mn, Ni, Cd et Zn sont modérément mobiles et iii) Co, Cu, Cr, Pb, Hg et Fe sont fortement liés aux cellules racinaires.

Au même titre que pour l'absorption racinaire, il a été montré que les ETM absorbés par voie foliaire peuvent être redistribués dans d'autres tissus, et notamment dans les tissus sous-jacents aux feuilles et principalement dans les racines (Shahid et al., 2017).

#### 1.2.3.4 L'accumulation des ETM par les plantes

La capacité des plantes à absorber les ETM issus de leur milieu de croissance est évaluée par le rapport suivant :  $[ETM]_{\text{plante}} / [ETM]_{\text{sol}}$ , appelé coefficient d'absorption biologique (BAC) (Cunha et al., 2014), facteur de bioaccumulation (BAF) (Harrad and Smith, 1997) ou d'accumulation biota-sol (BSAF) (Kwok et al., 2013). Pour la suite de ce manuscrit, sera utilisé le terme BAF pour traduire ce rapport. Les teneurs en ETM mesurées dans les tissus des plantes reflètent généralement les concentrations de la solution du sol (Figure 11) avec toutefois des BAF variables selon les éléments. De la même manière, l'absorption foliaire des ETM peut également être fonction des quantités présentes dans le milieu. Des relations linéaires entre les teneurs en Ni et en As des feuilles et celles dans l'atmosphère ont été montrées (Bondada et al., 2004; Kozlov et al., 2000).

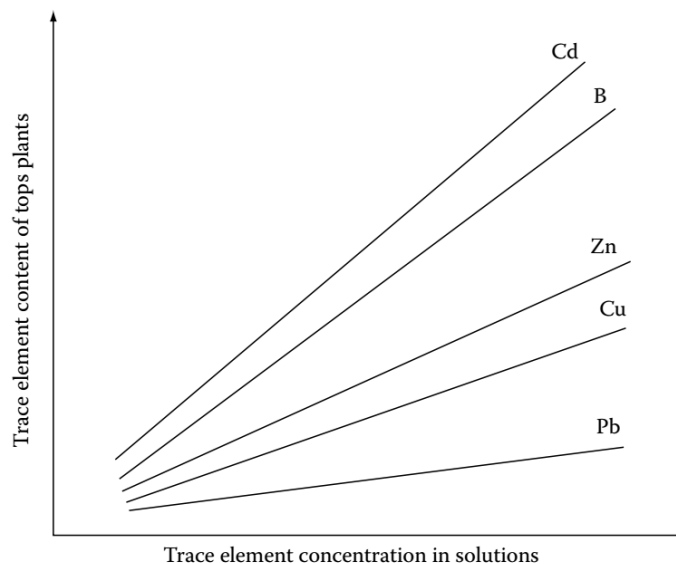


Figure 11. Concentration en ETM dans les tissus de diverses plantes en fonction de leur concentration en solution.



De plus, certaines plantes présentent des particularités leur permettant d'accumuler certains ETM en quantités particulièrement élevées. Cette capacité, intrinsèque aux plantes, varie considérablement selon les espèces. Les plantes dites métalphytes présentent des mécanismes évolués pour tolérer de fortes concentrations en métaux. D'après leurs stratégies physiologiques leur permettant de faire face à de fortes teneurs en métaux, les métalphytes peuvent être classés comme suit : i) accumulateurs : ils présentent une absorption et une translocation actives des métaux vers les parties aériennes ; ii) indicateurs : ils régulent l'absorption des métaux de sorte que leurs concentrations internes reflètent les concentrations externes du sol ; et iii) excluants : ils limitent l'entrée des métaux dans la racine et/ou leur transport vers les pousses (Baker, 1981). Certains métalphytes, appelés hyperaccumulateurs, possèdent des mécanismes spécialisés qui leur permettent d'accumuler des métaux au-delà de 1% de leur poids sec et pouvant atteindre dans certains cas jusqu'à 10% de ce dernier (Rascio and Navari-Izzo, 2011 ; Brooks, 2008), sans présenter de symptôme de phytotoxicité (Reeves, 2006). Jusqu'à présent, environ 450 espèces d'angiospermes ont été identifiées comme étant des hyperaccumulateurs d'ETM (As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, Zn,), représentant moins de 0,2% des espèces connues. Les concentrations seuils dans les feuilles, définissant le caractère hyperaccumulateur des plantes sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Relations entre les quantités de métaux essentiels et non essentiels, et les capacités d'hyperaccumulation d'une plante, d'après Greger, (1999).

	ETM	Quantité (µg/g MS)
Non essentiel	Cadmium (Cd)	> 100
	Sélénium (Se)	> 100
	Chrome (Cr)	> 300
	Plomb (Pb)	> 1000
	Arsenic (As)	> 1000
Essentiel	Cuivre (Cu)	> 300
	Nickel (Ni)	> 1000
	Zinc (Zn)	> 3000
	Manganèse (Mn)	> 10000

Les hyperaccumulateurs de Ni représentent 75% de l'ensemble des taxons présentant cette spécificité, tandis que seulement 5 espèces d'hyperaccumulateurs de Cd sont connues. Le Ni est également le métal pouvant atteindre la concentration la plus élevée quantifiée dans une plante, représentant jusqu'à 25% du latex de *Sebertia acuminata* (Sapotaceae), un arbre endémique des sols serpentins de Nouvelle-Calédonie. Environ 25% des hyperaccumulateurs découverts appartiennent à la famille des *Brassicaceae* et, en particulier, aux genres *Thlaspi* et *Alyssum*

(Brooks, 2008). Ces végétaux sont utilisés pour extraire et concentrer les ETMs présents dans les sols. Ainsi, de nombreuses études portant sur la phytoextraction des métaux ont été réalisées à l'aide d'espèces hyperaccumulatrices. Parmi elles, *Thlaspi caerulescens* est probablement l'hyperaccumulatrice de Zn et de Cd la plus étudiée (Assunção et al., 2018), en raison de ses capacités remarquables à accumuler le Zn et le Cd dans ses tissus aériens. L'espèce, *Arabidopsis halleri* (Brassicacée) est connue pour sa capacité d'hyperaccumulation du Zn (Bert et al., 2000) et du Cd (Küpper et al., 2000). Plusieurs espèces d'*Alyssum* ont également été étudiées pour leur potentiel de phytoextraction du Ni (Bani et al., 2015). D'autre part, la découverte d'une espèce de fougère hyperaccumulatrice d'As *Pteris vitata* (Ma et al., (2001) a conduit à la découverte d'autres espèces hyperaccumulatrices d'As dans cet embranchement.

L'hyperaccumulation dépend de plusieurs caractéristiques de base qui distinguent les hyperaccumulateurs des taxons non hyperaccumulateurs apparentés. Ces caractéristiques communes comprennent i) une capacité beaucoup plus grande à puiser les ETM du sol, ii) une translocation plus rapide et efficace des métaux de la racine aux parties aériennes, iii) une meilleure capacité pour détoxifier et séquestrer d'importantes quantités d'ETM dans les feuilles (Rascio and Navari-Izzo, 2011) et iv) une association avec des micro-organismes favorisant la biodisponibilité et la mobilisation des éléments (Whiting et al., 2001).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux raisons pour lesquelles la plante hyperaccumule ces métaux. Ces hypothèses incluent l'absorption par inadvertance (Cole, 1973), une résistance à la sécheresse (Baker and Walker, 1989), l'allélopathie, c'est-à-dire la « communication » chimique (Boyd and Jaffre, 2001), ou encore la défense contre les agents pathogènes et/ou les herbivores (Boyd and Wall, 2001). L'hyperaccumulation représente donc probablement un trait adaptatif favorisant l'accession à de nouvelles niches écologiques pour certaines plantes (Assunção et al., 2018).

#### 1.2.4 Exposition des micro-organismes aux ETM

Les micro-organismes et plus particulièrement les bactéries et les champignons jouent des rôles essentiels dans la biosphère. Au niveau du sol, ils sont notamment impliqués dans de nombreux processus biogéochimiques tels que la décomposition de la MO ou encore la biotransformation des métaux et des minéraux. Ils sont notamment capables de minéraliser des biocomposés récalcitrants, en particulier les biopolymères comme la lignocellulose et la chitine (Gadd, 2010; Haferburg and Kothe, 2007). Associés aux plantes, ces micro-organismes sont reconnus comme essentiels. Parmi ceux-ci, des espèces agissent comme auxiliaires des plantes,

impliqués dans la protection contre des composés toxiques ou des pathogènes du sol (Selosse et al., 2004), dans la nutrition (Gyaneshwar et al., 2002) ou encore dans l'adaptation à différents stress (Grover et al., 2011) dont les contaminations (Burd et al., 2000). Ces symbioses (Figure 12) déterminent le succès écologique des plantes et favorisent leur développement (Berg, 2009) faisant des micro-organismes des alliés essentiels dans des stratégies de bioremédiation (Khan, 2005).

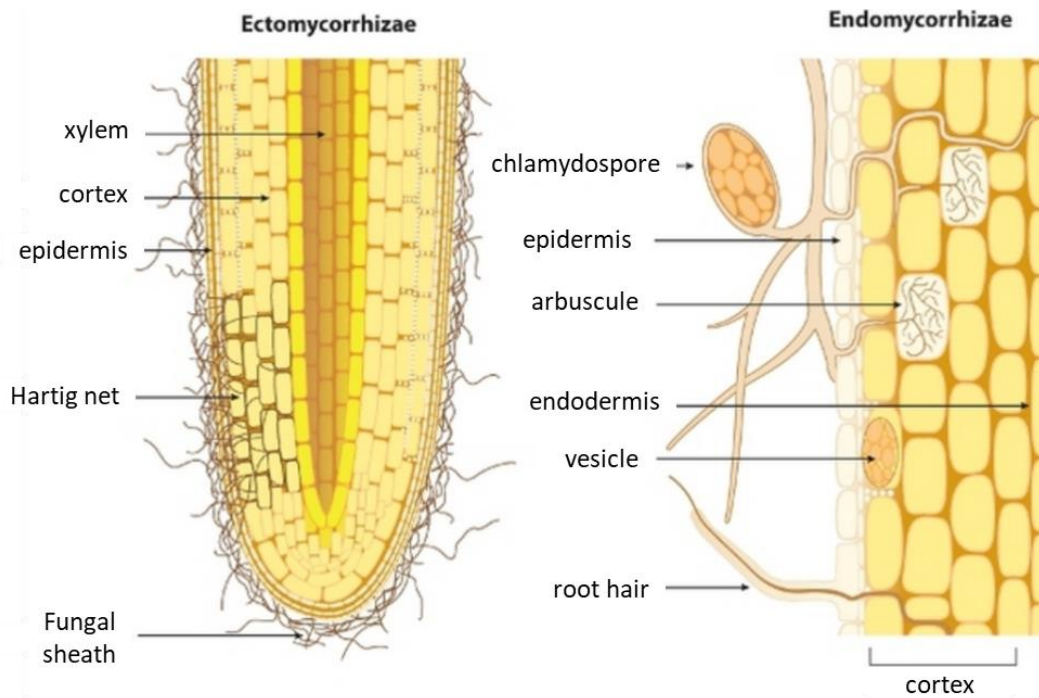


Figure 12. Schéma illustrant les symbioses entre plantes et champignons mycorhiziens (ectomycorhizes et endomycorhizes), d'après McNear Jr (2013).

Certains éléments, tels que Cu, Co, Fe, Mg, Mn, Ni et Zn sont des oligoéléments essentiels pour les micro-organismes, participant à la régulation de la pression osmotique et jouant un rôle dans les processus redox ou en tant que composants essentiels de certaines enzymes (Gadd, 2010). Les micro-organismes sont généralement capables de tolérer d'importantes quantités d'ETM, toutefois, jusqu'à certaines teneurs. Il a été démontré qu'un excès d'ETM réduit la diversité et la quantité de biomasse microbienne (Bååth, 1989; Giller et al., 2009), ainsi que l'activité enzymatique du sol (Giller et al., 1998), ce qui contribue à l'altération de la structure des communautés au profit de certains taxons plus tolérants (Schmidt and Schlegel, 1989; Zappellini et al., 2015). Ces micro-organismes tolérants aux ETM présentent des stratégies de résistance et peuvent influencer la spéciation, la solubilité, la biodisponibilité, la toxicité et la mobilité des métaux, ainsi que la formation, la dissolution et la détérioration des minéraux (Gadd, 2010). Bien que ces micro-organismes résistants puissent devenir dominants dans les sols chargés en métaux, ils ne remplissent pas toujours les mêmes fonctions écologiques que les autres espèces plus sensibles ce qui peut

conduire à des perturbations au niveau des fonctions écosystémiques (*e.g.*, décomposition de la MO du sol, respiration du sol, etc.). Le ralentissement des processus de décomposition de la MO induit par la présence d'ETM entraîne un appauvrissement du sol en nutriments ainsi qu'un mauvais drainage, ce qui peut altérer le développement des plantes (Boshoff et al., 2014).

Par ailleurs, la biomasse microbienne est capable d'accumuler des ETM en grande quantité (Gadd, 1990), en fonction de deux caractéristiques principales des cellules : la sorptivité (*i.e.*, mesure de la capacité à absorber ou désorber un liquide par capillarité) de l'enveloppe cellulaire et la capacité à absorber les éléments dans le cytosol. Cette capacité à absorber les ETM fait des micro-organismes des vecteurs potentiels de polluants dans les réseaux trophiques et notamment pour les espèces détritatives (Kallenborn and Blais, 2015). Malgré les effets négatifs des ETM sur les micro-organismes, ces derniers bénéficient de différents mécanismes intra- et extracellulaires pour limiter leur toxicité (Haferburg and Kothe, 2007). La plupart de ces mécanismes de survie reposent sur la modification de la spéciation du métal, de manière à diminuer ou augmenter sa mobilité (Gadd, 1990). Cependant, d'autres mécanismes existent, comme c'est le cas chez les champignons *Aspergillus niger* et *Penicillium spp.* qui solubilisent les métaux (plutôt que de les immobiliser) en libérant des acides organiques dans le sol, les rendant alors davantage biodisponibles (Gadd and Gadd, 2001).

## 1.2.5 Exposition des insectes aux ETM

### 1.2.5.1 Généralités

Au même titre que les micro-organismes et les plantes, d'autres organismes tels que les invertébrés, la micro, la méso et la macrofaune ont un lien étroit avec les ETM présents dans les sols. Ces derniers peuvent être affectés par ce type de pollution, avec des répercussions sur leur comportement et sur la structure de leur communauté (Figure 13) (Gall et al., 2015). Parmi les invertébrés, les insectes sont particulièrement exposés aux ETM en raison d'un contact direct avec le sol au cours de certaines phases de leur cycle biologique ou encore en raison des liens étroits que partagent les insectes phytophages avec leur(s) plante(s) hôte(s) (Heikens et al., 2001). De par leur omniprésence dans les écosystèmes et de leur importance à la base des réseaux trophiques, l'implication des insectes dans les flux de polluants a fait l'objet d'une attention spéciale.

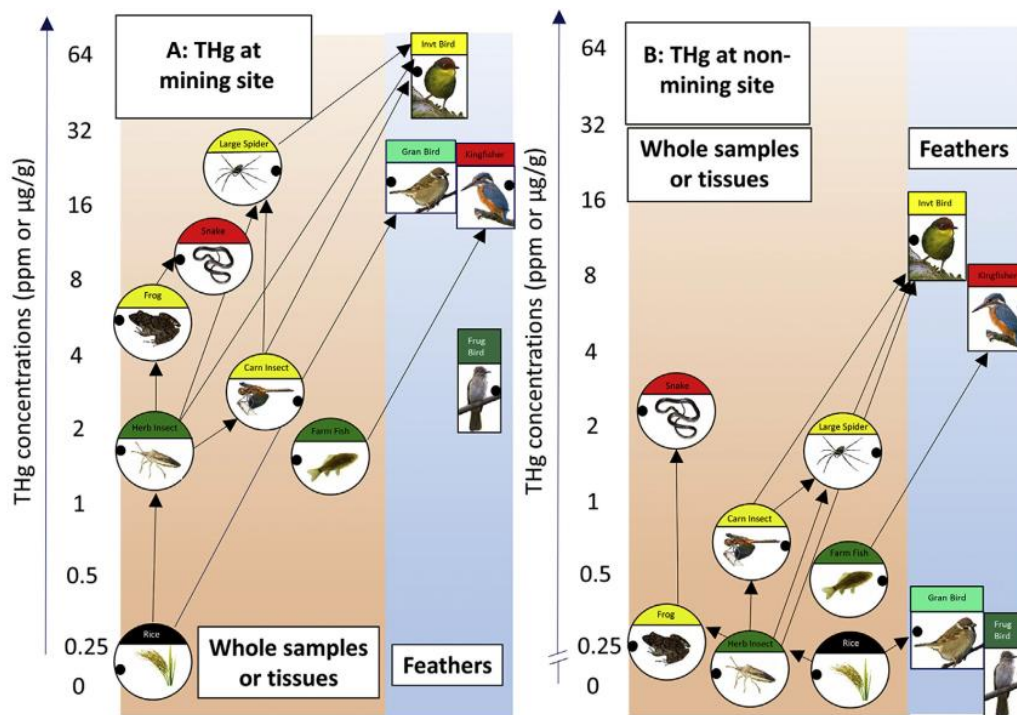


Figure 13. Exposition au Hg total (THg) de la faune typiquement associée à des rizières proches d'un site minier (A) et d'un site contrôlé (B), mettant en avant l'importance du niveau trophique des espèces dans l'accumulation du THg, d'après Abeysinghe et al., (2017).

Chez les invertébrés terrestres, une fois ingérés, les nutriments essentiels pénètrent passivement dans les cellules par des canaux, suivant un gradient de concentration par diffusion et/ou activement par des transporteurs membranaires. Ces ETM vont principalement emprunter des voies passives pour entrer dans les cellules ou emprunter des systèmes de transport utilisés pour d'autres éléments essentiels (Dar et al., 2019) car aucun transporteur/pompe spécifique n'a été signalé pour l'absorption de métaux non essentiels, comme le Cd et le Pb.

Le transfert et le devenir des ETM dans les milieux ont principalement fait l'objet d'études concernant les insectes aquatiques. Par exemple, la présence et le rôle des métallothionéines et d'autres protéines intracellulaires de liaison aux métaux dans la séquestration/désintoxication des ETM ont fait l'objet de beaucoup d'attention. Au contraire, les connaissances à propos des liens entre les ETM et les espèces dont la niche écologique principale se trouve au-dessus du sol restent à enrichir, et ce, pour de nombreux éléments (Dar et al., 2019).

De manière à investiguer le devenir des métaux dans les réseaux trophiques, le terme de biomagnification est couramment employé. Ce dernier est défini comme l'augmentation de la concentration en polluant dans un organisme par rapport à la source qui constitue sa nourriture (Mann, 2011). Il est utilisé pour prédire le risque de toxicité de certaines substances. Le degré de

biomagnification entre un organisme et sa nourriture pour un ETM donné est exprimé selon le Facteur de BioMagnification (BMF), qui se calcule de la manière suivante :

$$BMF = \frac{\text{Concentration en ETM dans un organisme}}{\text{Concentration en ETM dans sa nourriture}}$$

A l'échelle du réseau trophique entier, il est possible de calculer un Facteur de Magnification Trophique, qui cette fois-ci exprime un BMF moyen à l'échelle de chaque échelon trophique. Il se détermine en calculant l'antilog de la pente d'une régression entre les concentrations en polluant et le niveau trophique des différents taxons étudiés (Figure 14). Par conséquent, une valeur au-dessus de 1 témoigne d'un phénomène de biomagnification (Borgå et al., 2012).

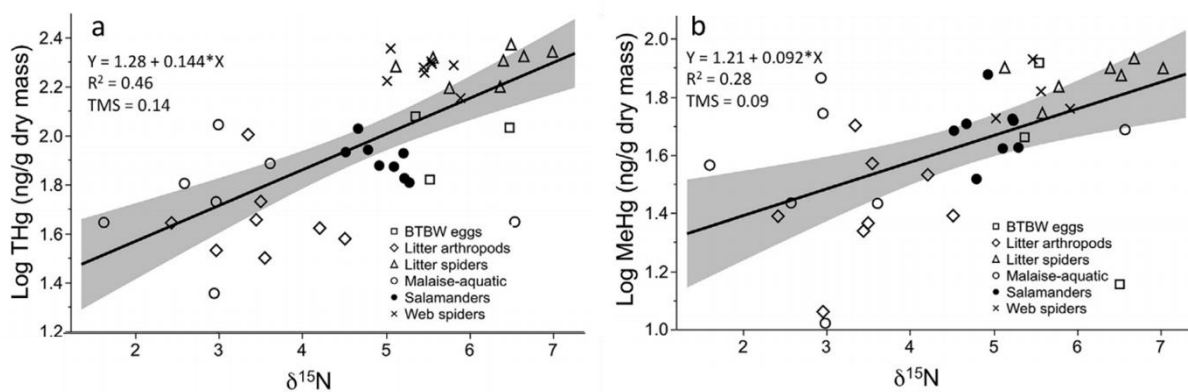


Figure 14. Relations entre les teneurs en Hg total (THg, a) et en méthyl-Hg (MeHg, b) et le niveau trophique, déterminé par  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$ , d'arthropodes issus d'une forêt tempérée. Le facteur de magnification trophique correspond à la pente de la droite de régression Y (Rodenhouse et al., 2019).

### 1.2.5.2 Exposition des insectes phytophages aux ETM

Les organismes phytophages se nourrissent sur des plantes capables de capter des métaux, ou sur la litière, elle aussi potentiellement enrichie, ce qui peut donc les exposer indirectement à ces contaminants potentiellement toxiques (Gall et al., 2015). Ces consommateurs primaires sont la proie d'autres organismes insectivores et jouent donc un rôle important dans le transfert des ETM vers les niveaux trophiques supérieurs (Devkota and Schmidt, 2000).

Il était admis que l'absorption des éléments non essentiels comme le Cd et le Pb était peu régulée chez les insectes et par conséquent que ces éléments étaient plus efficacement bioamplifiés que les éléments essentiels (Rainbow, 2007). Toutefois, les informations tirées de la récente synthèse de Dar et al. (2019) contrebalancent ce postulat et suggèrent une situation plus complexe. D'après les auteurs, la tendance d'un élément à être bioaccumulé ne dépendrait pas de son caractère essentiel, mais plutôt de la biochimie de l'élément et de la physiologie régulatrice de cet élément chez l'insecte modèle. Au sein même des insectes phytophages, les différents régimes alimentaires peuvent également induire des différences d'accumulation. En effet, des teneurs faibles en Cd, Cu,

Pb et Zn ayant été accumulées ont été observées chez les Coléoptères, ce qui reflète leurs habitudes de vie, liées à un régime alimentaire varié et une mobilité importante à l'état adulte (Heikens et al., 2001). À l'inverse, les fourmis ou les collemboles (organismes détritivores) ont montré des quantités élevées en Cu et en Pb, proportionnelles à la quantité du sol (Heikens et al., 2001). Ces résultats reflètent leur mode de vie plutôt souterrain, les exposant à un contact direct avec les contaminants. La pollinisation peut également être un facteur d'exposition pour les insectes. Une étude récente (Meindl and Ashman, 2013) montre que le nectar enrichi en métaux peut altérer le comportement des bourdons, suggérant que ces éléments, comme le Sélénium (Se) (Hladun et al., 2012), peuvent affecter négativement les pollinisateurs. De plus, les insectes se nourrissant de sève issue du phloème ou du xylème peuvent être davantage exposés aux ETM que les individus broyeur, se nourrissant de feuilles, en raison de la nature soluble des molécules dans la sève, potentiellement plus disponibles. Toutefois, ces facteurs ne sont actuellement que pressentis, des études complémentaires seraient nécessaires afin de confirmer ou non leur implication.

Parmi les taxons regroupant des espèces phytophages, les plus étudiés sont les Orthoptères (Devkota and Schmidt, 2000), les Coléoptères (Dar et al., 2017; Przybyłowicz et al., 2003), les fourmis (Grześ, 2010) et les pucerons. Ces derniers sont généralement considérés comme des bioaccumulateurs efficaces du Cd et du Zn (Dar et al., 2017; Green et al., 2003; Merrington et al., 1997). Le puceron a été largement étudié comme modèle en conditions contrôlées dans le système plante-puceron-coccinelle en raison des interactions trophiques fortes liant chacun des maillons. Dans l'étude de Dar et al., (2017), le Zn a été bioamplifié dans les pucerons (BMF de 2,1 à 2,4) et dans des coccinelles adultes (BMF de 1,3 à 1,4) alors que le Cd n'a été bioamplifié que dans les pucerons (BMF de 1,3 à 1,7) et le Pb n'a montré aucune bioamplification. Dans des études similaires, menées sur le Cd (Green et al., 2003; Wang et al., 2017) et le Pb (Naikoo et al., 2019; Zhang et al., 2017), ces deux composés ne semblent pas avoir été biomagnifiés. Ainsi, même pour un système linéaire et maîtrisé, le phénomène de bioamplification semble variable selon les ETM et selon des facteurs intrinsèques aux espèces de plantes et d'insectes considérées.

### *1.2.5.3 Exposition des insectes prédateurs aux ETM*

A l'intérieur des agrosystèmes, la plupart des insectes prédateurs sont considérés comme des auxiliaires des cultures dans la mesure où ils participent à la régulation des espèces potentiellement dommageables (Symondson et al., 2002) et sont ainsi des alliés utiles dans les programmes de gestion des organismes ravageurs. A travers la consommation de proies telles que des insectes phytophages, ils vont pouvoir ingérer des ETM. Cette exposition induit de potentiels effets négatifs sur leur valeur sélective et leur comportement, entraînant une diminution de leur intérêt en tant qu'agent pour le bio-contrôle.

De manière générale, en raison de leur place à des niveaux trophiques plus élevés, les prédateurs et les parasitoïdes sont généralement plus exposés aux contaminants et particulièrement aux ETM présentant le plus grand potentiel de biomagnification, comparativement à leurs proies. Cependant, des auteurs s'accordent sur le fait que le degré de bioaccumulation de certains métaux soit davantage conditionné par des facteurs physiologiques tels que des mécanismes d'excrétion (Mann, 2011; Naikoo et al., 2019). Par exemple, pour une même espèce de puceron (*Sitobion avenae*) exposés au Zn, ses prédateurs ont montré des BAF différents selon l'espèce : i) BAF = 2 pour le carabe *Bembidion lampros* (Winder et al., 1999), ii) BAF  $\geq$  1 pour la chrysope *Chrysopa carnea* (Green et al., 2006) et iii) BAF  $\leq$  1 pour des larves de coccinelles *Coccinella septempunctata* (Green et al., 2003). En plus de ces facteurs physiologiques, d'autres facteurs tels que l'habitat, la durée de l'exposition aux ETM, le stade du cycle biologique, le type de proies consommées ainsi que la biodisponibilité de l'élément dans la proie peuvent être déterminants dans les teneurs mesurées. En effet, la forme sous laquelle le métal est stocké dans les proies semble conditionner le transfert vers les prédateurs (Vijver et al., 2004). Wallace and Luoma, (2003) ont proposé que les fractions associées à des organites et à des protéines (e.g., métallothionéines, enzymes) étaient particulièrement disponibles pour les proies.

#### 1.2.5.4 Voies d'élimination des ETM chez les insectes

La concentration des ETM dans les tissus des insectes dépend de l'équilibre entre l'absorption et l'élimination de ces éléments, avec l'élimination en tant que processus dominant (Janssen et al., 1991). Ainsi l'importante tolérance à la pollution environnementale dont bénéficient les insectes semble liée à cette capacité à excréter la majorité des substances toxiques consommées (Kozlov et al., 2000). Il est bien documenté que chez la plupart des invertébrés terrestres, il n'y a que peu d'organes ou de tissus cibles où les ETM sont sélectivement assimilés (Dar et al., 2019). Généralement, ces organes font partie du tube digestif ou des tissus excréteurs. En effet, le principal lieu de stockage des ETM semble être l'intestin moyen, sous forme de concrétion, d'après l'étude menée sur la Chrysomèle *Chrysolina pardalina* (Przybyłowicz et al., 2003).



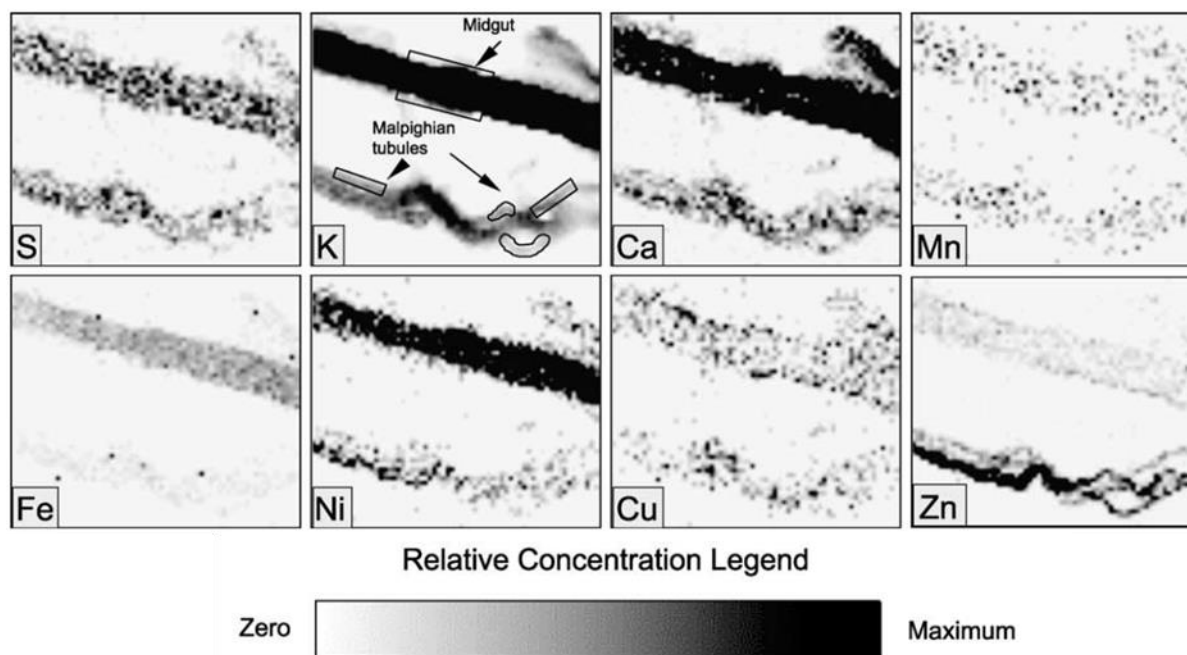


Figure 15. Exemple d'imagerie élémentaire pour S, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu et Zn de cellules issues de l'intestin moyen et des tubules de Malpighi de la coccinelle *Chrysolina pardalina*, le noir fait référence à des concentrations élevées en élément dans ces tissus, d'après Przybyłowicz et al., (2003).

Ces mêmes travaux ont également conclu que les tubes de Malpighi (*i.e.*, organes constitutifs de l'appareil excréteur des insectes) jouent un rôle crucial dans l'élimination du Ni de l'hémolymphe. Concernant la fraction susceptible d'entrer dans les cellules, des mécanismes de séquestration et de compartimentation dans des vésicules et de détoxification existent (Dallinger and Rainbow, 1993). Parmi les processus d'élimination, l'exocytose de vésicules contenant des métaux dans la lumière du tube digestif suivi d'une élimination par les fèces (Hopkin, 1989) représente un mécanisme d'excrétion dominant. Dans certains cas, la liaison des ETM à des protéines thermostables comme les métallothionéines peut limiter leur toxicité (Dvorak et al., 2018). Ces protéines sont riches en cystéine, qui se lie aux métaux et jouent par conséquent un rôle important dans la séquestration et la détoxification des métaux tels que le Cd, le Cu, le Hg, le Co et le Zn (Amiard et al., 2006).

Cette capacité à détoxifier et à excréter les ETM est en grande partie conditionnée par la physiologie des insectes, ce qui induit des variations considérables selon les espèces (Janssen et al., 1991) et également selon les ETM (Crawford et al., 1995). Crawford et al., (1995) ont notamment montré que chez le puceron noir du haricot *Aphis fabae*, le Cu n'était pas accumulé et que de grandes quantités étaient excrétées dans le miellat, alors que le Cd s'accumulait dans l'organisme sans être excrété. Une étude similaire a montré qu'un insecte prédateur (*Coccinella septempunctata*) accumulait le Zn de manière linéaire tandis qu'il éliminait le Cu et le Ni (Green and Walmsley, 2013).

Les phénomènes de mues larvaires et nymphales représentent également un mécanisme d'excrétion des ETM, au cours duquel une partie de leur charge corporelle enrichies en ETM va pouvoir être éliminée (Kraus et al., 2014). Les changements importants dans les tissus qui se produisent lors de la métamorphose peuvent réduire les concentrations en ETM des insectes, comme cela a été montré pour le Cd (Scheifler et al., 2002), le Cu (Gintenreiter et al., 1993), le Hg (Kraus et al., 2014), le Ni (Boyd et al., 2006) et le Zn (Dar et al., 2017) (Figure 15).

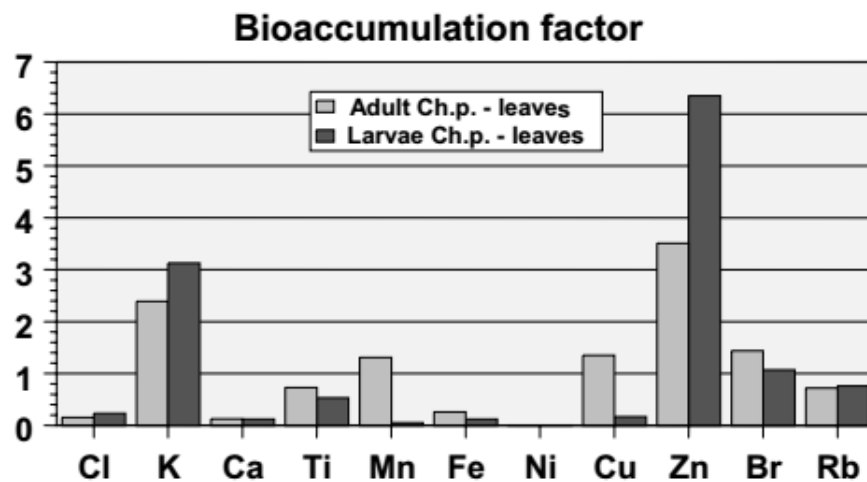


Figure 16. Différences en terme de facteurs de bioaccumulation entre des larves (avant avoir mué) et des adultes (après avoir mué) de *Chrysolina pardalina* consommant des feuilles de *Berkheya coddii*, dans le cadre d'une expérience en conditions contrôlées Przybyłowicz et al., (2003).

#### 1.2.5.5 Toxicité envers les insectes

Les effets néfastes des métaux toxiques peuvent se produire à tous les niveaux de l'organisation biologique et altérer des processus écologiques majeurs tels que la prédation, le parasitisme, la compétition et ainsi impacter la structure des communautés et des écosystèmes. Des quantités en ETM qui excèdent les capacités des insectes à les tolérer ou à les excréter sont généralement néfastes, affectant la croissance, le succès de l'éclosion, la forme et la fécondité, revus dans Butler and Trumble, (2008), Mogren and Trumble, (2010) et dans Butler et al., (2009) spécifiquement pour les parasitoïdes. Ces études, pour la plupart conduites en conditions contrôlées, ont mis en avant ces effets à la fois pour des éléments essentiels et non essentiels (Tableau 4).

Tableau 4. Effets sur les invertébrés terrestres résultant d'une exposition aux ETM, concentrations exprimées en mg/kg, d'après la revue réalisée par Dar et al., (2019).

Affected parameter	Organisms	Order	Element	Noted effect	±Effect	Exposure conc.	Exposure route	Internal conc.	
Reproduction	<i>Platynothrus peltifer</i>	Oribatida	Cd	EC <sub>50</sub> egg production	—	246–310	Food		
	<i>Orchesella cincta</i>	Collembola				>85.5			
	<i>Folsomia candida</i>	Collembola				1356			
	<i>Poecilus cupreus</i>	Coleoptera	Zn	Egg production		Unknown	Food		
	<i>Aphis medicaginis</i>	Hemiptera	Zn	Number of offspring		50–150	Plant		
	<i>Harmonia axyridis</i>	Coleoptera	Zn	Oviposition		100–150	Aphid		
	<i>Pieris napi</i>	Lepidoptera	Cd	Oviposition	No effect	>18	Plant		
	<i>Athalia rosae</i>	Hymenoptera	Zn			>1000			
	<i>Phaedon cochleariae</i>	Coleoptera							
Development	<i>Lithobius mutabilis</i>	Lithobiomorpha	Cu	LC <sub>50</sub> egg to emergence		<1500	Food & soil		
	<i>Musca domestica</i>	Diptera	Cu	LC <sub>50</sub> egg to pupation		689	Food & soil		
				LC <sub>50</sub> adult emergence		708			
	<i>Porcelio scaber</i>	Isopoda	Cd	Growth		562	Food		
	<i>Poecilus cupreus</i>	Coleoptera	Cd	Asymmetry		100–799	Food	11–96	
						236–692		97–133	
	<i>Orchesella cincta</i>	Collembola	Cd	EC <sub>50</sub> growth		>85.5	Food		
	<i>Folsomia candida</i>	Collembola				1687			
	<i>Porcelio scaber</i>	Isopoda				192			
	<i>Pterostichus cupreus</i>	Coleoptera	Cd	Locomotor behaviour		500	Food & soil	24.1–53.2	
Behaviour	<i>Pterostichus oblongopunctatus</i>	Coleoptera	Ni	Locomotor activity	+	2500	Food	220	
	<i>Pieris napi</i>	Lepidoptera	Cd	Feeding		>18	Plant		
	<i>Athalia rosae</i>	Hymenoptera	Zn			>1000			
	<i>Phaedon cochlearia</i>	Coleoptera							
				Zn					
	<i>Poecilus cupreus</i>	Coleoptera	Cd	Body calorific content		100–799	Food		
Metabolism	<i>Pterostichus oblongopunct-atus</i>	Coleoptera	Ni	LOEC respiration		2400	Food		
	<i>Pterostichus oblongopunct-atus</i>	Coleoptera	Ni	Respiration	+	2526–2760	Food	220	
	<i>Porcelio scaber</i>	Isopoda	Pb	Respiration	+	7945	Food	389	
	<i>Porcelio scaber</i>	Isopoda	Pb	hsp 70 levels		1178	Food	15.1	
	Stress indicators	<i>Lithobius mutabilis</i>	Lithobiomorpha	Cu	% survival compared to control		1000	Food & soil	
		<i>Porcelio scaber</i>	Isopoda	Cd	Death before reproduction		100	Food	
							100		
							2000		
							1000		
		<i>Platynothrus peltifer</i>	Oribatida	Cd	EC <sub>50</sub>		233–297	Food	
<i>Porcelio scaber</i>		Isopoda				86			
<i>Pterostichus oblongopunct-atus</i>		Coleoptera	Ni	LT <sub>50</sub>		10,094	Food	725	
<i>Pterostichus oblongopunct-atus</i>		Coleoptera	Ni	LC <sub>50</sub>		8351			
<i>Heliothis virescens</i>		Lepidoptera	Zn	Death before pupation		≥1200	Food		
<i>Harmonia axyridis</i>	Coleoptera	Zn	Predation		100–150	Aphid			

Ces effets pourraient être dus à une toxicité directe causée par l'altération de processus biologiques et physiologiques liés à l'accumulation d'ETM ou à une qualité alimentaire réduite des plantes hôtes (Gorur, 2007). En terme d'effets directs sur la reproduction, il est connu que les ETM affectent la reproduction chez les insectes en inhibant la synthèse de la vitellogénine (Cervera et al., 2004), une protéine essentielle pour la formation du vitellus (*i.e.*, réserves énergétiques utilisées par les embryons). Il a également été reporté que l'accumulation de métaux peut provoquer l'immunostimulation et l'immunosuppression chez les insectes. Parmi les réponses immunitaires, la production de mélanine (synthétisée à partir de phénol-oxydases) (van Ooik et al., 2007), l'augmentation des hémocytes (Coles et al., 1995) ou encore le taux d'encapsulation (Gillespie et al., 1997) sont courants chez les insectes affectés et permettent de détecter l'influence des ETM. Il est important de préciser que la plupart de ces travaux montrant la toxicité des ETM sur les insectes ont été conduits en conditions contrôlées et ne tiennent donc pas compte des stratégies d'évitement *in-situ* (Babin-Fenske and Anand, 2011).

## 1.3 Gestion durable et valorisation des sols pollués par les végétaux

biologiques (20) **biomasse** (30) cadre (17) **capacite** (25) **Cd**  
 (24) **concentrations** (38) conditions (15)  
**contamines** (66) C u (18) developpement (16) **effet** (22)  
 elements (43) **especes** (31) **essentiels** (20)  
**ETMs** (102) etudes (16) facteurs (15) faible (15) France (18)  
 friches (25) **gestion** (48) industrielles (28) l'absorption (17)  
 limiter (21) **metaux** (53) milieux (23) N i (18) organiques (18)  
 organismes (19) partir (15) P b (17) phytoextraction (16)  
 phytomanagement (24) **plantes** (54)  
 polluants (31) pollues (18) **pollution** (46) processus (21)  
 production (17) **projets** (40) quantites (21) risques (19)  
**sites** (91) **sols** (128) techniques (40)  
 teneurs (15) traitements (19) utilisation (27) valorisation (18) **Zn** (23)

### 1.3.1 Les phytotechnologies appliquées aux SSP

Les phytotechnologies regroupent un ensemble de techniques reposant sur la capacité des espèces végétales à extraire, contenir ou dégrader des polluants inorganiques ou organiques (Bert, 2012). Émergentes sur les marchés du traitement et de la gestion des sites et sols pollués, ces techniques douces peuvent s'appliquer *in-situ* sur une large variété de sols pollués (*e.g.*, sols agricoles, friches industrielles, sédiments excavés) en milieu rural et urbain. Elles sont jugées plus conformes aux enjeux du développement durable que les techniques classiques de gestion *ex situ*. Elles constituent également des solutions technico-financières particulièrement bien adaptées aux sites à vastes surfaces polluées, et représentent une alternative ou un complément aux techniques conventionnelles dans le cas de ces pollutions à grande échelle. Depuis les années 1990, les phytotechnologies ont fait l'objet de multiples recherches orientées selon deux axes complémentaires : i) un premier de nature fondamentale visant à acquérir des connaissances sur les mécanismes de tolérance et d'accumulation des plantes candidates aux phytotechnologies, pour connaître et améliorer leur capacité à tolérer, à immobiliser ou à extraire les polluants ; ii) un deuxième, plus appliqué, visant à mettre en œuvre et à optimiser les itinéraires techniques et les filières de valorisation de la biomasse collectée dans une approche intégrée de gestion durable des sols pollués (Bert, 2012). Bien que l'utilisation de ces techniques reste encore relativement timide en raison d'un manque de recul opérationnel, les réels progrès et avancées issues de ces 20 dernières années ont encouragé leur utilisation dans le secteur des SSP.

#### 1.3.1.1 Techniques de biomonitoring des pollutions

Les techniques du phytoscreening et de la dendrochimie sont des techniques de détection de pollutions actuelles et historiques, respectivement. En raison de leur caractère innovant, elles n'ont été intégrées à la méthodologie nationale SSP que dans sa version révisée de 2017. Ces deux techniques ont principalement été développées à partir des années 2000 en Amérique (Limmer et al., 2011, 2014, 2015), au Danemark (Algreen, 2015), en Allemagne (Algreen et al., 2015a; Nielsen et al., 2015a) et en France, dans le cadre des projets PIT et SILPHES soutenus par l'ADEME. Ces deux techniques reposent sur le fait que les arbres enregistrent, tout au long de leur vie, les impacts environnementaux (Burken et al., 2011). Ainsi, leurs racines pompant les eaux des aquifères superficiels et de la solution du sol, les arbres assimilent les polluants dissous ou certains éléments constitutifs qui se retrouvent ensuite piégés dans les cernes des troncs (Figure 17).

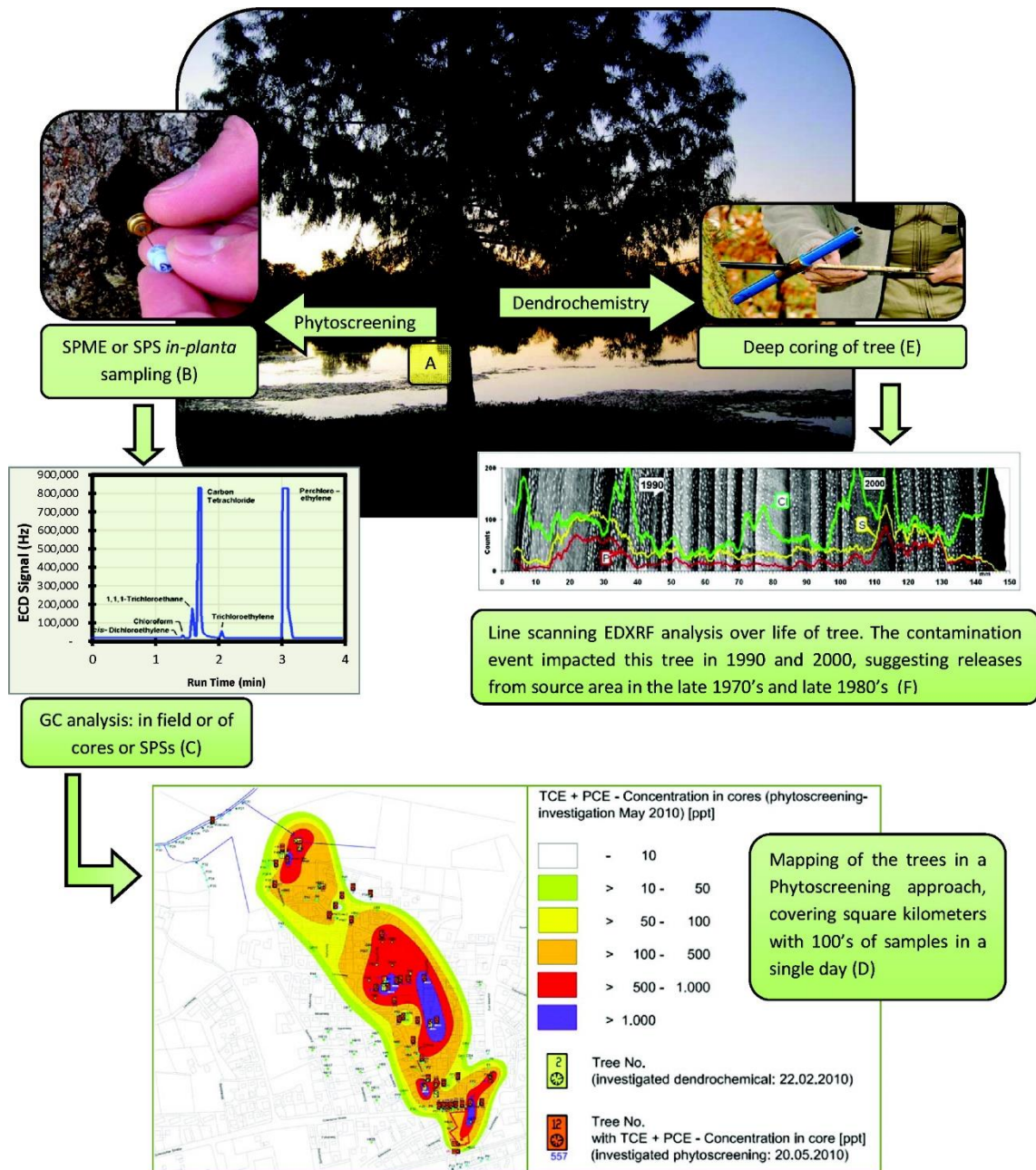


Figure 17. Schéma de l'échantillonnage, de l'analyse et du traitement de données relatif au phytoscreening et à la dendrochimie illustrant l'intérêt de ces outils pour fournir des renseignements sur les contaminations actuelles et historiques.

Le phytoscreening consiste en l'analyse de la partie externe du tronc, qui constitue la partie active dans laquelle circule la sève brute provenant directement du sol potentiellement contaminé. Pour cela, une carotte d'environ 1 cm dans le tronc des arbres est prélevée. L'analyse des composés contenus dans ces carottes renseigne sur les polluants présents dans les sols et les eaux souterraines et peut ainsi aider à préciser les extensions des panaches de pollutions actuels. Cet outil est particulièrement adapté dans le cadre de pré-diagnostics de pollution (Algreen, 2015; Nielsen and Trapp, 2014; Nielsen et al., 2015a) sur des sites de grande envergure afin d'identifier les secteurs

sources (Algreen et al., 2015b). Il permet ainsi d'optimiser l'implantation de piézomètres, pour un coût limité comparé à d'autres techniques équivalentes. Par conséquent, la technique peut se substituer à certaines analyses de sol, avec l'avantage que les arbres présentent un caractère intégrateur aussi bien sur le plan spatial que temporel (Nielsen et al., 2015a). La technique a principalement été développée dans des contextes de pollution aux composés organiques volatils (COV) comme les solvants chlorés, trichloroéthylène ou perchloroéthylène (Duncan and Brusseau, 2018; Limmer et al., 2011; Yung et al., 2017), courants dans les problématiques concernant les industries chimiques. Néanmoins, la technique a également été utilisée pour des BTEX (Nielsen et al., 2015b) et certains ETM tels que le Cd, Ni, Cu, Zn (Algreen et al., 2014) et le Hg (Bigham et al., 2015).

La dendrochimie consiste à réaliser des carottages dans le diamètre ou le rayon du tronc d'un arbre puis à analyser, cerne par cerne, les polluants assimilés. Ce type d'investigation permet de dater des pollutions et de reconstituer leur évolution au cours du temps. Elle peut aider à discriminer les origines d'une pollution entre différentes sources possibles. La dendrochimie peut aussi être utilisée pour estimer la vitesse de propagation d'un panache. Cette technique s'est avérée pertinente pour comprendre l'influence de mesures réglementaires ayant pour objectif de limiter les rejets atmosphériques industriels du Golfe de Fos-sur-Mer (Austruy et al., 2019). Elle peut être utile pour étudier des pollutions atmosphériques diffuses aux ETM (Austruy et al., 2019; Maillard et al., 2016; Wright et al., 2014) mais également pour des pollutions aux COHV des sols ou des eaux souterraines (Balouet et al., 2012).

#### *1.3.1.2 La phytoremédiation dans le domaine des SSP*

La phytoremédiation repose sur l'utilisation de plantes et des micro-organismes associés pour assainir des milieux contaminés en absorbant ou en dégradant les contaminants. Cette technique repose sur les capacités que présentent les plantes, et notamment les métalphytes à tolérer et/ou à accumuler d'importantes quantités de contaminants. Le choix des espèces végétales dépend du type de contaminant, des caractéristiques du site et de la stratégie de phytoremédiation adoptée. Les deux principales stratégies de phytoremédiation pour les ETM sont : i) la phytoextraction, l'utilisation de plantes pour extraire les métaux du sol (Garbisu et Alkorta 2001) et ii) la phytostabilisation, l'utilisation de plantes tolérantes pour réduire leur mobilité (Dary et al., 2010). Cette technique fait l'objet d'une attention croissante depuis son émergence, dans les années 1990 (Figure 18).

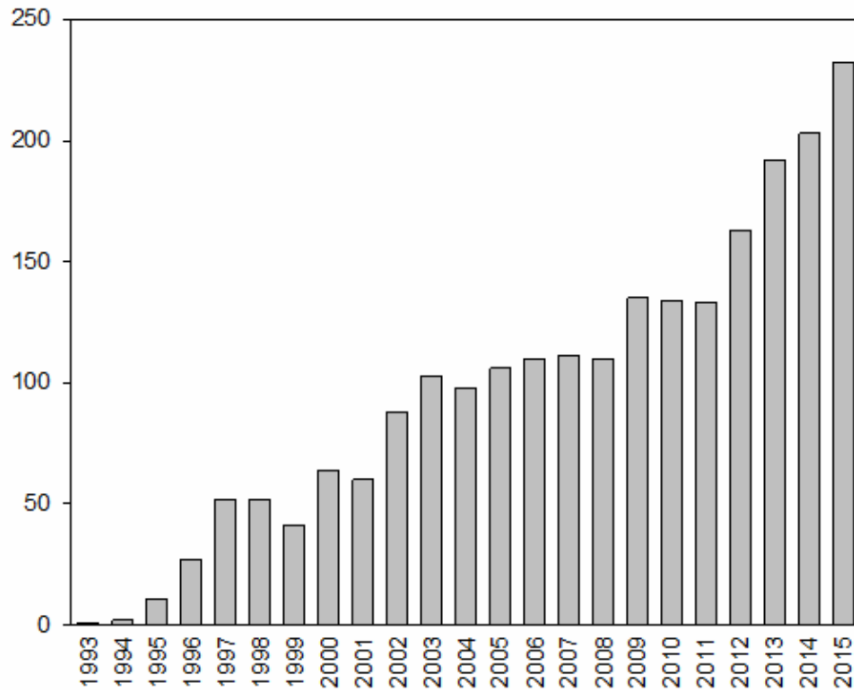


Figure 18. Nombre d'articles sur le thème de la phytoremédiation depuis 1993, basé sur le nombre de sorties à partir du terme « *phytoremediation* » sur *Web of Science*.

En France, le marché de la phytoremédiation est un marché naissant, en effet, elle n'est mise en œuvre que dans seulement 3% des opérations dans le domaine des SSP en 2018 (Château et al., 2018). En 2010, la France comptait une dizaine de sites gérés par phytostabilisation et deux sites ateliers pour des essais de phytoextraction. Les principaux projets Français, intégrant des essais de phytoremédiation *in-situ*, menés depuis 2000 sont référencés dans le Tableau 5. En 2018, deux projets de phytostabilisation étaient menés sur 26 ha dans le cadre de la gestion de pollutions résiduelles et non en traitement principal. Ainsi, cette technique est préconisée dans des approches de gestion combinées et plus particulièrement dans le cas de cocktails de polluants (BTEX, COHV, HAP, HCT, ETM et PCB). Les principaux freins à son utilisation sont liés i) au délai entre la mise en œuvre du dispositif et l'obtention des premiers résultats, ii) à la nécessité d'une importante phase d'étude pré-traitement et à un suivi environnemental rigoureux post-traitement et iii) à la nécessité de maintenir une restriction d'usages au cours du traitement.



Tableau 5. Principaux projet de Phytomanagement ayant été réalisés à des échelles terrain sur des sites contaminés aux ETM en France, entre 2000 et 2019. Ce tableau n'inclut pas les projets Européen récents s'appuyant sur certains de ces mêmes dispositifs expérimentaux.

Projet	Date	Objectif	Lieu	Type de site	Stratégie	ETM	Plante modèle	Valorisation
PHYTEO (ADEME)	2017	Evaluer la viabilité de la phytostabilisation des ETM et la production d'huiles essentielles	Site de Métaleurop (Pas-de-Calais)	Sols agricoles pollués par émissions atmosphériques	Phytostabilisation aidée	Cd, Pb, Zn	<i>Angelica sp.</i> , <i>salvia sp.</i> , <i>Coriandrum sp.</i>	Huiles essentielles
PHYTOFIBER (ADEME)	2017	Déployer une filière de valorisation de biomasses axée sur la production de produits à base de fibres végétales	Site d'Inovyn (Jura)	Lagune de sédiments industriels	Phytostabilisation	As, Hg	<i>Urtica dioica</i> , <i>populus sp.</i>	Matériaux fibrés
MISCHAR	2016	Evaluer la viabilité de biochar de Miscanthus pour la phytostabilisation	Site de Courcelles-Lens (Pas-de-Calais), Site de Métaleurop (Pas-de-Calais)	Ancien bassin de décantation industriel ; Sols agricoles pollués par émissions atmosphériques	Phytostabilisation aidée	Cd, Pb, Zn	Rotations de <i>Cannabis sativa</i> L. et <i>Triticum sp.</i>	Matériaux biosourcés
DEMOPHYTO (ADEME)	2014	Tester deux modalités de phytostabilisation aidée sur un terrain de dépôt de sédiments	Fresnes-sur-Escaut (Nord)	Terrain de dépôt de sédiments	Phytostabilisation aidée	Cd, Zn, Pb, Cu, As	Association de <i>Deschampsia cespitosa</i> et <i>Salix viminalis</i> (TTCR)	Bois-énergie
PHYTOAGGLO (ADEME)	2013	Intégrer à échelle réelle des phytotechnologies dans un projet d'aménagement urbain	Carrefour des Forges (Oise)	Zone urbaine	Phytostabilisation et phytoextraction	Cd, Zn	<i>Salix viminalis</i> , <i>Arabidopsis halleri</i>	Ecocatalyseurs pour la chimie verte ; bioénergie
PHYTOCHEM (ANR)	2013	Développer des procédés chimiques pour valoriser la biomasse issues de phytotechnologies	Site de Métaleurop (Pas-de-Calais) ; Site de Thann (Haut-Rhin)	Sols agricoles pollués par émissions atmosphériques ; lagune de sédiments industriels	Phytostabilisation ; Phytoextraction	Cd, Pb, Zn ; Fe, Mn	25 espèces de ligneux, <i>Arabidopsis halleri</i>	Ecocatalyseurs pour la chimie verte, bois-énergie

LORVER (FEDER)	2012	Créer une filière de production de biomasse végétale par valorisation de sites dégradés et de sous-produits industriels	Site d'Homécourt, Parcelle de Jeandelaincourt (Meurthe-et-Moselle)	Ancien site industriel	Phytostabilisation aidée	Zn, Cd, As	<i>Populus x canadensis, Salix viminalis, Alnus subcordata, Pterocarya stenoptera, Robinia pseudoacacia, Platanus orientalis ; Populus sp., Cannabis sativa L., Urtica dioica L., Noccaea caerulea</i>	Bois-énergie, biochar, matériaux fibrés, sels métalliques
PROLIPHYT (ADEME)	2013	Accroître le panel d'espèces ligneuses utilisables pour le phytomanagement et optimiser leur production	Site d'Inovyn (Jura) ; site de Thann (Haut-Rhin) ; site de Métaleurop (Pas-de-Calais) ; Plaine de Pierrelaye (Yvelynes)	Terrain de dépôt de sédiments ; Sols pollués par émissions atmosphériques ; Sols irrigués d'eaux usagées	Phytostabilisation aidée	As, Hg ; Fe, Mn ; Cd, Zn, Pb, Cu	50 espèces de ligneux	Bois-énergie
PHYTOSED2 (ADEME)	2012	Idem PHYTOSED mais à échelle pilote	Fresnes-sur-Escaut (Nord)	Terrain de dépôt de sédiments	Phytostabilisation aidée	Cd, Zn, Pb, Cu, As	Association de <i>Deschampsia cespitosa</i> et <i>Salix viminalis</i> (TTCR)	Bois-énergie
PHYTOSED (ADEME)	2011	Evaluer la pertinence de la phytostabilisation aidée (amendements chimiques) et de la valorisation de la biomasse produite	Fresnes-sur-Escaut (Nord)	Terrain de dépôt de sédiments	Phytostabilisation aidée	Cd, Zn, Pb, Cu, As	Association de <i>Deschampsia cespitosa</i> et <i>Salix viminalis</i> (TTCR)	Bois-énergie
BIOFILTREE (ANR)	2011	Evaluer la pertinence de la phytostabilisation aidée (amendements biologiques) et de la valorisation de la biomasse produite	Plaine de Pierrelaye (Yvelynes) ; Fresnes-sur-Escaut (Nord) ; Site d'Inovyn (Jura)	Sols irrigués d'eaux usagées ; terrain de dépôt de sédiments ; lagune de sédiments industriels	Phytostabilisation aidée	Cd, Zn, Pb, Cu ; As, Hg	<i>Populus spp., Alnus glutinosa</i> (TCR)	Bois-énergie
OPPORTUNITE (ANR)	2011	Développer des procédés de Chimie verte pour valoriser des déchets contaminés	Saint-Laurent-le-Minier (Gard)	Site minier	Phytomining	Cd, Pb, Zn	<i>Noccaea caerulea, Anthyllis vulneraria</i>	Ecocatalyseurs pour la chimie verte
SYMÉTAL (ANR)	2011	Optimiser la sélection des espèces végétales et microbiennes pour la stabilisation d'anciens sites miniers	Saint-Laurent-le-Minier (Gard)	Site minier	Phytostabilisation aidée	Cd, Pb, Zn	<i>Festuca arvernensis, Koeleria vallesiana, Anthyllis vulneraria subsp carpatica</i>	/

PHYSAFIMM (ADEME)	2009	Optimiser la phytostabilisation de friches industrielles métallurgiques ou minières	Crassier de Châteauneuf (Loire)	Crassier métallurgique	Phytostabilisation aidée	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Mélanges de poacées et d'herbacées dicotylédones	/
PHYTENER	2009	Redonner un intérêt économique à des terres agricoles disqualifiées	Site de Métaleurop (Pas-de-Calais)	Sols agricoles pollués par émissions atmosphériques	Phytostabilisation aidée	Cd, Pb, Zn	<i>Robinia pseudoacacia, Alnus glutinosa, Quercus ilex, Acer pseudoplatanus, Miscanthus x giganteus</i>	Bois-énergie
PHYTODEMO	2008	Tester la phytoremédiation sur des sites de traitement de bois	St. Médard d'Eyrans (Gironde)	Sites de traitement du bois	Phytostabilisation aidée, phytoextraction	Cu	<i>Populus nigra, Salix caprea, Salix viminalis, Amorpha fruticosa ; rotation Helianthus annuus, Nicotiana tabacum, Vetiveria zizanioides ; Sorghum bicolor, Fallopia sachalinensis ; Miscanthus spp., Chrysopogon zizanioides, Agrostis capillaris, A. delicatula, A. gigantea, Dactylis glomerata, Deschampsia caespitosa, Sporobolus indicus, Vulpia myuros, Festuca pratensis.</i>	Bois-énergie et aures
ECOLIRIMED	2008	Développer une filière d'écotypes ligneux pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau.	Wallonie, Lorraine française, Grand-Duché	Berges de cours d'eau	Phytostabilisation	ETM	<i>Alnus glutinosa, Salix spp., Fraxinus excelsior</i>	Bois-énergie
PHYTOPERF	2007	Suivre à long terme la phytostabilisation à une échelle industrielle	Site de La Combe du Saut (Aude)	Site minier	Phytostabilisation aidée	As	<i>Holcus lanatus, Dittrichia viscosa, Lotus corniculatus, Plantago lanceolata</i>	/
PHYTOSTAB	2007	Tester l'applicabilité de la phytostabilisation aux sédiments de curage	Fresnes-sur-Escaut (Nord)	Terrain de dépôt de sédiments	Phytostabilisation aidée	Cd, Zn, Pb, Cu, As	<i>Deschampsia caespitosa, Festuca rubra</i>	Bois-énergie
PHYTOPOP (ANR)	2007	Optimiser le potentiel du peuplier pour la phytoremédiation	Plaine de Pierrelaye (Val-d'Oise) ; site de Métaleurop (Pas-de-Calais)	Sols irrigués d'eaux usagées ; sols agricoles pollués par émissions atmosphériques	Phytostabilisation	Cd, Zn, Pb, Cu	<i>Populus spp. (TCR et TTCR)</i>	Bois-énergie
DIFPOLMINE	2002	Tester à grande échelle la phytostabilisation	Site de La Combe du Saut (Aude)	Site minier	Phytostabilisation aidée	As	Mélanges de poacées et d'herbacées dicotylédones	/

### 1.3.1.3 Etat des lieux des essais de phytoextraction

Des expérimentations menées *in-situ* ont montré la viabilité des espèces de plantes hyperaccumulatrices (Bani et al., 2015; Deng et al., 2016; Hammer and Keller, 2003; Kayser et al., 2000; Wan et al., 2016) dans des projets de phytoremédiation visant à réduire les concentrations en ETM dans les sols, jusqu'à atteindre des teneurs inférieures aux limites réglementaires dans certains cas (Wan et al., 2016; Hammer and Keller, 2003). Les plantes hyperaccumulatrices sont généralement caractérisées par une croissance lente et une faible production de biomasse et par conséquent une faible profondeur de racines, ce qui limite souvent l'applicabilité de la technique aux horizons de surface. Pour pallier à cela, des essais de phytoextraction utilisant des variétés à croissances rapides et notamment des arbres ont également été réalisés (Chalot et al., 2019; Hammer et al., 2003; Marmiroli et al., 2011; Maxted et al., 2007; Van Slycken et al., 2013) (Tableau 5). Chez les arbres, l'absence des mécanismes de solubilisation et de mobilisation des métaux, propres aux hyperaccumulateurs, est compensée par leur capacité à croître rapidement et à produire beaucoup de biomasse, ce qui leur permet d'absorber d'importantes quantités d'ETM. Les membres de la famille des Salicacées ont été les essences les plus étudiées.

Une récente étude menée sur différents sites contaminés par divers ETM a permis de mettre en avant que les variétés de peuplier les plus productives permettaient d'exporter de grandes quantités d'ETM (Chalot et al., 2019), sans appauvrir les stocks de nutriments dans le sol. Par ailleurs, l'étude de Van Slycken et al., (2013) a également démontré que certaines variétés de saules présentaient des capacités d'exportation des ETM intéressantes. D'autres espèces d'arbres tels que le bouleau, l'aulne ou encore l'érable ont été testées dans des contextes similaires en raison de leur haute tolérance aux métaux (Pulford and Watson, 2003) (Tableau 5). Par ailleurs des plantes cultivées telles que *Brassica juncea*, *B. napus*, *Helianthus annuus* ou encore *Zea mays* ont été présentées comme des candidates viables pour ce type d'application (Deng et al., 2016; Fässler et al., 2010; Herzig et al., 2014). Toutefois, d'un point de vue éthique, l'utilisation d'arbres plutôt que de végétaux communément utilisés à des fins alimentaires semble plus acceptable en raison d'une probabilité moindre que les ETM entrent dans la chaîne alimentaire.

Afin de pallier à une faible biodisponibilité des ETM, la phytoextraction a été couplée à l'application d'agents chélatants au sol afin d'améliorer l'absorption des ETM tels que le Cd, le Cu, le Zn ou le Pb et leur translocation vers les tissus aériens. Ces agents chélatants tels que l'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA) limitent la précipitation et la sorption des ETM dans le sol, maintenant ainsi leur biodisponibilité (Salt et al., 1995). Cette phytoextraction induite par agents chélatants renforce l'intérêt d'utiliser des espèces à forte production de biomasse. Toutefois, l'utilisation de ces chélatants reste controversée en raison du risque de lixiviation des ETM vers

les eaux souterraines et de leur toxicité envers les micro-organismes du sol (Ali et al., 2013). Ainsi, des traitements biologiques reposant sur l'utilisation de champignons mycorhiziens à arbuscules (AM), des champignons ectomycorhiziens (EM), des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) ou des bactéries endophytes sont aujourd'hui préférés à des traitements chimiques. Les micro-organismes utilisés sont connus pour favoriser la croissance des plantes, leur tolérance et leur potentiel d'absorption des ETM (Burges et al., 2016; Ciadamidaro et al., 2017; Phanthavongsa et al., 2017).

Parallèlement à ces stratégies visant à faciliter l'absorption et la tolérance des plantes aux ETM, des études visant à façonner des plantes transgéniques présentant des caractéristiques d'hyperaccumulation et de production de biomasse souhaités ont été menées. Celles-ci se sont focalisées sur la surexpression des gènes codants pour les transporteurs de métaux (Song et al., 2003), et ceux impliqués dans la synthèse des métallothionéines, des phytochélatines et autres chélateurs (Mosa et al., 2016) permettant de faciliter l'absorption et la translocation des métaux par le xylème. Bien que cette pratique ait donné des résultats prometteurs, elle se heurte à nouveau à des problématiques éthiques.

La principale limite à la phytoextraction est le temps très long nécessaire pour extraire efficacement les ETM des sols, en particulier dans les sites moyennement et fortement contaminés (Zhao et al., 2003). Mais si l'objectif consiste en l'extraction de la fraction biodisponible du sol et non en l'atteinte des concentrations totales en ETM fixées par le cadre juridique, le délai pour mener à bien cette tâche est beaucoup plus court (Vangronsveld et al., 2009). La faible biomasse produite et la croissance lente de la plupart des hyperaccumulateurs sont en grande partie responsables de cette limitation. Les cocktails d'ETM apparaissent également comme un facteur limitant à cette technique (Garbisu and Alkorta, 2001). Par ailleurs, dans l'étude de Michels et al., (2018), les concentrations en ETM mesurées dans le sol de surface se sont avérées plus élevées à la fin d'un projet de phytoextraction de 6 ans. Les feuilles chargées en ETM, en retombant au sol, seraient la raison de cet enrichissement. Ainsi, la phytoextraction nécessiterait des modalités de gestion régulières afin de réellement extraire les ETM. Par ailleurs, lorsque la récupération des métaux à partir de la biomasse végétale est possible (*i.e.*, phytomine), la phytoextraction devient une technique nettement plus attractive en raison du potentiel économique qui en découle (Jiang et al., 2015). En effet, le phytomining de certains métaux et notamment du Ni peut s'avérer particulièrement rentable (Chaney et al., 2007; Sheoran et al., 2009). En France, le procédé global de la phytomine du Ni à partir d'*Alyssum murale* a été optimisé dans le cadre du projet ECONICK (2011-2014), débouchant notamment sur un brevet.

#### 1.3.1.4 Etat des lieux des essais de phytostabilisation

La phytostabilisation n'a pas pour objectif de dépolluer les sols mais de limiter les risques liés à la présence des contaminants, tant sur le plan environnemental que sanitaire. Certaines typologies de sites industriels, tels que les terrils miniers peuvent présenter des concentrations en ETM toxiques pour les organismes en plus d'être totalement dépourvus de MO, rendant ainsi les sols stériles et inadaptés à une revégétalisation naturelle. Ces sites sont ainsi particulièrement sujets à l'érosion éolienne et au lessivage des ETM. Dans ces cas particuliers, l'utilisation de plantes adaptées aux conditions particulières du milieu peut permettre une revégétalisation limitant ces phénomènes d'érosion et de lixiviation. En effet, une couverture végétale i) limite la dispersion éolienne ou hydrique des particules de sol contaminées par les ETM (ii) diminue la disponibilité et la mobilité des éléments par accumulation dans les racines et par adsorption et précipitation induites par la rhizosphère (Vangronsveld et al., 2009). Ainsi, dans ce cas, le principal défi de la phytostabilisation consiste à identifier des espèces candidates. Ces dernières, pour être viables, doivent présenter diverses caractéristiques telles que i) être tolérantes aux ETM, ii) avoir un système racinaire étendu, iii) produire une grande quantité de biomasse et iv) maintenir une translocation racine-tige aussi faible que possible afin de limiter l'entrée de contaminants dans la chaîne alimentaire (Alkorta et al., 2010). Afin de sélectionner des essences candidates, les études se sont concentrées sur des investigations de terrains, considérant préférentiellement les espèces indigènes (Zapata-Carbonell et al., 2019; Zhang et al., 2012). Ainsi, de nombreuses plantes excluant pour certains ETM (e.g., *Festuca rubra*, *Agrostis capillaris*, *A. stolonifera*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Lupinus luteus*, *Arundo donax*) présentant (en partie) les caractéristiques préalablement mentionnées ont été utilisées pour la revégétalisation de sols fortement contaminés (Arienzo et al., 2004; Bidar et al., 2007; Dary et al., 2010). Néanmoins, les essences ligneuses semblent représenter de meilleurs candidats pour la phytostabilisation en raison notamment i) de leur système racinaire massif, ii) de leur capacité à enrichir le sol en matière organique *via* la chute des feuilles améliorant ainsi le cycle des nutriments et finalement en raison iii) de leur capacité de rétention d'eau (Domínguez et al., 2009; King et al., 2008; Meeinkuirt et al., 2012). Par ailleurs, le taux élevé de transpiration et la demande en eau de certaines familles d'arbres telles que les Salicacées participent activement à la réduction de l'infiltration d'eau chargée en ETM vers la zone saturée (Pulford and Watson, 2003), ils ont par conséquent été particulièrement étudiés (Tableau 5 Tableau 6).

De la même manière que pour la phytoextraction, des stratégies ont été développées afin de faciliter la phytostabilisation. L'utilisation d'amendements organiques apparaît inévitable lorsque le potentiel agronomique initial du sol est médiocre comme c'est le cas pour certaines friches industrielles ou crassiers miniers. Ces amendements permettent notamment d'augmenter les teneurs

en MO et en nutriments essentiels (Alvarenga et al., 2009; Galende et al., 2014) ou encore de réduire la biodisponibilité des métaux (Tableau 6).

Tableau 6. Types d'amendement communément utilisés selon les contaminants en présence, d'après Bert, (2012).

ETM	Mécanismes contrôlant la mobilité	Amendements préconisés	Amendements à éviter
As	Adsorption	Sels de fer	Phosphates
	Désorption	Oxydes de Fe,	Compost facilement minéralisable
	Co-précipitation avec des oxydes métalliques	d'Al ou Mn	
Cr	Réduction du chrome IV en chrome III	MO	Oxydes de Mn Cendres volantes Hydroxyapatites Carbonate de Ca
Cu	Dépendant du pH et du rapport MO soluble/MO particulaire	Cendres volantes	MO trop soluble Amendements ayant un pH trop élevé
		Certains alumino-silicates	
		Minéraux argileux	
		Certains composts	
		Boues d'épuration	
Pb	Échange ionique Précipitation	Mélanges matériaux alcalins-compost	MO trop soluble
		Phosphates	
Zn	Complexation avec des ligands organiques	Argiles	Amendements
		Cendres volantes	acidifiants
		Certains alumino-silicates	
Cd	Dépendant du pH Sorption sur les oxydes et les argiles	Matériaux alcalins	Amendements
		Chaux et matériaux alcalins	acidifiants
		Carbonates	
		Oxydes de Mn ou Fe	

Dans une démarche de développement durable, l'accent a été mis sur la réutilisation de matériaux considérés comme déchets organiques et inorganique. Ainsi, le compost, les boues d'épuration, le fumier de ferme, le lisier d'animaux, les déchets solides municipaux ou encore la litière ont été utilisés dans le cadre de projets de phytostabilisation aidée (Pérez-de-Mora et al., 2011; Touceda-González et al., 2017). Quant aux amendements inorganiques couramment utilisés, les aluminosilicates, les oxyhydrates métalliques, les zéolithes et les cendres volantes ont également montré un intérêt pour la technique (Li and Huang, 2015; Liu et al., 2017; Mench et al., 2003).

Par ailleurs, dans des contextes de phytostabilisation, les micro-organismes bactériens et fongiques font également l'objet de nombreuses études en raison de leurs caractère auxiliaire pour les végétaux, mais pas seulement. Ils contribuent également à l'immobilisation des ETM en modifiant activement leur spéciation, en les adsorbant sur leurs parois cellulaires ou en les faisant précipiter (Rajkumar et al., 2012). Les AMF peuvent également agir en tant que filtres afin de limiter le transfert des métaux vers les parties aériennes (Göhre and Paszkowski, 2006) tandis que les endophytes bactériens sont connus pour produire des chélateurs, comme les sidérophores, limitant la translocation des ETM vers les pousses et favorisant leur accumulation dans les racines (Mastretta et al., 2009).

### 1.3.2 De la Phytoremédiation au Phytomanagement

En raison des contraintes citées préalablement, la phytoextraction se heurte à des limites quant à son utilisation à l'échelle commerciale. En ce qui concerne la phytostabilisation, elle reste considérée comme une méthode utilisée à défaut de pouvoir employer d'autres techniques, ou temporaire, en attendant de nouvelles opportunités de remédiation. Par conséquent, ces stratégies, en tant que processus de remédiation, suscitent souvent un scepticisme quant à leur viabilité. De récentes approches novatrices, appelées « méthodes de remédiation douces » ou « Gentle Remediation Options (GRO) » en anglais, combinent ces phytotechnologies avec une utilisation durable et rentable des sites, faisant ainsi naître la notion de « phytomanagement » (Cundy et al., 2013). Alors que la phytoremédiation vise à atténuer les risques, le phytomanagement permet une gestion intégrée des sites, dans laquelle, parallèlement à la prise en compte des risques, les avantages économiques, sociaux, écologiques et environnementaux pour l'humanité sont considérés (Figure 19) (Burgess et al., 2018). Selon ce concept, les sols contaminés ne sont plus uniquement considérés comme des sources de danger nécessitant une remise en état, mais comme une ressource capable d'encourager de nombreux services écosystémiques à partir de fonctions écologiques, tels que la production de végétaux ou encore la promotion de la biodiversité. Ainsi, les sols contaminés prennent davantage le statut de ressources durables, capable de produire des plantes à des fins très diverses et rentables. Le phytomanagement peut ainsi se traduire par l'ingénierie ou la manipulation des systèmes sol-plantes-micro-organismes pour contrôler les flux d'ETM dans l'environnement, maximiser les avantages économiques et/ou écologiques tout en minimisant les risques (Robinson et al., 2009).



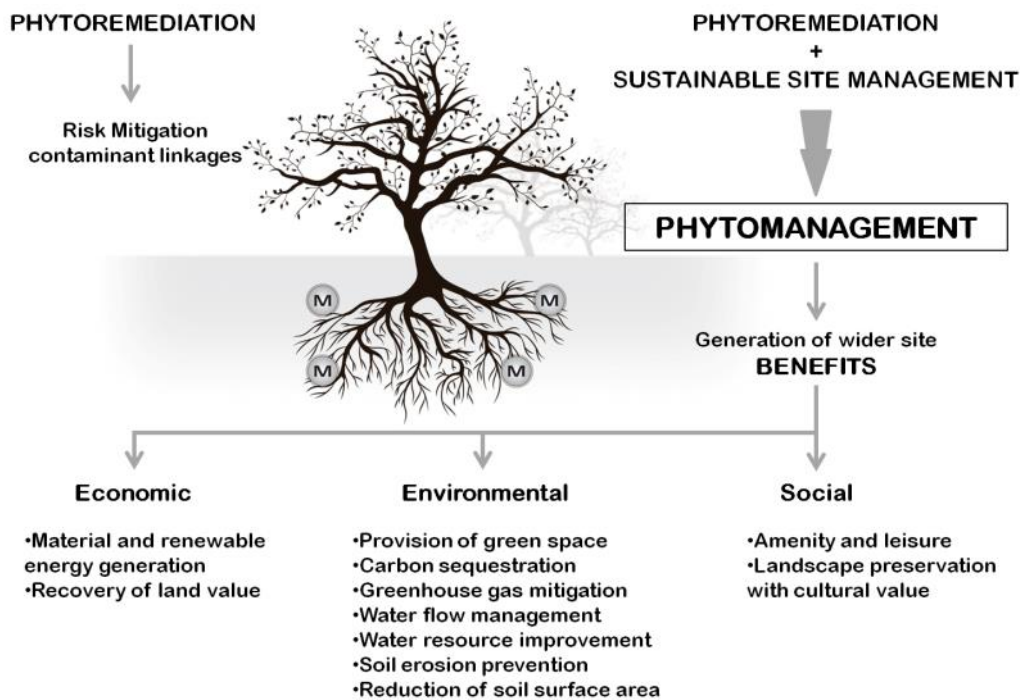


Figure 19. Représentation schématique du phytomanagement et de ses intérêts selon Burges et al., (2018).

Le phytomanagement a donc pour vocation de contribuer à de nombreux services écosystémiques, tels que i) la prévention de l'érosion des sols, ii) la gestion de l'écoulement des eaux de surface et souterraines, iii) la fourniture d'espaces verts, iv) la production d'énergie et de matériaux renouvelables, v) la réduction de la superficie des sols inexploités vi) l'amélioration de la structure et de la fertilité des sols et vii) la séquestration du carbone (Cundy et al., 2013) (Figure 19). De plus, le rapport coûts-avantages du phytomanagement est généralement inférieur à celui des approches par phytoremédiation en raison des bénéfices économiques engendrés par la biomasse végétale produite et son caractère valorisable. Par conséquent, dans des problématiques complexes où un abattement total de la contamination n'est pas réaliste (e.g., surface de sol à traiter trop importante) ou dans des situations où le site présente une faible valeur foncière, sans projet de reconversion, le phytomanagement permet de donner une fonction économique au parcellaire tout en stabilisant ou en remédiant progressivement la contamination.

### 1.3.2.1 Espèces candidates et itinéraires cultureux pour le phytomanagement

Pour présenter un intérêt, les plantes utilisées pour le phytomanagement doivent avoir une croissance rapide, accompagnée d'une forte production de biomasse et présenter des itinéraires cultureux adaptables. Leurs caractéristiques quant à l'accumulation des ETM dépendent de l'objectif à plus long terme, toutefois, la priorité concerne le caractère valorisable (valeur économique ou écologique) de la biomasse produite. Là où le but de la phytoextraction est de

produire une biomasse végétale enrichie en ETM, la phytostabilisation (aidée) vise à produire une biomasse végétale ayant des concentrations proches de leurs concentrations physiologiques, par conséquent, cette dernière est la plus à même de produire de la biomasse valorisable.

Dans le cas des sites pour lesquels l'enjeu principal consiste en une revégétalisation et une stabilisation du sol et non pas une valorisation économique de la production, le choix peut être fait de favoriser le développement de la végétation indigène. Cette stratégie, utilisée pour revégétaliser des crassiers métallurgiques (PHYSAFIMM) ou d'anciens sites miniers (DIFPOLMINE) nécessite toutefois un diagnostic des risques de transfert et une surveillance renforcée (Tableau 5).

Tableau 7. Potentiel positif (+) ou négatif (-) des différentes plantes pour la phytoremédiation, basé sur leur tolérance et leur capacité à accumuler les ETM, d'après Evangelou et al., (2015).

	Trace elements		
	Cd	Zn	Pb
<i>Trees</i>			
Birch ( <i>Betula pendula</i> )	+	+	--
Eucalyptus ( <i>Eucalyptus</i> spp.)	-	-	+
Oak ( <i>Quercus</i> spp.)	++	++	+
Poplar ( <i>Populus</i> spp.)	--	--	+
Maple ( <i>Acer</i> spp.)	+	+	+
Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> )	++	++	+
Willow ( <i>Salix</i> spp.)	--	--	+
<i>Agricultural crops</i>			
Corn ( <i>Zea mays</i> )	+	-	+
Rapeseed ( <i>Brassica napus</i> )	-	-	-
Sorghum ( <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench)			+
Soybean ( <i>Glycine max</i> )		--	
Sugarcane ( <i>Saccharum</i> spp.)	--		
Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> )	-	--	
Tobacco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	--		
Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)			+
<i>Perennial grasses</i>			
Elephant grass ( <i>Pennisetum purpureum</i> )	-	-	-
Giant reed ( <i>Arundo donax</i> )	+/-	+/-	+/-
Switchgrass ( <i>Panicum virgatum</i> )	+	+	+
Vetiver grass ( <i>Vetiveria zizanioides</i> L.)	+	+	+

Les espèces les plus couramment utilisées et leur potentiel pour le phytomanagement, selon leur tolérance/capacité d'absorption des ETM sont résumées dans le Tableau 7. Parmi elles, diverses espèces ligneuses ont été utilisées pour produire de la biomasse ligneuse sur des sols contaminés. Le tronc, en plus d'être le compartiment présentant le plus grand potentiel de valorisation est également celui qui accumule le moins la plupart des ETM (Unterbrunner et al., 2007, Chalot et al. 2019). Ainsi, le saule (*Salix* spp.) et le peuplier (*Populus* spp.) ont été largement utilisés pour la production de bioénergie en raison de leur croissance rapide. De manière à optimiser la production de biomasse en vue d'assurer la rentabilité de la plantation, les itinéraires culturaux sont

généralement tirés des pratiques traditionnelles en milieu non contaminé. Pour la production de bois, la plupart des espèces de Salicacées ont été cultivées sous la forme de taillis à courtes rotations (TCR), permettant une culture dense, avec des arbres qui rejettent après la première rotation prévue à 7 ans (Ruttens et al., 2011). Toutefois, en raison de leur aptitude à accumuler d'importantes concentrations de Cd et de Zn, il est préférable d'éviter leur utilisation à des fins de valorisation de la biomasse sur des sols contaminés par ces ETM (Evangelou et al., 2013; Migeon et al., 2009). D'autres feuillus comme l'eucalyptus (*Eucalyptus spp.*), le hêtre (*Fagus spp.*), l'érable (*Acer spp.*) ou le bouleau (*Betula spp.*) ainsi que des résineux comme le pin (*Pinus spp.*), le sapin (*Abies spp.*) ou le mélèze (*Larix spp.*) ont été cultivés sur des sites contaminés (Evangelou et al., 2015). Le bouleau est un arbre pionnier caractérisé par une croissance rapide et de faibles besoins en éléments nutritifs du sol. Ainsi, il peut être un candidat approprié pour la revégétalisation des sols contaminés à faible teneur en éléments nutritifs. Le chêne (*Quercus spp.*) présente une tolérance élevée aux ETM et une faible accumulation, toutefois sa croissance lente est un frein à son utilisation pour le phytomanagement (Evangelou et al., 2013). Les arbres ne sont toutefois pas les seuls candidats, des espèces de « grande culture » telles que le blé (*Triticum spp.*), le maïs (*Zea mays L.*), le tournesol (*Helianthus annuus L.*) ou encore le colza (*Brassica napus L.*) ont été utilisées en phytomanagement en raison de leur capacité à accumuler de grandes quantités d'amidon, de sucre ou d'huiles dans leurs organes de stockage (Asad et al., 2017; Mench et al., 2018). Par ailleurs, bien que la culture de graminées vivaces soit relativement nouvelle, elles sont des espèces prometteuses en raison de leur potentiel pour la production de bioénergie (Evangelou et al., 2015). De nombreux travaux (e.g., projet PHYTENER) ont révélé que le miscanthus (*Miscanthus spp.*) serait un candidat prometteur pour ce type d'application en raison de son caractère excluant et de son potentiel de valorisation (Nsanganwimana, 2014; Pidlisnyuk et al., 2019).

### 1.3.2.2 Valorisation des biomasses produites

Les biomasses issues du phytomanagement peuvent intégrer, dans les conditions fixées par la réglementation, les filières de valorisation existantes à condition qu'elles ne perturbent pas le fonctionnement et la performance des procédés et que les émissions d'ETM soient maîtrisées afin de prévenir les transferts dans l'environnement. Le Tableau 8 présente les principales filières de valorisation pour la biomasse issue des projets de phytomanagement, selon la stratégie de remédiation et le type de polluants en présence.

La biomasse végétale peut être convertie en bioénergie par des procédés thermiques ou biologiques. Le terme "bioénergie" symbolise un nombre important de sources d'énergie facilement disponibles et pouvant être rapidement renouvelées par rapport aux combustibles fossiles (Dahiya, 2014). Parmi les procédés thermo-chimiques, la combustion est le plus couramment utilisé pour

convertir la biomasse en gaz, valorisable sous forme de chaleur et d'électricité, tandis que la torréfaction et la pyrolyse sont deux procédés en émergence. Ces procédés ont récemment été mis en œuvre en utilisant des biomasses ligneuses (e.g., saule, peuplier, miscanthus) issues de projets de phytomanagement à l'échelle de pilotes industriels (projets GREENLAND, PHYTOPOP, BIOFILTREE et PHYTENER).

Tableau 8. Filières de valorisation pour la biomasse issue de phytostabilisation et de phytoextraction (ADEME, 2012)

Stratégie	ETM	Filières de valorisation	Espèces préconisées	Noms latins
<b>Phytostabilisation</b>	NC	Bois-énergie	Arbres et arbustes à croissance rapide et à forte biomasse	<i>Salix sp.</i> , <i>Populus sp.</i> , <i>Miscanthus sp.</i>
	NC	Compostage	Poacées	<i>Poaceae</i>
	NC	Méthanisation à la ferme	Maïs ; tournesol ; luzerne ; blé	<i>Zea maïs</i> , <i>Heliantus annus</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Triticum sp.</i>
	NC	Eco-matériaux	Miscanthus, chanvre	<i>Miscanthus sp.</i> , <i>Cannabis sativa</i>
	NC	Gazéification	Tout type de biomasse	<i>Salix sp.</i> , <i>Populus sp.</i> , etc.
	NC	Bioraffineries (biocarburants, etc.)	Blé ; maïs ; tournesol	<i>Triticum sp.</i> , <i>Zea maïs</i> , <i>Heliantus annus</i> , <i>Salix sp.</i>
		Co-combustion, gazéification, hydrométallurgie	Hyperaccumulateurs	<i>Thlaspi caerulescens</i> , <i>Arabidopsis halleri</i>
<b>Phytoextraction</b>	Cd	Bois-énergie, gazéification	Arbres et arbustes à croissance rapide et à forte biomasse	<i>Salix sp.</i> , <i>Populus sp.</i>
		Bioraffineries (biocarburants, etc.)	Herbacées à forte biomasse	<i>Zea maïs</i> , <i>Heliantus annus</i> , <i>Brassica napus</i>
		Co-combustion, gazéification, écomatériaux catalytiques, et synthèse de biomolécules	Hyperaccumulateurs	<i>Thlaspi caerulescens</i> , <i>Arabidopsis halleri</i>
	Zn	Bois-énergie, gazéification	Arbres et arbustes à croissance rapide et à forte biomasse	<i>Salix sp.</i> , <i>Populus sp.</i>
		Bioraffineries (biocarburants, etc.)	Herbacées à forte biomasse	<i>Zea maïs</i> , <i>Heliantus annus</i> , <i>Brassica napus</i>
	As	Solvolyse	Hyperaccumulateurs	<i>Pteris vittata</i>
	Ni	Hydro-métallurgie, écomatériaux et synthèse d'agents thérapeutiques	Hyperaccumulateurs	<i>Alyssum murale</i> , <i>Alyssum corsicum</i>
	Cu	Hydro-métallurgie, solvolyse	Herbacées à forte biomasse	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Heliantus annus</i> , <i>Brassica napus</i>

Ces projets ont montré que la combustion était un procédé viable pour ce type de biomasse, toutefois, les chaudières collectives ou industrielles utilisées doivent être équipées d'un filtre empêchant l'émission de certains ETM vers l'atmosphère. Ce procédé a le double intérêt de produire de l'énergie tout en concentrant les ETM dans les cendres sous-foyer, tout en respectant les seuils réglementaires fixés par la directive européenne sur les grandes installations de combustion (Chalot et al., 2012). Des essais de torréfaction (290°C) et de pyrolyse (450 – 800°C) ont été conduits dans un réacteur breveté à partir de bois de peupliers issus de sols pollués. La valorisation en tant qu'amendement des produits issus de ces procédés (*i.e.*, biochar, biomasse torréfiée, bio-huiles et gaz) s'est avérée impossible en raison de concentrations en Cd excédant les normes en vigueur (Bert et al., 2017). Une étude récente a également obtenu des résultats mitigés quant à la qualité du biochar obtenu, suggérant la nécessité d'études complémentaires (He et al., 2019). Enfin, la méthanisation (ou fermentation anaérobie) est un procédé biologique de dégradation partielle de la MO produisant du biogaz, avec diverses filières de valorisation possibles (*e.g.*, injection dans le réseau de gaz naturel après épuration). Etant donné que les ETM se concentrent dans la fraction solide, un retour au sol du digestat en tant qu'amendement peut être envisagé uniquement dans le cas de biomasses présentant des teneurs physiologiques avant valorisation (Witters et al., 2012).

D'autres filières de valorisation prometteuses ont également émergé ces dernières années. En effet, de nombreuses variétés de "plantes aromatiques" peuvent tolérer les milieux toxiques et améliorer la qualité du sol tout en présentant un potentiel pour la production d'huiles essentielles, de cosmétiques et de produits de soins (Lubbe and Verpoorte, 2011). Parmi elles, les espèces suivantes ont fait l'objet d'études récentes : le vétiver (*Chrysopogon zizanioides*), la citronnelle (*Cymbopogon flexuosus*), la menthe, la lavande (*Lavandula spp.*), le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) ou encore le Géranium (*Pelargonium spp.*) (Pandey et al., 2019). D'après Lal et al., (2013) et Zheljzakov et al., (2006), la culture d'espèces aromatiques sur des sites contaminés aux ETM n'entrave pas la qualité des huiles essentielles produites et ne présente pas de risques sanitaires pour les utilisateurs des produits transformés. Enfin, des plantes à fibre et plus particulièrement le chanvre (*Cannabis sativa*) a été montré comme étant un candidat adapté au phytomanagement en raison d'une tolérance à des concentrations modérées en ETM, notamment liée à un faible taux de translocation des éléments toxiques (Pietrini et al., 2019). De plus, Linger et al., (2002) se sont spécifiquement intéressés aux propriétés physico-chimiques et mécaniques de la fibre de chanvre issue de sols contaminés, et ont conclu que la qualité des fibres n'est pas affectée par la contamination, ce qui leur permet d'être valorisées.

### 1.3.2.3 Principaux projet de phytomanagement en France et en Europe

En France, le phytomanagement est passé du laboratoire au déploiement sur des sites ateliers (*e.g.*, site d'Homécourt) dans le cadre de différents projets, pour beaucoup soutenus par l'ADEME, l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dont les principaux sont présentés dans le Tableau 5. Ces projets sont de nature diverse, allant de la revégétalisation de sites minier (OPPORTUNITE, PHYTOPERF) ou de crassiers métallurgiques (PHYSAFIMM) en utilisant des espèces indigènes ou tolérantes, à des projets visant explorer de nouvelles filières de valorisation (huiles essentielles, projet PHYTEO) (Tableau 5). Parmi les organismes actifs dans ce domaine, le Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI), intégrant 10 laboratoires de recherche publique de Lorraine met en synergie différentes compétences autour d'un projet dédié à l'acquisition de connaissances pour la requalification des sites pollués.

A cela s'ajoutent des projets et initiatives Européennes telles que les Actions COST 837 et COST 859 qui ont été les réseaux européens leaders, de 1998 à 2009, pour structurer les travaux sur les phytotechnologies appliquées aux sites contaminés. De ces réseaux ont émergés des projets (*e.g.*, GREENLAND, TIMBRE, PhytoSUDOE, INTENSE) visant à démontrer, sur sites, le potentiel du phytomanagement pour gérer durablement des terrains contaminés/dégradés, rétablir des fonctions écologiques des sols et *in fine* proposer des usages pour ces sites remédiés en zones péri-urbaines, rurales ou naturelles. Ces réseaux d'essais intègrent de nombreux sites-ateliers Français ainsi que d'autres à l'international. La nature multidisciplinaire des projets accroît la collaboration, l'échange de connaissances et l'expertise sur la remédiation des sols.

### 1.3.2.4 Limites et perspectives des phytotechnologies

Bien que les phytotechnologies présentées jusqu'ici soient au centre de l'intérêt de nombreuses équipes de recherche partout dans le monde, leur acceptation et utilisation au-delà des échelles pilotes par les parties prenantes reste très limitée (Bert, 2012). En effet, un manque de sensibilisation des parties prenantes et des propriétaires de sites dégradés a été reporté. Actuellement, les principaux obstacles à une utilisation plus généralisée du phytomanagement sont liés i) au cadre juridique qui prévoit généralement une élimination totale des ETM, ii) à la nécessité d'une surveillance à long terme et iii) à l'incertitude quant à la reproductibilité due à conditions de milieu différentes selon les sites (Burges et al., 2018).

Le problème d'applicabilité des phytotechnologies se pose pour de nombreux sites et nécessite généralement une importante phase de diagnostic préliminaire. Récemment, le projet GREENLAND a permis la mise au point d'un outil d'aide à la décision permettant de faciliter cette étape initiale (Cundy et al., 2015). Toutefois, les procédures réglementaires d'évaluation des sols

pollués sont aujourd'hui basées sur la seule mesure des teneurs totales en contaminants, sans considérer la biodisponibilité de ces derniers. Il apparaît donc nécessaire de compléter les analyses classiques par un ensemble de données renseignant sur la biodisponibilité des contaminants, à partir de bioindicateurs pertinents, afin d'améliorer le réalisme de cette évaluation.

Lorsqu'un projet de phytomanagement voit le jour, des expérimentations à plusieurs échelles (*i.e.*, tests en pots, micro-parcelles et parcelles), nécessitant un temps d'évaluation de plusieurs années est un passage nécessaire, ce qui peut décourager certains donneurs d'ordres. De la même manière, les études à long terme visant à caractériser l'influence de la couverture végétale sur les flux de contaminants, la biodiversité structurelle et fonctionnelle, la résilience des écosystèmes et les services écosystémiques des sols contaminés sont cruciales pour démontrer l'efficacité et durabilité de la gestion mise en œuvre. De plus, les approches et les méthodes permettant d'évaluer l'efficacité des phytotechnologies et les risques résiduels liés à une gestion *in-situ* des sites contaminés sont encore récentes et il n'existe pas de procédure généralisable.

Le phytomanagement s'oriente vers la production de biomasses pour des applications industrielles liées au développement durable avec économie de matières premières, toutefois la rentabilité de ces projets fait généralement défaut (cas des projets BIOFILTREE et PHYTOSED 2) (Bert, 2017). Toutefois, l'outil développé dans le cadre de GREENLAND et permettant d'évaluer la rentabilité d'un projet de phytomanagement n'intègre que des données économiques. En effet, il ne permet pas d'attribuer une valeur pécuniaire aux services écosystémiques rendus par ce type de pratiques. Dans la mesure où les phases i) de sélection des variétés, ii) de mise en œuvre des plantations, iii) d'optimisation *via* des amendements organiques ou inorganiques et iv) d'identification et de maîtrise de filières de valorisation viables ont fait l'objet de nombreux travaux à diverses échelles (Kidd et al., 2015; Mench et al., 2010), l'un des défis actuels consiste à identifier et quantifier l'influence du phytomanagement sur l'ensemble des composantes des écosystèmes réhabilités.

### 1.3.3 L'utilisation de systèmes agroforestiers en contexte de phytomanagement

#### 1.3.3.1 *L'écologie au service de la pérennité des cultures : l'agroécologie*

Le terme « agroécologie » a été proposé par l'agronome américain Basil Bentsin en 1928 pour désigner une approche de l'agronomie s'inspirant des acquis de l'écologie, qui a développé l'approche du vivant comme « système » de communautés interagissantes et dynamiques. Le terme a ensuite été repris en France par le ministère de l'Agriculture en 2012 afin de promouvoir une agriculture compétitive et écologique. Ce terme s'oppose à l'actuelle « agriculture industrielle » dont la pérennité est aujourd'hui très largement remise en question et, à qui on attribue en partie les problématiques liées à la dégradation des sols et au déclin de la biodiversité. Au même titre que les GRO, l'agroécologie prône des pratiques intégrées, qui ne se cantonnent pas seulement à une technique, mais qui considèrent l'ensemble du milieu dans lequel elles s'inscrivent tout en promouvant un maximum de services écosystémiques. La pratique agroécologique a la capacité à refertiliser les sols, à lutter contre la désertification, à préserver la biodiversité et à optimiser l'usage de l'eau. Elle vise également à reconsidérer l'organisation du système économique et social lié à l'agriculture afin de favoriser des pratiques plus cohérentes et respectueuses de l'environnement. L'agroécologie, s'appliquant à l'agriculture, a pour grands principes i) de minimiser les flux entrants, ii) de diversifier le système de production afin de favoriser les synergies entre plantes, iii) d'optimiser l'usage des ressources naturelles renouvelables (*e.g.*, énergie solaire) iv) de proscrire l'utilisation de substances phytosanitaires néfastes pour l'environnement et v) de profiter des services écosystémiques rendus par la biodiversité.

L'agroécologie est une discipline particulièrement vaste intégrant de nombreuses dimensions (*e.g.*, scientifiques, sociétales, culturelles). Dans ce travail, seule la dimension scientifique de l'agroécologie adaptée à un contexte de production de biomasse végétale sera abordée. L'agroforesterie est une des nombreuses disciplines scientifiques couramment associées à ce concept d'agroécologie.

#### 1.3.3.2 *Principe de l'agroforesterie*

L'agroforesterie est l'une des approches durables de la gestion des terres où l'agriculture et la foresterie se combinent en un système de production intégré afin d'obtenir un maximum de bénéfices (Kidd and Pimental, 2012). Selon l'ICRAF (Centre International pour la Recherche en Agroforesterie, aujourd'hui Centre mondial de l'agroforesterie), "*l'agroforesterie est une intégration délibérée de composantes ligneuses à des opérations agricoles et pastorales sur une même parcelle, soit dans un ordre spatial ou temporel, de telle sorte que les interactions écologiques et économiques s'y produisent*". L'agroforesterie n'est pas nouvelle, en réalité, il s'agit d'une pratique



séculaire relancée récemment avec un intérêt scientifique renouvelé pour le maintien de la durabilité des agroécosystèmes (Noble and Dirzo, 1997). Ce renouveau de l'agroforesterie est devenu inévitable pour répondre à la demande croissante d'une population de plus en plus nombreuse, pour compenser la déforestation et la dégradation rapide des sols et pour conserver la biodiversité. L'agroforesterie apparaît comme l'une des alternatives pour planter des arbres hors du contexte forestier (Batish, 2008). Selon Nair, (1998) le concept d'agroforesterie, popularisé dans les années 1990, a franchi les étapes de formulation d'hypothèses et d'expérimentations et se concentre maintenant sur la science et la technologie pour optimiser et généraliser les applications. L'agroforesterie est pratiquée dans la majorité des régions du monde, avec toutefois des applications différentes selon les latitudes. La plupart des recherches dans le domaine se sont concentrées sur des pratiques consistant à inclure diverses espèces ligneuses dans des cultures vivrières classiques comme le maïs (*Zea mays*), le riz (*Oryza sativa*), les haricots (*Phaseolus spp.*, *Vigna spp.*) et le manioc (*Manihot esculenta*). Toutefois l'agroforesterie ne se limite pas à cela et le terme peut s'appliquer à d'autres types de culture dès lors qu'elles intègrent des associations végétales. Par exemple, la considération de la végétation spontanée dans des TCR de ligneux à croissance rapide peut représenter une forme d'agroforesterie. Les enjeux actuels de l'agroforesterie consistent à anticiper et à maîtriser i) la concurrence entre les arbres et les cultures pour l'obtention de ressources, ii) les effets allélopathiques des arbres sur les cultures, iii) la croissance rapide de certaines espèces d'arbres occupant l'espace des cultures, iv) l'entrée d'espèces adventices, de ravageurs ou autres pathogènes favorisée par les arbres (Kidd and Pimental, 2012).

### 1.3.3.3 Interactions écologiques en contexte agroforestier

Une interaction écologique fait référence à l'impact d'une espèce sur une autre ou sur un autre individu de la même espèce. Ces interactions peuvent être de nature complémentaires (positives), neutres ou concurrentielles (négatives) (Tableau 9) (Van Noordwijk and Hairiah, 2000). En contexte agroforestier, les arbres (de grande taille et dominants) ont une influence majeure sur les espèces herbacées cultivées et déterminent l'ampleur des interactions (Ong, 1995). De plus, grâce à un système racinaire bien développé et à une meilleure adaptabilité aux stress environnementaux dans la plupart des cas, les arbres sont capables de conditionner ces interactions pour leur propre bénéfice.

Tableau 9. Principaux effets positifs et négatifs engendrés par l'agroforesterie dans un contexte de production de biomasse végétale, d'après Batish, (2008).

Effets positifs pour la culture	Effets négatifs pour la culture
Augmentation de la fertilité des sols	Compétition pour les ressources
Amélioration des micro-climats	Apport d'ombrage
Maintien de la ressource en eau	Allélopathie
Gestion des espèces adventices	Caractère invasif de certaines espèces introduites
Apport d'insectes auxiliaires	Hébergement d'agents pathogènes et de nuisibles
Favorable à la biodiversité	
Séquestre le carbone et réduit les gaz à effet de serre	
Augmente le nombre d'habitat	
Phytoremédiation	

Parmi les nombreux effets bénéfiques liés à cette pratique, les dispositifs associant des espèces végétales sont connus pour abriter une diversité plus riche que les monocultures, qu'elles soient sylvicole ou céréalière (Isbell et al., 2017). Cette biodiversité, en plus d'être favorisée, peut elle-même s'avérer bénéfique aux espèces cultivées (Altieri, 1999; Gurr et al., 2003). En effet, dans des TCR de saule, la végétation herbacée spontanée a été montrée comme abritant une entomofaune auxiliaire pour les ligneux (Stephan et al., 2016) (Figure 20). Cette diversité contribue à la pérennité de ces agrosystèmes en limitant l'impact des ravageurs, leur donnant ainsi la capacité d'assurer des services écosystémiques plus nombreux (Isbell et al., 2017).

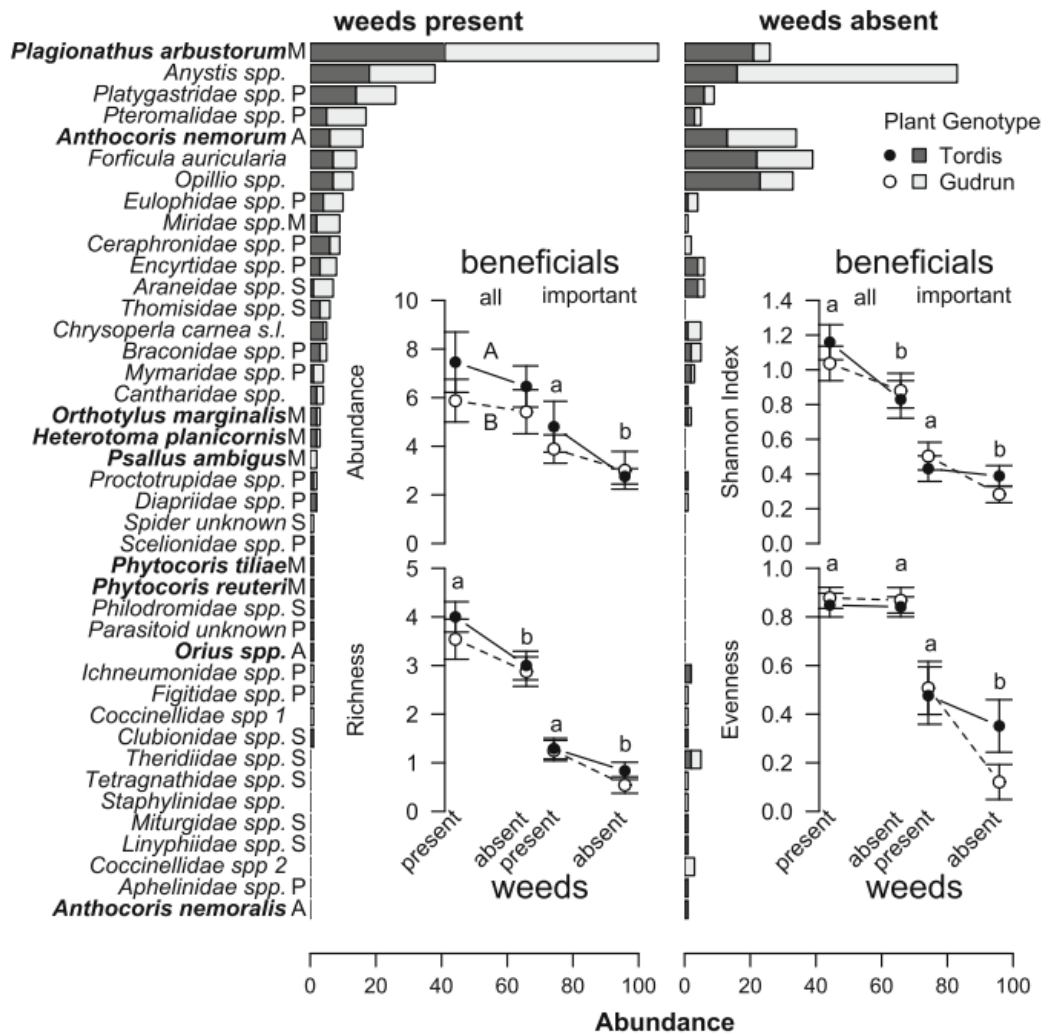


Figure 20. Abundance des arthropodes auxiliaires (Miridae (M), Anthocoridae (A), araignées (S), parasitoïdes (P)) collectés en présence (gauche) et absence (droite) d'adventices dans des plantations de peuplier Tordis et Gudrun. Les noms en gras indiquent que l'insecte a été identifié comme un prédateur important des œufs de *P. vulgaticissima* (Stephan et al., 2016).

Le principal défi de l'agroforesterie consiste à profiter des bienfaits des associations végétales, tout en maîtrisant les aspects potentiellement négatifs de ces associations. Par exemple, l'ombrage généré par les arbres est généralement considéré comme négatif pour les cultures sous-jacentes, diminuant leur productivité. Toutefois, dans des conditions favorables (e.g., bonne fertilité du sol) certaines espèces tolérantes à l'ombrage peuvent se développer de manière satisfaisante. Ce phénomène peut notamment limiter l'apparition d'espèces adventices héliophiles (Jama et al., 1991). Un autre défi consiste à gérer la compétition pour l'eau et les nutriments ainsi que les phénomènes d'allélopathie entre les espèces cultivées. Ainsi, une complémentarité entre les racines des arbres et celles des cultures est essentielle pour minimiser la concurrence et maximiser l'utilisation des ressources (Van Noordwijk and Hairiah, 2000).

#### 1.3.3.4 *L'importance de l'allélopathie dans les dispositifs agroforestiers*

Le terme allélopathie a été proposé en 1937 par Hans Molisch et est défini actuellement comme « tout effet positif ou négatif, direct ou indirect, d'une plante sur une autre (y compris les micro-organismes) par la libération de métabolites dans l'environnement (Rice, 1985). Les métabolites impliqués dans ces processus sont appelés allélochimiques ou métabolites spécialisés ou secondaires. Ils sont principalement représentés par trois grandes familles biochimiques, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. Ces composés sont estimés au nombre de 200 000 mais pourraient être 5 à 10 fois supérieurs (Neilson et al, 2013). Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes et ont un rôle reconnu dans des processus de défense, d'adaptation aux changements environnementaux et de communication inter et intra espèces. Ainsi, il a été montré que lors d'un stress, certaines plantes augmentent la synthèse de ces molécules. Ces métabolites spécialisés peuvent également avoir plusieurs fonctions chez les végétaux, comme dans le cas des polyphénols anti UV, impliqués également dans la germination des graines (Chiapusio et al., 2008). Les plantes réduiraient alors les coûts globaux liés à la biosynthèse et à la maintenance des métabolites secondaires car le même composé serait utilisé à des fins multiples (Neilson et al, 2013). Ces composés sont libérés dans l'environnement directement par lixiviation à partir des parties vivantes de la plante, sous forme d'exsudats racinaires, par volatilisation ou indirectement par décomposition de la plante ou de sa litière. L'importance relative de leur synthèse et de leur émission est conditionnée par l'âge de la plante, les organes et les interactions entre la plante et son environnement (Seigler, 1996). L'allélopathie se distingue donc de la compétition par la libération de molécules chimiques par la plante.

Le rôle de certains de ces allélochimiques notamment ceux ayant un rôle phytotoxique sont maintenant bien connus. Ils permettent notamment de repousser les insectes nuisibles, les ravageurs, les pathogènes microbiens ou au contraire d'attirer les champignons symbiotiques (Reigosa, 2006). Ils peuvent également améliorer l'aptitude reproductive des plantes tout en entravant le développement d'autres plantes (Reigosa, 2006). Bien que tous les groupes taxonomiques puissent présenter un potentiel allélopathique (*e.g.*, bactéries, algues, champignons, bryophytes, ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes), il a principalement été étudié chez les angiospermes et les gymnospermes. Dans les systèmes agroforestiers (SAF), les micro-organismes ont un rôle important en raison de leur potentiel pour modifier et/ou transformer les composés allélochimiques, et notamment les acides phénoliques, dans le sol (Pellissier, 1998). D'autre part, ces composés peuvent influencer positivement ou négativement la croissance des micro-organismes et, de ce fait, interférer indirectement avec la disponibilité des nutriments, particulièrement l'azote et le phosphore, dans le sol (Pellissier, 1993).

Par conséquent, l'allélopathie est maintenant reconnue comme un mécanisme d'interaction majeur dans les SAF et a fait l'objet de nombreuses études (Batish, 2008; Zeng, 2008b; Regnault-Roger et al., 2008; Singh et al., 2001a; 2006). Par exemple, les arbres incorporés dans des agroécosystèmes peuvent influencer sur les cultures associées et notamment entraîner une réduction de leur productivité (Kohli et al., 1997) (Figure 21).

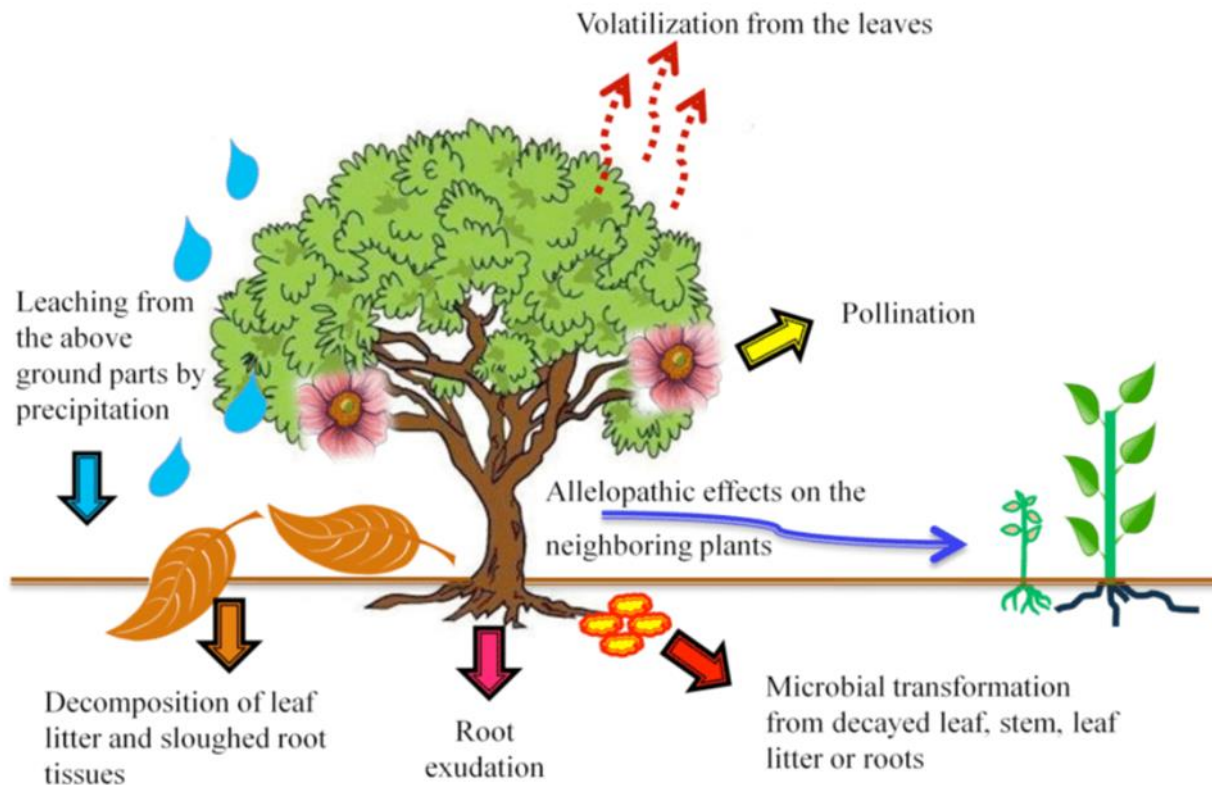


Figure 21. Voies d'entrée possibles des substances allélopathiques dans les dispositifs agroforestiers à partir des plantes allélopathiques, d'après Islam and Kato-Noguchi, (2013) adapté de Chick and Kielbaso, (1998).

Le potentiel allélopathique de certaines espèces d'arbres comme l'eucalyptus, le noyer ou encore le peuplier, en laboratoire et sur le terrain, est aujourd'hui bien documenté. Des études portant sur le peuplier deltoïde ont mis en avant des effets phytotoxiques sur diverses cultures céréalières, au travers de sa litière libérant des composés phénoliques allélochimiques tels que la salicine, composé caractéristique des membres de la famille des Salicacées (Singh et al., 2001b).

La majorité des études dans le domaine de l'allélopathie concerne l'agriculture. Récemment, des variétés de riz ont été montrés comme capable, grâce à leurs micro-organismes associés, de contrôler les espèces adventices (Kong et al., 2008). Ainsi, l'allélopathie pourrait être utilisée de manière à ce que les arbres plantés en SAF contribuent à la lutte contre les mauvaises herbes (Altieri and Doll, 1978), les parasites ou encore les insectes ravageurs (Kohli et al., 1997). De même des actions de facilitations pourraient être envisagées.

La métabolomique avec les « metabolic profiling » représente actuellement un outil indispensable pour mieux connaître les groupes chimiques de composés secondaires actifs ou répondant à des changements environnementaux, sans avoir à les identifier dans un premier temps (Weston et al, 2015).

### 1.3.3.1 L'agroforesterie pour contrôler les pollutions

Bien que l'agroforesterie et le phytomanagement soient le plus souvent cités indépendamment, leur combinaison a préalablement été proposée. Quelques travaux portant sur des sites contaminés se sont intéressés à des associations végétales entre ligneux à croissance rapide et d'autres espèces végétales sous-jacentes. D'après Rockwood et al., (2004), l'utilisation de SAF en contexte de phytomanagement pourrait accroître la faisabilité économique de la technique, ce qui représente un aspect essentiel pour son acceptation. Les systèmes basés sur des TCR de ligneux à croissance rapide ont été considérés comme étant les plus appropriés à ce type d'application, notamment en raison d'un partage de ressources possible (Rockwood et al., 2004). Parmi les différentes typologies de SAF, cinq ont été identifiées par Garrett and Buck, (1997) comme pouvant être déclinées en contexte de phytomanagement (Tableau 10).

Tableau 10. Exemple de systèmes agroforestiers basés sur des TCR de ligneux et d'autres cultures, pouvant se décliner en contexte de phytomanagement, d'après Garrett and Buck, (1997)

SAF	TCR	Culture	Type de site, contaminants	Description
Ripsisylve	Peuplier	Grande culture	Sols agricoles, engrais / pesticides	Rangées d'arbres le long des cours d'eau : stabilisation des berges et épuration des eaux
Haie brise-vent	Peuplier	Céréales	Sédiments contaminés, ETM	Rangées d'arbres espacées : production de biomasse
Haie brise-vent	Eucalyptus	Agrumes	Sols agricoles, Engrais / pesticides	Rangées d'arbres : production de biomasse
Culture combinée	Robinier	Graminée/herbacées	Sédiments contaminés, ETM	Arbres intercalés : production de biomasse
Culture combinée	Eucalyptus	Flore indigène	Sites miniers, ETM	Arbres plantés sur des sites miniers/métallurgiques : restauration de sites
Sylvopastoralisme	Pin	Animaux	Sols agricoles, engrais	Groupement d'arbres espacés : production de biomasse et élevage
Sylviculture	Peuplier	Fougères	Sites industriels, Arsenic	Arbres et fougères en co-culture, production de biomasse et phytoextraction

L'un des systèmes proposés intègre une plante de sous-bois hyperaccumulatrice, capable d'absorber les contaminants localisés dans le profil supérieur du sol et une espèce ligneuse en TCR, produisant de la biomasse valorisable en raison d'une accumulation limitée du contaminant, ce qui pourrait accroître l'efficacité du système. Ce type d'association a été mise en place dans le sud-est des États-Unis dans un contexte de pollution à l'As (Rockwood et al., 2004).

Par ailleurs, dans la plupart des cas, ces études s'intéressent à des contaminants d'origine agricole (*e.g.*, pesticides, engrais) revues récemment par [Pavlidis and Tsihrintzis, \(2018\)](#). Certaines études ont indiqué qu'il pourrait être rentable d'associer des peupliers hybrides aux cultures nécessitant de grandes quantités d'engrais azotés (*e.g.*, maïs), afin de limiter l'infiltration des engrais vers les eaux souterraines ([Rivest et al., 2009](#)). En effet, ses résultats montrent que des SAF sont capable de réduire le lessivage des nutriments dans les eaux souterraines jusqu'à 97,7% et 90% pour l'azote et le phosphore respectivement, et jusqu'à 100% pour les deux polluants dans le cas de ruissellements de surface. En outre, un certain nombre d'études ont présenté la possibilité de limiter les quantités de pesticides présents dans les eaux souterraines, en atténuant jusqu'à 100% du ruissellement de certains herbicides et fongicides.

Ces initiatives restent toutefois peu répandues, et, bien que les processus fondamentaux impliqués dans le phytomanagement et l'agroforesterie commencent à être mieux connus, il reste nécessaire d'enrichir les connaissances de ces SAF en présence de contaminants, et notamment en présence d'ETM pour lesquels très peu de retours d'expérience sont disponibles.

### *1.3.3.2 Les essais d'associations végétales sur site contaminés par des ETM en France*

La plupart des projets de phytomanagement se concentraient initialement sur une seule catégorie de végétaux selon la stratégie et la valorisation envisagées (*e.g.*, espèces ligneuses pour la bioénergie, plante herbacées pérennes pour la chimie verte). Depuis 2011, dans le cadre des projets PHYTOSED 2 et DEMOPHYTO, des essais d'associations végétales, incluant le saule et des espèces herbacées ont été effectués en France.

Dans le cadre des projets PHYTOSED 2 (2011-2014) et DEMOPHYTO (2014-2018), une parcelle de 1 ha associant la canche cespiteuse et 2 cultivars de saule (TTCR) a été mise en place en 2011 sur un site de dépôt de sédiments enrichi en Cd, Zn et Pb. Différentes modalités, incluant la présence ou non de la canche et d'amendements, sur le développement du saule et la colonisation des adventices, ont été testées. La canche a montré des taux de recouvrement de près de 95%, réduisant ainsi de 27% la reprise des plantes invasives initialement présentes. A cela s'ajoutent de faibles concentrations mesurées dans la biomasse aérienne, ce qui en fait un candidat intéressant pour ce type d'application. Toutefois, en raison d'un phénomène de compétition avec la canche et d'une attaque d'insectes herbivores, un taux de mortalité de près de 30% a été observé chez le saule. Ces résultats renforcent l'importance de respecter les équilibres écologiques de manière à assurer l'équilibre des plantations.

## 1.4 Description de l'espèce modèle : *Urtica dioïca* L.

acides (6) annuelles (6) clone (6) **composites** (11) conditions (6)  
**culture** (11) **d'ortie** (29) developpement (6) differentes (6)  
 differents (8) **dioica** (10) dioique (7) effet (7) **especes** (20)  
**etudes** (11) europe (5) extraits (8) faible (8) **feuilles** (20)  
**fibres** (38) fleurs (7) genre (9) graines (9) l'espece (6)  
**l'ortie** (66) lin (6) marche (6) mg (7) niveau (7) **orties** (11)  
 parties (10) **plantes** (37) poils (7) potentiel (8) pouvoir (7)  
 production (6) **proprietes** (11) proteines (5) racines (7) reproduction (8)  
 rhizomes (6) sol (7) sp (8) teneur (6) **tige** (14) **urtica** (13) urticants (7)  
**utilisation** (11) valorisation (9) vegetales (8)



### 1.4.1 Généralités

La grande ortie (*Urtica dioïca* L. 1753) est une plante herbacée vivace décrite pour la première fois en 1753 par le naturaliste suédois Carl Von Linné. Elle appartient à la famille des *Urticaceae* (embranchement des Angiospermes). Il existe 46 espèces appartenant du genre *Urtica* (Kregiel et al., 2018). L'étymologie du mot latin « *Urticae* » signifie « brûler », ce qui fait référence au caractère urticant de ses poils dont la piqûre peut s'apparenter à une brûlure entraînant une éruption cutanée temporaire. L'ensemble des plantes appartenant à ce genre sont des plantes herbacées, vivaces et munies de poils, pour certains urticants, au niveau de leurs parties aériennes. Les espèces les plus répandues sont la grande ortie ou ortie dioïque (*Urtica dioïca* L.) et la petite ortie (*Urtica. urens* L.), originaires d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Nord. Les deux espèces les plus communes présentent des caractéristiques morphologiques similaires, cependant *U. dioïca* peut atteindre 2 mètres de hauteur alors que *U. urens* n'excède pas les 60 cm.

### 1.4.2 Phylogénie de l'ortie

Dans toute son aire géographique, le genre *Urtica* présente des espèces morphologiquement différentes et pour certaines impossibles à distinguer les unes des autres en raison de caractères morphologiques assez disparates. La monoécie (*i.e.*, caractère monoïque) est le système sexuel prédominant dans le genre *Urtica*, rapporté pour 11 clades différents (Grosse-Veldmann and Weigend, 2018). Au travers des travaux menés par Grosse-Veldmann et al., (2016), ce n'est que récemment que le genre *Urtica* et plus particulièrement 61 des 63 espèces reconnues ont fait l'objet d'une étude phylogénétique. En ce qui concerne l'espèce *Urtica dioïca*, elle intègre un complexe de sous-espèces caractérisé par des morphotypes relativement proches (avec le type d'indumentum comme critère déterminant) (Grosse-Veldmann and Weigend, 2015), des habitats spécifiques (Cronk et al., 2016) et des niveaux de ploïdie différents (*i.e.*, diploïdes et tétraploïdes) (Rejlová et al., 2019), complexifiant ainsi les études phylogénétiques portant sur ces espèces. Récemment, Rejlová et al., (2019) ont montré que la taille du génome serait également un critère déterminant pour distinguer différentes sous-espèces de *U. dioïca* et que les sous-espèces tétraploïdes sont d'autant plus majoritaires que le milieu est anthropisé. Une trentaine de clones, sélectionnés dans un contexte de production de fibre végétale ont pu être distingués, mais le plus utilisé actuellement dans les champs expérimentaux est le clone 13, en raison de sa teneur élevée en fibre (Bacci et al., 2011).

### 1.4.3 Aire de répartition

Le genre *Urtica*, probablement originaire d'Europe et d'Asie, est aujourd'hui présent sur tous les continents excepté l'Antarctique et dans la plupart des pays non tropicaux (Grosse-Veldmann and Weigend, 2015). L'ortie est présente dans la majorité de l'Europe (Figure 22). Les graines d'orties ont été montrées comme viables après de longues périodes de flottaison dans l'eau de mer, favorable à une dispersion sur de grandes distances selon l'hypothèse de dispersion transocéanique de Darwin, pouvant ainsi expliquer sa vaste répartition géographique (Wu et al., 2018).

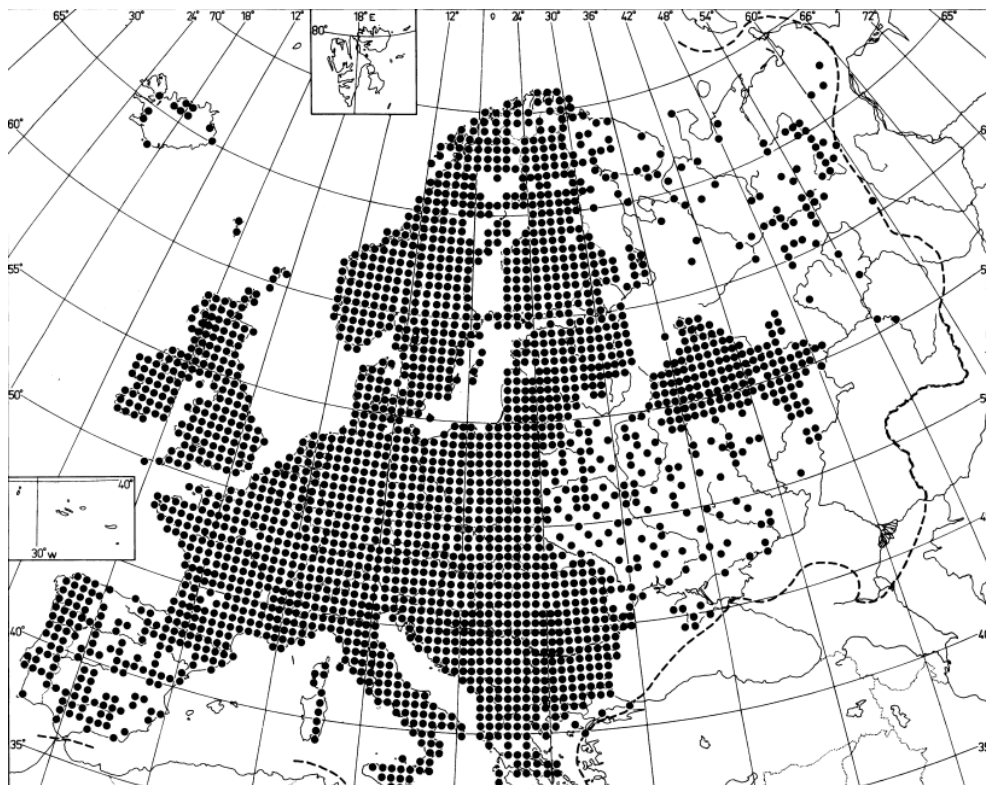


Figure 22. Distribution de l'espèce *Urtica dioica* en Europe, d'après Jalas and Suominen (1988), repris dans Taylor (2009).

### 1.4.4 Habitat

Naturellement, l'ortie se retrouve dans des habitats ouverts (e.g., plaines inondables, pâturages, prairies, bords de chemin) et représente une espèce typique des forêts modérément ombragées. Elle est présente sur presque tous les types de sols, bien qu'elle soit absente des sols gorgés d'eau. En effet, les inondations réduisent considérablement la survie des jeunes plantes. Šrutek, (1997) a constaté que la présence d'une nappe phréatique proche de la surface du sol limitait la production de biomasse chez l'ortie et diminuait la longueur de ses tiges. L'ortie est également qualifiée d'espèce de demi-ombre de par sa capacité à se développer dans des conditions d'ombrage modérées, ces conditions ne lui sont toutefois pas optimales. Le sol doit surtout avoir une

composition modérée en MO en décomposition mais être riche en azote (plante nitrophile) et en éléments traces tels que le Fe (Figure 23). Sur des sols particulièrement enrichis en azote et en fer, elle peut être utilisée pour leur fixation (Radman et al., 2018).

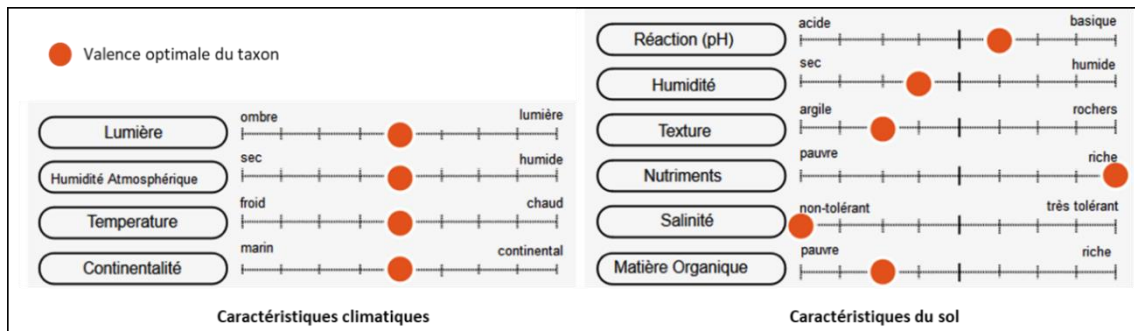


Figure 23. Optimums écologiques de l'ortie en terme de conditions climatiques et des caractéristiques du sol, d'après le site internet tela-botanica.org.

La grande ortie est une plante « rudérale » très envahissante, ce qui signifie qu'elle affectionne particulièrement les milieux anthropisés et le voisinage de l'Homme qui lui fournissent des conditions favorables. De nombreuses études ont pu mettre en avant d'importants peuplements monospécifiques sur des sites marginaux (e.g., terrils, chantiers, fossés) riches en nutriments (Šrůtek and Teckelmann, 1998). Une étude récente portant sur un transect latitudinal à travers l'Europe (Cronk et al., 2016) a permis de révéler une présence fréquente de l'ortie sous des saulaies proches de rives. Lorsque les conditions du milieu lui sont favorables, ou lorsqu'elle présente un avantage compétitif sur les autres essences pionnières, l'ortie peut s'avérer être très envahissante, elle pourra en effet facilement et rapidement coloniser (par multiplication des rhizomes et retombée des graines) d'importantes surfaces.

## 1.4.5 Morphologie

### 1.4.5.1 Le système racinaire

*Urtica dioica* est une plante vivace rhizomateuse, formant un système souterrain étendu et traçant, composé de rhizomes (i.e., tige aérienne principale s'enracinant et produisant de nouvelles pousses à chaque entre-nœud) et de stolons (i.e., tige aérienne secondaire rampante s'enracinant et produisant de nouvelles pousses), lui permettant de se reproduire végétativement et de former des colonies. Les rhizomes sont des structures cylindriques jaunâtres, d'épaisseur variable, pourvus d'un chevelu de fines racines abondamment ramifiées (Figure 24.B). Le système racinaire de l'ortie est présent dans l'horizon organique à faible profondeur (10-30 premier cm).

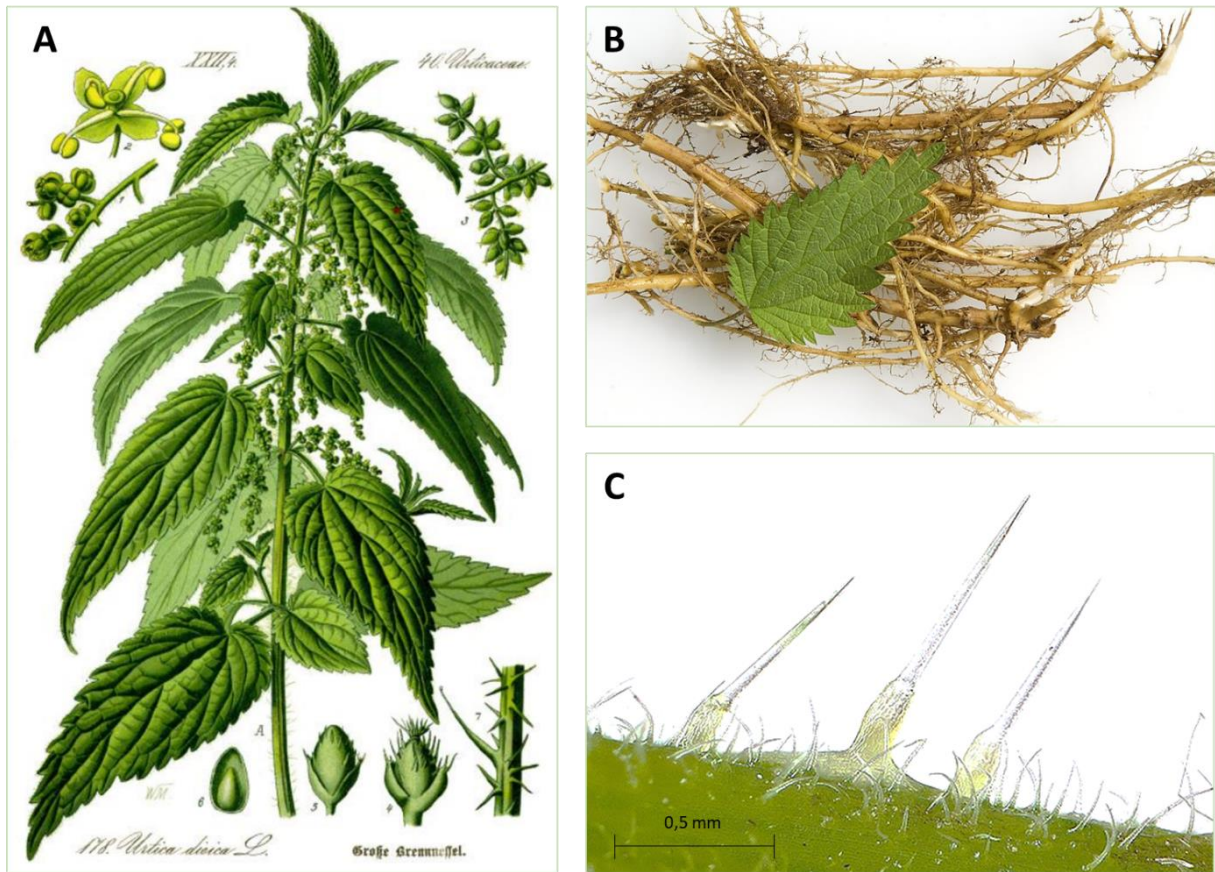


Figure 24. Planche de la grande ortie (*Urtica dioica* L.) présentant la morphologie générale, les fleurs mâles et femelles ainsi que les graines et les fruits (A), rhizome d'ortie comprenant des ramifications composées de racines fines (B) et les trichomes de l'ortie localisé sur sa tige (C).

#### 1.4.5.2 L'appareil végétatif

La tige est généralement dressée, robuste et non ramifiée, à section quadrangulaire pouvant atteindre plus de 2 mètres de hauteur. Elle porte des feuilles simples, opposées, vertes, avec un bord irrégulièrement dentelé et ovoïdes pour les feuilles inférieures tandis que les supérieures sont plutôt lancéolées. A la base des feuilles, sont présents des stipules, donnant lieu à des pousses latérales à la fin de l'été et en automne (Figure 24.A).

La tige et les feuilles sont plus ou moins densément couvertes de poils urticants, ces derniers étant absents de l'inflorescence. Ces poils urticants, appelés trichomes sont des excroissances de l'épiderme, caractéristiques des Urticaceae. Ces structures coniques enrichies en silice sont présentes sur l'épiderme (tige et feuille) de l'ortie et dirigés vers l'extrémité de la plante. Les trichomes sont constitués d'un bulbe incrusté de silice et surmontés par une pointe recourbée (Figure 24.C). La vacuole des poils urticants contient de nombreux composés tels que l'histamine, l'acide formique, l'acétylcholine, la sérotonine, responsables de la réaction d'irritation qui se produit lorsque le poil urticant entre en contact avec l'épiderme d'un mammifère.

### 1.4.5.3 L'appareil reproducteur

La plupart des individus de l'espèce *Urtica dioïca* étant dioïques, les fleurs mâles et femelles sont portées par des pieds différents. Les fleurs sont disposées en grappes ramifiées, pendantes depuis l'insertion des feuilles et fixées à un pédoncule (Figure 24.A). Leur floraison a généralement lieu de juin à août (Grime et al., 1988). Les fleurs mâles sont caractérisées par un périanthe composé de 4 à 5 sépales, un androcée constitué de 4 à 5 étamines à longs filets et des anthères arrondies. Les fleurs femelles sont quant à elles caractérisées par un périanthe à 4 sépales inégaux dont les 2 extérieurs sont parfois absents ou de petite taille. Le style est difficilement observable, surmonté d'un stigmate en pinceau.

## 1.4.6 Reproduction

### 1.4.6.1 Reproduction sexuée

Lorsque les anthères sont mûres, les étamines se redressent de façon explosive, dispersant le pollen. La pollinisation est principalement effectuée par le vent, mais les insectes peuvent aussi y participer. Le fruit formé est un akène inclus dans un périanthe persistant. Chez l'ortie, la reproduction sexuée est peu impliquée dans sa propagation, toutefois, elle a été montrée comme essentielle pour la colonisation de nouveaux sites (Rosnitschek-Schimmel, 1983). Dans les zones ouvertes, les pieds d'*U. dioïca* peuvent porter jusqu'à 20 000 graines tandis que ce nombre est réduit à 5000 dans les zones ombragées (Bassett et al., 1977). Les graines sont généralement semées à partir d'août (Grime et al., 1988). De manière générale, les graines d'ortie peuvent rester viables longtemps et survivre à une ingestion par des animaux (Taylor, 2009) ou encore à de longue période de flottaison dans des eaux salées (Wu et al., 2018). La stratégie de dissémination des graines d'ortie ne repose pas sur un seul mécanisme prédominant, mais sur une multitude (*e.g.*, par le vent, l'eau, les animaux, l'homme), plus ou moins efficaces selon l'environnement dans lequel la plante se trouve (Grime et al., 1988). Dans les climats tempérés, la germination commence généralement au début du mois de janvier et le pic est atteint en mars. Cette dernière est inhibée par l'obscurité et stimulée par la lumière et les fluctuations de température. La reproduction sexuée s'avère peu efficace dans les sites où le recouvrement par la végétation est important (Grime et al., 1988).

### 1.4.6.2 Reproduction asexuée

La principale stratégie d'expansion de l'ortie est la reproduction végétative, lui permettant de se multiplier à partir de ses parties souterraines. À la fin de l'été lorsque la déhiscence des feuilles se produit, les tiges vont se coucher et devenir souterraines, formant des stolons ou des rhizomes, à partir desquels chaque nœud (*i.e.*, lieu d'insertion des feuilles sur la tige) va pouvoir donner lieu à

un nouveau clone. Cette stratégie peut être mise en place dès la première période de croissance des plantes établies à partir de graines (Šrůtek and Teckelmann, 1998). La plupart des pousses, issues des rhizomes, se développent à l'automne. Bien que certaines d'entre elles se décomposent, elles peuvent hiverner et reprendre leur croissance au printemps suivant. Environ un tiers de la biomasse maximale des pousses est maintenu pendant l'hiver (Šrůtek and Teckelmann, 1998). Cette stratégie de reproduction peut expliquer le caractère envahissant de l'ortie, formant des peuplement monospécifiques voir monoclonaux denses (Figure 25), dans des milieux où les autres plantes présentent un faible pouvoir compétitif ou lorsque les conditions du sol lui sont favorables.



Figure 25. Photographie d'un peuplement monospécifique d'ortie dioïque, localisé en bordure de la peupleraie installée sur la lagune de sédiments chlore-alkali localisée à Tavaux (Jura). Photo : L.Yung

#### 1.4.7 Composition phytochimique de l'ortie

De nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique des différentes parties de l'ortie en vue d'une utilisation industrielle dans le domaine des cosmétiques, de la médecine ou encore de l'alimentation animale, et faisant appel à des approches de métabolomique. Ces derniers ont récemment été revus dans Kregiel et al., (2018).

##### 1.4.7.1 Métabolome des parties aériennes

Des études ont révélé que les feuilles d'orties contiennent un nombre important de composés biologiquement actifs tels que des terpénoïdes (Gül et al., 2012), des caroténoïdes (e.g.,  $\beta$ -carotène, néoxanthine, violaxanthine, lutéine, lycopène) (Guil-Guerrero et al., 2003; Kudritsata et al., 1986; Kukric et al., 2012), des acides gras (palmitiques, cis-9,12-linoléique et  $\alpha$ -linoléique) (Bağci, 2002;

Guil-Guerrero et al., 2003), des polyphénols (tannins) (Carvalho et al., 2017; Grevsen et al., 2008; Orčić et al., 2014), des acides aminés essentiels, les chlorophylles, de nombreuses vitamines à des concentrations élevées (Rutto et al., 2013), des glucides, stérols, polysaccharides ou encore des isolectines (Sajfritová et al., 2005) (Tableau 11).

Tableau 11. Composition des feuilles d'ortie (par rapport à une masse sèche) d'après Adhikari et al., (2016).

<b>Paramètre</b>	<b>Contenu</b>
<i>Humidité (%)</i>	7.0 ± 0.8
<i>Protéines (%)</i>	33.8 ± 0.4
<i>Fibres (%)</i>	9.1 ± 0.1
<i>Matière grasse (%)</i>	3.6 ± 0.1
<i>Glucides (%)</i>	37.4 ± 0.7
<i>Calcium (mg/100 g)</i>	168.8 ± 1.5
<i>Fer (mg/100 g)</i>	227.9 ± 0.2
<i>Tannins (%)</i>	0.9 ± 0.01
<i>Polyphenols (mg GAE/g)</i>	128.8 ± 0.2
<i>Carotenoids (µg/g, db)</i>	3496.7 ± 0.6
<i>Calories (kcal/100 g)</i>	307.2 ± 0.1

Les feuilles sont également connues pour contenir des quantités particulièrement importantes de minéraux tels que Se, Zn, Fe et Mg (Kara, 2009; Tack and Verloo, 1996). Parmi les métaux majoritaires, le Zn a notamment été trouvé à des concentrations de 27 mg/kg, suivi du Cu et du Mn à 17 mg/kg de masse sèche. Elles contiennent également du Bo, du Na, de l'iode, du Cr, du Cu, du Co et du soufre en plus faible quantité (Rafajlovska et al., 2013).

Les composés polyphénoliques de l'ortie ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur pouvoir anti-oxydant (Orčić et al., 2014). De nombreux auteurs s'accordent pour dire que le contenu en polyphénols de l'ortie est bien supérieur à celui de la plupart des autres plantes sauvages (Augšpole et al., 2017; Kregiel et al., 2018). Un gramme de feuille d'ortie contiendrait une teneur en phénol totaux de 129 mg GAE (équivalent acide gallique) (Kregiel et al., 2018). Ces valeurs sont comparables à celles mesurées dans la myrtille, considérée comme une plante riche en composés polyphénoliques (environ 115 mg /g phenols totaux + 220 mg/g de tanins). Orčić et al., (2014) ont quantifié les différents composés polyphénoliques présents dans des extraits méthanoliques de fleurs, de racines, de tiges et de feuilles d'orties provenant de Serbie, mettant en évidence plus de 20 composés. Parmi eux, les composés les plus abondants retrouvés dans les feuilles étaient l'acide 5-O-caféoylquinique (acide chlorogénique), suivi de la quercétine (Tableau 12).

Tableau 12. Composés phénoliques (mg/g MS) contenus dans des extraits d'ortie, repris de Kregiel et al., (2018).

Group of Compounds	Compound	Stara Planina			
		Flowers	Leaves	Stems	Roots
Phenolic acids	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.036	0.051	0.014	0.048
	Gentisic acid	not det	det	not det	not det
	Protocatechuic acid	0.022	0.072	0.0069	0.0106
	Vanillic acid	not det	not det	not det	0.09
	<b>Quinic acid</b>	<b>0.86</b>	<b>0.66</b>	<b>0.088</b>	<b>0.36</b>
	Ferulic acid	0.05	0.052	0.024	0.024
	<b><i>p</i>-Coumaric acid</b>	<b>0.022</b>	<b>0.026</b>	<b>0.18</b>	<b>0.23</b>
	<b>Caffeic acid</b>	<b>0.64</b>	<b>0.93</b>	<b>0.031</b>	<b>0.0039</b>
	<b>5-O-Caffeoylquinic acid</b>	<b>35</b>	<b>28</b>	<b>2.3</b>	<b>0.025</b>
Coumarins	Esculetin	0.0095	0.0074	det	det
	Scopoletin	0.04	0.073	0.048	0.18
Lignans	Secoisolariciresinol	not det	not det	not det	0.009
Flavones	Chrysoeriol	0.0027	det	det	det
Flavonols	Kaempferol	0.019	not det	not det	not det
	<b>Kaempferol 3-O-glucoside</b>	<b>0.6</b>	<b>0.07</b>	<b>0.017</b>	<b>not det</b>
	Quercitrin	not det	not det	not det	not det
	<b>Quercetin 3-O-glucoside</b>	<b>2.82</b>	<b>1.08</b>	<b>0.48</b>	<b>not det</b>
	<b>Quercetin 3-O-rutinoside</b>	<b>9.5</b>	<b>4.6</b>	<b>2.25</b>	<b>0.0054</b>
	Isorhamnetin	0.047	not det	not det	not det
Biflavonoids	Amentoflavone	det	det	det	det
Flavan-3-ols	Catechin	1.0	not det	not det	not det

Les trichomes des orties contiennent un liquide âcre dont les composants actifs sont l'acétylcholine, l'histamine et l'acide formique, la silice, la sérotonine et la 5-hydroxy tryptamine. Les résultats de nombreuses expériences suggèrent que chaque espèce d'ortie, ainsi que chaque partie de la plante (racine, tige ou feuilles) ont des profils différents en composés bioactifs (Oliver et al., 1991).

#### 1.4.7.2 Métabolome des racines

Les racines d'ortie contiennent de l'amidon, de l'albumine, des sucres ainsi que des neurotransmetteurs et des récepteurs, comme l'histamine, l'acétylcholine, la choline ou la sérotonine. Les fractions lipophiles contiennent généralement des phytostérols, des triterpénoïdes pentacycliques, des céramides et des acides gras hydroxylés (Kregiel et al., 2018). La teneur en composés phénoliques des racines est significativement plus faible que celle des feuilles (Tableau 12). Par conséquent, les racines des orties sont considérées comme la partie la plus pauvre en termes de composés bioactifs. Kraus and Spiteller, (1990) ont toutefois identifié 18 composés phénoliques (e.g., alcool homovanillylique, vanilline, acide vanillique, phénylpropanes) et 19 ligands (e.g., isolaric, iresinol, sécoisolariciresinol, néo-olivil) dans des extraits racinaires d'ortie. Les racines d'ortie présentent également une protéine de type lectine : l'*Urtica dioica* agglutinine (UDA) ayant



fait l'objet de nombreux travaux en raison de ses propriétés intéressantes du point de vue médical et de sa potentielle implication dans la résistance à certains pathogènes (Galelli and Truffa-Bachi, 1993; Van Parijs et al., 1992; Vierheilig et al., 1996).

## 1.4.8 Ecologie de l'ortie

### 1.4.8.1 Phytosociologie de l'ortie

L'ortie dioïque est susceptible de se retrouver dans de nombreux biotopes, néanmoins, il s'agit d'une plante indicatrice ou caractéristique de près d'une vingtaine d'habitats (Tableau 13). Ainsi, elle est communément retrouvée dans des milieux fermés tels que des saulaies, érable, aulnaies - frênaies, dans lesquels elle est accompagnée d'autres espèces ligneuses (*e.g.*, *Acer sp.*, *Salix sp.*, *Populus sp.*, *Alnus sp.*, *Fraxinus sp.*, *Ulmus sp.*) et herbacées (*e.g.*, *Glechoma hederacea*, *Geum urbanum*, *Rubus caesius*) caractéristiques de ces milieux. Elle est également une plante typique des lisières forestières plus ou moins exposées à la lumière, milieu dans lesquels elle est couramment accompagnée d'autres espèces herbacées telles que *Galium aparine*, *Calystegia sepium*, *Cirsium arvense*. Dans des milieux ouverts, tels que des mégaphorbiaies, elle est généralement accompagnée d'autres plantes vivaces (*e.g.*, *Angelica sylvestris*) et de certaines Poacées (*e.g.*, *Poa trivialis*) (Tableau 13). Finalement, les zones rudérales sont généralement caractérisées par des communautés végétales constituées d'espèces « adventices » telles que l'ortie, *Rumex sp.*, *Sambucus ebulus*, etc. Les peuplements denses d'ortie peuvent être classés en tant que « Galio-Urticetea » (Šrůtek and Teckelmann, 1998) et intègrent une faible richesse spécifique reflétant l'importante compétitivité de l'ortie et des espèces de Gaillet (*Gallium sp.*) accompagnant cette dernière.

Tableau 13 : Principaux habitats incluant l'ortie en tant qu'espèce indicatrice/caractéristique ainsi que les autres espèces constitutives de ces habitats, d'après les cahiers d'habitat NATURA2000, le Prodrome des Végétations de France (PVF) de l'INPN et la base de données European Nature Information System (EUNIS).

Typologie	Code habitat	Nom de l'habitat	Relation avec l'habitat	Autres espèces
<b>Cahiers d'habitats</b>	6430-1	Mégaphorbiaies mésotrophes collinéennes	Espèce indicatrice	<i>Thersamolycaena dispar</i> ; <i>Angelica sylvestris</i> ; <i>Caltha palustris</i> ; <i>Cruciata laevipes</i> ; <i>Deschampsia cespitosa</i> ; <i>Epilobium tetragonum</i> ; <i>Eupatorium cannabinum</i> ; <i>Filipendula ulmaria</i> ; <i>Lysimachia vulgaris</i> ; <i>Lythrum salicaria</i> ; <i>Mentha suaveolens</i> ; <i>Poa trivialis</i> ; <i>Polygonum bistorta</i> ; <i>Scirpus sylvaticus</i> ; <i>Scrophularia auriculata</i> ; <i>Scrophularia umbrosa</i> ; <i>Stachys palustris</i> ; <i>Stachys sylvatica</i> ; <i>Valeriana repens</i> ; <i>Vicia cracca</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	6430-4	Mégaphorbiaies eutrophes des eaux douces	Espèce indicatrice	<i>Symphytum officinale</i> ; <i>Stachys sylvatica</i> ; <i>Stachys palustris</i> ; <i>Solidago gigantea</i> ; <i>Scrophularia umbrosa</i> ; <i>Rubus caesius</i> ; <i>Poa palustris</i> ; <i>Phalaris arundinacea</i> ; <i>Myosoton aquaticum</i> ; <i>Mentha longifolia</i> ; <i>Lythrum salicaria</i> ; <i>Lamium maculatum</i> ; <i>Lamium album</i> ; <i>Iris pseudacorus</i> ; <i>Galium palustre</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Eupatorium cannabinum</i> ; <i>Epilobium parviflorum</i> ; <i>Epilobium hirsutum</i> ; <i>Cruciata laevipes</i> ; <i>Calystegia sepium</i> ; <i>Barbarea vulgaris</i> ; <i>Artemisia vulgaris</i> ; <i>Alliaria petiolata</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	6430-6	Végétations des lisières forestières nitrophiles, hydroclines, héliophiles à semi-héliophiles	Espèce indicatrice	<i>Aegopodium podagraria</i> ; <i>Anthriscus nitida</i> ; <i>Anthriscus sylvestris</i> ; <i>Campanula latifolia</i> ; <i>Chaerophyllum aureum</i> ; <i>Chaerophyllum bulbosum</i> ; <i>Chelidonium majus</i> ; <i>Cirsium arvense</i> ; <i>Cruciata laevipes</i> ; <i>Dactylis glomerata</i> ; <i>Galeopsis tetrahit</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Geranium phaeum</i> ; <i>Geranium ratense</i> ; <i>Glechoma hederacea</i> ; <i>Heracleum sphondylium</i> ; <i>Lamium album</i> ; <i>Lamium maculatum</i> ; <i>Ranunculus ficaria</i> ; <i>Roegneria canina</i> ; <i>Silene dioica</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	6430-7	Végétations des lisières forestières nitrophiles, hydroclines, semi-sciaphiles à sciaphiles	Espèce indicatrice	<i>Alliaria petiolata</i> ; <i>Anthriscus sylvestris</i> ; <i>Brachypodium sylvaticum</i> ; <i>Bryonia dioica</i> ; <i>Campanula trachelium</i> ; <i>Cardamine impatiens</i> ; <i>Chaerophyllum temulum</i> ; <i>Cirsium arvense</i> ; <i>Cynoglossum germanicum</i> ; <i>Dactylis glomerata</i> ; <i>Dipsacus pilosus</i> ; <i>Epilobium montanum</i> ; <i>Euphorbia stricta</i> ; <i>Galeopsis tetrahit</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Galium mollugo</i> subsp. <i>erectum</i> ; <i>Geranium lucidum</i> ; <i>Geranium robertianum</i> ; <i>Geum urbanum</i> ; <i>Glechoma hederacea</i> ; <i>Lamium galeobdolon</i> ; <i>Lapsana communis</i> ; <i>Moehringia trinervia</i> ; <i>Mycelis muralis</i> ; <i>Poa nemoralis</i> ; <i>Scrophularia nodosa</i> ; <i>Stellaria nemorum</i> ; <i>Torilis japonica</i> ; <i>Veronica chamaedrys</i> ; <i>Viola reichenbachiana</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	9180-4	Érabraies à Scolopendre et Lunaire des pentes froides à éboulis grossiers	Espèce indicatrice	<i>Acer pseudoplatanus</i> ; <i>Aconitum vulparia</i> ; <i>Actaea spicata</i> ; <i>Corylus avellana</i> ; <i>Daphne mezereum</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Galium odoratum</i> ; <i>Geranium robertianum</i> ; <i>Impatiens noli-tangere</i> ; <i>Lamium galeobdolon</i> ; <i>Lunaria rediviva</i> ; <i>Polystichum aculeatum</i> ; <i>Sambucus racemosa</i> ; <i>Ulmus glabra</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	91E0-1	Saulaies arborescentes à Saule blanc	Espèce indicatrice	<i>Aegopodium podagraria</i> ; <i>Anthriscus nitida</i> ; <i>Anthriscus sylvestris</i> ; <i>Campanula latifolia</i> ; <i>Chaerophyllum aureum</i> ; <i>Chaerophyllum bulbosum</i> ; <i>Chelidonium majus</i> ; <i>Cirsium arvense</i> ; <i>Cruciata laevipes</i> ; <i>Dactylis glomerata</i> ; <i>Galeopsis tetrahit</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Geranium phaeum</i> ; <i>Geranium pratense</i> ; <i>Glechoma hederacea</i> ; <i>Heracleum sphondylium</i> ; <i>Lamium album</i> ; <i>Lamium maculatum</i> ; <i>Ranunculus ficaria</i> ; <i>Roegneria canina</i> ; <i>Silene dioica</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	91E0-2	Saulaies arborescentes à Saule cassant	Espèce indicatrice	<i>Angelica sylvestris</i> ; <i>Carex riparia</i> Curtis ; <i>Deschampsia cespitosa</i> ; <i>Filipendula ulmaria</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Glechoma hederacea</i> ; <i>Iris pseudacorus</i> ; <i>Phalaris arundinacea</i> ; <i>Phragmites australis</i> ; <i>Populus nigra</i> ; <i>Rubus caesius</i> ; <i>Salix alba</i> ; <i>Salix purpurea</i> ; <i>Sambucus nigra</i> ; <i>Solanum dulcamara</i> ; <i>Symphytum officinale</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	91E0-7	Aulnaies-frênaies caussenardes et des Pyrénées orientales	Espèce indicatrice	<i>Aconitum vulparia</i> ; <i>Agropyron caninum</i> ; <i>Alnus glutinosa</i> ; <i>Anthriscus sylvestris</i> ; <i>Cornus sanguinea</i> ; <i>Crataegus monogyna</i> ; <i>Eupatorium cannabinum</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Galium mollugo</i> ; <i>Geranium nodosum</i> ; <i>Geum urbanum</i> ; <i>Glechoma hederacea</i> ; <i>Knautia dipsacifolia</i> ; <i>Luzula nivea</i> ; <i>Mentha longifolia</i> ; <i>Primula vulgaris</i> ; <i>Ranunculus aconitifolius</i> ; <i>Ranunculus ficaria</i> ; <i>Rubus caesius</i> ; <i>Saponaria officinalis</i>

<b>Cahiers d'habitats</b>	91E0-9	Frênaies-ormaies atlantiques à Aegopode des rivières à cours lent	Espèce indicatrice	<i>Aegopodium podagraria</i> ; <i>Alliaria petiolata</i> ; <i>Alnus glutinosa</i> ; <i>Festuca gigantea</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Geum urbanum</i> ; <i>Glechoma hederacea</i> ; <i>Primula elatior</i> ; <i>Quercus robur</i> ; <i>Ranunculus ficaria</i> ; <i>Rubus caesius</i> ; <i>Stachys sylvatica</i> ; <i>Symphytum officinale</i> ; <i>Ulmus minor</i> ; <i>Veronica hederifolia</i>
<b>Cahiers d'habitats</b>	91F0-2	Chênaies-ormaies rhénanes	Espèce indicatrice	<i>Acer pseudoplatanus</i> ; <i>Allium ursinum</i> ; <i>Arum maculatum</i> ; <i>Brachypodium sylvaticum</i> ; <i>Circaea lutetiana</i> ; <i>Clematis vitalba</i> ; <i>Equisetum sylvaticum</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Galium aparine</i> ; <i>Hedera helix</i> ; <i>Populus alba</i> ; <i>Quercus robur</i> ; <i>Stachys sylvatica</i> ; <i>Ulmus laevis</i> ; <i>Ulmus minor</i>
<b>EUNIS</b>	E5.41	Écrans ou rideaux rivulaires de grandes herbacées vivaces	Espèce caractéristique	<i>Aegopodium podagraria</i> ; <i>Angelica sylvestris</i> ; <i>Caltha palustris</i> ; <i>Chaerophyllum hirsutum</i> ; <i>Crepis paludosa</i> ; <i>Epilobium hirsutum</i> ; <i>Filipendula ulmaria</i> ; <i>Geranium palustre</i> ; <i>Mentha longifolia</i> ; <i>Petasites sp.</i>
<b>EUNIS</b>	E5.58	Communautés alpines à Rumex	Espèce caractéristique	<i>Achillea distans</i> ; <i>Aconitum napellus</i> ; <i>Cirsium spinosissimum</i> ; <i>Geranium phaeum</i> ; <i>Peucedanum ostruthium</i> ; <i>Phleum alpinum</i> ; <i>Rumex alpinus</i> ; <i>Senecio alpinus</i> ; <i>Heracleum sphondylium ssp. Transsilvanicum</i> ; <i>Leucanthemum waldsteinii</i> ; <i>Senecio subalpinus</i>
<b>EUNIS</b>	G1.11	Saulaies riveraines	Espèce caractéristique	<i>Aster novi-belgii</i> ; <i>Impatiens glandulifera</i> ; <i>Lycopus europaeus</i> ; <i>Lysimachia vulgaris</i> ; <i>Phalaroides arundinacea</i> ; <i>Populus alba</i> ; <i>Populus nigra</i> ; <i>Salix alba</i> ; <i>Solidago canadensis</i> ; <i>Aster novi-anglii</i> ; <i>Populus canescens</i> ; <i>Salix sp.</i>
<b>EUNIS</b>	G1.21211	Aulnaies-frênaies à Stellaire	Espèce caractéristique	<i>Acer platanoides</i> ; <i>Acer pseudoplatanus</i> ; <i>Aconitum vulparia</i> ; <i>Allium ursinum</i> ; <i>Alnus glutinosa</i> ; <i>Athyrium filix-femina</i> ; <i>Corylus avellana</i> ; <i>Dryopteris carthusiana</i> ; <i>Filipendula ulmaria</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Geum rivale</i> ; <i>Impatiens noli-tangere</i> ; <i>Lamium galeobdolon</i> ; <i>Luzula sylvatica</i> ; <i>Matteuccia struthiopteris</i> ; <i>Primula elatior</i> ; <i>Prunus padus</i> ; <i>Ranunculus ficaria</i> ; <i>Ranunculus platanifolius</i> ; <i>Ribes rubrum</i> ; <i>Ribes uva-crispa</i> ; <i>Stellaria nemorum</i> ; <i>Ulmus glabra</i> ; <i>Ulmus laevis</i>
<b>EUNIS</b>	G1.2132	Aulnaies-frênaies ouest-européennes à hautes herbes	Espèce caractéristique	<i>Aconitum napellus</i> ; <i>Alnus glutinosa</i> ; <i>Calystegia sepium</i> ; <i>Carex acutiformis</i> ; <i>Carex paniculata</i> ; <i>Cirsium oleraceum</i> ; <i>Dipsacus pilosus</i> ; <i>Epilobium hirsutum</i> ; <i>Equisetum fluviatile</i> ; <i>Equisetum telmateia</i> ; <i>Eupatorium cannabinum</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Humulus lupulus</i> ; <i>Iris pseudacorus</i> ; <i>Ribes rubrum</i> ; <i>Salix cinerea</i> ; <i>Sambucus nigra</i> ; <i>Solanum dulcamara</i> ; <i>Symphytum officinale</i> ; <i>Ulmus sp.</i>
<b>EUNIS</b>	G1.A4112	Forêts de ravin à Frêne, Érable sycomore et Lunaire	Espèce caractéristique	<i>Acer platanoides</i> ; <i>Acer pseudoplatanus</i> ; <i>Anthriscus nitida</i> ; <i>Campanula latifolia</i> ; <i>Fagus sylvatica</i> ; <i>Fraxinus excelsior</i> ; <i>Hesperis matronalis subsp. matronalis</i> ; <i>Impatiens noli-tangere</i> ; <i>Lamiastrum galeobdolon subsp. montanum</i> ; <i>Lunaria rediviva</i> ; <i>Mercurialis perennis</i> ; <i>Tilia platyphyllos</i> ; <i>Ulmus glabra</i> ; <i>Anthriscus nitidus</i>
<b>EUNIS</b>	E5.11	Habitats des plaines colonisés par de hautes herbacées nitrophiles	Espèce diagnostique	<i>Epilobium sp.</i>
<b>PVF2</b>		Filipendulo ulmariae - Convolvuletea sepium	Espèce caractéristique	<i>Angelica sylvestris</i> ; <i>Caltha palustris</i> ; <i>Calystegia sepium</i> ; <i>Cirsium palustre</i> ; <i>Deschampsia cespitosa</i> ; <i>Eupatorium cannabinum</i> ; <i>Filipendula ulmaria</i> ; <i>Heracleum sphondylium</i> ; <i>Lythrum salicaria</i> ; <i>Scrophularia auriculata</i> ; <i>Valeriana officinalis</i>
<b>PVF2</b>		Chaerophyllo hirsuti - Valerianetum pyrenaicae	Combinaison caractéristique	<i>Angelica sylvestris</i> ; <i>Athyrium filix-femina</i> ; <i>Chaerophyllum hirsutum</i> ; <i>Filipendula ulmaria</i> ; <i>Valeriana pyrenaica</i>

#### 1.4.8.1 Potentiel compétitif et allélopathique de l'ortie

L'ortie a été désignée comme plante à fort pouvoir compétitif (Grime et al., 1988), notamment grâce à sa capacité à se multiplier végétativement de manière efficace grâce à ses stolons et rhizomes. Comparativement à d'autres plantes (e.g., *Agropyron repens*, *Artemisia vulgaris*, *Phalaris arundinacea*, *Calamagrostis epigeios*, *Epilobium angustifolium*, *Cirsium arvense*, *Typha spp.*), l'ortie montre la plus grande capacité d'expansion (Prach and Wade, 1992). Peu d'espèces sont capables de concurrencer l'ortie, toutefois, certaines graminées (Bassett et al., 1977) ainsi que le Gaillet croisette (*Gallium aparine*) (Puntieri and Pyšek, 1993) peuvent entraver la prolifération de l'ortie. Le pouvoir concurrentiel de ce dernier peut expliquer sa co-dominance avec l'ortie dans de nombreux habitats (Tableau 13).

Le pouvoir allélopathique de préparations à base d'ortie a été testé sur la germination de différents céréales (i.e., blé, orge, avoine) (Bojović et al., 2015; Dziamski and Stypczyńska, 2015) et sur des espèces adventices des cultures (i.e., *Chenopodium album* et *Apera spica-venti*) (Synowiec and Nowicka-Połeć, 2016). Les extraits d'ortie ont engendré des effets inhibiteurs sur la germination et le développement des espèces adventices. Néanmoins les résultats obtenus sur les grains de céréales se sont montrés très variables, avec à la fois des effets inhibiteurs et stimulateurs, principalement dépendant de la concentration en extrait et de l'espèce de plante. Des études complémentaires visant à appréhender un éventuel pouvoir allélopathique de l'ortie restent donc à prévoir.

#### 1.4.8.2 Structure et écologie des communautés microbiennes de l'ortie

Les propriétés antibactériennes et antifongiques de l'ortie ont été largement étudiées en conditions contrôlées (Koszegi et al., 2017), toutefois leurs fonctions écologiques *in-situ* restent méconnues. Par ailleurs, les communautés de micro-organismes fongiques et bactériens associés à l'ortie n'ont fait l'objet que de peu d'attention. Toubal et al. (2018) ont étudié la diversité bactérienne associée aux différentes parties de l'ortie à partir de tests biochimiques et par analyses spectrométriques (MALDI-TOF MS), ce qui a permis d'isoler 7 genres et 11 espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Paenibacillus*. Pour les différentes parties de l'ortie, l'espèce la plus commune est *Bacillus pumilus*-ME. L'ortie a également été montrée comme étant un hôte à la bactérie *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas*), à l'origine de la pourriture brune de la pomme de terre (Wenneker et al., 1999).

Une étude couplant des approches *in-situ* et en mésocosme a permis de mettre en évidence l'absence de structures mycorhiziennes au niveau de la rhizosphère de l'ortie, ainsi qu'une inhibition du développement de *Glomus mosseae* en présence d'ortie (Vierheilig et al., 1996). Selon

les auteurs, la protéine UDA présentant des propriétés anti-fongiques (Broekaert et al., 1989) pourrait être impliquée dans ce phénomène. De plus, l'effet inhibiteur de l'ortie pourrait même impacter les AMF d'autres plantes mycorhizables (Fontenla et al., 1999). Ainsi, des études supplémentaires sont à envisager de manière à mieux appréhender les interactions entre l'ortie et son environnement microbiologique.

#### 1.4.8.3 L'entomofaune de l'ortie

Les premières études portant sur l'entomofaune de l'ortie ont eu lieu en Europe (Davis, 1975, 1989; Perrin, 1975) et ont caractérisé cette plante comme un réservoir d'insectes abritant une grande diversité et notamment de nombreux hémiptères et de coléoptères (Davis, 1973). Plus d'une centaine d'espèces d'insectes a pu être observée sur l'ortie, dont au moins une trentaine spécifique à cette plante, telles que des espèces d'Aphididae, Psyllidae et de chenilles. De nombreuses autres espèces polyphages comme des Miridae, Lygaeidae ou Cicadellidae ont été trouvées, ainsi que de nombreux prédateurs et parasitoïdes comme des Coccinellidae, Syrphidae et Braconidae (Figure 26).

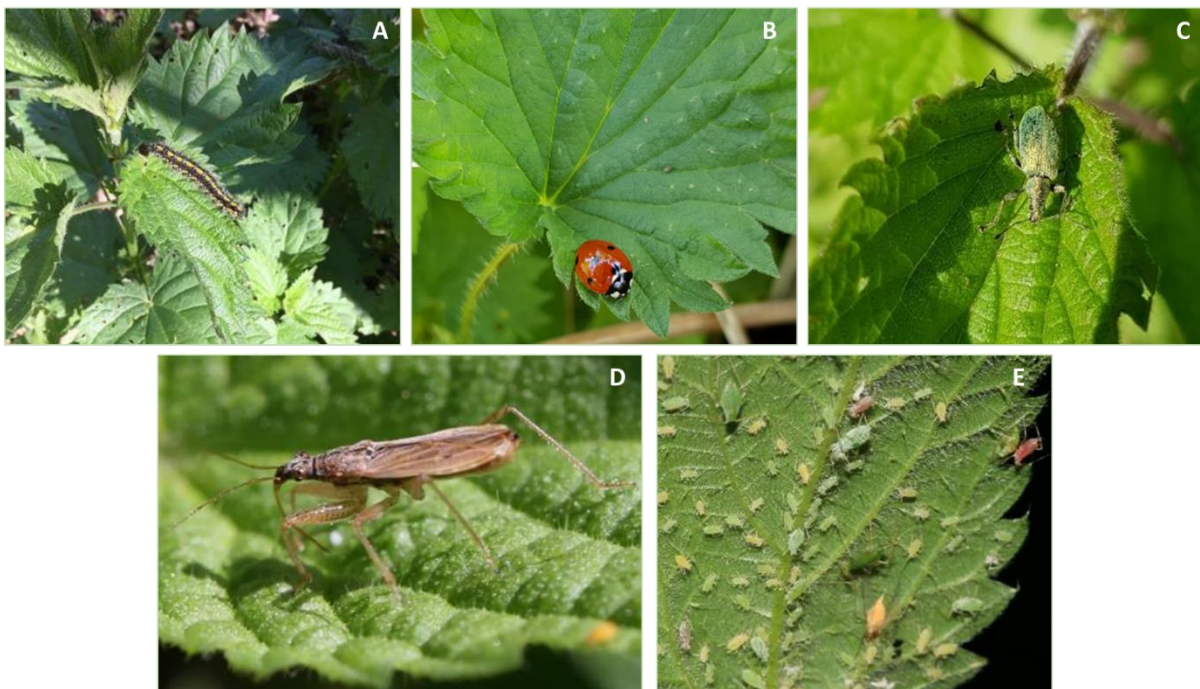


Figure 26. Espèces d'insectes communément hébergées par l'ortie dioïque, *Aglais urticae* (A), *Coccinella septempunctata* (B), *Phyllobius pomaceus* (C), *Nabis* sp. (D) et *Microlophium carnosum* (E). Photos A, B, C, E : L. Yung.

Plus récemment, plusieurs autres études ont été menées aux Etats-Unis (James et al., (2015) ou en Belgique (Alhmedi et al., 2007, 2009, 2011), concluant que le maintien de l'ortie en tant que patch mais plus efficacement en tant que peuplement monospécifique (Zabel and Tschardtke, 1998) participait à l'amélioration de la biodiversité des agrosystèmes. Parmi les nombreuses espèces

d'herbivores monophages hébergées par les orties, une attention particulière a été portée au puceron de l'ortie *Microlophium carnosum* en raison de son importance potentielle en tant que proie alternative pour les ennemis naturels des ravageurs des cultures (Perrin, 1976). En effet, les pucerons hébergés par les orties peuvent constituer une source de nourriture pouvant attirer des insectes aphidophages ou parasitoïdes (Ekesi et al., 2005). Par conséquent, l'ortie pourrait indirectement contribuer à la régulation des ravageurs des cultures dans le milieu environnant (Alhmedi et al., 2007, 2011). De plus, Baverstock et al., (2011) ont montré qu'une plantation d'un clone particulier d'ortie, sélectionné pour sa teneur en fibres, était également capable de supporter l'espèce de puceron *M. carnosum* et donc de promouvoir ses ennemis naturels. Ces derniers peuvent ainsi contribuer à la stabilité et à la durabilité des agrosystèmes contre les insectes nuisibles comme suggéré par James et al., (2015).

#### 1.4.9 Potentiel de valorisation de l'ortie

De tout temps, l'ortie dioïque a été considérée comme une plante aux multiples usages (*e.g.*, alimentaire, médicinale). A l'époque contemporaine, l'ortie a plutôt été relayée au statut de « mauvaise herbe » et son utilisation s'en est vue limitée. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, l'ortie fait l'objet d'un regain d'intérêt lié à la mise en avant des « phytothérapies » ou encore des matériaux biosourcés. Ainsi, de nombreux travaux de thèse ont porté sur l'ortie, dans les domaines de la pharmacologie (Candais, 2019; Delahaye, 2015; Draghi, 2005), la phyllogénie (Grosse-Veldmann, 2016) ou encore la phytochimie (Bennouar and Chekakta, 2017) et son potentiel de valorisation a été revu à plusieurs reprises (Kregiel et al., 2018; Suryawan et al., 2017; Amal Ait et al., 2016; Baumgardner, 2016; Di Virgilio et al., 2015; Kalia et al., 2014; Harwood and Edom, 2012).

##### 1.4.9.1 Les différentes filières connues

L'intégralité des parties de l'ortie présente un potentiel de valorisation en raison de propriétés mécaniques (fibre d'ortie contenue dans la tige), curatives (feuilles, racines) ou alimentaires (feuilles). Les principales filières de valorisation ayant fait l'objet de travaux sont présentées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Filières de valorisation explorées pour les différentes parties de l'ortie, adapté de Di Virgilio et al., (2015).

Domaine d'application	Utilisation	Partie de la plante	Référence
<b>Textile / fibre</b>	Cordages et filets de pêche, tissus et toiles, papier, vêtements, teinture naturelle	Fibre végétale de la tige, racine et feuilles pour les teintures	Bacci et al., 2011, 2011; Bisht et al., 2012; Bodros and Baley, 2008; Gatti et al., 2008; Harwood and Edom, 2012; Vogl and Hartl, 2003
<b>Fibre</b>	Biocomposite, panneaux composites de fibres de bois	Fibre végétale de la tige	Fischer et al., 2012; Mahendrakumar et al., 2019; Yallew et al., 2016
<b>Médecine</b>	Anémie, rhumatisme, goutte, eczéma, diurétique, hypoglycémie, hypotension, prostatique bénigne, hyperplasie, problèmes cardiovasculaires, arthrite, rhinite allergique, antioxydant, antimicrobien, antifongique, antiviral, antiulcère	Feuilles, graines, racines, extraits aqueux et alcooliques	Dhouibi et al., 2019; Esposito et al., 2019; Guarrera and Savo, 2013; Roschek et al., 2009
<b>Cosmétique</b>	Savons, shampooings, lotions pour la peau	Racines, feuilles	Bisht et al., 2012; Vogl and Hartl, 2003; Fischer et al., 2017
<b>Alimentaire</b>	Salade, quiches, soupes, tisane	Jeunes feuilles	Guil-Guerrero et al., 2003
<b>Culture fourragère</b>	Compléments alimentaires pour volaille, bovins, chevaux, porcs, poissons	Plante entière	De Vico et al., 2018; Loetscher et al., 2013
<b>Agronomie</b>	Bio-pesticides d'origine végétales	Racines, feuilles, tiges	Garmendia et al., 2018; Mensah, 2017

Depuis l'Antiquité, l'ortie dioïque a été considéré comme une plante médicinale, utilisée en tant que remède populaire pour soigner un vaste panel de pathologies telles que les plaies gangréneuses, des infections diverses, les ulcères, les douleurs d'estomac, les douleurs articulaires. La plupart des indications de cette médecine empirique sont aujourd'hui vérifiées scientifiquement et développées industriellement. L'ortie est actuellement reconnue en France et en Europe comme une plante médicinale, dont l'utilisation est autorisée en compléments alimentaires ou « en mélanges pour préparations officinales » (Delahaye, 2015). En plus de cela, l'ortie est considérée comme utile pour prévenir ou atténuer les cancers de l'Homme en raison de ses teneurs élevées en substances naturelles bioactives, y compris les polyphénols qui posséderaient des propriétés antioxydantes, antimutagènes et antiprolifératives (Esposito et al., 2019).

En plus de propriétés curatives, l'ortie présente une valeur nutritive élevée et notamment plusieurs composés bénéfiques tels que : vitamines A, D et C, protéines, minéraux, calcium, Fe, potassium, Mn, amines, chlorophylle antioxydante, caroténoïdes et acides gras essentiels, lui valant une utilisation comme légume-feuille pour des salades, des quiches ou des soupes depuis des siècles (Guil-Guerrero et al., 2003). De plus, l'utilisation de l'ortie piquante comme culture fourragère a été

étudiée avec des résultats prometteurs. En période de pénurie de fourrage, pendant les deux guerres mondiales, l'ortie était également utilisée fraîche, séchée, moulue ou ensilée pour l'alimentation des volailles, des bovins, des chevaux et des porcs (Vogl and Hartl, 2003). L'utilisation de l'ortie dans le secteur cosmétique est aujourd'hui en plein essor. Plusieurs produits commerciaux sont actuellement présents sur le marché (*e.g.*, savons, shampooings antipelliculaires, lotions pour nettoyer la peau). Les principaux constituants qui confèrent à l'ortie ses propriétés cosmétiques sont la chlorophylle antioxydante, les protéines, les vitamines A, D et C, ainsi que certains minéraux (Bisht et al., 2012).

#### 1.4.9.2 Intérêt de l'ortie pour la filière fibre

Comme pour d'autres plantes phloémiennes, les fibres d'orties sont situées entre l'écorce extérieure (épiderme) et le noyau central ligneux. Ces cellules de structure sont composées de fibres de cellulose et d'hémicellulose disposées en faisceaux (Figure 27).

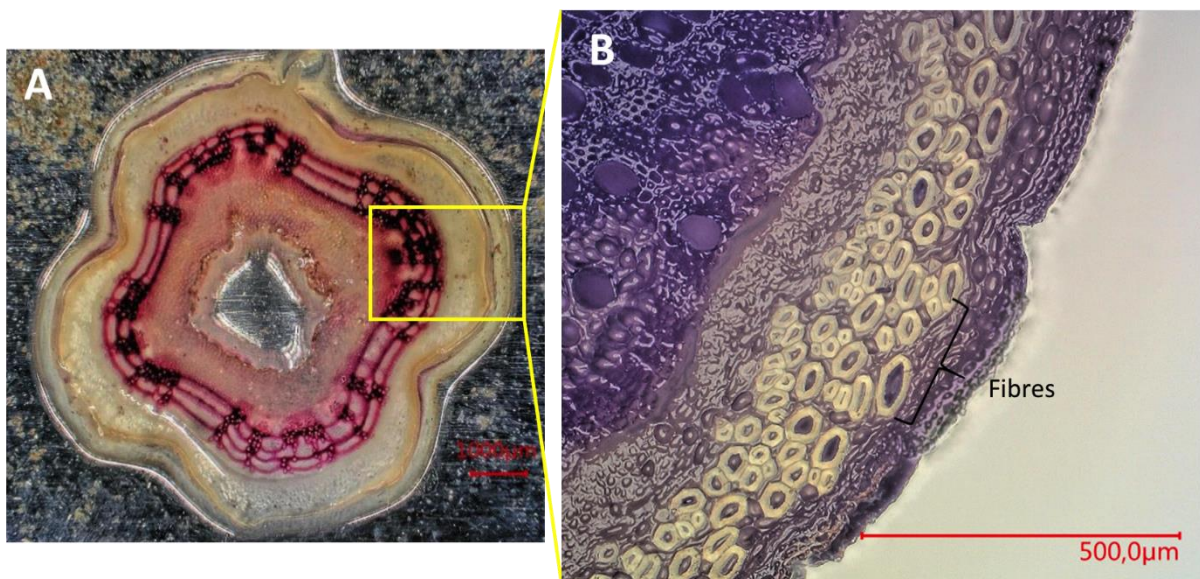


Figure 27. Observation au microscope d'une coupe transversale de tige d'ortie (A) avec un zoom sur les fibres végétales.

La grande ortie a une longue histoire en tant que fibre textile de remplacement du lin, remontant à l'époque médiévale. Elle a également été utilisée commercialement plus récemment pendant les deux guerres mondiales, lorsque d'autres cultures, comme le coton, étaient manquantes (Di Virgilio et al., 2015). La fibre peut aussi être utilisée pour la fabrication de cordes, de papier et de matériaux composites (Bisht et al., 2012). Comme le lin et le chanvre, les fibres d'ortie sont biodégradables, elles nécessitent peu d'énergie à produire et elles sont extraites d'une source renouvelable. La fibre d'ortie n'a rien à envier aux autres matériaux, qu'ils soient pétro-sourcés ou bio-sourcés. La littérature montre qu'elle peut être deux fois plus rigide et résistante que celle du



chanvre et supérieure à celle du lin avec des propriétés de rigidité et de résistance en traction variant respectivement en moyenne de 65 GPa (Dreyer et al., 2002; Franck, 2005) à 87 GPa (Bodros and Baley, 2008) et de 740 MPa à 1594 MPa. Compte tenu de sa faible masse volumique (de l'ordre de  $1500 \text{ kg.m}^{-3}$ ), ses propriétés dépassent également celles des fibres de verre. Pour certaines applications, dans lesquelles la fibre d'ortie pourrait se substituer à des fibres de verre ou de carbone, comme pour la manufacture de composites pour l'industrie automobile ou le remplacement des fibres d'amiante, les fibres d'ortie pourraient être supérieures aux fibres de lin (Guo et al., 2005). Un rapport de l'ADEME (Meirhaegue, 2011) souligne que la fibre d'ortie pourrait à plus long terme devenir un gisement de fibres végétales. Afin de valoriser pleinement cette ressource naturelle, une bonne compréhension de leur comportement et de leurs propriétés mécaniques ainsi que la maîtrise de leur durabilité sont requises sous des conditions environnementales contrôlées (Davies and Bruce, 1998). Malgré un potentiel de valorisation prometteur, la culture de l'ortie nécessite de lever certains verrous techniques, engendrant une faible disponibilité en matière première, ce qui n'a à ce jour pas permis de développer des utilisations industrielles.

#### *1.4.9.3 La place de l'ortie dans le marché des fibres végétales en France*

Dans le cas de l'industrie des panneaux de process, les essences sont principalement résineuses pour les performances de leurs fibres. Toutefois, des ressources alternatives de fibres sont possibles : feuillus (Prasad et al., 2013) ou plantes annuelles, lin ou chanvre (Prasad et al., 2013). Des produits commerciaux sont actuellement disponibles pour des marchés de niche. Dans le passé, l'entreprise UNILIN incorporait de telles fibres dans les panneaux. Toutefois, le manque de ressource est un obstacle à leur utilisation.

Une autre industrie fortement consommatrice de fibres végétales est celle des biocomposites. En effet, en Europe, ces fibres, de par leurs propriétés mécaniques, sont utilisées en renfort dans les composites, et représentent aujourd'hui un marché en forte progression (Meirhaegue, 2011). Au niveau mondial, la part des composites à base de fibres végétales atteint, en 2011, 2 à 2,5% de l'ensemble des composites (Meirhaegue, 2011). L'augmentation est significative et la marge de progression encore grande. Les études prospectives prévoient un fort développement du marché des fibres issues des plantes annuelles avec une augmentation évaluée à 300% dans les 25 prochaines années (Shah, 2013). Dans le secteur automobile, l'UE pourrait augmenter sa production en composites biosourcés de plus de 600 000t en 2020, en utilisant 150 000t de fibres issues du bois et de plantes annuelles, contre 150 000t (utilisant 80 000t de fibres de bois et de plantes annuelles) produits en 2012 (Karus, 2004). L'augmentation de cette demande en fibres pour des applications techniques requiert également d'accroître les surfaces cultivées. D'ici 25 ans, des prospectives montrent que les besoins en fibres végétales pour des usages

matériaux pourraient représenter environ 300 000 ha (Meirhaghe, 2011), le gisement moyen actuel étant d'environ 100 000 ha. À ce jour, en Europe, les principales plantes annuelles utilisées sont principalement le lin et le chanvre avec respectivement une part relative de 64% et 10% du marché (Shah, 2013). La forte augmentation des besoins en fibres issues de plantes annuelles nécessite l'émergence de nouveaux bassins de production, reposants sur de nouvelles espèces prometteuses telles que l'ortie.

#### *1.4.9.4 Les essais de production d'ortie : principaux freins et leviers*

Entre 1997 et aujourd'hui, seulement une quinzaine de projets centralisés sur l'ortie ont été menés et financés en France, Italie, Lituanie, Allemagne, Autriche, Royaume-Uni et Finlande (Tableau 15). Ces projets ont porté principalement sur des aspects agronomiques liés à la culture de la plante, sur les méthodes d'extraction pour une utilisation des molécules à visées alimentaire, thérapeutique et cosmétique, sur les méthodes de défibrage pour une exploitation des fibres dans le domaine textile. Les résultats de ces projets montrent clairement que l'ortie dioïque a de réelles potentialités pour ces secteurs applicatifs, et en particulier pour le textile de luxe (Bergfjord *et al.*, 2012; Debnath, 2015), en mélangeant les fibres d'ortie à d'autres fibres naturelles ou synthétiques. Parmi les avancées historiques majeures concernant l'utilisation de l'ortie, Bredemann, (1959) a sélectionné, après plus de 30 ans d'élevage, des clones caractérisés par une teneur élevée en fibres (jusqu'à 16 % contre environ 4 à 5 % pour l'ortie sauvage) et des tiges longues et non ramifiées (favorable au défibrage). Les clones les plus intéressants sont encore conservés dans des instituts de recherche en Allemagne et ont fait l'objet de nombreux travaux (Bacci *et al.*, 2009, 2011; Gatti *et al.*, 2008).

Tableau 15. Principaux projets financés depuis 1999 au niveau national ou international et portant sur la culture et/ou la valorisation de l'ortie.

	Acronyme - Intitulé (années)	Financement	Partenaires / positionnement
Projets nationaux	NEWFIBRE – Fibres d'ortie pour l'industrie textile (2015- 2018)	Région Lorraine - FEDER	Regroupe 4 PME et 4 laboratoires lorrains. Culture et valorisation des fibres d'ortie pour le textile.
	LORVER – Filière de production de biomasse à usage industriel par la valorisation des délaissés (2013-2018)	Région Lorraine - FEDER	Regroupe 4 entreprises et 5 laboratoires lorrains. Culture du chanvre, de l'ortie et d'arbres sur sols reconstruits (non contaminés).
Projets réalisés hors France	Study of alternative fibre plants in Lithuania (2010-2013)	Part of the long-term LRCAF programme "Biopotential and Quality of Plants for Multifunctional Use" – Lituanie	Optimisation des aspects agronomiques liés à la culture de l'ortie
	Plant resources for food and non-food use in Tuscany Region (2010-2011)	Région Toscane - Italie	Analyse de Cycle de Vie de produits à base de fibres d'ortie
	ICCOG – Use of clones of nettle and Spanish broom for textile and phytotherapeutic use (2008-2009)	Région Toscane - Italie	Identification et caractérisation de clones avec une haute teneur en fibres et métabolites
	STING - Sustainable Technology in Nettle Growing (2001-2004)	Department for Environmental Food and Rural Affairs, UK	Développement d'une fibre textile naturelle à partir de ressources non-alimentaires.
	From nettle to textile (1997 – 2003)	Agricultural Research Centre of Finland	Culture de l'ortie, procédé biotechnologiques de défibrage
	Natural textiles made of nettle-innovative technology and product development for the textile industry (1999 – 2002)	Germany	Culture de l'ortie et fabrication textile.
	NETTLE - Reintroduction of stinging nettle cultivation as a sustainable raw material for the production of fibres and cellulose (1999-2001).	EU – FP4-FAIR	Culture et transformation de l'ortie pour la production de fibres et de cellulose.

Cette sous-utilisation des fibres d'ortie pour des applications techniques est attribuée à différents verrous liés à la culture, à la récolte et également aux procédés de transformation. Ceux-ci sont décrits dans une revue récente de la littérature (Di Virgilio *et al.*, 2015). Les difficultés techniques liées à la culture et à la récolte font que la disponibilité en matière est extrêmement faible, rendant impossible à ce jour une utilisation industrielle. Effectivement, la culture de l'ortie n'est pas simple, et les stratégies envisagées jusqu'à ce jour (reproduction par semis de graines et multiplication végétative) induisent un coût économique non compatible avec les secteurs de valorisation cités précédemment. D'autres verrous touchant aux procédés de récolte et de transformation sont souvent évoqués. Il semble néanmoins que les avancées récentes faites au niveau du chanvre puissent être transposées aisément à l'ortie, que cela soit au niveau des outils de coupe et récolte de la tige qu'au niveau des procédés de défibrage (Di Virgilio *et al.*, 2015). La valorisation de l'ortie à une échelle industrielle passe donc nécessairement par la création d'une filière de production et de transformation de la tige.

## 1.5 Problématique et objectifs du travail de thèse

Nous avons montré au travers de la synthèse bibliographique que les friches industrielles et plus généralement les sites contaminés par les ETM sont nombreux sur le territoire Français et qu'ils représentent des surfaces exploitables à condition d'employer des approches appropriées pour la réhabilitation de ces sites. Le phytomanagement, qui utilise des espèces végétales pour extraire, contenir ou dégrader des polluants, apparaît comme une solution adaptée pour contribuer à la réhabilitation écologique de ces sites tout en produisant de la biomasse végétale. Les approches récentes s'accordent sur l'importance des associations végétales dans l'optimisation de ces dispositifs. Dans des dispositifs de phytomanagement basés sur des TCR de peuplier, l'ortie offre de nouvelles perspectives liées i) à son aptitude à coloniser spontanément les sites anthropisés, ii) à son intérêt pour promouvoir la biodiversité en milieu naturel et finalement iii) à son potentiel de valorisation pour différentes filières et notamment en raison de la qualité de sa fibre végétale, utilisable pour la fabrication de biomatériaux. Toutefois, le fonctionnement de cet agrosystème et la valeur ajoutée en terme de services écosystémiques que peut représenter l'ortie n'ont jamais été investigués en contexte de phytomanagement. De plus, la présence de l'ortie dans un tel système soulève un certain nombre de questions auxquelles nous avons tenté de répondre au travers des objectifs spécifiques.

Dans le cadre de ce projet de thèse, il est ainsi proposé d'étudier le fonctionnement et les performances du dispositif agroforestier peuplier-ortie, sur des sites contaminés et impropres à la production agricole à vocation alimentaire. **L'objectif général de mon projet de thèse consiste à évaluer l'intérêt écologique, environnemental et économique d'associer l'ortie à des plantations de ligneux cultivés en mode TCR et installées dans un contexte de phytomanagement**, et ce, à partir de plusieurs approches disciplinaires. Il se décline en 3 objectifs spécifiques qui constituent les chapitres 2, 3 et 4 présentés ci-après et auxquels sont associées des questions scientifiques :

(1) Comprendre le **fonctionnement** de ce dispositif peuplier-ortie à **l'interface rhizosphérique** et sa **réponse aux ETM** *via* des approches de métabolomique ciblée et de barcoding environnemental.

→ Quelle est l'influence réciproque de l'ortie et du peuplier sur leur développement et leur capacité à accumuler les ETM présents dans le sol ?

→ Quelles sont les communautés fongiques associées à l'ortie et au peuplier dans le cas d'une co-culture sur sol contaminé et quel est leur rôle ?

→ Quels sont les facteurs pouvant influencer la production de métabolites spécialisés ou allélochimiques par les racines d'ortie et de peuplier ? Quels sont les rôles de ces métabolites ?

(2) Appréhender le rôle des plantes modèles dans la **restauration écologique** de sites contaminés au travers d'études phytosociologique et entomologique et évaluer l'implication des communautés associées dans les **flux d'ETM** par une approche écotoxicologique.

→ Au regard des contaminants en présence, quelles sont les communautés végétales et entomologiques associées à l'agrosystème peuplier-ortie, et quels sont leurs rôles dans le fonctionnement de ce dernier ?

→ De quelle manière l'ortie et son cortège entomologique influencent-ils les flux d'ETM ?

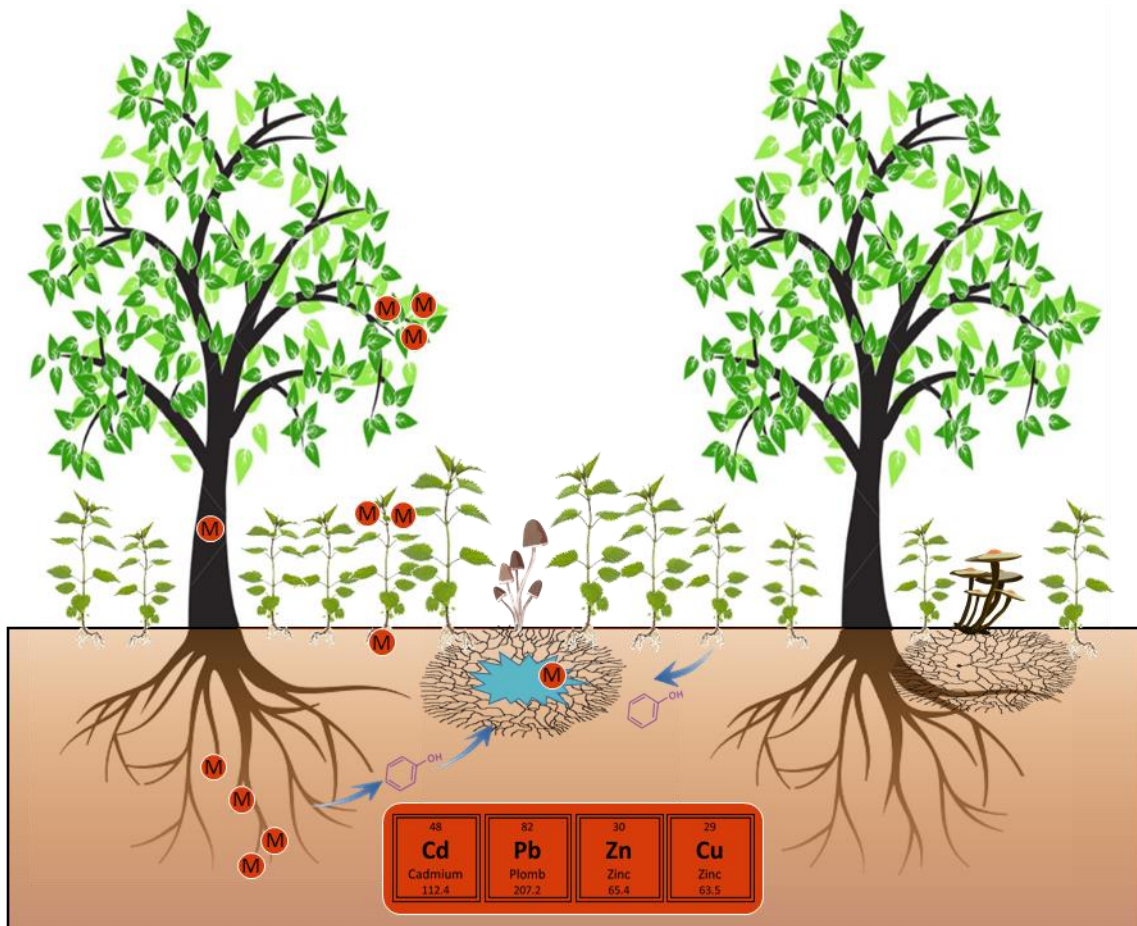
(3) Identifier les filières de valorisation adaptées au contexte d'étude et optimiser le **potentiel de production** du dispositif selon une approche agronomique.

→ L'ortie accumule-elle les ETM ? dans quels tissus ? Les concentrations sont-elles compatibles avec certaines filières de valorisation ?

→ Quel est le potentiel de production de l'ortie indigène lorsqu'elle se développe spontanément sur des sites contaminés, et comment améliorer ses rendements ?

# Chapitre 2

Fonctionnement de l'agrosystème ortie-peuplier au niveau rhizosphérique : cas d'une contamination aux Cd, Pb, Zn, Cu





## 2.1 Présentation du site expérimental

### 2.1.1 Localisation et origine de la pollution

Le site de dépôt de sédiments de Fresnes-sur-Escaut (59) est situé au bord du canal de l'Escaut dans le département du Nord, région des hauts de France (Figure 28). Le terrain appartient aux Voies Navigables de France (VNF) et a été utilisé entre 1978 et 1989 pour le dépôt de sédiments issus du curage de l'Escaut. Près de 200 000 m<sup>3</sup> de limons et de sables issus du curage d'élargissement du bief de Fresnes ont été déposés successivement sur le site, occasionnant une épaisseur totale de sédiments pouvant varier de quelques centimètres à plusieurs dizaines de centimètres pour les secteurs les plus exposés.



Figure 28. Présentation du site expérimental de dépôt de sédiments de Fresnes-sur-Escaut, situé en bordure du canal de l'Escaut dans le nord de la France.

Ces dépôts ont entraîné un enrichissement hétérogène en Cu, Cd, Pb et Zn des horizons de surface (0-50 cm). Un rapport datant de 1990 provenant de la DDAF du Nord, de la DRIR Nord-Pas-de-Calais et du Service des Voies Navigables attribue la pollution de l'Escaut à différentes sources : i) la fertilisation agricole et un excès d'azote d'origine urbaine, ii) des rejets industriels liés notamment à des usines textiles et iii) un dysfonctionnement des réseaux d'épuration des eaux. Malgré cette contamination, le site a été utilisé en tant que prairie et terrain de chasse à l'issue des dépôts de sédiments. Depuis 2010, les terrains de dépôt de sédiments sont particulièrement encadrés



et contrôlés car soumis à la réglementation sur les ICPE (Décret n° 2010-369 du 13 avril 2010). Néanmoins, une valorisation de ces sites peut être envisagée en fonction des caractéristiques physico-chimiques des sédiments, s'ils ne sont pas classés comme dangereux. Dans le cas du site de Fresnes-sur-Escaut, une évaluation des risques pour la santé humaine (2010) a identifié des risques sanitaires liés à des activités de loisirs (promenade).

### 2.1.2 Description du dispositif expérimental

Dans le cadre du projet BIOFILTEREE, le dispositif expérimental mis en place sur le site de Fresnes-sur-Escaut consiste en une plantation de TCR (2200 tiges/ha) de peupliers cultivars « Skado » (*Populus trichocarpa* x *P. maximowiczii* section Tacahamaca) et « I214 » (*P. deltoides* x *P. nigra* section Aigeiros) ainsi que de rangées d'Aulnes (*Alnus glutinosa*) d'environ 7000 m<sup>2</sup> plantés en 2011. La parcelle est découpée en 32 placettes, comptant 48 tiges, de surface unitaire de 432 m<sup>2</sup>, inoculées ou non. Cet inoculum composé de champignons ecto- et endomycorhiziens commercialisés par les sociétés Agronutrition (Toulouse, France) et Symbiom (République tchèque) a été déposé au pied des plançons afin de favoriser la croissance des arbres et de réduire le transfert des ETM dans les parties récoltables. Bien qu'un effet positif de l'inoculation sur la croissance des peupliers ait pu être montré (Ciadamidaro et al., 2017), 5 ans après l'inoculation, l'ensemble des arbres de la parcelle présente des taux de mycorhizations équivalents. Ces résultats ont été obtenus en 2016 dans le cadre d'une thèse et ne sont pas publiés à ce jour (Phanthavongsa, unpublished data). Par conséquent, la modalité liée à l'inoculation des peupliers ne sera pas considérée dans le cadre de ce travail de thèse. Un important taux de mortalité des aulnes a été observé les premières années, par conséquent, de manière à s'affranchir des biais liés à ce phénomène, les placettes incluant des aulnes n'ont pas été considérées.

Après trois à quatre années de plantation, la strate herbacée s'est vue clairement dominée par la grande ortie (*Urtica dioïca* L.) apparue spontanément sous les peupliers et présentant des taux de recouvrement variables selon les placettes. Le taux de mortalité du cultivar I214 (4%) plus important que du cultivar Skado (1%) a entraîné une pénétration plus intense des rayons lumineux jusqu'au sol, ce qui a été favorable au développement de la végétation indigène, et particulièrement à l'ortie qui présente à un taux de recouvrement d'environ 60%. En outre, la faible mortalité du cultivar Skado et sa croissance plus importante ont donné lieu à une strate arborée plus épaisse, limitant la pénétration des rayons lumineux au sol. Dans ce type de placette, le taux de recouvrement de l'ortie avoisine les 20% (données issues de la parcelle de Tavaux).

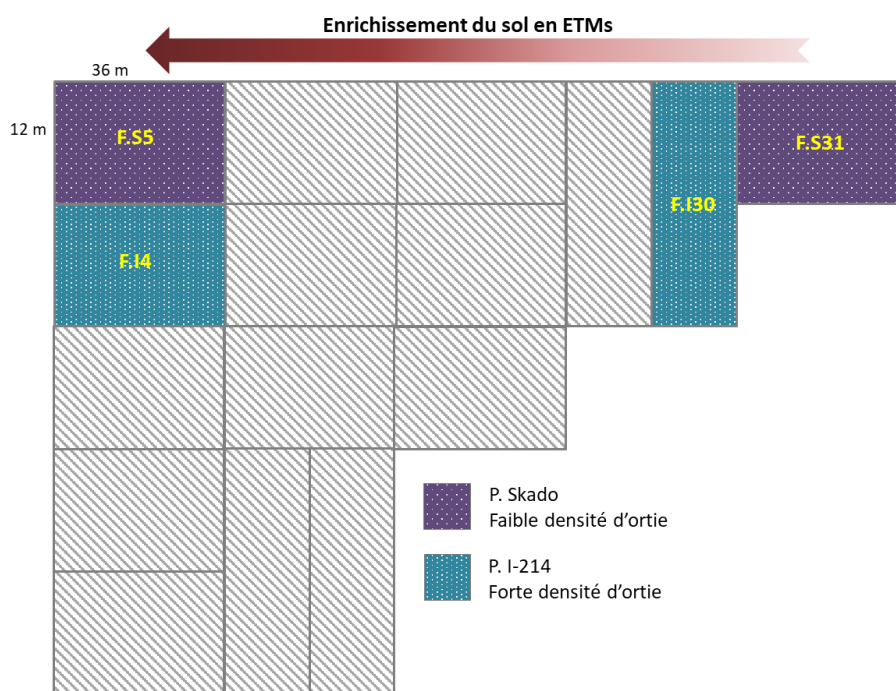


Figure 29. Présentation de la parcelle expérimentale de Fresnes-sur-Escaut et des 4 placettes de peuplier retenues, à savoir FI4, FI30, FS5 et FS31 (numérotation des placettes d'après Phanthavongsa et al., 2017).

### 2.1.3 Traitements étudiés

Dans le cadre de ce travail de thèse, 4 placettes ont été retenues sur la parcelle de Fresnes-sur-Escaut (Figure 29), à savoir des placettes de monoculture de:

- peupliers I214 (forte densité d'ortie)
  - sur substrat fortement enrichi en ETM (placette FI4): traitement **I214-HTM**
  - sur substrat faiblement enrichi en ETM (placette FI30): traitement **I214-LTM**
- peupliers Skado (faible densité d'ortie)
  - sur substrat fortement enrichi en ETM (placette FS5): traitement **Skado-HTM**
  - sur substrat faiblement enrichi en ETM (placette FS31): traitement **Skado-LTM**

A partir de ces placettes, les effets suivants ont été appréhendés sur le microbiome fongique (section 2.3) et le profil métabolique (section 2.4) des plantes étudiées.

- effet placette (cultivar) sur le peuplier (**I214-LTM vs Skado-LTM** et **I214-HTM vs Skado-HTM** pour le **peuplier**),
- effet placette (cultivar de peuplier/densité d'ortie) sur l'ortie (**I214-LTM vs Skado-LTM** et **I214-HTM vs Skado-HTM** pour l'**ortie**),

- effet contamination sur les 2 cultivars de peuplier (**Skado-LTM vs Skado HTM** et **I214-LTM vs I214-HTM** pour le **peuplier**),
- effet contamination sur l'ortie issue des 2 types de placette (**Skado-LTM vs Skado-HTM** et **I214-LTM vs I214-HTM** pour l'**ortie**).

#### 2.1.4 Description des sols

L'apport de sédiments sur la parcelle de Fresnes-sur-Escaut a participé à la modification des propriétés physico-chimiques du sol. En effet, le contraste entre le secteur ayant reçu une forte quantité de sédiments et celui en ayant reçu de façon moindre est bien marqué du point de vue des paramètres physico-chimiques des sols. La différence majeure repose sur les teneurs en MO : le secteur le plus enrichi présente 3 fois plus de MO et un rapport C/N 2,5 fois plus élevé que le secteur le moins enrichi. De plus, ces deux types de sol présentent des valeurs de CEC élevées (Tableau 16).

Tableau 16. Principaux paramètres physico-chimiques (moyennes) des sols de Fresnes-sur-Escaut et Tavaux (Assad et al. 2016).

	Argile	Limon fin	Limon grossier	Sable fin	Sable grossier	pH	CaCO <sub>3</sub>	P assim.	C org.	MO	N tot.	C/N	CEC	K <sub>2</sub> O	MgO	CaO
	%	%	%	%	%		%	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg		meq/kg	g/kg	g/kg	g/kg
FI30	15.2	18.7	48.7	11.4	6	8	3.2	0.6	46.3	80.1	2.7	17	119	0.3	0.2	8.7
FS31																
FI4	15.5	32.1	34.7	14.4	3.3	8	7.1	0.5	149	258	3.6	41	155	0.6	0.2	11
FS5																

Concernant les concentrations en ETM retrouvées dans les sols de Fresnes-sur-Escaut, les placettes F.I4 et F.S5 se démarquent très nettement des placettes F.I30 et F.S31 (Tableau 16, 17), avec notamment des concentrations 20 fois supérieures pour le Zn, 9 fois supérieures pour le Pb et 100 fois supérieures pour le Cd. Les valeurs mesurées pour les placettes F.I4 et F.S5 sont bien au-delà des valeurs moyennes mondiales rapportées par [Kabata-Pendias \(2011\)](#). Pour le Zn, le Pb et l'As, un enrichissement de l'ordre de 50 à 100% par rapport aux moyennes mondiales est à noter pour les parcelles F30 et F31.

Tableau 17. Concentrations moyennes (mg/kg) des principaux ETM présents dans les 4 placettes retenues pour la parcelle de Fresnes-sur-Escaut (F- et F+) (adapté de Assad et al. 2016).

Site	Plot	Al	Fe	Zn	Cu	As	Pb	Cd
		mg/kg						
Fresnes	FI30	345	184	92	25.5	8.69	44.5	0.46
	FS31	373	196	137	27.8	10.2	47	0.49
	FI4	505	374	2560	114	23.5	459	67.1
	FS5	483	348	2023	101	21	390	60.1
<b>Indicative world means in soil (Kabata-Pendias, 2011)</b>		ND	ND	70	38.9	6.8	27	0.41

### 2.1.5 Travaux préalablement réalisés

La parcelle expérimentale installée sur le site de dépôt de sédiments de Fresnes-sur-Escaut a fait l'objet de plusieurs travaux valorisés ces dernières années. L'effet de l'inoculation a été testé sur la production de biomasse du peuplier (Ciadamidaro et al., 2017) et sur l'accumulation des ETM dans leurs feuilles (Phanthavongsa et al., 2017), révélant un effet positif de l'inoculation sur la croissance et une réduction de la translocation des ETM vers les parties aériennes. Dans le cadre d'un projet de thèse en cotutelle avec l'INERIS (Phanthavongsa 2018), un inventaire floristique des espèces végétales a mis en évidence 18 espèces rudérales (e.g., *Galium aparine*, *Arrhenatherum elatius*) ou forestières (e.g. *Glechoma hederacea*, *Ranunculus repens*), avec toutefois une claire prédominance de l'ortie (35 à 93% d'abondance totale). En plus d'une étude de la mobilité des ETM dans le sol, une étude des communautés de micro-organismes (i.e., champignons et bactéries) via barcoding environnemental a été réalisée à partir d'échantillons de sol et de racines de peuplier Skado (Phanthavongsa, unpublished data).



## 2.2 Etude de la viabilité d'une association peuplier-ortie en mésocosme

### 2.2.1 Préambule

La première étape de ces travaux de thèse a consisté en la mise en place d'un test en mésocosme ayant pour objectif principal d'évaluer l'influence réciproque de l'ortie et du peuplier sur leur développement en co-culture sur des sols contaminés par les ETM et d'appréhender le potentiel d'accumulation des ETM par l'ortie. Ainsi, cette expérience repose sur un test en pot, utilisant comme substrats les deux sols du site de Fresnes-sur-Escaut (*i.e.*, LTM et HTM) à partir duquel nous avons cultivé l'ortie et le peuplier individuellement ou en co-culture. A ce stade, nous avons seulement fait émerger les principaux résultats issus de ce test, par conséquent, le travail d'exploitation des données reste à poursuivre. Pour cette section, je représenterai brièvement le contexte et les objectifs de cette étude (en français), puis présenterai une première version du « matériel et méthodes » et des principaux « résultats » (en anglais), qui feront l'objet d'un futur manuscrit.

### 2.2.2 Contexte et objectifs

Nous avons mis en avant dans la synthèse bibliographique que l'un des principaux enjeux de l'agroforesterie consiste à s'assurer de la viabilité des associations végétales et de maîtriser ces dernières afin de garantir un potentiel productif à ces systèmes (section 1.3.3). Dans notre contexte de phytomanagement, certains enjeux liés à la présence de contaminants dans le sol viennent complexifier l'équilibre et la pérennité de ces SAF. Le potentiel productif de ces SAF est notamment lié à l'efficacité photosynthétique des plantes, à leur capacité à tolérer les ETM ou encore à la présence de symbioses fongiques et bactériennes. Ainsi les objectifs de cette étude consistent à i) appréhender l'influence réciproque de l'ortie et du peuplier sur leur développement en cas de co-culture, ii) quantifier les symbioses fongiques et iii) appréhender l'influence réciproque de ces deux plantes sur leur potentiel d'accumulation des éléments traces (TE).

### 2.2.3 Matériel et méthodes

#### ***Studied soil and plants***

The tested soils were collected at a depth of 0–30 cm from a TM contaminated dredged sediment landfill site, located at Fresnes-sur-Escaut in the Hauts-de-France region (France, 50°25'47.9"N 3°35'07.8"E). Due to a deposit of approximately 200 000 m<sup>3</sup> of silt and sand from the dredging of the canal de l'Escaut, the surface horizons (0-50 cm) of soil have been heterogeneously enriched with As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn, depending on the amount of received sediments. For the present study, soils from the high trace-metal (HTM) and low trace-metal (LTM) areas were collected in November 2016. The physico-chemical characteristics, total concentrations of trace and major elements of these two topsoils have been described in detail in a previous study (Phanthavongsa et al., 2017). Briefly, the HTM area had mean soil concentrations of Zn (2231 mg/kg), Pb (425 mg/kg), Cu (108 mg/kg) and Cd (63 mg/kg), 20-, 9-, 4- and 100-fold higher than the LTM area, respectively. After collection, soils from each location were air dried at ambient temperature (20°C), sieved at 5-mm and mixed in order to homogenise the contaminants. Substrate subsamples for both the LTM- and HTM-soil were then collected for further analysis.

The tested plants included young poplar plants of the 717-1B4 cultivar obtained from a nursery stock from the University de Lorraine (France), and a native stinging nettles (*Urtica dioica* L.) collected from the sediment landfill located at Fresnes-sur-Escaut. Before transplantation, the young poplar plants were acclimated for about 1-month in a growth chamber and the nettles were vegetatively propagated using roots fragments (at least 3-mm diameter and 1-cm length with one node), in a loam substrate.

#### ***Experimental design***

For this study, we selected four treatments: i) monoculture of nettle (“N”), ii) monoculture of poplar (“P”), iii) co-culture poplar nettle with a low density of nettle (“PN”) and iv) co-culture poplar nettle with a high density of nettle (“PNN”), which were tested for the LTM soil (“L\_”) and HTM soil (“H\_”). For each treatment and type of substrate, seven replicates were considered. For this, each plastic pot of 1.5-L was loaded with approximately 700g of the LTM soil or HTM soil. Both poplars and nettles were planted after clearing the roots to ensure root contact with the new substrate. The “PN” treatment was obtained by planting only one plant of nettle, while three plants were planted for the “PNN” treatment. The seven pots from a same treatment were placed in a saucer, watered once a week with 2-L of tap water. The plants were cultivated in a growth chamber at the laboratory with climatic conditions as follows: daylight for 16h (250–300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), day temperature of 22 °C, night temperature of 18 °C, and day and night humidity of 30%.

### ***Height and photosynthesis measures***

The height of poplar trunks were measured every two weeks. The analyses of PSII activity in photosynthesis were conducted on both poplar and nettle leaves using a (MINI- PAM, Walz, Effeltrich, Germany). For that, we measured, in the dark, the  $F_v/F_m$  ( $F_v = F_m - F_o$ ) value ( $F_o$  and  $F_m$  are the minimum and maximum values of chlorophyll fluorescence of dark-adapted leaves, respectively), after at least 1-hr of obscurity. For each plant, measurements of  $F_v/F_m$  were made on four leaves, taken randomly on the first four floors from the apical zone. The  $F_v/F_m$  value have been shown as a reliable marker of photo- inhibition that could be linked to several stressors (Krause et al., 1988). The photosynthetic yields of poplar and nettle leaves were estimated using a MINI-PAM fluorimeter. The plants were placed in the dark at least 30 minutes before the start of the measurements in order to ensure that the activity of the photoreceptors is set to zero. For each plant, measurements were made on four leaves, taken randomly on the first four floors from the apical zone. From incident radiation, the device was used to estimate the photosynthetic yield ( $F_v/F_m$ ) of the IEHP photoreceptor, which provides information on the physiological condition of plants.

### ***Biomass measurements***

After 110 days of cultivation, plant biomass data were collected by extracting them from the pots. For the treatments with co-cultures, the tangled roots of each plants were carefully separated. Rhizospheric soil samples were then collected by shaking whole plants and collecting the soil attached to the roots, followed by homogeneous mixing. The different parts of poplar plants were then separated in roots, stems and leaves and washed as following i) washing with tap water, ii) bath with de-ionized water, iii) bath with de-ionized water and ultrasons treatment and finally iv) de-ionized water rinse. The same treatment have been carried out on the aerial and root samples of nettles. A known weight of fresh roots samples of nettle and poplars were stocked for microscopic observation of endophytic and ectomycorrhizal fungi. Soil, roots, stem and leaves were then ice-dried. Once dried, samples were carefully weighted using a NewClassic MS analytical balance (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Switzerland). Finally, samples were stored at ambient temperature for further analyses. A known weight of fresh root samples of nettles and poplars were stored in glycerol for microscopic observation of endophytic and ectomycorrhizal fungi.

### ***Soil and plants TE analyses***

Soil samples were manually homogenized and sieved to <4 mm. The total concentrations of TM (*i.e.*, Cd, Pb, Cu, Zn) and major elements (*i.e.*, Mg, Ca, Na, K) in the soil were measured following the acid digestion of 500 mg of sample (DigiPREP system, SCP Sciences, Courtaboeuf, France) using a mix of 2 mL of 67% nitric acid, 6 mL of 34% hydrochloric acid and 2 mL of 48%



hydrofluoric acid. CaCl<sub>2</sub>-extractable fractions of elements were determined in soil samples after shaking 2.5g of dried soil in 25 ml of a 0.01 M solution of CaCl<sub>2</sub> during 3 hr (140 g.min<sup>-1</sup>). The soil mixtures were filtered on filtration units at 0.45 µm (Millipore). Eluates were acidified to a pH < 2 for preservation. Soil pH were measured following the NF ISO 10390 (2005) standard. Five grams of sieved sample were shaken with 25 mL of distilled water for 1 hr, then left to rest for 1 hr. The pH was measured under constant stirring.

Before analyses, dried plant samples were ground into a homogenous powder in a MM40 Mixer Mill (Retsch, Eragny sur Oise, France) at 30 Hz during 3, 5 and 7 minutes for leaves, roots and stems, respectively. For each sample, between 50 and 100 mg of plant material were digested using concentrated between 1.75 and 3.5 mL of HNO<sub>3</sub> and 1 and 2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DigiPREP system), depending on the mass of sample. The digested samples were filtered to < 1 µm (Millipore) and acidified to a pH < 2 for preservation. TE in plant and soil samples were analyzed using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Thermo Fischer Scientific, Inc., Pittsburgh, USA). All samples were run together with certified reference materials, including oriental basma tobacco leaves (LGC Promochem, Molsheim, France) and brush and leaves (LGC Promochem, Molsheim, France). The percentage of recovery of the studied elements ranged between 87 and 112%. All the results were expressed as µg/kg of the dry weight (DW).

#### ***Estimation of the fungal colonization of roots***

Seven samples from the L-P, L-PNN, H-P and H-PNN treatments that were stored fresh were used for the determination of the EM and DSE fungal colonization. For each treatment, the extent of EM fungal colonization was estimated by counting the percentage of short roots with EM fungal structure (number of root apex with EM fungal structure / total number of root apex x100) on at least 100 apex of randomized fine roots of poplar, using a binocular microscope.

For endophytic fungi, fresh fine roots of poplar and nettle were cleared and stained to the protocol proposer by [Trouvelot et al. \(1986\)](#) . Briefly, roots were autoclaved with 10% KOH for 3-min at 110°C, then KOH have been neutralized using a 1% HCl solution. Finally, roots were strained with Trypan blue for 12-hr and stocked in glycerol. Strained roots were cut into segments of 1-cm and, for each sample, 30 1-cm segments were placed on slides. Roots were then observed with the 10x objective of a microscope and each 1-mm segment assessed separately. The length of each root and the number of 1-mm segments of that root containing fungal structures (i.e., internal hyphae, arbuscules, vesicles) were recorded. The presence of DSE was estimated by determining the frequency of brown/dark microsclerotia (melanised fungal structures) within cells. Another endophytic fungus from the *Olpidium* genus was characterized by specific zoospores (Figure 2, B).

From these informations, the intensity of the fungal colonization (M%) was calculated for each sample using the MycoCalc software.

### ***Statistical analyses***

Statistical analyses were performed with R software v.3.5.1 (R Development Core Team, 2013). All the considered variables were checked for their homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro–Wilk test). Non-normal data were log transformed. Data that did not fit a normal distribution after transformation were analyzed with nonparametrical tests. All statistical tests were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

For each plant, the influence of the level of soil contamination and the co-cropping effect were investigated for i) growth parameters, ii) enzymatic activities and biochemical analyses and iii) soil TM concentration ( $\text{CaCl}_2$  extractable) using ANOVA followed by a Tukey HSD test or Kruskal-Wallis post hoc tests, depending on the normality. For each plant and each level of soil contamination, the co-cropping effect was investigated on the TM concentrations of each plant organs using ANOVA followed by a Tukey HSD test or Kruskal-Wallis post hoc tests, depending on the normality. The co-cropping effect was investigated by comparing the i) DSE colonization (poplar and nettle), ii) *Olpidium* colonization (poplar and nettle) and the iii) EM fungal colonization (poplar) by comparing the co-culture treatments (PN and PNN) with the monoculture treatments (N or P) through a Student or Wilcoxon test depending on the normality.

## 2.2.4 Résultats

### *Effect of contamination and co-cropping on plants growth and photosynthesis efficiency*

The biomass data showed that poplars were more impacted by the contamination than the presence of nettle when co-cropped. The root biomass of poplar was significantly ( $P < 0.05$ ) reduced when grown alone (40%) or with nettle (PNN treatment) (50%) in the HTM soil (Table 1). On the contrary, the level of contamination did not influence the aerial biomass. Consequently, the aerial / root ratio were significantly ( $P < 0.05$ ) higher for poplar from the HTM soil (averages between 0.99 and 1.71) than those for poplar from the LTM area (averages between 0.63 and 0.68). The only influence of nettle on the poplar growth was detected for the height of the tree, which was reduced by 25% ( $P < 0.05$ ) when co-cropped with nettle (PNN treatment) (Table 1).

*Table 1. Growth (average  $\pm$  SD) of poplar (height, biomass, aerial/root ratio) and nettle (biomass, aerial/root ratio) depending on the level of contamination and the treatment (LTM soil: L\_P, L\_PN and L\_PNN ; HTM soil: H\_P, H\_PN and H\_PNN). Values designated with the same letters were not significantly different (Kruskal–Wallis or ANOVA tests,  $P < 0.05$ ).*

A.	Poplar						
	Modality	L_P	L_PN	L_PNN	H_P	H_PN	H_PNN
Height (cm)	19,39 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,6	17,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,34	17,72 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,69	21,01 <sup>a</sup> $\pm$ 3,84	16,77 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,61	15,49 <sup>b</sup> $\pm$ 2,33	
Roots (g. DW)	2.40 <sup>a</sup> $\pm$ 0.89	1.89 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.32	2,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.36	1.40 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.33	1.38 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.19	1.04 <sup>c</sup> $\pm$ 0.35	
Aerial (g. DW)	1.41 <sup>a</sup> $\pm$ 0.33	1.22 <sup>a</sup> $\pm$ 0.34	1.37 <sup>a</sup> $\pm$ 0.34	1.46 <sup>a</sup> $\pm$ 0.35	1.35 <sup>a</sup> $\pm$ 0.20	1.22 <sup>a</sup> $\pm$ 0.35	
Total biomass (g. DW)	3.82 <sup>a</sup> $\pm$ 1.21	3.11 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.64	3,38 <sup>a</sup> $\pm$ 0,68	2.86 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.64	2.73 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.29	2.26 <sup>b</sup> $\pm$ 0.16	
Aerial/roots	0.63 <sup>b</sup> $\pm$ 0.15	0.64 <sup>b</sup> $\pm$ 0.10	0.68 <sup>b</sup> $\pm$ 0.08	1.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16	0.99 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18	1.71 <sup>a</sup> $\pm$ 1.97	
B.	Nettle						
	Modality	L_N	L_PN	L_PNN	H_N	H_PN	H_PNN
Aerial (g. DW)	0.55 <sup>a</sup> $\pm$ 0.15	0.05 <sup>b</sup> $\pm$ 0.03	0.18 <sup>b</sup> $\pm$ 0.16	0.84 <sup>a</sup> $\pm$ 0.29	0.08 <sup>b</sup> $\pm$ 0.03	0.15 <sup>b</sup> $\pm$ 0.11	
Roots (g. DW)	1.08 <sup>a</sup> $\pm$ 0.46	0.21 <sup>c</sup> $\pm$ 0.04	0.88 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.48	1.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.48	0.23 <sup>c</sup> $\pm$ 0.10	0.49 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.34	
Total biomass (g. DW)	1.63 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.49	0.26 <sup>d</sup> $\pm$ 0.06	1.06 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.63	2.11 <sup>a</sup> $\pm$ 0.56	0.31 <sup>d</sup> $\pm$ 0.10	0.64 <sup>cd</sup> $\pm$ 0.44	
Aerial/roots	0.64 <sup>a</sup> $\pm$ 0.51	0.24 <sup>b</sup> $\pm$ 0.13	0.19 <sup>b</sup> $\pm$ 0.10	0.65 <sup>a</sup> $\pm$ 0.17	0.39 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.21	0.44 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.45	

These slight differences in term of biomasses and height for poplar were not corroborated by the results from the photosynthetic yield of poplar leaves based on the Fv/Fm ratio of the PSII, providing information on the physiological condition of plants. With average Fv/Fm values in the

range 800 to 830, no particular stresses due to the co-cropping or the level of contamination were detected (Figure 1).

Our results clearly indicated that the level of contamination did not influence the development of nettles, but that the latter was significantly impacted by the presence of poplar. Significant reduction of both the aerial parts (78% for LTM soil and 86% for HTM) and the roots (50% for LTM soil and 82% for HTM) of nettle were detected when co-cropped with poplar. The reduction was more pronounced for the aerial part of nettle, leading to a aerial/root ratio significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the presence of poplar (Table 1).

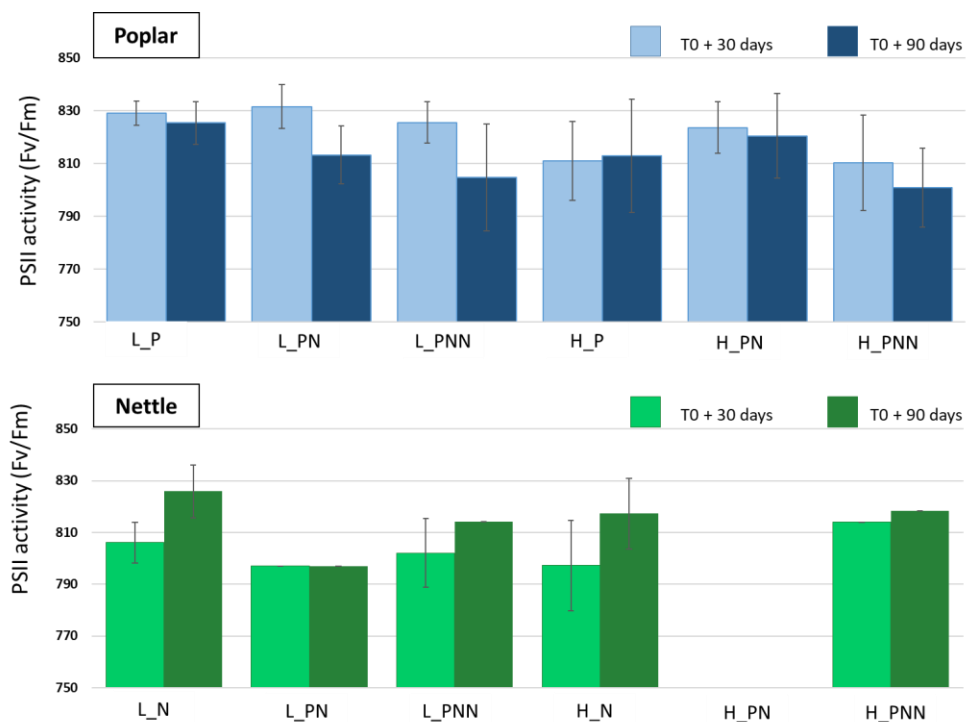


Figure 1. Photosynthetic yield of poplar leaves based of the photosynthetic yield ( $Fv/Fm$ ) of the PSII, providing information on the physiological condition of plants. Measures were made at T0 + 30 days and T0 + 90 days. Nettle leaves from the H\_PN treatment were not sufficiently developed to measure the  $Fv/Fm$  ratio.

### ***Effect of co-planting on fungal-symbiosis***

According to our results, EM fungi were clearly the most abundant group of fungi colonising the roots of poplar, with a mean intensity of colonisation of 53%. *Olpidium* and DSE presented a mean intensity of colonisation of 17% and 3%, respectively. No EM fungal structures were observed on nettle roots but we recorded *Olpidium* (5%) and DSE (6%) into root cells (Figure 2).

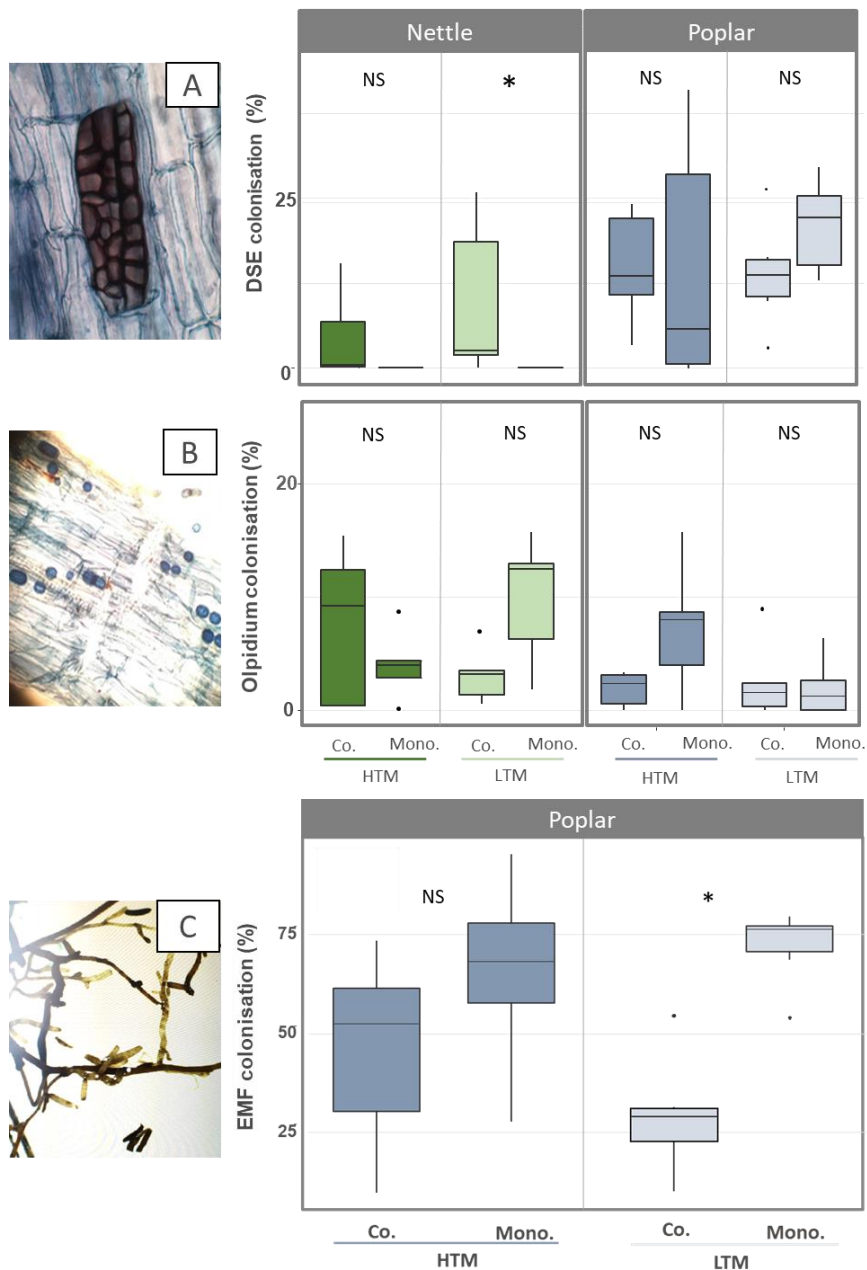


Figure 2. Co-cropping effect on i) DSE colonisation (%; A), ii) Olpidium colonisation (%; B) of poplar and nettle roots and on iii) EMF fungal colonisation (%) of the poplar roots.

We did not detect any influence of the level of soil contamination in the fungal colonisation of nettle and poplar. However, a significant ( $P < 0.05$ ) reduction of the poplar EM fungi when co-cropped with nettle was highlighted. This observation was more pronounced for the LTM soil, where the percentage of EMF dropped from  $72.1 \pm 8.7$  to  $28.7 \pm 13.6$  ( $P < 0.05$ ) when poplar was co-cropped with nettles. Interestingly, we identified a clear co-cropping effect on the percentage of colonisation of nettle roots by DSE. Indeed, for nettle grown alone, we only detected one or two brown/dark microsclerotia within cells by sample, and only for 40% of them. Consequently, the percentage of colonisation did not exceed 0.11%. In contrast, when co-cropped, this percentage

ranged between 0.03 and 25.9%, averaging at  $4.6 \pm 6.7$  for HTM and  $13.5 \pm 10.7$  for LTM soils. Due to the high standard deviations presented above, the increase in nettle-associated DSE in the case of co-cropping were only significantly confirmed for the LTM soil ( $P < 0.05$ ).

### ***Bioavailability of soil TE and effect of co-cropping***

With pH ranging from 6.2 to 6.8 for all the treatments, we did not noticed any differences related to the soil or the modality of culture. The concentrations of bioavailable nutrients and TM were higher in the HTM soil compared to the LTM soil, but the differences were slight compared to those for the total fraction (material & methods section). More precisely, the bioavailable fractions of Cu and Pb were comparable for the two soils whereas higher ( $P < 0.05$ ) concentrations of bioavailable Cd (x2) and Zn (x7) were measured in the HTM soil compared to the LTM soil, which could be related with the higher total concentrations. Concerning nutrients, the bioavailable Na concentrations were comparable between the two soils. Higher concentrations of Mg (x1.2), Ca (x1.2) and K (x2) were also detected in the HTM soil compared to the LTM soil ( $P < 0.05$ ). When comparing with the initial (T0) concentration of bioavailable TM and nutrients, 120 days after, the bioavailable fraction of Cu and Mg increased while K decreased (Figure 3, yellow lines). Zn and Cd were overall comparable and Na and Pb were not detected in the initial soil.

The bioavailable TM and nutrients in the soil (Figure 3) seemed not to be influenced by any treatment. Indeed, the obtained results did not allowed us to detect any influence related to the co-cropping of nettle and poplar on the bioavailable concentrations of the studied nutrients and TM.

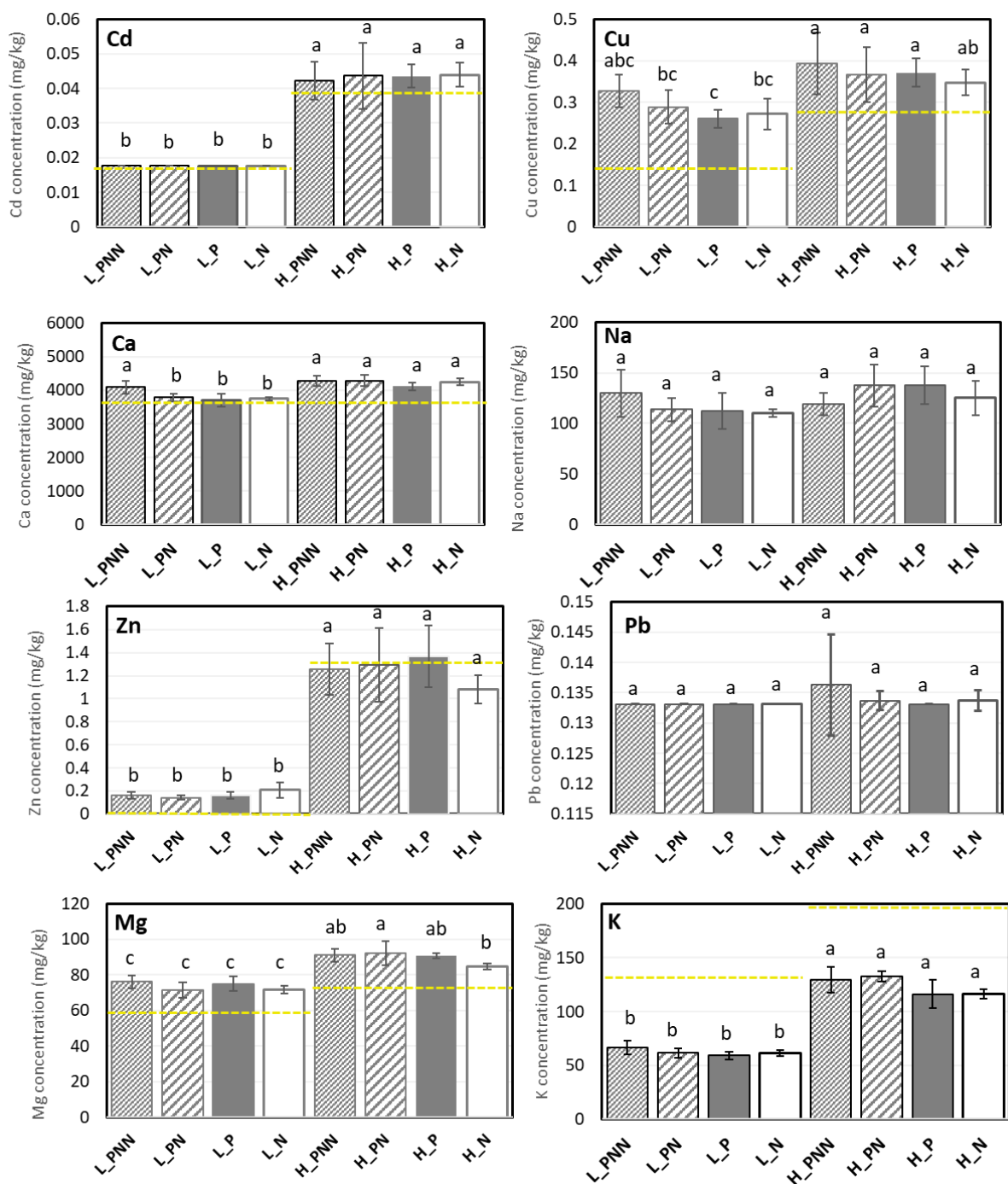


Figure 3. Bioavailable ( $\text{CaCl}_2$  extractable) concentrations (mean  $\pm$  SD, mg/kg) of TM (i.e., Cd, Cu, Zn, Pb) and nutrients (i.e., Mg, Ca, K, Na) in the LTM (i.e., L\_PNN, L\_PN, L\_P, L\_N) and HTM (i.e., H\_PNN, H\_PN, H\_P, H\_N) soils at the end of the experiment. The yellow lines indicated the initial concentration ( $T_0$ ) of bioavailable TE. The bars designated with the same letters were not significantly different (Kruskal–Wallis or ANOVA tests,  $P < 0.05$ ).

### Effect of co-planting on the uptake and accumulation of TM

Without taking into account the organs, nettle tended to accumulate much less TM than poplar. More precisely, the concentrations of Cd (x0.24), Cu (x0.69), Zn (x0.20), Pb (x0.78) were lower in nettle than in poplar. Our results demonstrated that nettles only accumulated Cd, Cu, Pb,

Zn in their roots whatever the level of soil contamination ( $P < 0.05$ ) (Figure 4). Indeed, in the HTM soil, the concentrations in roots were significantly higher than those in leaves for Cd (x153), Cu (x16), Zn (x9) and Pb (x36).

Concerning poplar, results were more contrasted, depending on the TM. Cu and Pb were only accumulated in roots, as already observed for nettle, whereas comparable concentrations of Cd were measured in leaves, roots and stems of poplar (averages from 9.2 to 27.7 mg/kg). In addition, Zn was significantly more accumulated in poplar leaves ( $P < 0.05$ ), with high concentrations for the two soils (averages 1452 mg/kg for HTM and 1152 mg/kg for LTM). In each organ where TM were accumulated, the concentrations were lower in the LTM soil compared to the HTM soil (Figure 4).

The concentrations of Cd, Cu, Zn and Pb in nettle roots were significantly higher when nettle was cultivated alone ( $P < 0.05$  for LTM soil). More precisely, Cd, Cu, Zn and Pb decreased by 84%, 60%, 74% and 66%, respectively. A similar trend was observed for HTM soil, however, the large standard deviations did not enabled to statistically confirm this tendency. Moreover, no similar impact of co-cropping in term of TM concentration was detected in the nettle leaves and stems. These results could be linked to the poplar capacity to accumulate higher concentrations of TM than nettle.



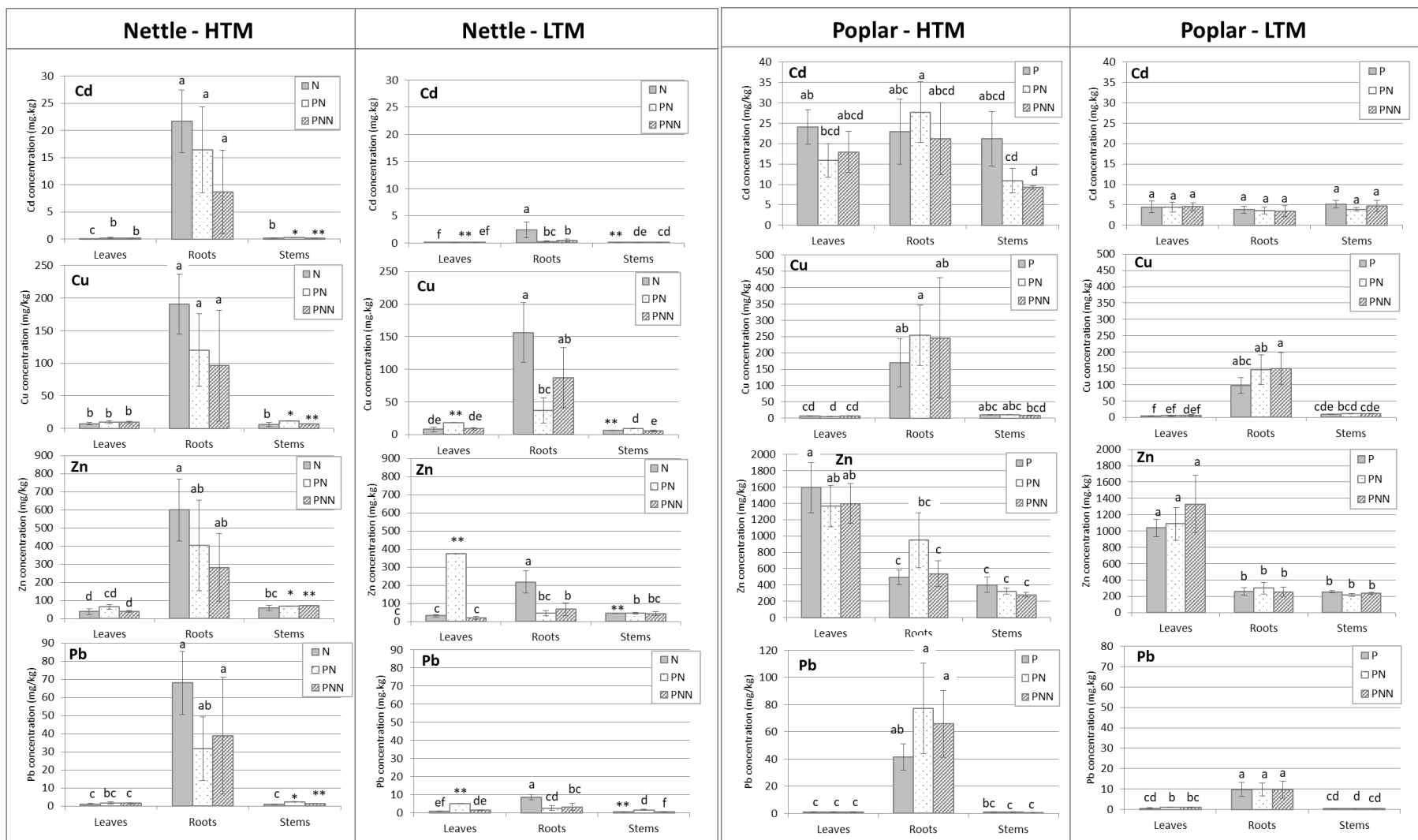


Figure 4. Concentrations (mean  $\pm$  SD, mg/kg) of TM (i.e., Cd, Cu, Zn, Pb) in the tissues of nettle and poplar (i.e., roots, stem, leaves) grown in the LTM (i.e., L\_PNN, L\_PN, L\_P, L\_N) and HTM (i.e., H\_PNN, H\_PN, H\_P, H\_N) soils. Bars designated with the same letters were not significantly different (Kruskal–Wallis or ANOVA tests,  $P < 0.05$ ).

### Effect of co-planting on the nutrients content

For both nettles and poplars, the plant tissues had comparable nutrients concentrations when grown in the LTM or HTM soil. Nettles exhibited higher concentration than poplars for all the nutrients, and more precisely for Mg (x2), K(x2), Na (x12), Ca (x2) and P (x2) (Figure 5). However, this greater capacity for the uptake and accumulation of nutrients for nettle did not induced any reduction in the bioavailable fraction of these nutrients in the soil where nettles grew (Figure 3). All of the nutrients except Na (mainly accumulated in poplar roots compared to other tissues,  $P < 0.05$  for the two soil) were equally distributed between leaves, stems and roots, whatever the plant. However, Mg and K tended to be preferentially concentrated in the leaves. Additionally, Na and Ca seemed to be more recovered in nettle tissues when co-cropped with poplar ( $P < 0.05$  for nettle leaves and roots grown in the LTM soil).

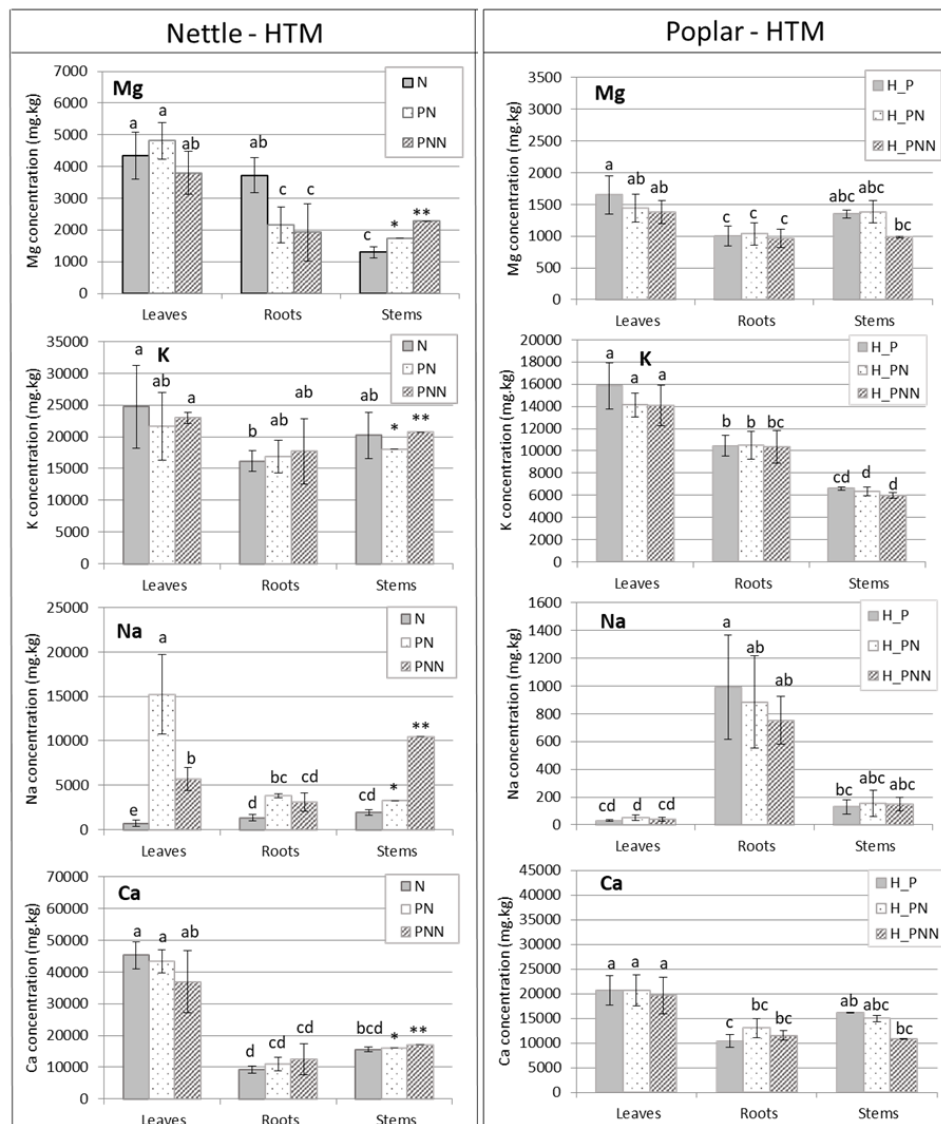


Figure 5. Concentrations (mean  $\pm$  SD, mg/kg) of nutrients (i.e., Mg, K, Na, Ca) in the tissues of nettle and poplar (i.e., roots, stem, leaves) grown in the HTM (i.e., H\_PNN, H\_PN, H\_P, H\_N). Bars designated with the same letters were not significantly different (Kruskal–Wallis or ANOVA tests,  $P < 0.05$ ).

### 2.2.5 Discussion et conclusion

In the present mesocosm study, when co-cropped, interactions between the two plants were overestimated due to the limited growth space, as compared to natural conditions. This phenomenon lead to an overestimation of subsequent effect linked with co-cropping such as i) modification of biomass production and allocation (Zu et al., 2017), ii) competition for nutrients, iii) production of organic acids by underground root interactions, which contributes to nutrient element uptake and utilization (Desjardins et al., 2018), iv) modification of uptake and translocation of TM (Zeng et al., 2019a) and v) modification of rhizospheric microbial community structure (Gao et al., 2010; Ma et al., 2017; Zeng et al., 2019b).

Poplar seemed to be well adapted to the co-cropping system under the tested TM-contaminated soils as its biomass production was not significantly reduced in the presence of nettle. Indeed, in the co-planting system, the only negative effect detected on the poplars growth was related to poplar height. As *in-situ* plantations often used more mature plants, the latter phenomenon would probably not happen. On the contrary, the presence of poplars in the studied mesocosm conditions significantly affected the development of nettle, which mainly resulted in an increase of belowground tissues production. We did not notice any positive impact of the co-cropping system (*e.g.*, improvement of root length and root surface area) on nettle or poplar, as has been demonstrated in previous studies (Zeng et al., 2019a; Zu et al., 2017).

Additionally, we detected higher nutrient concentrations in nettle leaves as compared to poplar leaves. These concentrations in nettle leaves also tended to be higher when poplars were co-cropped. Thus, the detrimental effect of poplar on nettle development seemed not to be linked to nutrient competition.

The bioavailable fraction of TM in the soils as well as the uptake and accumulation potential of TM by poplar were not influenced by the presence of nettle, which could be linked to the comparable pH between treatments. The uptake of TM by nettle was low as compared with poplar, with physiological levels of Cu and Zn in leaves, whatever the bioavailable concentrations in the soil solution. Indeed, TM were exclusively accumulated in the belowground tissues of nettle, with very low translocation factors. These results clearly suggested that nettles would be suitable candidates for the phytostabilisation of Cd, Pb, Cu and Zn, and particularly for the first 20 cm of soil because of their dense root systems. Additionally, we observed a significant reduction of TM uptake by nettles when associated with poplar. This result could be linked to the higher TM uptake by poplar, as compared to nettle.

As we observed significant influence of co-cropping on the root-associated fungal communities, the rhizospheric interface appeared to be the site of complex interactions between

plants and fungi. Although the observed reduction of EM colonisation of poplar roots in the presence of nettle could be determined by poplar itself, this is more likely due to a detrimental effect of nettle on these fungal communities. Indeed, a similar influence of nettle has already been demonstrated on the colonisation of *Pisum sativum* by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Fontenla et al., 1999). Since EM fungi play crucial roles in plant nutrition, metal uptake, accumulation or restriction in plants (Smith and Read, 2010), it would be necessary to investigate more precisely the relation between the EM colonization rates of poplar roots and the above factors.

Interestingly, for DSE fungi, which are also known to be involved in the plant nutrition and their tolerance to TM (Berthelot et al., 2016, 2019), a contrasted phenomenon was observed. These fungi (as hyphae or microsclerota) were only detected in nettle roots when poplars, which exhibited a significantly higher colonisation rate, were co-cropped. As the development of nettle seemed to be impacted by the presence of poplar, developing these symbioses could be a response of nettle to better adapt to stress.

Overall, according to our results, co-cropping nettle and poplar at TM contaminated site seemed to be suitable in a context of phytostabilisation. However, the reciprocal impacts of plants on the fungal communities need to be more accurately assessed, as mycorrhizal symbiosis are essential for the growth and tolerance of plants to TM.



## 2.3 Influence de la contamination sur les micro-organismes fongiques de l'agrosystème

### 2.3.1 Préambule

La section 2.3 a pour objectif de caractériser les communautés fongiques associées aux racines d'ortie et de peuplier et d'évaluer l'impact des ETM sur la structure de ces dernières, par une approche de barcoding environnemental à partir d'échantillons de racines issus de la parcelle de Fresnes-sur-Escaut. Les sections suivantes présenteront d'abord le contexte et la démarche de cette étude, puis développeront plus en détail la méthode de barcoding environnemental utilisée pour caractériser ces communautés fongiques.

*Les résultats de recherche obtenus sont présentés sous la forme d'un article dans la section 2.3.5.*

### 2.3.2 Contexte

Dans le cadre de la synthèse bibliographique, l'importance des micro-organismes du sol et notamment des champignons en tant qu'auxiliaires des plantes, favorisant leur développement et leur tolérance aux ETM dans des contextes de phytomanagement, a pu être mise en avant. Bien que le microbiome du peuplier ait été largement étudié, celui de l'ortie n'a fait l'objet que de peu d'études (voir section 1.4.8.2). De plus, des propriétés antifongiques empêchant le développement du champignon mycorhizien *Glomus mosseae* et pouvant même impacter les symbioses fongiques des plantes voisines, ont été attribuées aux racines d'orties. Dans un contexte de co-culture de ces deux plantes, il semble primordial de caractériser taxonomiquement et fonctionnellement le microbiome fongique associé à l'ortie et d'appréhender son impact potentiel sur celui du peuplier.

### 2.3.3 Démarche

N'ayant que très peu de recul sur les communautés fongiques associées à l'ortie, en tant que première approche il semblait nécessaire d'adopter une méthode globale, permettant d'appréhender l'ensemble de la structure des communautés fongiques. C'est pourquoi la méthode du barcoding environnemental a été sélectionnée. Nous avons également fait le choix de considérer à la fois les communautés épiphytes (*i.e.*, localisées à la surface des racines) et les communautés endophytes (*i.e.*, localisées à l'intérieur des racines) dans un souci d'étude globale.

### 2.3.4 Caractérisation des communautés fongiques par barcoding environnemental

Le barcoding est une approche moléculaire permettant d'identifier les organismes à partir de leur ADN présent dans un échantillon environnemental. Cet ADNe (ADN environnemental) est un mélange complexe d'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique qui peut être intracellulaire ou extracellulaire et appartenant à divers organismes vivants (*e.g.*, champignons, bactéries, plantes, animaux, etc.). Cet ADNe peut être extrait de l'eau, du sol, de sédiments ou d'autres matrices que l'on souhaite analyser. Ensuite, à partir de cet ADNe extrait, une région de l'ADN codante ou non, appelée marqueur moléculaire, sera amplifiée, dépendant des organismes que l'on souhaite étudier. Dans notre cas, le marqueur moléculaire sélectionné est la région intergénique ITS (Internal Transcribed Spacer) et plus précisément la région ITS1 encadrant les gènes ribosomiaux 18S et 5,8S (Figure 30). Ce marqueur constituera donc le « code barre » moléculaire pour la future identification des communautés fongiques associées aux racines d'ortie et de peuplier.

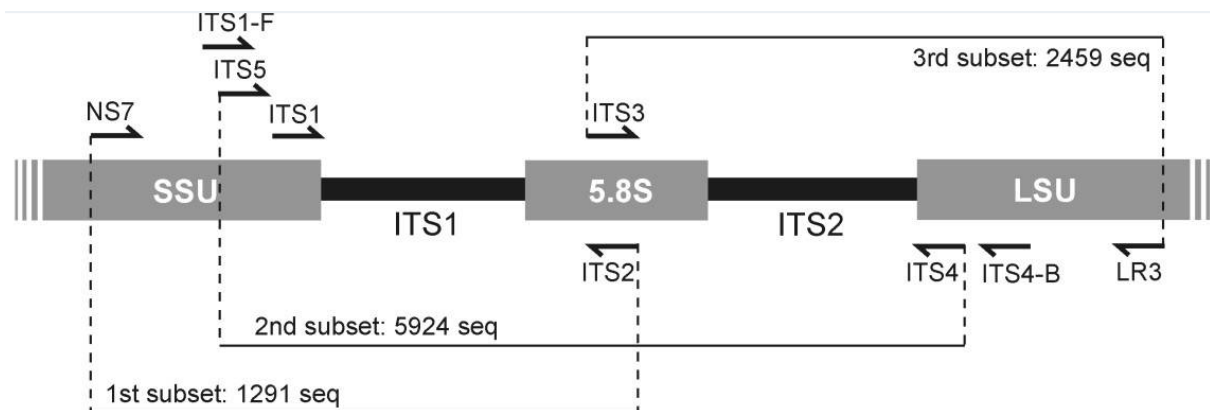


Figure 30. Détail du fragment amplifié ITS1 au sein de l'ADN ribosomique de champignon avec la position relative des amorces, nombre de séquences de chaque sous-unité déjà disponibles dans les bases de données (Bellemain et al., 2010).

Ce marqueur moléculaire est très utilisé pour l'étude taxonomique de communautés fongiques de par sa forte variabilité au sein des espèces. De plus, l'amplification de ce fragment produit des amplicons d'environ 300 pb adaptés pour un séquençage haut débit (Wang et al., 2015). Ensuite, les dernières étapes de cette méthode de barcoding sont le séquençage des produits PCR obtenus grâce à l'utilisation de la technologie NGS (séquençage nouvelle génération) et des analyses bio-informatiques afin d'obtenir des données exploitables, à partir de données brutes issues du séquençage.

#### 2.3.4.1 *Échantillonnage des racines de végétaux*

Cette étude a été réalisée à partir d'échantillons *in-situ* issus de la parcelle de Fresnes-sur-Escaut. Pour chacune des 4 placettes, 9 arbres ont été sélectionnés aléatoirement (Figure 29). Les traitements étudiés sont ceux présentés dans la section 2.1.3. Pour chacun des arbres considérés, des racines de peuplier et d'orties adjacentes ont été prélevés en novembre 2016. Les racines fines de l'ortie ont été séparées des rhizomes. L'ensemble de ces échantillons ont été minutieusement lavés à l'eau distillée, lyophilisés et broyés pour être ensuite aliquotés et conservés à 20°C.

#### 2.3.4.2 *Méthode moléculaire employée*

Les échantillons de racines ont été broyés à l'aide d'un broyeur à billes de tungstène (Retsch Inc. Modèle MM400) afin de réaliser une première lyse mécanique cellulaire. L'extraction de l'ADNe a été réalisée à l'aide du kit PowerSoil® (MOBIO, Inc., Carlsbad, CA USA), connu pour son efficacité à éliminer les inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons de racines, notamment les polysaccharides et les acides humiques. Ainsi l'ADNe total des racines de chaque échantillon a été isolé puis purifié en suivant un protocole standard recommandé, puis conservé à 4°C jusqu'à l'étape d'amplifications par PCR.

Un fragment d'environ 400 paires de base (pb) comprenant la fin de la sous unité ribosomique 18S, la région ITS1 et le début de la sous unité 5,8S a été amplifié lors d'une première PCR avec le couple d'amorces spécifiques ITS1-F (5'-TCG TCG GCA GCG GCG TCA GAT GAT GTG TAT AAG AGA CAG CTT GGT CAT TTA GAG GAA GAA GTA A) et ITS2 (5'-GTC TCG TGGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGC GTT CTT CAT CGA TGC) (Figure 30). Les amplifications ont été effectuées dans un volume total de 25µL contenant 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTPs, 0.5µM d'amorces, une unité de Phire Green Hot Start Polymérase (ThermoFisher Scientific) et 8.75 µl d'extrait d'ADN fongique. Pour chaque PCR, un témoin positif et négatif sont ajoutés pour vérifier la qualité de nos produits d'amplification et de la PCR. Les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Bio Rad T100™ Thermal Cycler, débutant par un cycle de dénaturation de 30sec à 98°C suivi de 35 cycles de 5s à 98°C pour la dénaturation ; 5s à 57,2°C pour l'hybridation ; 15s à 72°C pour la phase d'élongation, puis un cycle de 1min à 72°C d'élongation supplémentaire. Les amplifications ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% associé à de l'Ez-Vision pendant 50 min sous un courant de 100V. La visualisation de l'ADN est réalisée grâce au visualiseur Gel doc EZ imager (Biorad) (Figure 31).



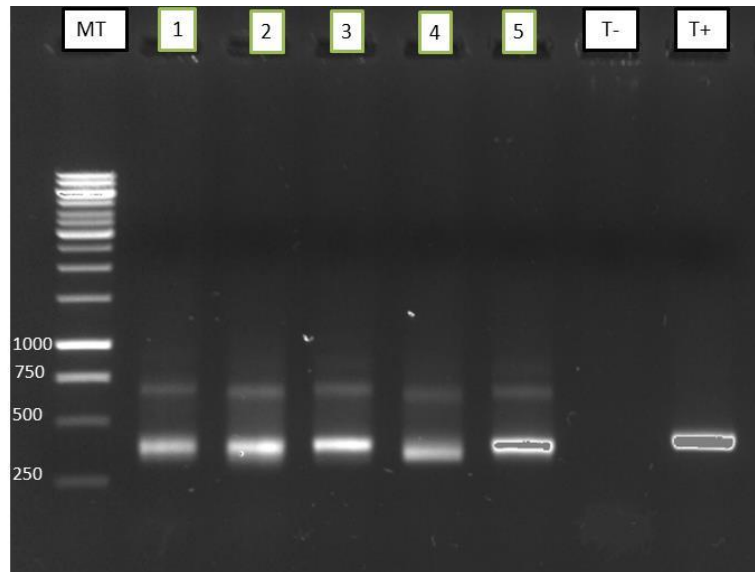


Figure 31. Photographie d'un gel d'électrophorèse après migration. Présence du marqueur de taille (MT) sur la gauche, suivi de 5 échantillons différents puis du témoin négatif (T-) et du témoin positif contenant de l'ADN de champignons (T+).

Les concentrations des amplicons ont ensuite été calculées à l'aide du logiciel Image Lab ou au Qbit 3 fluorometer. Selon le protocole du prestataire qui réalise le séquençage (Microsynth, Suisse), la quantité d'ADN doit être supérieure à 5 ng/μl. Une fois cette concentration minimale validée dans tous les échantillons, une seconde PCR a été effectuée en ajustant le nombre de cycles à 25 selon les conditions de Microsynth. Les produits PCR ont ensuite été envoyés pour séquençage.

#### 2.3.4.3 Analyses bio-informatiques

Les analyses bio-informatiques des données générées par le séquençage haut débit ont été traitées à l'aide de la plateforme GALAXY (<https://galaxyproject.org/>) en utilisant la suite d'analyse Mothur. Les résumés (« résumé.1, .2, .3, .4 ») présents dans la Figure 32, permettent de suivre l'évolution de différents paramètres des séquences après chaque étape de traitement.

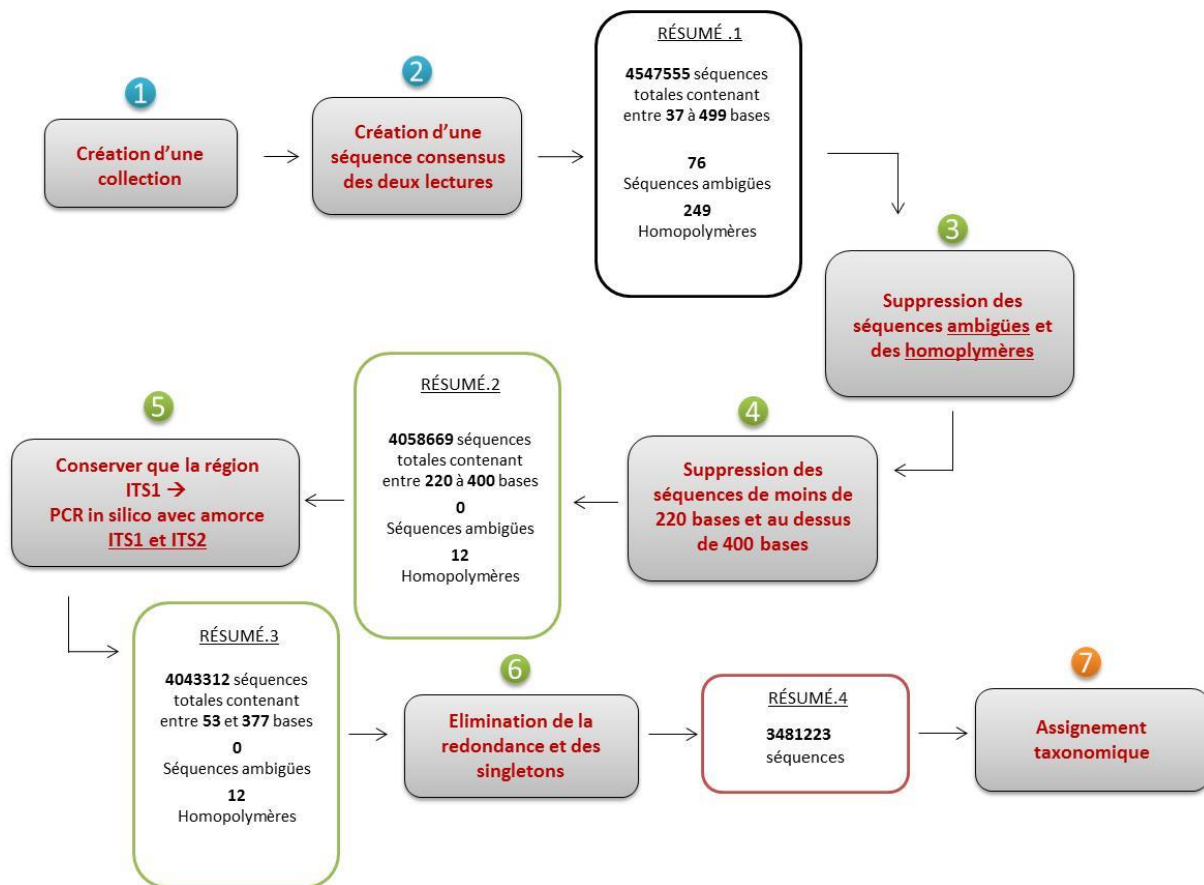


Figure 32. Schéma récapitulatif des différentes étapes de traitement des données générées par le séquençage haut débit. Les étapes colorées avec des numéros bleus sont les étapes d'assemblage, suivi des étapes de nettoyage et de filtration en vert et de l'assignement taxonomique en orange.

Lors du séquençage haut débit, le fragment d'ADN d'intérêt est lu dans les deux sens 5'3' (forward R1) et 3'5' (reverse R2). La première étape est de créer une collection (1) de ces deux lectures (R1 et R2) pour les 54 échantillons. Une fois que la collection est créée pour chaque échantillon, une séquence consensus de ces deux lectures est ensuite réalisée pour chaque échantillon (2). Il s'en suit plusieurs étapes de filtration des données. Tout d'abord, les bases ambiguës et les homopolymères sont retirées (3), mais à un certain seuil (plus de 12 homopolymères), car il peut exister des homopolymères au sein des séquences d'intérêt. L'étape suivante est la suppression des séquences faisant moins de 220 bases et plus de 400 bases (4) car nous voulons conserver que la région d'intérêt ITS1 comprise dans cet intervalle. De plus, pour n'étudier que l'ITS1 une PCR informatique est effectuée (5) en utilisant l'amorce ITS1 à la place de ITS1F. Les fragments comprenant moins de 220 bases sont une nouvelle fois retirés. L'ADN d'une même espèce va se retrouver en un grand nombre de copies, il est donc important d'éliminer cette redondance en ne gardant que des séquences uniques (6). Les séquences lues qu'une seule fois, appelées singletons, sont retirées du le jeu de données (6) car elles sont potentiellement dues

à des erreurs de séquençage et peuvent surestimer le nombre d'espèces. Après ces six étapes de filtrations et nettoyage des données, la dernière étape consiste en l'assignement taxonomique (7) de nos séquences uniques. Pour ce faire, la base de données de référence UNITE contenant les séquences d'espèces connues de champignons a été utilisée (Kõljalg et al., 2013). Cet assignement donne une annotation taxonomique pour chaque séquence unique et ces dernières sont clustérisées dans des Operational Taxonomic Units (OTUs) défini à 97% de similarité. Cependant, un regroupement des séquences uniques identifiant une même unité taxonomique est effectué afin de pouvoir réaliser des analyses ultérieures de diversité. Pour aller plus loin, chaque OTUs qui a été identifiée est assignée à un groupe fonctionnel et morphologique en utilisant la base de données FUNguild (Nguyen et al., 2016). Pour chaque assignement, cet outil permet d'attribuer une catégorie fonctionnelle à chaque OTUs à partir du taxon identifié.

### 2.3.5 Présentation de l'article et des principaux résultats

Cet article, intitulé “ An unexpected mycorrhizal association identified in nettle roots when co-cropped with poplars at a trace-metal contaminated site ”, est actuellement en préparation.

Ces travaux visaient à caractériser les communautés fongiques associées aux racines d'ortie et de peuplier en co-culture *via* une approche par barcoding environnemental à partir d'échantillons prélevés sur la parcelle de Fresnes-sur-Escaut. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des communautés fongiques globalement contrastées entre l'ortie et le peuplier ainsi que des effets de la contamination du sol sur l'abondance de certains taxons. Le résultat marquant de cet article concerne la présence de champignons ectomycorhiziens associés aux racines d'orties (plante ne développant pas de structures mycorrhiziennes) et qui semblent liées à la présence du peuplier.

Dans le cadre de cette étude, je me suis chargé des prélèvements, du conditionnement des échantillons ainsi que des premières étapes visant à confirmer que l'extraction et l'amplification d'ADNe étaient possibles à partir des échantillons de racine d'ortie et de peuplier. Les étapes d'extraction d'ADN et d'optimisation des conditions PCR ont ensuite été réalisées par C. Zapellini, post-doctorant au LCE, impliqué dans le projet PHYTOFIBER. Une fois ces étapes maîtrisées, F. Tafforeau, dans le cadre d'un stage de Master 2 s'est chargé de traiter l'ensemble des échantillons (*e.g.*, amplification avec les conditions des séquençage, quantification des amplicons). Il s'est également chargé du traitement bio-informatique. Ces étapes moléculaires ont principalement été supervisées par C. Bertheau et M. Chalot. Quant à l'exploitation des données, il s'agit d'un travail collectif bien que les principaux contributeurs soient F. Tafforeau et moi-même. Enfin, je me suis chargé de la rédaction du manuscrit.

## **An unexpected mycorrhizal association identified in nettle roots when co-cropped with poplars at a trace-metal contaminated site.**

*Loïc Yung<sup>1</sup>, Flavien Tafforeau<sup>1</sup>, Cyril Zappellini<sup>2</sup>, Benoit Valot<sup>1</sup>, Chloé Viotti<sup>1</sup>, François Maillard<sup>3</sup>, Philippe Binet<sup>1</sup>, Geneviève Chiapasio<sup>4</sup>, Coralie Bertheau<sup>1</sup>, Michel Chalot<sup>1</sup>*

**KEYWORDS:** Ectomycorrhizal fungi; Fungal communities; Illumina-based sequencing; Metal-enriched sediments; Phytomanagement; Poplar-nettle agrosystem.

### **ABSTRACT**

Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) is the subject of growing interest in the domain of phytomanagement because it commonly grows under poplar SRC set up at trace-metal (TM) contaminated sites and constitutes a new resource of high-quality herbaceous fibres. The capacity of plants to colonise TM-contaminated environments is partly related to their ability to establish symbiotic relationships with soil microorganisms, including those tolerant to TM. While poplar is known to establish tripartite symbiotic associations with ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi, few studies on nettle have attributed antifungal properties, limiting fungal developments under root influence. This study aimed at characterizing the fungal diversity associated with root nettle and poplar co-cropped at a TM-contaminated site using Illumina Mi-seq sequencing. The environmental DNA from plant roots was extracted, amplified using the fungi-specific ITS1F-ITS2 primers and sequenced. Root-associated fungal communities were significantly different between nettle and poplar. Nettle was characterized by the genus *Kotlabaea* (Pezizomycetes) while several EM fungi such as *Inocybe* (Agaricomycetes) and *Tuber* (Pezizomycetes) species characterized the poplar fungal community. Most of the Pezizomycetes taxa tended to be more represented in the highly contaminated area whereas Agaricomycetes tended to be reduced in this area. Surprisingly, we detected a significant part (9.7%) of ectomycorrhizal (EM) OTU associated with *Urtica dioica* roots and demonstrated that these EM OTU were shared by poplar, suggesting some connexions between these two communities. Finally, our study raised the interest in reconsidering these fungal associations with known non-EM plant in the case of plant association.

## INTRODUCTION

Phytomanagement is a technique based on plant species to rehabilitate and revalorize polluted sites. Fast-growing trees such as poplars (*Populus sp.*) allows the production of a high amount of valuable plant biomass for the production of renewable energy (Kidd et al., 2015; Pandey et al., 2016). At the same time, trees are able to limit the dispersal and the risk associated with contaminants while promoting the biodiversity (Parraga-Aguado et al., 2014). Recent approaches on the optimisation of phytomanagement systems pointed out the importance of assemblages between crops and the spontaneous species (Parraga-Aguado et al., 2013) to ensure a gentle remediation of these marginal lands (Boisson et al., 2016). The biodiversity of this spontaneous vegetation was generally restricted by the soil physico-chemical properties, limiting the panel of species that are able to develop and to compete with the tolerant species (Macnair, 1987). The stinging nettle (*Urtica dioica* L.) was frequently observed as a companion species on poplar plantations at both natural (Cronk et al., 2016) and polluted sites (Yung et al., 2019). Indeed, nettle is one of the most represented plant in the world due to its ability to colonize a vast diversity of environments and particularly anthropogenic areas (Balabanova et al., 2015; Shams et al., 2010; Viktorova et al., 2016). Recently, nettle has been the subject of growing interest in the domain of phytomanagement because it i) constitutes a new resource of high-quality herbaceous fibres for the manufacture of biomaterials (Bacci et al., 2009; Di Virgilio et al., 2015), ii) can promote the biodiversity of local entomofauna (James et al., 2015; Perrin, 1975) and iii) is able to spontaneously grow at various contaminated sites (Murtic et al., 2019; Paukszto and Miroslawski, 2019; Viktorova et al., 2016).

The success of phytomanagement depends on the capacity of plants to colonize harsh environments, which is partly related to their ability to establish symbiotic relationships with soil microorganisms. Among these microorganisms, arbuscular mycorrhizal (AM) (Miransari, 2017), ectomycorrhizal (EM) (Gil-Martínez et al., 2018) and Dark Septate Endophyte (DSE) (Deng and Cao, 2017) fungi are known as major drivers of the growth and tolerance to abiotic stress and resistance to phytopathogens for plants (Otero-Blanca et al., 2018). The use of fungal inoculum is known to enhance phytoremediation by improving uptake and accumulation of trace metals (TM) by plants in phytoextraction application or by limiting the translocation of TM from roots to shoots during phytostabilisation (Khan, 2005; Ma et al., 2019; Berthelot et al., 2016). Recent studies highlighted the positive effects of ecto- and endomycorrhizal inoculation on poplar cultivars growing at a site contaminated with Cr, Zn, Cu and Pb (Ciadamidaro et al., 2017; Phanthavongsa et al., 2017). While the success of field inoculation is still unpredictable (Gerhardt et al., 2017) due to various abiotic and biotic parameters (e.g., competition with the local microbiome), the risks of failure may be mitigated by considering endogenous strains (Wubs et al., 2016).

In the temperate climate zone, poplars are among the few cultivated trees that form tripartite symbiotic associations with EM and AM fungi (Gehring et al., 2006). As symbiotic fungi play crucial roles in soil fertility, colonisation, plant nutrition, metal uptake, accumulation or restriction in plants (Smith and Read, 2010), poplar microbiomes have been well studied in various phytomanagement contexts (Durand et al., 2017; Foulon et al., 2016; Schmidt et al., 2018; Vitali et al., 2019; Zappelini et al., 2015). However, fungal microbiomes associated with nettle remained poorly studied in natural or anthropogenic biota. A study combining *in-situ* and mesocosm approaches concluded that the nettle rhizosphere was devoid of any mycorrhizal structures and revealed that the AM fungus *Glomus mosseae* was not able to develop in the presence of nettle (Vierheilig et al., 1996). According to the authors, a protein called *Urtica dioica* Agglutinin (UDA) located into the rhizomes, which has anti-fungal properties (Broekaert et al., 1989), could be involved in this phenomenon. In addition, this observed inhibitory effect should even affect local microbiome of other neighbouring plants (Fontenla et al., 1999).

The present study therefore aimed at characterizing the fungal diversity associated with nettle and poplar co-cropped within an agrosystem set up at a contaminated site with various

concentrations of TM using Illumina Mi-seq sequencing. We hypothesised that poplar and nettle would harbour distinct root-associated fungal communities. Poplar tree communities would be dominated by EM and AM fungi. By opposition, nettle associated communities would be composed of endophytic fungi and would present a low fungal diversity due to the presence of a potential anti-fungal compound described above. We also hypothesised that the degree of contamination would reduce the root fungal diversity and shape the structure of the fungal communities for the two plants toward TM tolerant fungi.

## MATERIALS AND METHODS

### *Site description*

The study site located in Fresnes-sur-Escaut in the Hauts-de-France region (France, 50°25'47.9"N 3°35'07.8"E) consists in a nettle-poplar agrosystem on a dredged sediment disposal site, contaminated with TM, operating between 1978 and 1989. Approximately 200 000 m<sup>3</sup> of silt and sand from the dredging of the canal de l'Escaut were deposited on the studied site, resulting in a total thickness of sediment ranging from a few centimetres to several tens of centimetres for the most exposed areas. Further soil analyses had revealed heterogeneous contamination with As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn within the surface horizons (0-50 cm). Physico-chemical characteristics, total and Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-extractable concentrations of trace and major elements of the topsoil have been described in detail in a previous study (Phanthavongsa et al., 2017). Briefly, the experimental site is divided into two areas depending on the degree of contamination: the low trace-metal (LTM) and the high trace-metal (HTM) areas. The HTM area has mean soil concentrations of Zn (2231 mg/kg), Pb (425 mg/kg), Cu (108 mg/kg) and Cd (63 mg/kg), 20-, 9-, 4- and 100-fold higher than the LTM area, respectively. A phytomanagement field trial was implemented in 2011 on this site with the two poplar cultivars Skado (*P. trichocarpa* × *P. maximowiczii*) and I214 (*P. deltoides* × *P. nigra*) as a short-rotation coppice (SRC; 2200 stems/ha). A detailed description of the experimental design is also available in Ciadamidaro et al., (2017) and Phanthavongsa et al., (2017). Although significant differences were found in terms of growth (Ciadamidaro et al., 2017) and TM accumulation (Phanthavongsa et al., 2017) between inoculated and non-inoculated poplars, we could not detect significant differences between inoculated and not inoculated trees in terms of fungal community structure after 2 years (Phanthavongsa, unpublished data).

Five years after the plantation, the spontaneous herbaceous layer has evolved in a similar way to that of the same experimental plantation set up in eastern France, with a domination of the stinging nettle (Yung et al., 2019).

### *Sample collection and preparation*

The sampling was conducted in November 2016, consisting of collecting root samples from the upper 20-cm layer of soil from 9 random poplars and 9 adjacent nettles for each of the four studied plots. A total of three pseudo-replicates of thin roots were sampled from each tree and mixed to obtain a composite whereas the entire root system of nettles was collected. All samples were collected over a one-day period to reduce any heterogeneity imparted by climatic conditions. For each plant, the root samples were carefully sorted so as not to be mixed, the soil was carefully removed *via* three autoclaved distilled-water baths, and the smallest roots were selected and separated from larger roots by sampling them with a scalpel. The samples were freeze-dried and stored at -20 °C for molecular analysis. Thus, we considered both the endophytic and epiphytic fungi from the rhizospheric habitat.

### ***Molecular method***

The environmental DNA (eDNA) from the roots was extracted with the PowerSoil DNA isolation Kit following the manufacturer's instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). PCR was performed using the fungi-specific forward primers ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and reverse ITS2 (GCTGCGTTCCTTCATCGATGC). The first-step PCR was performed in a reaction volume of 35  $\mu$ L containing 8.75  $\mu$ L of eDNA and 26.25  $\mu$ L of Master Mix (14.35  $\mu$ L of Mi-Q water, 7  $\mu$ L of PCR buffer, 0.7  $\mu$ L of 10 mM dNTP Mix, 1.75  $\mu$ L of each primer and 0.7  $\mu$ L of Phire). Amplifications were performed using the Phire hot start II with PCR conditions as following: denaturation 98°C for 30s followed by 25 amplification cycles of 5s at 98°C, 5s at 57.2 °C, 15s at 72°C and followed by 1min final extension at 72°C. These primers targeted a short portion of the fungal ITS region, resulting in amplicons of small size (~300 bp), appropriated for Illumina sequencing. The DNA quality and quantity were assessed by agarose gel electrophoresis using the ImageLab software (Bio-Rad, USA) and with a Qubit<sup>TM</sup> dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using the Qubit 4 fluorometer. We selected 6 or 7 samples based on the DNA quantity for sequencing the partial fungal ITS region (Wang et al., 2015), which was performed with the Illumina MiSeq platform (Microsynth AG, Switzerland).

### ***Bioinformatic analysis***

The sequence data were processed using Mothur (Schloss et al., 2009). First, all raw read pairs were joined at the overlapping region to create consensus sequences. Then several steps of filtering were performed, consisting in removing homopolymers (greater than 12), ambiguous (greater than 0) and length (shorter than 220 and greater than 400). An in-silico PCR (ITS1 , ITS2) was performed to precisely target the ITS1 region and avoid the SSU (small subunit) region, which was also amplified using the ITS1F (Toju et al., 2012). Post-filtration reads were then clustered into OTUs using the swarm tools (Mahé et al., 2015) with a difference value of “1” and fastidious option enable. We removed singleton OTUs to avoid technical artefacts and overestimation of the number of species (Tedersoo et al., 2010). The taxonomic assignment of OTUs was performed using the UNITE (Kõljalg et al., 2013) database by a naïve bayesian approach (Wang et al., 2007). Sequences corresponding to plant contamination were removed at this step. Each fungal OTU was further assigned to functional or morphological groups of fungi using FUNguild (Nguyen et al., 2016). For each assignment, three confidence rankings (“possible”: suspected, “probable”: fairly certain, “highly probable”: absolutely certain) referring to previously peer reviewed data were given. We only considered the functional and morphological assignation with at least a “fairly certain” confidence ranking. Finally, the guilds related to a similar function were grouped to obtain a total of six main guilds, based on the literature.

### ***Data analysis***

Alpha diversity indices (OTU richness, Chao estimation, Shannon diversity index, inverse of the Simpson diversity index) were calculated using MOTHUR. Samples were rarefied at 33 000 sequences, corresponding to the smallest number of sequences detected in a sample. No sample was excluded. Good's coverage was calculated as  $C = [1 - (n / N)] \times 100$  (%), where n is the number of OTUs, and N is the number of sequences, for each sample and treatment.

We considered two factors for each plant (*i.e.*, nettle and poplar), including two treatments each: i) the degree of contamination (LTM vs HTM areas) and ii) the cultivar of poplar where the samples were collected (I214 vs Skado). Thus, the studied treatments were I214-HTM, I214-LTM, Skado-HTM and Skado-LTM for both nettle and poplar. The number of sequences of each OTU was transformed to the relative abundance. Statistical analyses were performed with R software v.3.6.1 (R Development Core Team, 2013). All the considered variables were verified for their homoscedasticity (Bartlett or Levene tests) and normal distribution (Shapiro–Wilk test). Non-

normal data were “sqrt” or “log” transformed. Data that did not fit a normal distribution after transformation were analysed with nonparametrical tests. All statistical tests were considered significant at  $P \leq 0.05$ . First, to evaluate the completeness of our sampling effort, we calculated and drew rarefaction curves for each treatment and both poplar and nettle, using “rarecurve” function available in the R Vegan Package. The shape of the curve is a graphic display of the relative estimated species accumulation rates. All diversity and richness indices and the mean number of OTUs were then compared between all treatments and plants through ANOVA followed by a Tukey HSD test.

To summarise differences in fungal OTUs composition between the four treatments for both the nettle and poplar plants, we used two-dimensional non-metric Multi-Dimensional Scaling (NMDS) plots based on Bray-Curtis dissimilarity matrix ( $k = 3$ ) using the metaMDS function of the R Vegan package. Permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) based on Bray-Curtis dissimilarity were applied to determine the potential effects of environmental conditions (degree of contamination) and cultivar of poplar (I214 or Skado) on fungal communities for both nettle and poplar. To assess the influence of the studied factors on the fungal classes, genera, EM fungal taxa and guilds, the treatments were compared using a Kruskal-Wallis test, followed by a post-hoc test with a Holm correction of the p-value.

NMDS and PERMANOVA analyses were further performed on the EM and AM fungal guilds as previously done for the whole fungal community. We used Bray-Curtis dissimilarities indices to evaluate the distance between nettle and poplar for the same treatment. We also tested correlations between the nettle and poplar EM fungi, based on i) the diversity and abundance taken individually, using a Spearman test and ii) the whole community composition, using a Mantel test. The relative abundances of EM fungal taxa were represented by a heatmap, from the pheatmap R package. Similarly, a hierarchical cluster analysis of the relative abundances of EM fungal OTUs from the various treatments was represented by a dendrogram expressing the linkage between species and between treatments.

## RESULTS

### *Illumina Mi-Seq sequencing revealed contrasted fungal microbiome associated with nettle and poplar roots*

Illumina MiSeq sequencing from amplicons of the ITS1 region extracted from 51 roots samples of poplar and nettle generated a total of 3 481 223 non-chimeric fungal sequences. The initial total number of sequences obtained by sample was between 33 615 and 140 409 (Table 1). The lowest value was selected for subsampling, revealing a total number of 1833 non-singleton OTUs for 1 683 000 fungal reads, constituting our final dataset. For nettle and poplar fungal community associated with roots, 45% and 20% have not been assigned to a genus, respectively.



Table 1: Descriptive results of the Illumina MiSeq sequencing from amplicons of the ITS1 region, including richness and diversity indices of the fungal communities from the eight studied treatments. Mean values and standard deviations (mean  $\pm$  SD) were provided for each treatment. Values designated with the same letters were not significantly different (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ).

	NETTLE				POPLAR			
	LTM		HTM		LTM		HTM	
	I214	Skado	I214	Skado	I214	Skado	I214	Skado
<b>NUMBER OF SAMPLES</b>	6	6	6	7	6	7	6	7
<b>MEAN OF TOTAL NUMBER OF SEQUENCES</b>	52264	73778	68434	70185	69479	63116	55243	61067
<b>SUBSAMPLE SIZE</b>	33000	33000	33000	33000	33000	33000	33000	33000
<b>MEAN OTUS OBSERVED</b>	175 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 56)	168 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 69)	122 <sup>b</sup> ( $\pm$ 23)	109 <sup>b</sup> ( $\pm$ 52)	178 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 19)	196 <sup>a</sup> ( $\pm$ 30)	156 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 38)	204 <sup>a</sup> ( $\pm$ 43)
<b>CHAO ESTIMATION</b>	248 <sup>c</sup> ( $\pm$ 56)	280 <sup>bc</sup> ( $\pm$ 61)	221 <sup>c</sup> ( $\pm$ 25)	210 <sup>c</sup> ( $\pm$ 64)	362 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 31)	410 <sup>a</sup> ( $\pm$ 74)	232 <sup>c</sup> ( $\pm$ 33)	358 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 70)
<b>SHANNON INDEX</b>	2.3 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 0.8)	2.7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1.0)	2.2 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 0.6)	1.4 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1.0)	2.4 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 0.5)	2.7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.5)	2.9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.7)	2.9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.5)
<b>INVERSE OF SIMPSON DIVERSITY INDEX</b>	6.0 <sup>a</sup> ( $\pm$ 5.4)	8.9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 6.1)	5.8 <sup>a</sup> ( $\pm$ 3.4)	3.1 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2.8)	5.7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2.3)	7.7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 5.3)	10.1 <sup>a</sup> ( $\pm$ 5.7)	8.9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 6.1)

Rarefaction curves calculated for each treatment of nettle and poplar tended to reach an asymptotic profile, suggesting that most of the local and collectable fungal diversity associated with the roots have been recorded (Gotelli and Colwell, 2001). Rarefaction curves associated with nettles clearly exhibit two trends depending on the area (LTM vs HTM). For a same number of reads on the asymptote, the I214-HTM and SKADO-HTM treatments reached a number of OTUs reduced by approximately 30%, as compared to the I214-LTM and SKADO-LTM treatments (Figure S1). Concerning poplar, the curve for I214-HTM treatment was clearly lower than those corresponding to the three other treatments. Additionally, the measured Good's coverage values, reflecting the completeness of the sampling, were greater than 99% for each treatment and in every sample, suggesting a representative sampling.

A PERMANOVA analysis revealed that the root-associated fungal communities were significantly different between nettle and poplar ( $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.14$ ). The total number of fungal OTUs were 1218 for nettle and 1321 for poplar (Figure 1). Among them, nettle and poplar shared 766 OTUs, representing 63% of the total number of OTUs for nettle and 58% for poplar (Figure 1). More precisely, the number of OTUs for the four considered treatments were i) for nettle: 612, 446, 661, 467 under I214-LTM, I214-HTM, Skado-LTM and Skado-HTM, respectively and ii) for poplar: 643, 505, 747, 744 for I214-LTM, I214-HTM, Skado-LTM and Skado-HTM, respectively. Only 7.1% and 7.5% of the total number of OTUs were shared between the four treatments for nettle and poplar, respectively. Additionally, the percentage of OTUs specific to each treatment ranged between 8.5% and 19.9% for nettle and between 11.2% and 14.8% for poplar (Figure 1). For nettles, this number of specific OTUs was 2-fold higher in the LTM area (35.4%) compared to the HTM area (17.3%), whereas it was comparable for poplar (23 vs 26%).

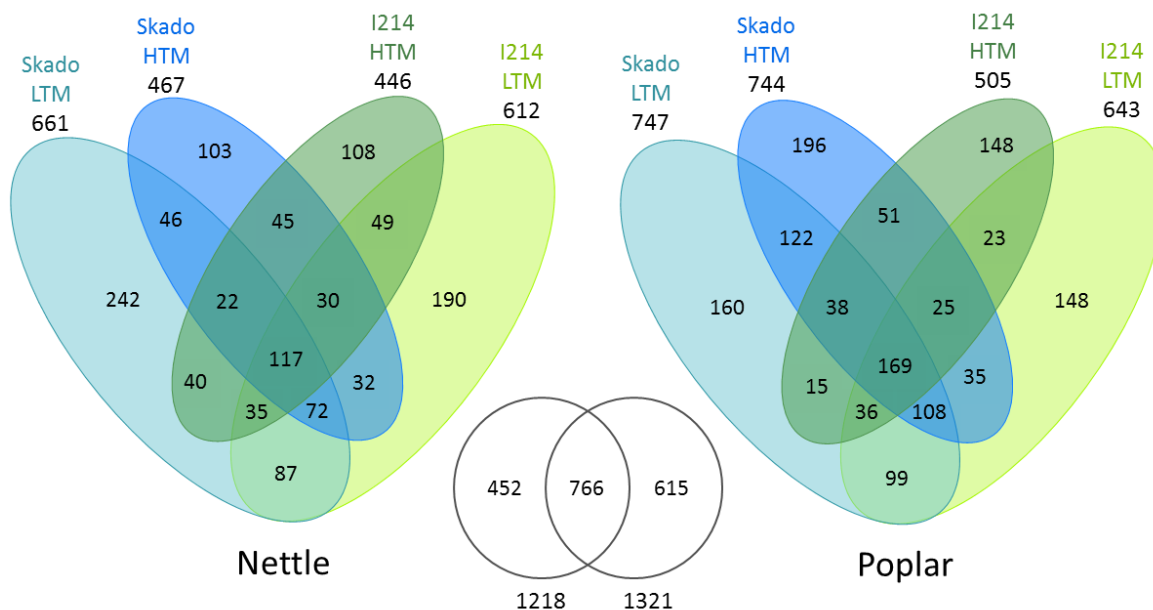


Figure 1: Venn diagrams showing the overlap of the fungal communities according to the four studied treatments, for nettle (left) and poplar (right). These diagrams presented the number of total (above the ellipses), specific and shared OTUs. The two circles provided the total number of OTUs for nettle (left) and poplar (right) and the shared number (intersection).

According to both the obtained and the estimated (according to the Chao model) mean numbers of fungal OTUs, the fungal species richness seemed to be higher in poplar roots (Table 1). The species richness of the HTM area was lower than the LTM area for both plants as suggested by the rarefaction curves (Figure 1), however, this reduction was only significant for the roots of I214 poplars ( $P < 0.05$ ). The highest mean number of OTUs was obtained for the poplar roots from the Skado-HTM treatment, whereas the lowest was obtained for the nettles within the same treatment, with a significant difference ( $P < 0.05$ ). For nettle, we collected an average of 65% and 54% of the estimated number of OTUs for the LTM and HTM areas, respectively, whereas we obtained 69% for HTM versus 48% for LTM for poplar.

Overall, when considering individually the various diversity estimators related to poplar or nettle, no clear influence of the studied factors (*i.e.*, degree of contamination and poplar cultivars) were noticeable. However, a NMDS analysis highlighted a net clustering of each treatment for nettle and poplar fungal communities according to the poplar cultivar (*i.e.*, I214 vs Skado) and the degree of contamination (*i.e.*, HTM vs LTM) (Figure 2). This phenomenon was the most pronounced for the nettle. These visual dissimilarities were confirmed by a PERMANOVA analysis indicating that for both nettle and poplar, the fungal microbiomes were influenced by the two factors. More precisely, these factors explained 53% and 26% of the variance in the fungal community of nettle and poplar, respectively. Within the nettle community, the cultivar factor was the most explanatory (31%) whereas the poplar community was mostly influenced by the degree of contamination (13%) (Figure 2). The NMDS plots revealed that the HTM treatment presented a lower between-sample variation than the LTM for the nettle community, while the opposite result was observed for the poplar community (see sizes of ellipses in Figure 2).

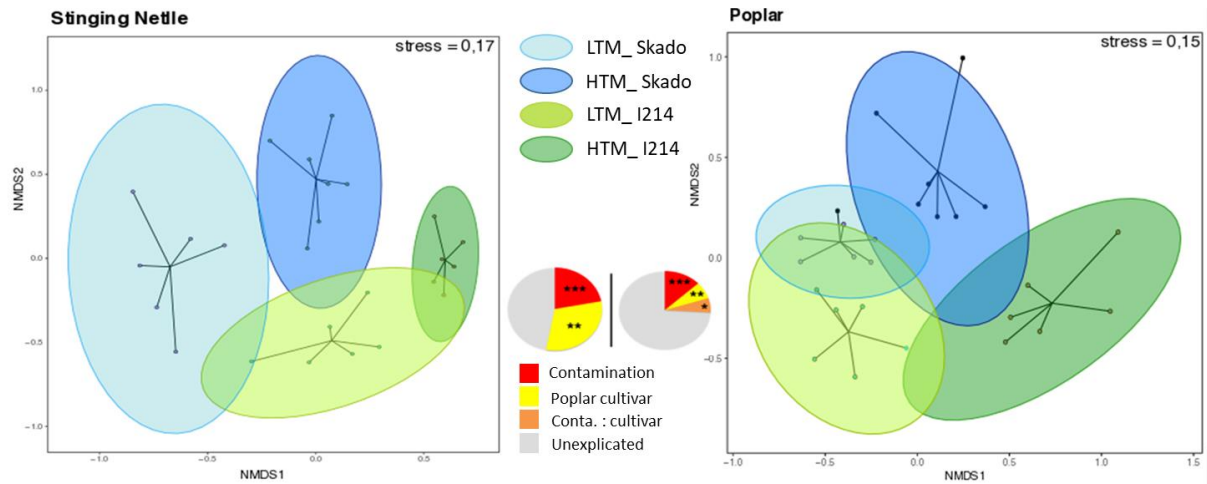


Figure 2: Non-parametric multidimensional scaling (NMDS) plot of fungal communities associated with the four treatments for nettle (A) and poplar (B), using the Bray-Curtis dissimilarity measure. Each point represents the fungal community of a given sample. Confidence area of ellipses = 0.95. The central pie-charts provide the results from a PERMANOVA analysis for each considered factors, with the following legend: P-value '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.

### **Fungal response to the contamination level**

The fungal communities across the studied sediment disposal site were clearly dominated by the phylum *Ascomycota* in nettle (84.5% of total relative abundance) and in poplar roots albeit to a lesser extent (52.3%), followed by *Basidiomycota* with 12.3% and 43.2% for nettle and poplar, respectively. Consequently, the *Ascomycota/Basidiomycota* ratio was significantly higher for nettle than for poplars ( $P < 0.05$ ). Among all samples, we detected 29 and 28 distinct fungal classes for nettle and poplar, respectively. Among them, the most abundant classes were *Pezizomycetes*, *Agaricomycetes*, *Leotiomycetes*, *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Mortierellomycetes*, *Eurotiomycetes* and *Olpidiomycetes* with each of them having a total relative abundance  $> 0.5\%$ . At the class (Figure S2) and genus (Figure 3) scales, no clear differences were detected between the fungal OTU compositions of the two poplar cultivars, reflecting the low variability explained by the PERMANOVA. However, substantial differences between fungal OTUs associated with nettle and poplar and between the LTM and HTM areas were observed (Figures S2 and 3).

For this study, *Dothideomycetes* and *Leotiomycetes*, as abundant classes, characterized the fungal community of nettle roots whereas poplar roots were characterized by *Agaricomycetes*, representing between 20% and 66% of the total number of sequences, depending on the treatment (Figure S2). *Pezizomycetes* were also well represented, with a similar abundance in the two plants. However, this class was significantly influenced by the degree of contamination in the soil. Indeed, for nettle, the relative abundance of *Pezizomycetes* was significantly higher at the HTM area for nettles collected under both the I214 (10% for LTM ; 32% for HTM ;  $P < 0.05$ ) and Skado (7% for LTM ; 68% for HTM ;  $P < 0.05$ ) plots. For poplar, this observation was only valid for the Skado cultivar, for which *Pezizomycetes* accounted for 6% of the total abundance of the LTM area and 41% of the HTM area ( $P < 0.05$ ) (Figure S2).

Among *Pezizomycetes*, the most abundant genus found associated with roots of nettle was *Kotlabaea* (26% of the total abundance), which also significantly increased in the HTM area (for I214 plots: LTM, 0.1% and HTM, 31.7% ( $P < 0.05$ ); for Skado plots: LTM, 2.5% and HTM, 65.1%, ( $P < 0.05$ )) (Figure 3). Concerning poplar community, *Tuber* species were the most represented *Pezizomycetes* with a relative abundance of 11% in poplar roots (1). As for *Kotlabaea* associated to nettle, the *Tuber* genus tended to be more represented in the poplar roots collected from the HTM area (for the I214 cultivar: LTM, 6.2 % and HTM, 17.6% ; for the Skado cultivar: LTM, 4.6% and

HTM, 15.2), however, the high between-sample variability did not allowed us to statistically confirm this tendency. Interestingly, *Genabea* species were well represented in the nettle roots from the Skado plots, whereas they were almost absent in nettle from the I214 plots. At contrary, the *Genabea* species detected in poplar roots were only detected in samples from the I214 plots. However, these observations have not been statistically confirmed.

*Agaricomycetes* associated with both poplar and nettle also seemed to be influenced by the degree of TM in soil as their abundance was significantly reduced in the HTM areas ( $P < 0.05$ ), except for nettle from the I214 plots (Figure S2). This reduction of *Agaricomycetes* in the HTM area was mainly due to the decrease of the *Inocybe* genus, which was the most abundant among all the *Agaricomycetes* for nettle (34%) and poplar (40%). When considering nettle and poplar together, the relative abundance of *Inocybe* species decreased from 31.9% (LTM) to 1.5% (HTM) for the I214 cultivar ( $P < 0.05$ ) and from 24.1% (LTM) to 8.1% (HTM) for the the Skado cultivar ( $P < 0.05$ ) (Figure 3). A similar trend was also noticeable for the genus *Tomentella* within the I214 plots, but less pronounced. Among the other genus, we did not notice any clear influence of the studied factors (Table S1).

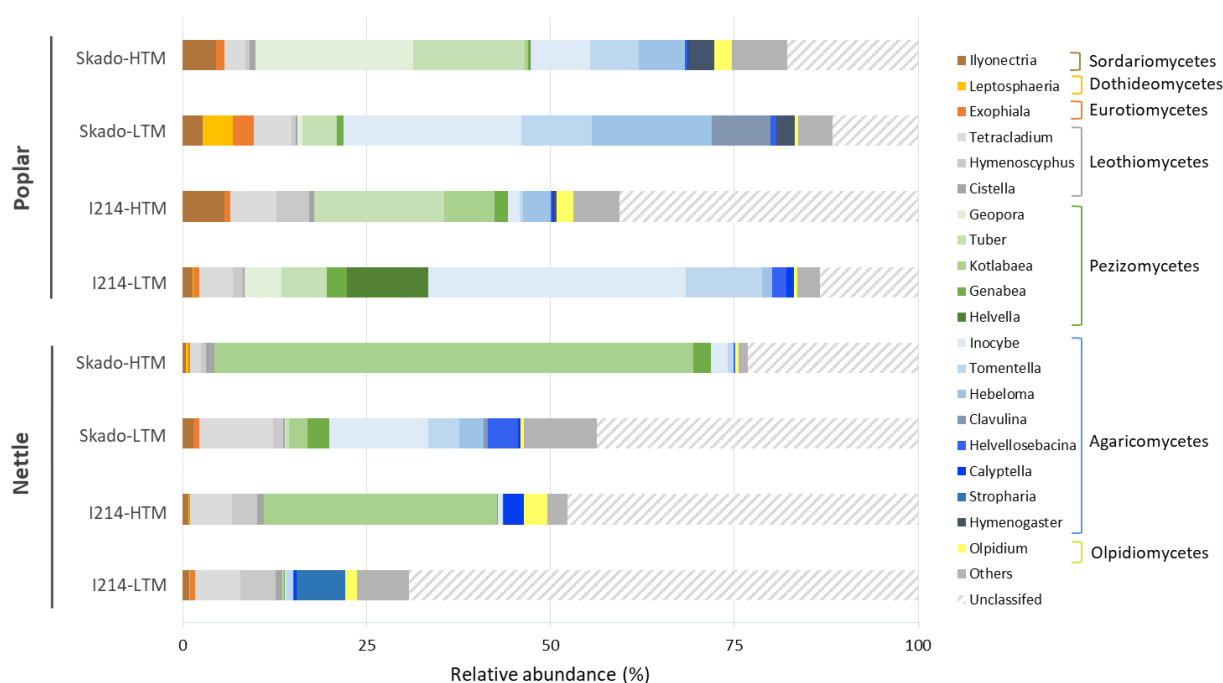


Figure 3: Relative abundance of the 20 most represented fungal genera, belonging to seven classes, according to the various studied treatments for both nettle and poplar. The classes with a relative abundance  $< 0.5\%$  have been gathered in the “others” group. For each genus, the related results from Kruskal–Wallis or Tukey HSD tests were presented in the Table S1.

among the 1205 fungal OTUs recorded in nettle and the 1373 recorded in poplar roots, 70.4% and 83.1%, respectively, were successfully assigned to a functional guild with at least a “fairly certain” confidence ranking using FUNguild (Nguyen et al., 2016). This functional assignment revealed a majority of saprotroph taxa (40.0%), followed by plant pathogens (10.1%) and EM fungi (9.7%) in the nettle roots whereas EM fungi (59.6%) accounted for the most abundant guild in poplar roots. With a relative abundance of 0.1%, endophytes were poorly represented in the poplar roots in contrast to nettle where they accounted for 9.2% of the total number of sequences (Figure 4). Twelve OTUs assigned to AM fungi were observed for both nettle and poplar, but they only accounted for less than 0.05% of the total number of sequences.

At the level of the functional guild, some trends related to the observations mentioned above have been identified. Indeed, the relative abundance of nettle saprotroph tended to be higher in the HTM area, which was statistically confirmed for the Skado plots ( $P < 0.05$ ). This result could be linked to the fact that *Kotlabaea* was the most abundant genus within this guild and that it followed the same tendency (Figure 3). An unidentified species belonging to this genus, accounting for 66% of all the saprotroph associated with nettle, was indeed significantly ( $P < 0.001$ ) more present in the HTM areas.

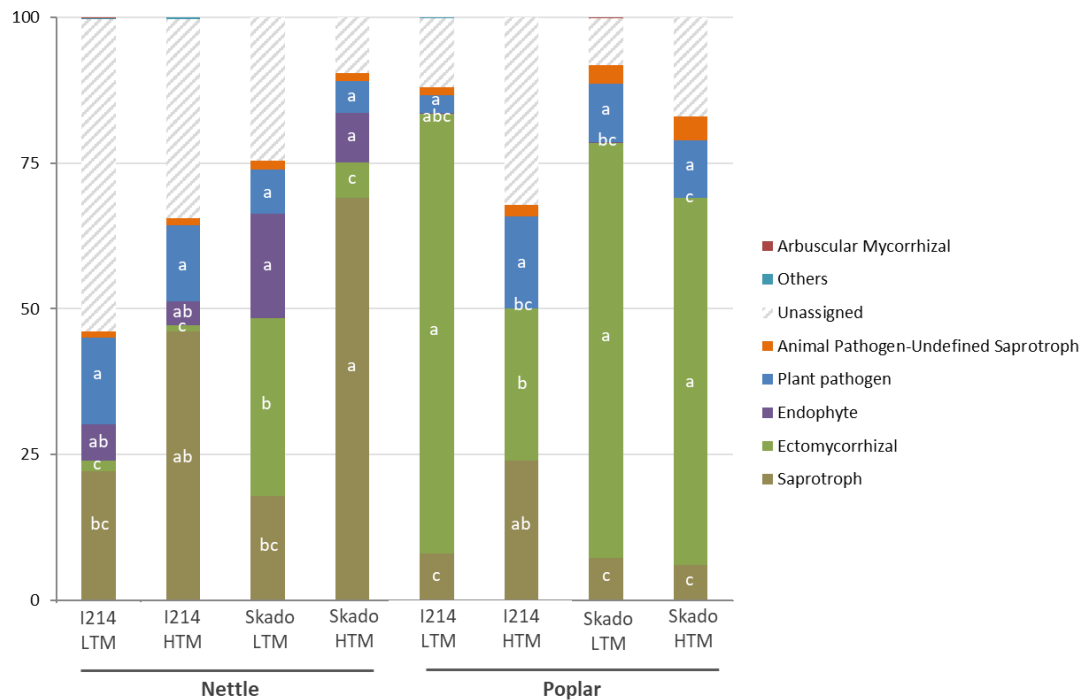


Figure 4: Relative abundance of major fungal guilds, according to the various studied treatments for both nettle and poplar. The classes with a relative abundance  $< 0.5\%$  have been gathered in the “others” group. For each class, bars designated with the same letter(s) were not significantly different (Kruskal–Wallis,  $P < 0.05$ ).

### Link between poplar and nettle fungal communities

EM fungi were significantly more represented (59.6% vs 9.7%,  $P < 0.05$ ) and diverse (46 OTUs vs 38 OTUs,  $P < 0.05$ ) in poplar roots than in nettle roots. However, for the Skado-LTM treatment, EM fungi represented the main guild associated with nettle, accounting for 30.5% of the total number of sequences of this treatment (Figure 4). Overall, the presence of EM fungi were higher in roots from the Skado plots, as compared with that from the I214, particularly in the case of nettle (9.0% vs 0.7% for the I214 plots).

According to the NMDS analysis, EM fungi associated with nettle seemed to be clustered together, and the same could be observed for poplar EM fungi (Figure 5A). Additionally, equal reductions of EM fungi in term of abundance and diversity between poplar and nettle have been observed (Figure 5B and C). Indeed, the EM fungi<sub>nettle</sub>/EM fungi<sub>poplar</sub> richness were similar (from 0.64 to 0.83) between each treatment. A PERMANOVA analysis revealed that EM fungi associated with poplar and nettle were significantly influenced by the two studied factors ( $P < 0.05$ ), reflecting the results obtained for the whole fungal community. Moreover, both the NMDS representation and the diversity and abundance data showed a comparable influence of these factors on EM fungi associated with each plant (Figure 5). Indeed, the Bray-Curtis dissimilarities indices, reflecting the distance between two communities, revealed similar values for all the modalities when comparing the two plants.

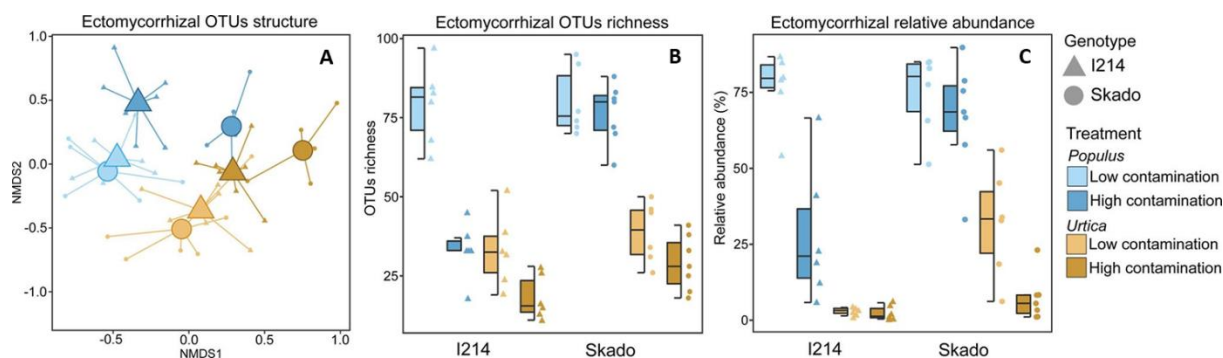


Figure 5: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of the roots EM fungal community structure (A), the EM OTU richness (B) and the EM relative abundance (C), depending on the plant species (*Populus* and *Urtica*), the poplar cultivar (I214 and Skado) and the degree of contamination (LTM and HTM).

Consequently, these results suggested that nettle and poplar roots shared an EM fungal community, while the abundance and diversity of some of these shared OTU were reduced in nettle roots. These observations were corroborated by a Spearman's rank correlation ( $P < 0.05$ ) and a Mantel test ( $P < 0.001$ ), revealing a significant correlation of the EM fungal richness and the EM fungal composition between nettle and the I214 poplar cultivar, respectively (Figure 6). Overall, this phenomenon was also confirmed for both the Skado and I214 ( $P < 0.01$ ) cultivars when considering the entire fungal community (Figure 6).

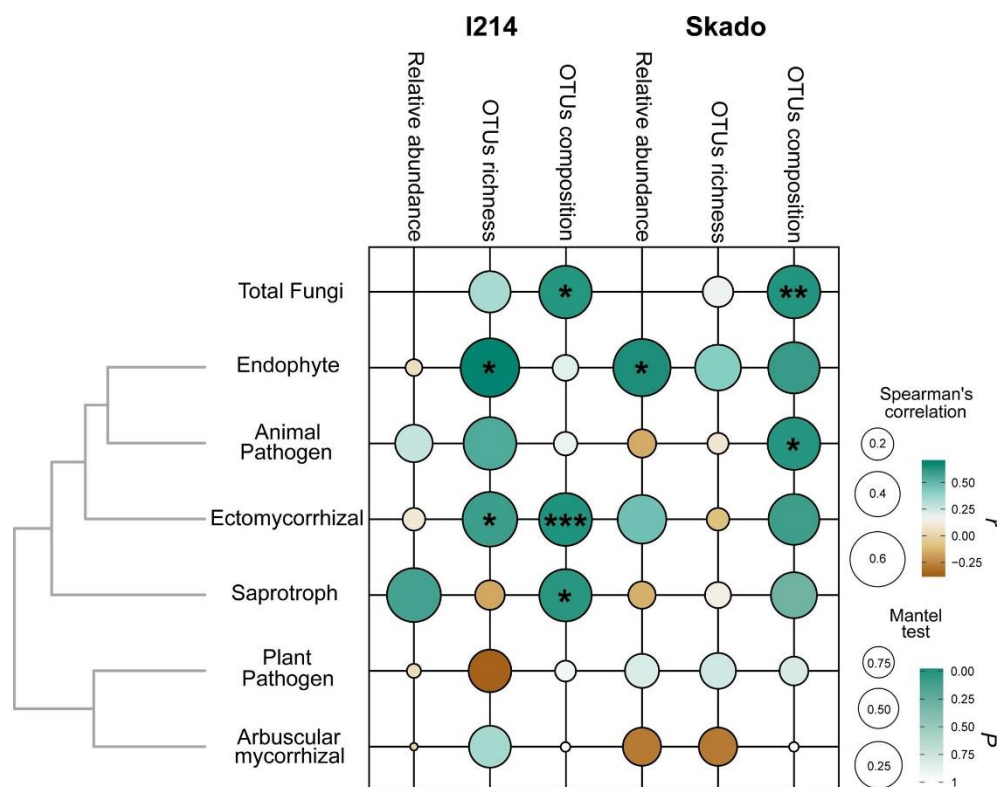


Figure 6: Correlations, in term of relative abundance, richness and OTUs composition of the root-associated fungal communities, between poplar and nettle depending on the poplar cultivar (I214 and Skado). The Spearman's correlation was used to evaluate potential significant correlations between fungal guilds relative abundance and guild OTU richness. The Mantel test was used to evaluate potential significant correlations between fungal community compositions. Fungal guilds were clustered using the Hclust function of the vegan R package depending on the Spearman's correlation coefficients and the Mantel test p-values. The size of the circles is proportional to the correlation coefficient. The colour of the circles depends on the direction of the correlation. \* $P \leq 0.05$  \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

In more details, a heatmap representation based on the relative abundance of the 28 most represented EM fungal taxa revealed that some of them were specific to a treatment or a plant. Indeed, three clusters have been identified according to a hierarchical analysis on the same taxa (Figure 7). A first cluster included all the EM fungi from nettle roots, a second cluster included the EM fungi associated with poplar from the LTM area and finally the third cluster gathered the poplar EM fungi from the HTM area (Figure 7). Thus, poplar from the LTM area was characterized by a higher number of OTUs for the EM fungal species *Inocybe rimosa*, *Tomentella sp.*, *Helvella elastica*, *Inocybe semifulva*, *Clavulina sp.* and *Hebeloma eburneum*. Poplars growing in the HTM area were characterized by the EM fungal OTU *Geopora cervina* and *Tuber rapaeodorum* (Figure 7).

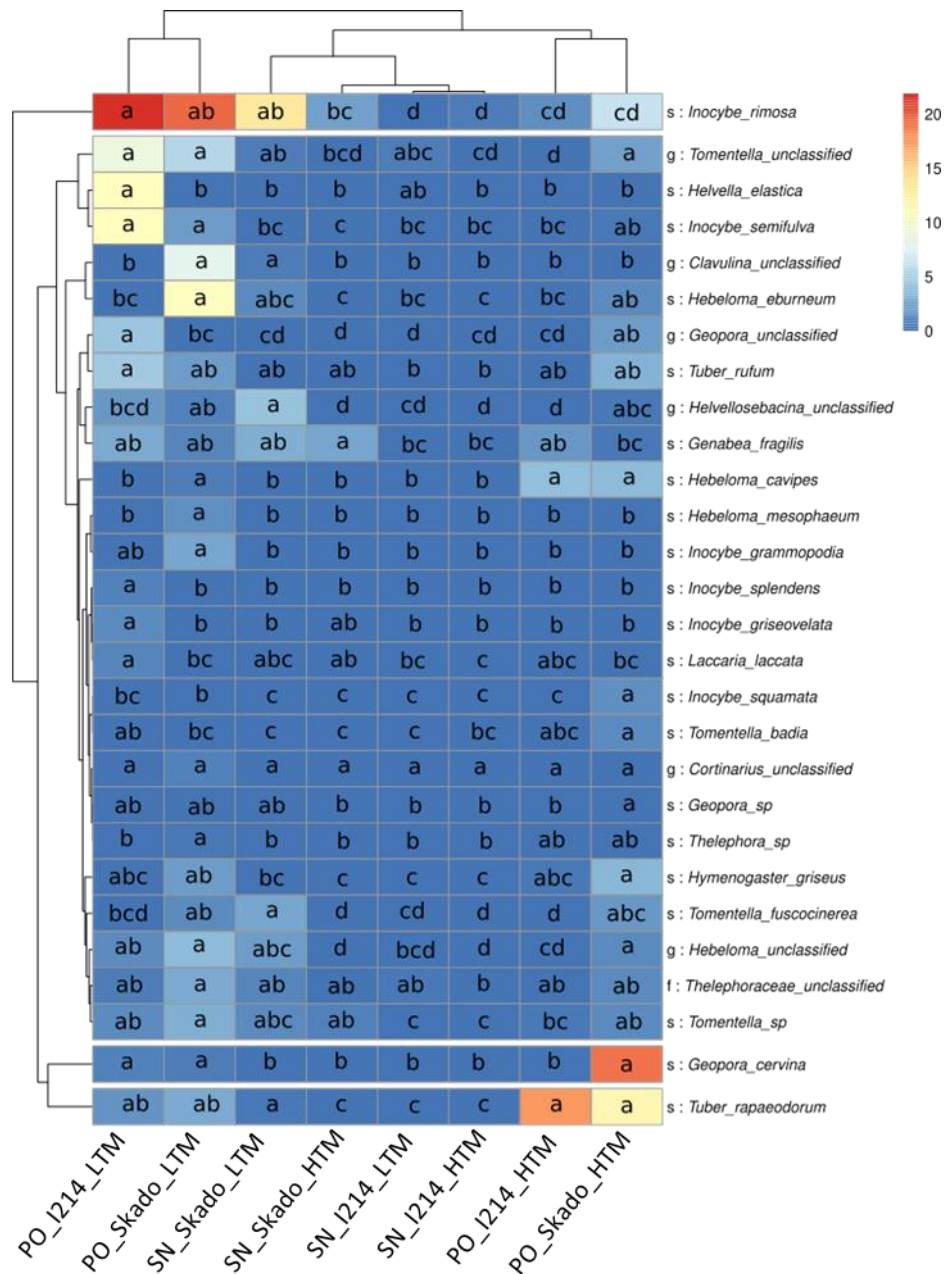


Figure 7: Heatmap based on the relative abundance of the main OTUs assigned as EM fungi according to the four studied treatments from nettle and poplar

Most of these taxa were also characteristic of poplars as they were poorly represented in the nettle roots, except for *Inocybe rimosa*, which was interestingly the most abundant EM fungus for both poplar and nettle. Indeed, this species accounted for 4% of the total number of nettle sequences (95% from the Skado plots) and 12.3% of poplar sequences (52% from the Skado plots). Additionally, when associated with nettle, this species was significantly influenced by the poplar cultivar factor ( $P < 0.05$ ) whereas it was sensitive to the degree of soil contamination ( $P < 0.05$ ) when associated with poplar. Finally, nettle roots did not present any specific EM fungal taxa, which supports the hypothesis that the nettle EM fungal community may arise from the poplar EM fungal community.

## DISCUSSION

### ***Illumina Mi-Seq sequencing revealed a comparable fungal diversity associated with nettle and poplar***

The Illumina MiSeq sequencing platform was used to characterize root-associated fungal communities of poplar and nettle, at a TM-contaminated site where these plants were co-cultivated. As no particular treatment was applied to the roots samples, our approach did not allow us to distinguish epiphytic and endophytic microbial communities. With a high Good's coverage and rarefaction curves tending to reach saturation plateau, our data seemed to be representative of the whole locale fungal diversity associated with nettle and poplar roots. Based on the richness and diversity indices for fungal communities, no striking difference was observed between the two plants, but these diversity indicators were slightly greater for poplar. Similar studies have been conducted on the Skado roots in other TM-enriched soils (Durand et al., 2017; Phanthavongsa, unpublished data), revealing comparable results in term of fungal diversity and richness.

### ***EM fungi dominated the poplar microbiome***

In this study, the fungal communities associated with *Populus* roots were clearly dominated by several EM fungal species, such as *Inocybe rimosa* (Agaricomycetes), *Tomentella sp.* (Agaricomycete), *Hebeloma spp.* (Agaricomycetes), *Tuber rapeodorum* (Pezizomycetes), *Geopora cervina* (Pezizomycetes), which accounted for up to 60% of the total number of sequences. We also detected the presence of AM fungi from the *Rhizophagus* and *Glomus* genera, but the number of sequences was too low to be considered in the present study. The recorded EM fungal species are known to develop symbiotic interactions with their plant hosts, which improves plant health by enhancing resistance to diverse stresses like drought, salinity, heavy metals and pathogens, among others (van der Heijden et al., 2015). Additionally, as they facilitate the adaptation of plants to TE stress, promoting the host growth, they facilitate the phytomanagement of TM-contaminated soils (Gil-Martínez et al., 2018).

Within a previous study, the fungal communities associated with the Skado cultivar from the same experimental site were investigated (Phanthavongsa, unpublished data). Our study confirmed the dominance of the previously observed trend suggesting that the Basidiomycète, Agaricomycète and Sordariomycète fungal classes were dominant within the root-associated fungal communities of Skado poplar. Consequently, 3-year after, the fungal microbiome of poplar roots seemed to be comparable. Interestingly, 6-years after, among the six ectomycorrhizal strains composing the initial inoculum (i.e., *Hebeloma mesophaeum*, *Amanita rubescens*, *Laccaria proxima*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus arrhizus* and *Scleroderma citrinum*), we only recorded *Hebeloma mesophaeum*, which accounted for 0.4% of the total number of fungal sequence in poplar roots. Despite the low presence of these strains, a significant improvement of the plant growth has been demonstrated for the inoculated plots (Ciadamidaro et al., 2017).



This study is a part of the BIOFILTREE project (ANR), which also considered a Hg-enriched chlor-alkali sediment disposal site with a particular soil, where the same experimental design was set up. Durand et al. (2017) studied the fungal microbiome and concluded that EM fungi, and particularly the *Tuber* and *Geopora* genera were also dominant within the roots of Skado cultivar at this chlor-alkali site. These results could be widely generalized to contaminated sites (Bonito et al., 2014; Guevara et al., 2013; Lacercat-Didier et al., 2016). Consequently, the presence of these EM fungi were not related to the physico-chemical properties of these sites but rather to the short rotation regime (Foulon et al., 2016; Lacercat-Didier et al., 2016) as the rotation period seemed to selectively promotes some Pezizales (*Geopora* spp., *Tuber* spp.) or Agaricales (*Inocybe* spp.) (Hryniewicz et al., 2010). These *Hebeloma* or *Inocybe* species, which were well represented at the studied site, could be categorized as “early stage” fungi as they were capable of colonizing roots of trees established in virgin or disturbed habitats (Smith and Read, 2010). In our dataset, only 7% of the variability were explained by the cultivar factor when performing a PERMANOVA on the poplar dataset, indicating that the fungal communities of Skado and I214 roots were comparable, which appeared inconsistent with previous results (Foulon et al., 2016). In the later study, the fungal communities associated with the roots of eight poplar cultivars including Skado and I214, in a TM-contaminated site, were investigated. The results highlighted large differences in term of fungal diversity between the cultivars, with *Laccaria* spp. representing more than 95% of the I214 fungal microbiome, whereas in Skado roots, this genus was poorly represented. Interestingly, within our studied site, the *Laccaria* genus was only recorded under the I214 cultivar, but only in small proportion. These inconsistencies in term of fungal composition could not be linked to the age of the poplar plantation, which was 7-year-old in Foulon et al. (2016), as compared to 6-year-old in the present study. Although the TM present at the two sites were of similar nature (Cd, Pb and Zn), their concentrations were different, which might have impacted the fungal communities.

### ***Saprotroph and endophytic fungi dominated the nettle microbiome***

We demonstrated that the overall fungal microbiome associated with nettle roots differed from the poplar microbiome, and this, in spite of their co-cultivation. Most of the dominant species associated with nettles were only assigned to the family or order level, reflecting a lack of information concerning nettle microbiome. Dominant species on nettle roots were mostly endophytic or pathogenic fungi, such as *Tetracladium* sp., *Olpidium* spp., or saprotroph belonging to the Helotiales, and Pleosporales orders. The most abundant OTU was assigned to the *Kotlabaea* genus, accounting for more than 26% of the total number of sequences. This species belongs to the Pyronemataceae family, which is the largest and most heterogeneous family of Pezizales. This family has traditionally been considered saprotrophic, but the trophic strategies of most species are not well studied and remain undocumented (Perry et al., 2007). An increasing number of species are being identified as EM associates (Tedersoo et al., 2010). The observed *Kotlabaea* sp. were classified as saprotroph in the present study, based on (Tedersoo et al., 2014), but uncertainties remained. Overall, knowledge about taxonomy and functional role of these root-associated fungi of nettle needs to be enriched by fungal isolation and characterisation experiments.

### ***The contamination differently affected the fungal communities of poplar and nettles***

HA slight reduction of fungal diversity was noticed for the roots of plants grown at the most contaminated area (HTM), which is commonly observed. Indeed, while certain fungal microorganisms can tolerate large concentrations of non-essential heavy metals (e.g., Al, As, Cd, Hg, Pb), they can be affected at the community scale (Gadd, 2010). Generally, TM reduced the amount of soil microbial biomass as well as the species richness, which changed microbial structure in favor of tolerant taxa, impacting the soil functioning (Giller et al., 1998, 2009).

Some mycorrhizal fungi isolated from contaminated soils develop adaptative mechanisms to tolerate metals (Colpaert et al., 2011; Gonçalves et al., 2009), which make them particularly suitable for phytomanagement applications. Indeed, plants inoculated with metal-tolerant EM fungi (Adriaensen et al., 2005; Redon et al., 2009) or DSE (Likar and Regvar, 2013) showed enhanced tolerance when compared to plants inoculated with non-tolerant strains. According to our observations, Agaricomycetes, and particularly the *Inocybe* and *Tomentella* genera, when associated with nettle or poplar, were the most impacted by the level of contamination. Although significantly reduced, they were still well represented at the HTM area on both nettle and poplar roots, which make them potential candidates for phytomanagement applications. Additionally, the *Inocybe* genus has already been isolated from a basidiocarp (Repáč, 1996), and successfully tested as an inoculum strain on coniferous trees (Flores-Rentería et al., 2018), which supports its interest in bioremediation applications.

In our study, members of the Pezizomycetes seemed to be the most tolerant fungi as the *Kotlabaea* genus associated with nettle and the *Tuber* genus associated with poplar were more represented in the area with the highest concentration of Cd, Zn, Cu and Pb. This increase of Pezizomycetes related to a higher degree of soil contamination have already been assessed in the case of hydrocarbon-contaminated soils (Bell et al., 2014; Tardif et al., 2016). It would be interesting to assess whether hydrocarbons were present at our site because dredged sediments from canals generally contains a large variety of contaminants, including hydrocarbons (Besser et al., 1996; King et al., 2006).

#### ***A significant fraction of EM fungi were shared by poplar and nettle roots***

We detected a significant part (9.7%) of EM OTUs constituting the fungal community associated with *Urtica dioica* roots, which might be surprising as nettle was considered as a non-mycorrhizal plant (Vierheilig et al., 1996) with roots containing the protein UDA that has been shown to have anti-fungal properties on *Phycomyces blakesleeanus* and some AM fungi (Van Parijs et al., 1992; Vierheilig et al., 1996). Nettle roots were carefully washed and sorted in order to eliminate all other mineral and organic material, and it is therefore unlikely that EM fungal sequences found on nettle came from contaminations by the adjacent soil or poplar roots.

We demonstrated that poplar and nettle roots shared EM fungi, suggesting some connexions between these two communities. The fact that no specific EM fungal taxa was recorded on nettle roots supports this hypothesis. Sharing EM fungi has already been validated between an herbaceous ectomycorrhizal perennial, which has the ability to persist or re-establish on disturbed sites, and oak savannas. The perennial *Helianthemum bicknellii*, by promoting the EM fungal colonization of *Quercus* seedlings, has indeed favoured its establishment (Dickie et al., 2004). Recently, Montesinos-Navarro et al., (2019) showed that this facilitation mechanism between plants through mycorrhizal symbiosis increased with the phylogenetic distance between the nurse and facilitated plant species. However, these studies considered mycorrhizal herbaceous plants. The possibility of an overlooked interaction between EM- and AM- or non-mycorrhizal plants growing close to host trees, have been recently suggested by Schneider-Maunoury et al. (2018). These authors confirmed the presence of *Tuber melanosporum* using metabarcoding in most of the non-mycorrhizal plants growing in brûlé patches, which led them to consider EM fungi as potential root endophytes of non-EM plants. Moreover, in a recent commentary, Selosse et al., (2018) compiled several literature evidences that many fungus have more complex niches (e.g., dual niches) than what is commonly agreed, which could be explained by different evolutionary trajectories. Interestingly, the presence of EM fungi in nettle roots might indicate an interconnection between nettle and poplar. The connection and the exchange of carbon between plants sharing the same belowground ectomycorrhizal network were demonstrated for trees (Klein et al., 2016; Simard et al., 1997). These results might indicate that trees and herbaceous plants are more connected than initially suspected in agroforestry systems. Further investigations including <sup>13</sup>C labeling experiments are now

necessary to conclude about the functionality of this Poplar-Nettle ectomycorrhizal network and its consequence on the functioning of this agroforestry system.

### ***Inocybe rimosa* as endophyte of nettle roots?**

*Inocybe rimosa* was the most abundant EM fungal species found on *U. dioica* roots, accounting for approximately 4% of the total fungal sequences in nettle roots. The *Inocybe* genus includes approximately 500 species (Larsson et al., 2009) and is one of the most studied genera among EM fungi (Esteve-Raventós et al., 2018). Some reports have also indicated the presence of *I. rimosa* on TM-polluted soils (Huang et al., 2012; Krpata et al., 2009). Like *T. melanosporum* colonizing roots of non-mycorrhizal plant as endophyte, we hypothesized that *I. rimosa* would have a similar behavior in *U. dioica* roots co-cropped with poplars. The ability of *I. rimosa* to colonize roots of non-mycorrhizal plants as endophytes has not been previously investigated, but it was detected in some herbaceous plants (Schneider-Maunoury et al., 2018). This facilitation phenomenon through EM fungi could even be partly implicated in the dominance of nettles within Salicaceous SRC in natural conditions (Cronk et al., 2016) and in contaminated sites (Yung et al., 2019). However, these findings were only based on metabarcoding and subsequent statistical analysis evidences, raised the interest to conduct further researches about the microbiome of nettle roots and particularly in the case of co-cropping at phytomanagement sites. A first step to assess the endophytism of *Inocybe* species would be to assess morphological evidences of their interactions with non EM-plants, using e.g. a fluorescent *in-situ* hybridization labelling on roots.

## ASSOCIATED CONTENT

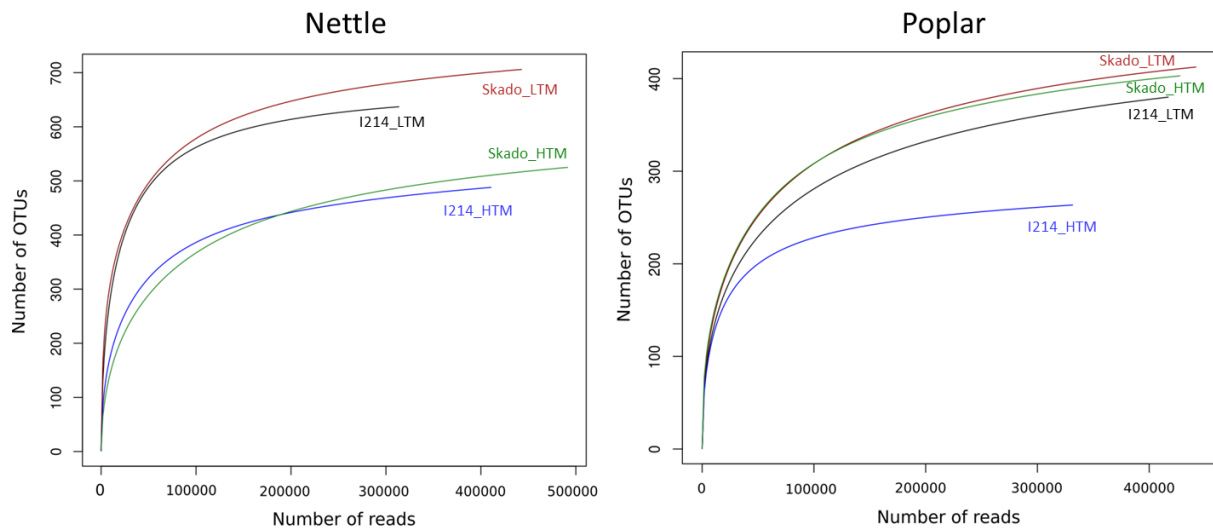


Figure S1: Rarefaction curves at the level of each studied treatment for each plant, based on a threshold of < 97% sequence similarity for the delineation of OTUs and their number of reads.

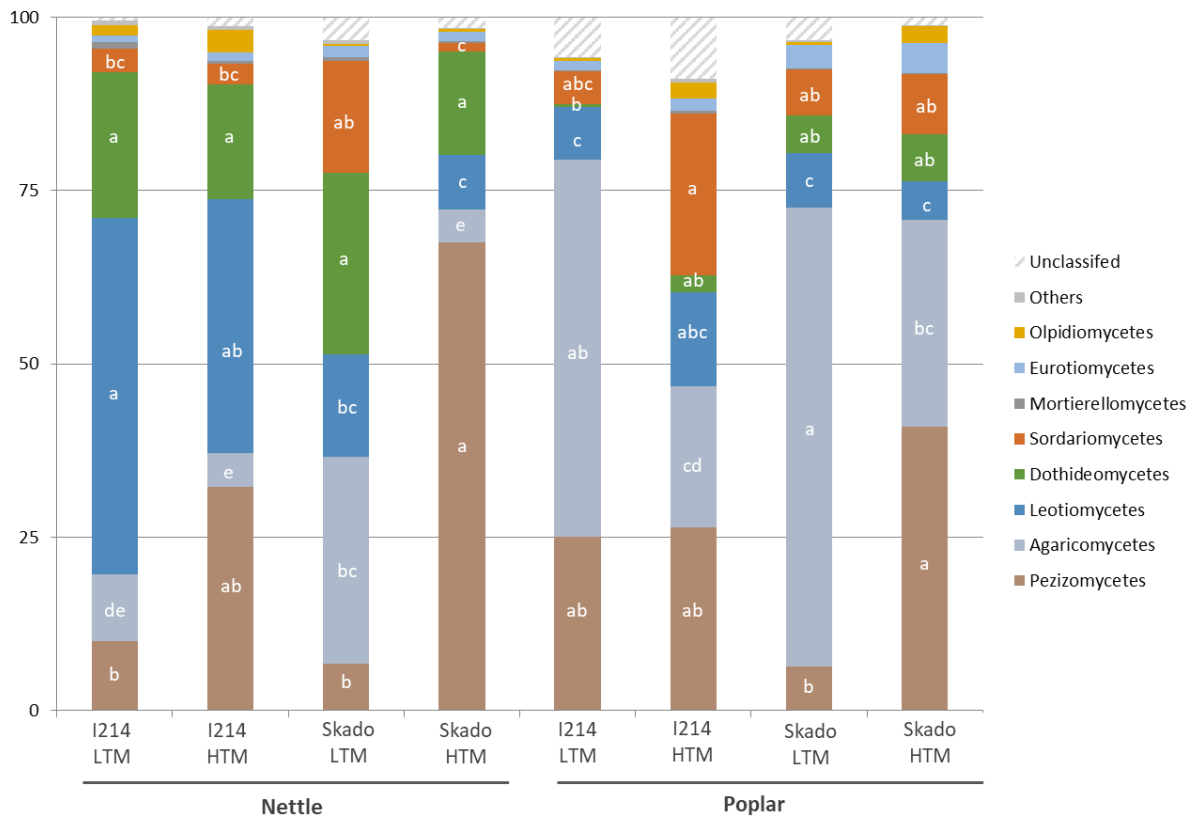


Figure S2: Relative abundance of the eight most represented fungal classes according to the various studied treatments for both nettle and poplar. Classes with a relative abundance < 0.5% were gathered in the “others” group. For each class, bars designated with the same letter(s) were not significantly different (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ).

## REFERENCES

- Adriaensen, K., Vrålstad, T., Noben, J.-P., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2005). Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 7279–7284.
- Bacci, L., Baronti, S., Predieri, S., and di Virgilio, N. (2009). Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy. *Ind. Crops Prod.* *29*, 480–484.
- Balabanova, B., Stafilov, T., and Bačeva, K. (2015). Bioavailability and bioaccumulation characterization of essential and heavy metals contents in *R. acetosa*, *S. oleracea* and *U. dioica* from copper polluted and referent areas. *J. Environ. Health Sci. Eng.* *13*.
- Bell, T.H., Hassan, S.E.-D., Lauron-Moreau, A., Al-Otaibi, F., Hijri, M., Yergeau, E., and St-Arnaud, M. (2014). Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME J.* *8*, 331–343.
- Besser, J.M., Giesy, J.P., Kubitz, J.A., Verbrugge, D.A., Coon, T.G., and Emmett Braselton, W. (1996). Assessment of Sediment Quality in Dredged and Undredged Areas of the Trenton Channel of the Detroit River, Michigan USA, using the Sediment Quality Triad. *J. Gt. Lakes Res.* *22*, 683–696.
- Boisson, S., Le Stradic, S., Collignon, J., Séleck, M., Malaisse, F., Ngoy Shutcha, M., Faucon, M.-P., and Mahy, G. (2016). Potential of copper-tolerant grasses to implement phytostabilisation strategies on polluted soils in South D. R. Congo: Poaceae candidates for phytostabilisation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *23*, 13693–13705.
- Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M.S., Nelson, J., Hodgkinson, B.P., Tuskan, G., Schadt, C.W., and Vilgalys, R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol. Ecol.* *23*, 3356–3370.
- Broekaert, W.F., VAN Parijs, J., Leyns, F., Joos, H., and Peumans, W.J. (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science* *245*, 1100–1102.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappelini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., and Chalot, M. (2017). Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environ. Exp. Bot.* *139*, 48–56.
- Colpaert, J.V., Wevers, J.H.L., Krznanic, E., and Adriaensen, K. (2011). How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Ann. For. Sci.* *68*, 17–24.
- Cronk, Q., Hidalgo, O., Pellicer, J., Percy, D., and Leitch, I. (2016). *Salix* transect of Europe: variation in ploidy and genome size in willow-associated common nettle, *Urtica dioica* L. sens. lat., from Greece to arctic Norway. *Biodivers. Data J.* *4*, e10003.
- Deng, Z., and Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere* *168*, 1100–1106.
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., and Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Ind. Crops Prod.* *68*, 42–49.
- Dickie, I.A., Guza, R.C., Krazewski, S.E., and Reich, P.B. (2004). Shared ectomycorrhizal fungi between a herbaceous perennial (*Helianthemum bicknellii*) and oak (*Quercus*) seedlings. *New Phytol.* *164*, 375–382.
- Durand, A., Maillard, F., Foulon, J., Gweon, H.S., Valot, B., and Chalot, M. (2017). Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microb. Ecol.*
- Esteve-Raventós, F., Bandini, D., Oertel, B., González, V., Moreno, G., and Olariaga, I. (2018). Advances in the knowledge of the *Inocybe mixtilis* group (Inocybaceae, Agaricomycetes), through molecular and morphological studies. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* *41*, 213.
- Flores-Rentería, D., Barradas, V.L., and Álvarez-Sánchez, J. (2018). Ectomycorrhizal pre-inoculation of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* is replaced by native fungi in a temperate forest of central Mexico. *Symbiosis* *74*, 131–144.
- Fontenla, S., Garcia-Romera, I., and Ocampo, J.A. (1999). Negative influence of non-host plants on the colonization of *Pisum sativum* by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Soil Biol. Biochem.* *31*, 1591–1597.
- Foulon, J., Zappelini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., and Chalot, M. (2016). Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Sci. Total Environ.* *571*, 1230–1240.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* *156*, 609–643.
- Gehring, C.A., Mueller, R.C., and Whitham, T.G. (2006). Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecologia* *149*, 158–164.
- Gerhardt, K.E., Gerwing, P.D., and Greenberg, B.M. (2017). Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Sci.* *256*, 170–185.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* *30*, 1389–1414.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol. Biochem.* *41*, 2031–2037.
- Gil-Martínez, M., López-García, Á., Domínguez, M.T., Navarro-Fernández, C.M., Kjeller, R., Tibbett, M., and Marañón, T. (2018). Ectomycorrhizal Fungal Communities and Their Functional Traits Mediate Plant–Soil Interactions in Trace Element Contaminated Soils. *Front. Plant Sci.* *9*.
- Gonçalves, S.C., Martins-Loução, M.A., and Freitas, H. (2009). Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates of *Cenococcum geophilum* from serpentine soils. *Mycorrhiza* *19*, 221–230.
- Gotelli, N.J., and Colwell, R.K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* *4*, 379–391.
- Guevara, G., Bonito, G., Trappe, J.M., Cázares, E., Williams, G., Healy, R.A., Schadt, C., and Vilgalys, R. (2013). New North American truffles (*Tuber* spp.) and their ectomycorrhizal associations. *Mycol.* *1051* 194–209 *105*, 194–209.

- van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.-A., and Sanders, I.R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* 205, 1406–1423.
- Hryniewicz, K., Baum, C., Leinweber, P., Weih, M., and Dimitriou, I. (2010). The significance of rotation periods for mycorrhiza formation in Short Rotation Coppice. *For. Ecol. Manag.* 260, 1943–1949.
- Huang, J., Nara, K., Lian, C., Zong, K., Peng, K., Xue, S., and Shen, Z. (2012). Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) in Pb–Zn mine sites of central south China. *Mycorrhiza* 22, 589–602.
- James, D.G., Lauby, G., Seymour, L., and Buckley, K. (2015). Beneficial insects associated with stinging nettle, *Urtica dioica* Linnaeus, in central Washington State. *Pan-Pac. Entomol.* 91, 82–90.
- Khan, A.G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., et al. (2015). Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *Int. J. Phytoremediation* 17, 1005–1037.
- King, R.F., Royle, A., Putwain, P.D., and Dickinson, N.M. (2006). Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 143, 318–326.
- Klein, T., Siegwolf, R.T.W., and Körner, C. (2016). Belowground carbon trade among tall trees in a temperate forest. *Science* 352, 342–344.
- Köljal, 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., et al. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 22, 5271–5277.
- Krpata, D., Fitz, W., Peintner, U., Langer, I., and Schweiger, P. (2009). Bioconcentration of zinc and cadmium in ectomycorrhizal fungi and associated aspen trees as affected by level of pollution. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 157, 280–286.
- Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E., Chalot, M., and Blaudez, D. (2016). New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrhiza* 26, 657–671.
- Larsson, E., Ryberg, M., Moreau, P.-A., Delcuse Mathiesen, Å., and Jacobsson, S. (2009). Taxonomy and evolutionary relationships within species of section Rimosae (*Inocybe*) based on ITS, LSU and mtSSU sequence data. *Persoonia* 23, 86–98.
- Likar, M., and Regvar, M. (2013). Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil* 370, 593–604.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Oliveira, R.S., Zhang, C., and Freitas, H. (2019). Potential of plant beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of metal-contaminated saline soils. *J. Hazard. Mater.* 379, 120813.
- Macnair, M.R. (1987). Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. *Trends Ecol. Evol.* 2, 354–359.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, and Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3, e1420.
- Miransari, M. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Heavy Metal Tolerance in Plants. In *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*, Q.-S. Wu, ed. (Singapore: Springer Singapore), pp. 147–161.
- Montesinos-Navarro, A., Valiente-Banuet, A., and Verdú, M. (2019). Plant facilitation through mycorrhizal symbiosis is stronger between distantly related plant species. *New Phytol.* 224, 928–935.
- Murtic, S., Jurkovic, J., Basic, E., and Hekic, E. (2019). Assessment of wild plants for phytoremediation of heavy metals in soils surrounding the thermal power station.
- Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., and Kennedy, P.G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* 20, 241–248.
- Otero-Blanca, A., Folch-Mallol, J.L., Lira-Ruan, V., del Rayo Sánchez Carbente, M., and Batista-García, R.A. (2018). Phytoremediation and fungi: an underexplored binomial. in *approaches in bioremediation: the new era of environmental microbiology and nanobiotechnology*, R. Prasad, and E. Aranda, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 79–95.
- Pandey, V.C., Bajpai, O., and Singh, N. (2016). Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 54, 58–73.
- Parraga-Aguado, I., Gonzalez-Alcaraz, M.N., Alvarez-Rogel, J., Jimenez-Carceles, F.J., and Conesa, H.M. (2013). The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environ. Pollut.* 176, 134–143.
- Parraga-Aguado, I., Querejeta, J.-I., González-Alcaraz, M.-N., Jiménez-Cárceles, F.J., and Conesa, H.M. (2014). Usefulness of pioneer vegetation for the phytomanagement of metal(loid)s enriched tailings: Grasses vs. shrubs vs. trees. *J. Environ. Manage.* 133, 51–58.
- Paukszto, A., and Miroslawski, J. (2019). Using stinging nettle (*Urtica dioica* L.) to assess the influence of long term emission upon pollution with metals of the Tatra National Park area. *Atmospheric Pollut. Res.* 10, 73–79.
- Perrin, R.M. (1975). The role of the perennial stinging nettle, *Urtica dioica*, as a reservoir of beneficial natural enemies. *Ann. Appl. Biol.* 81, 289–297.
- Perry, B.A., Hansen, K., and Pfister, D.H. (2007). A phylogenetic overview of the family Pyronemataceae (Ascomycota, Pezizales). *Mycol. Res.* 111, 549–571.
- Phanthavongsa, P. (2018). Etude de deux modalités de phytomanagement testées sur un terrain de gestion de sédiments contaminés par des métaux et métalloïdes. thesis. Bourgogne Franche-Comté.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., and Bert, V. (2017). Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environ. Exp. Bot.* 143, 72–81.
- Redon, P.-O., Béguiurstain, T., and Leyval, C. (2009). Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza* 19, 187–195.

- Repáč, I. (1996). Inoculation of *Picea abies* (L.) Karst. seedlings with vegetative inocula of ectomycorrhizal fungi *Suillus bovinus* (L.: Fr.) O. Kuntze and *Inocybe lacera* (Fr.) Kumm. *New For.* 12, 41–54.
- 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., et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
- Schmidt, C.S., Lovecká, P., Mrnka, L., Vychodilová, A., Strejček, M., Fenclová, M., and Demnerová, K. (2018). Distinct communities of poplar endophytes on an unpolluted and a risk element-polluted site and their plant growth-promoting potential in vitro. *Microb. Ecol.* 75, 955–969.
- Schneider-Maunoury, L., Leclercq, S., Clément, C., Covès, H., Lambourdière, J., Sauve, M., Richard, F., Selosse, M.-A., and Taschen, E. (2018). Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecol.* 31, 59–68.
- Selosse, M.-A., Schneider-Maunoury, L., and Martos, F. (2018). Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytol.* 217, 968–972.
- Shams, K.M., Tichy, G., Fischer, A., Sager, M., Peer, T., Bashar, A., and Filip, K. (2010). Aspects of phytoremediation for chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica*, *Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant Soil* 328, 175–189.
- Simard, S.W., Perry, D.A., Jones, M.D., Myrold, D.D., Durall, D.M., and Molina, R. (1997). Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388, 579–582.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic Press).
- Tardif, S., Yergeau, É., Tremblay, J., Legendre, P., Whyte, L.G., and Greer, C.W. (2016). The willow microbiome is influenced by soil petroleum-hydrocarbon concentration with plant compartment-specific effects. *Front. Microbiol.* 7.
- Tedersoo, L., May, T.W., and Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217–263.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Pöhlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Villarreal Ruiz, L., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., et al. (2014). Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1256688.
- Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., and Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLOS ONE* 7, e40863.
- Van Parijs, J., Joosen, H.M., Peumans, W.J., Geuns, J.M., and Van Laere, A.J. (1992). Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Arch. Microbiol.* 158, 19–25.
- Vierheilig, H., Iseli, B., Alt, M., Raikhel, N., Wiemken, A., and Boller, T. (1996). Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant Soil* 183, 131–136.
- Viktorova, J., Jandova, Z., Madlenakova, M., Prouzova, P., Bartunek, V., Vrchotova, B., Lovecka, P., Musilova, L., and Macek, T. (2016). Native Phytoremediation Potential of *Urtica dioica* for Removal of PCBs and Heavy Metals Can Be Improved by Genetic Manipulations Using Constitutive CaMV 35S Promoter. *PLoS ONE* 11.
- Vitali, F., Raio, A., Sebastiani, F., Cherubini, P., Cavalieri, D., and Coccozza, C. (2019). Environmental pollution effects on plant microbiota: the case study of poplar bacterial-fungal response to silver nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 8215–8227.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- Wang, X.-C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J.-H., Cai, D., and Li, J.-Q. (2015). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Mol. Ecol. Resour.* 15, 573–586.
- Wubs, E.R.J., Putten, W.H. van der, Bosch, M., and Bezemer, T.M. (2016). Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nat. Plants* 2, 1–5.
- Yung, L., Bertheau, C., Cazaux, D., Regier, N., Slaveykova, V.I., and Chalot, M. (2019). Insect Life Traits Are Key Factors in Mercury Accumulation and Transfer within the Terrestrial Food Web. *Environ. Sci. Technol.*
- Zappellini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., et al. (2015). Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol. Biochem.* 90, 101–110.

## 2.4 Interactions chimiques ortie-peuplier et réponse métabolique aux facteurs environnementaux

### 2.4.1 Préambule

La section 2.4 s'intéresse aux interactions chimiques (*i.e.*, allélopathie) entre l'ortie et le peuplier à l'interface rhizosphérique ainsi qu'à leur réponse aux ETM *via* l'étude des composés phénoliques contenus dans leurs racines. Les sections suivantes présenteront d'abord le contexte et la démarche de cette étude, puis développeront plus en détail les deux approches utilisées. Cette étude s'est heurtée à un certain nombre de difficultés d'ordre technique et a nécessité des mises au points méthodologiques qui seront présentées dans les sections qui suivent.

*La méthodologie finale ainsi que les résultats de recherche obtenus sont présentés sous la forme d'un article (section 2.4.6).*

### 2.4.2 Contexte

Nous avons montré dans la section 1.3.3.4 que l'allélopathie (*i.e.*, interactions chimiques entre plantes pouvant conditionner leur croissance et leur survie), au travers de l'exsudation de composés allélopathiques à l'interface rhizosphérique, représente un phénomène majeur dans les SAF. Dans ce contexte, le peuplier a été montré comme étant un arbre allélopathique tandis que le caractère allélopathique de l'ortie n'a pas été avéré dans un contexte naturel. Il semble donc primordial de s'intéresser aux interactions chimiques entre ces deux plantes dans notre SAF sur sols contaminés en ETM.

De plus, s'intéresser à ces phénomènes d'allélopathie sur des sols pollués est d'autant plus pertinent que les composés allélopathiques peuvent également être impliqués dans la réponse des plantes à des stress biotiques et abiotiques. Nous avons ainsi focalisé notre étude sur une famille de composés spécialisés : les composés phénoliques ou polyphénols car ces composés sont majoritairement présents dans les racines de peuplier, et sont également connus chez l'ortie. De plus, ces métabolites secondaires sont ubiquistes et présentent des fonctions écologiques et physiologiques primordiales (*e.g.*, fort pouvoir oxydant, propriétés antifongiques et/ou antimicrobien, potentiel de détoxification des métaux) (section 1.3.3.4), reconnus dans de nombreuses interactions allélopathiques. Bien que présents dans toutes les parties des plantes, nous avons ciblé cette étude sur le compartiment racinaire en raison de l'importance de l'interface rhizosphérique dans ces mécanismes d'interaction avec les micro-organismes associés aux plantes ou présents dans le sol rhizosphérique.



Ainsi, l'identification et la quantification de ces composés dans les plantes représentent un enjeu majeur pour la compréhension des interactions chimiques entre l'ortie, les micro-organismes et le peuplier et la réponse métabolique des plantes en présence d'ETM.

### 2.4.3 Démarche

Pour cela, nous avons adopté une approche en deux étapes. La **première étape** a consisté en l'extraction et le dosage des polyphénols totaux contenu dans des parties souterraines d'ortie et de peuplier par un dosage colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Dans la mesure où cette méthode ne fournit qu'une valeur globale de la quantité des phénols sans refléter la variabilité des composés, elle ne s'est pas montrée suffisamment précise pour détecter des réponses métaboliques. Une **deuxième** a consisté en une étude plus précise des composés phénoliques considérés individuellement, *via* une approche qualitatif-quantitative par métabolomique ciblée. Cette technique a consisté à séparer les différents composés chimiques à 280 nm par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC-UV), à sélectionner les composés répondant à nos différents facteurs environnementaux (cultivars de peuplier/densité ortie, contamination). L'identification de ces molécules d'intérêt a été réalisée avec une collaboration à Nancy (S. Dumarçay, LERMAB) pour le peuplier et à Lyon (A.E. Hay de Bettigny et G. Meiffren, LEM, CESN) pour l'ortie à l'aide d'une méthode UHPLC Qtof MS. Dans la mesure où ces techniques ont demandé un certain nombre de développements méthodologiques n'apparaissant pas dans l'article relatif à cette étude, ceux-ci seront développés à la suite de cette partie.

### 2.4.4 Mise au point du protocole d'extraction des composés phénoliques racinaires

#### 2.4.4.1 Plan de prélèvement

De manière à mettre au point la méthode sans impacter le stock d'échantillons issus de Fresnes-sur-Escaut, des échantillons de racines d'ortie et de peuplier ont été prélevés sur les 6 placettes de la parcelle de Tavaux. Nous avons également considéré le sol rhizosphérique prélevé à Fresnes-sur-Escaut afin de réaliser des essais d'extraction des phénols. Les parties racinaires de l'ortie ont été séparées en racines fines et en rhizomes. Les échantillons de racine ont été minutieusement lavés, lyophilisés et broyés. L'ensemble de ces échantillons ont été aliquotés et conservés à 20°C.

#### 2.4.4.2 Essais de différents protocoles d'extraction

La première étape de l'analyse des phénols totaux a consisté en l'optimisation du protocole d'extraction de ces composés contenus dans les parties racinaires considérées. Pour cela, chaque

échantillon correspondant aux racines fines d'ortie, rhizomes d'ortie et racines fines de peuplier (parcelle Tavaux) et de sols rhizosphérique (parcelle Fresnes-sur-Escaut) ont été poolés (par type d'échantillon) pour constituer des échantillons de référence. Les différents protocoles à tester ont été proposés sur la base de la littérature (Stanojević et al., 2016) et des différents protocoles mis au point au laboratoire pour d'autres plantes.

- Protocole A : extraction à l'eau à froid
- Protocole B : extraction avec éthanol-eau (80/20 v/v) à chaud et à reflux
- Protocole C : extraction avec méthanol-eau (50/50 v/v) (une extraction)
- Protocole D : extraction avec méthanol-eau (75/25 (v/v) (deux extractions successives)

Nous avons initialement utilisé une masse de 100 mg pour chaque matrice. Cette masse a ensuite été mise dans 10 mL de méthanol à 50. La solution a ensuite été soumise à une agitation à bascule pendant 1 heure puis à un bain à ultrasons pendant 15 minutes. L'extrait a ensuite été centrifugé 10 minutes à 9500 tr. Après récupération du surnageant et filtration à 0.45 µm, les extraits ont été dilués et insérés dans un tube, 0.36 mL de réactif de Folin-Ciocalteu, oxygéné et tempéré et 0,71 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ont été ajoutés. Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Gayon, 1968). Les tubes ont ensuite été incubés dans un bain thermostaté à 40 °C durant 20 min. La coloration produite, mesurée à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. L'absorbance a enfin été mesurée à 760 nm. La concentration en phénols totaux des échantillons a été déterminée à l'aide d'une gamme d'étalonnage basée sur l'acide gallique, utilisé comme composé phénolique de référence (Figure 33). Les concentrations en phénols totaux sont ainsi exprimées en mg/g acide gallique équivalent (GAE). Cette gamme étalon a été refaite à chaque nouvelle série d'échantillon ou à chaque utilisation de nouvelles solutions de réactifs. Ces extractions ont été testées sur 4 réplicats provenant des pools de chaque matrice.

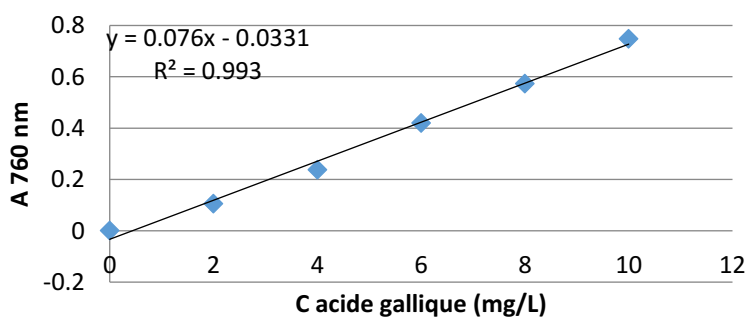


Figure 33. Exemple de courbe d'étalonnage à l'acide gallique utilisée pour le dosage colorimétrique des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

L'efficacité de ces différents protocoles a été évaluée d'après la quantité de composés phénoliques extraite et la répétabilité de l'extraction. Bien que l'extraction à l'eau présente des résultats intéressants, notamment au niveau de la répétabilité, elle ne permet d'extraire que les composés hydrosolubles ce qui est trop restrictif dans notre cas. L'extraction reposant sur l'éthanol à chaud a permis d'obtenir les meilleurs rendements, néanmoins la répétabilité n'est pas suffisante compte-tenu de la forte variabilité observée pour les racines fines de peuplier. Le protocole d'extraction basé sur l'utilisation d'une solution aqueuse de méthanol avec une seule extraction a été retenu car il présente des rendements satisfaisants, avec une bonne répétabilité (faibles écarts-types sur les racines fines d'ortie et de peuplier) et permettra d'avoir des molécules à polarité mixte (Figure 34).

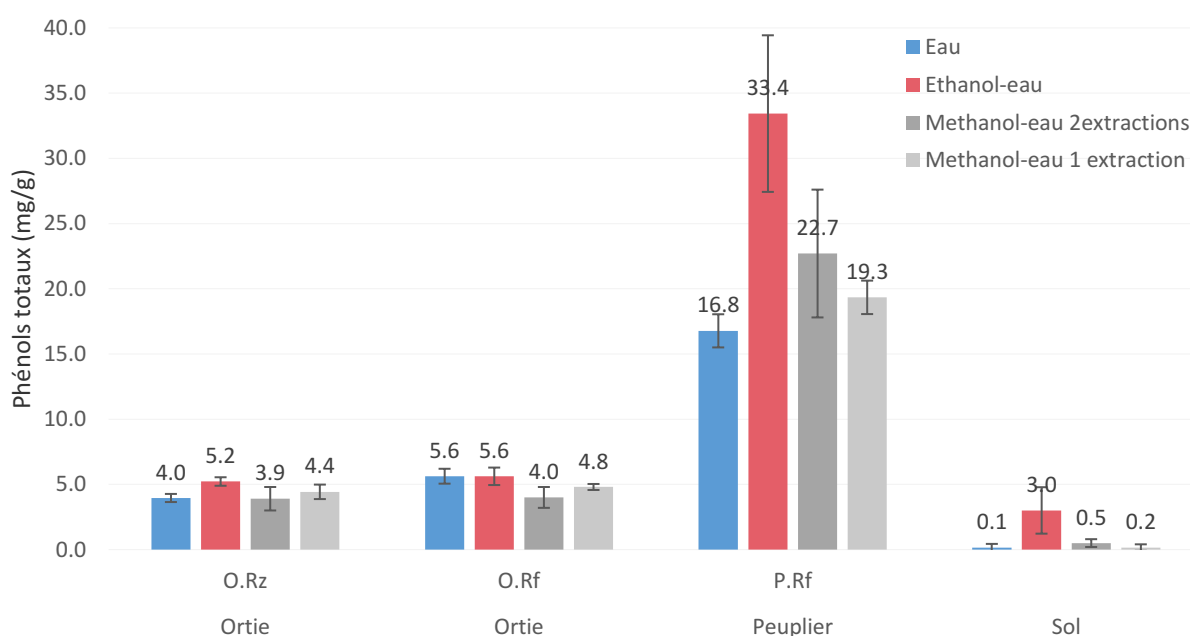


Figure 34. Moyennes ( $n = 4$ )  $\pm$  écart-types en phénols totaux (mg/g MS GAE) mesurés dans un pool de rhizomes d'ortie (parcelle Tavaux - O.Rz), de racines fines d'ortie (parcelle Tavaux - O.Rf), de racines fines de peuplier (parcelle Tavaux - P.Rf) et de sol (parcelle Fresnes), à partir de plusieurs protocoles d'extraction.

Cette première étape a également permis d'appréhender les quantités de composés phénoliques présents dans les différentes matrices considérées et ainsi d'affiner la masse d'échantillon utilisée pour l'extraction. Ainsi, les parties souterraines d'ortie présentent des concentrations en phénols totaux d'environ 5 mg/g, alors que les racines de peuplier en contiennent environ 5 fois plus soit 25 mg/g. Par conséquent, nous avons affiné les masses d'échantillons à 30 mg pour les racines de peuplier et à 80 mg pour les rhizomes et les racines fines d'ortie. Nos essais sur le sol n'ont pas permis d'extraire efficacement les composés phénoliques qui y étaient présents (Figure 34). Ces composés organiques présentant une forte affinité avec les composés phénoliques du sol de Fresnes-sur-Escaut et entravent l'extraction de ceux-ci. Les spécificités de ces sols

contaminés nécessitent des développements méthodologiques spécifiques pour doser les composés phénoliques. Nous avons ainsi choisi de nous focaliser sur les contenus racinaires.

Enfin, les échantillons de végétaux issus de la parcelle de Fresnes-sur-Escaut (prélevés en novembre 2016) ont été extraits selon le protocole C (méthanol-eau, une extraction), en utilisant les masses citées préalablement. L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans l'article intitulé « Metabolic responses of a *Urtica dioica* – *Populus spp.* agroecosystem to trace-metal contaminated soil ».

#### 2.4.5 Approche par métabolomique ciblée

Afin de compléter la méthode globale d'analyse des phénols totaux, les extraits méthanoliques réalisés à partir des échantillons de Fresnes-sur-Escaut ont été séparés, quantifiés par UHPLC-UV puis identifiés par UHPLC-Q-TOF-MS. Cette méthode qualitative et quantitative nous a permis de séparer, de quantifier (de manière relative) et d'identifier les différents composés présents dans les extraits de peuplier et d'ortie. Cette étude s'est articulée en 7 tâches qui seront présentées en détail à la suite de ce chapitre (Figure 35).

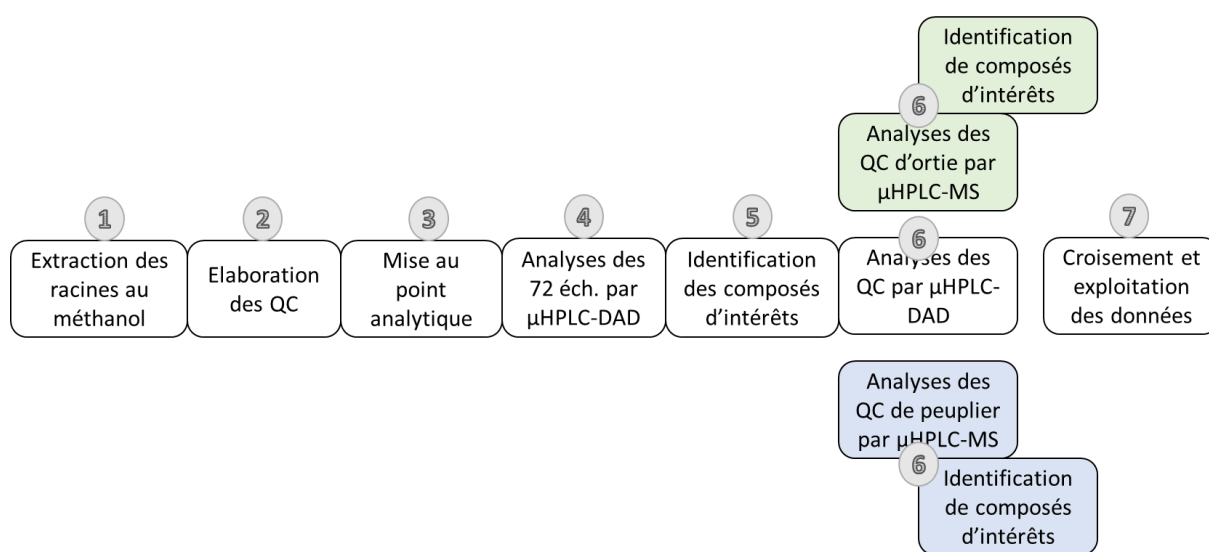


Figure 35. Etapes réalisées pour l'identification et la quantification des composés phénoliques issus d'extraits racinaires de peuplier et d'ortie par une approche de métabolomique ciblée

Cette analyse qualitative du métabolome de l'ortie et du peuplier s'est basée sur les mêmes extraits méthanoliques que ceux utilisés pour le dosage des phénols totaux, de manière à pouvoir les relier et gagner en efficacité (1). A partir d'un volume précis et équivalent pour chacun des échantillons de racines d'ortie et des peupliers Skado et I214, des échantillons nommés « Quality check » (QC) ont été préparés, pour chacune de ces trois matrices pour les identifications. Ces derniers ont été utilisés pour réaliser la mise au point de la technique (2).

Nous nous sommes initialement basés sur la littérature et notamment sur (Orčić et al., 2014; Otles and Yalcin, 2012; Pinelli et al., 2008) pour élaborer le protocole de séparation des composés. L'équipement utilisé pour cette étape était une UHPLC couplée à un récepteur DAD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), récemment acquise au laboratoire. La première étape a consisté en une mise au point du protocole de séparation des métabolites présents dans les extraits méthanoliques de peupliers et d'ortie. A la suite de différents tests de mise au point de l'analyse des extraits, un même protocole permettant une séparation satisfaisante des composés présents dans les extraits d'ortie et de peuplier a été élaboré (3).

L'analyse en série des 108 échantillons de plante par UHPLC-UV a pu être réalisée (4). A partir des résultats obtenus et basés sur les aires de pics, l'influence des facteurs contamination et placette (section 2.1.3) a été testée sur l'ensemble des profils métaboliques des plantes et sur chaque composé pris individuellement, à l'aide d'analyses multivariées et bivariées, respectivement. Cette étape a permis d'identifier les composés répondants à ces facteurs et potentiellement impliqués dans la réponse métabolique des plantes aux facteurs étudiés (5).

Les QC ont été envoyés à deux laboratoires partenaires présentant les compétences nécessaires à l'identification des composés et munis d'un équipements UHPLC-MS-QTOF. Le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois (LERMAB) UMR 1093, Nancy a été en charge de l'identification des composés du peuplier, tandis que l'UMR Ecologie microbienne 5557, Lyon s'est chargé des échantillons d'ortie (6). Cette étape d'identification des composés a permis l'identification de 7 composés pour les peupliers et 1 pour l'ortie. Néanmoins les résultats ont montré que les composés obtenus ne correspondaient pas tous à ceux de la bibliographie des racines d'ortie et de peuplier, et cela plus particulièrement dans le cas de l'ortie. Finalement, la dernière étape a consisté à reporter les identifications effectuées à Nancy et à Lyon à partir des échantillons QC, sur nos chromatogrammes correspondants aux échantillons analysés (7).

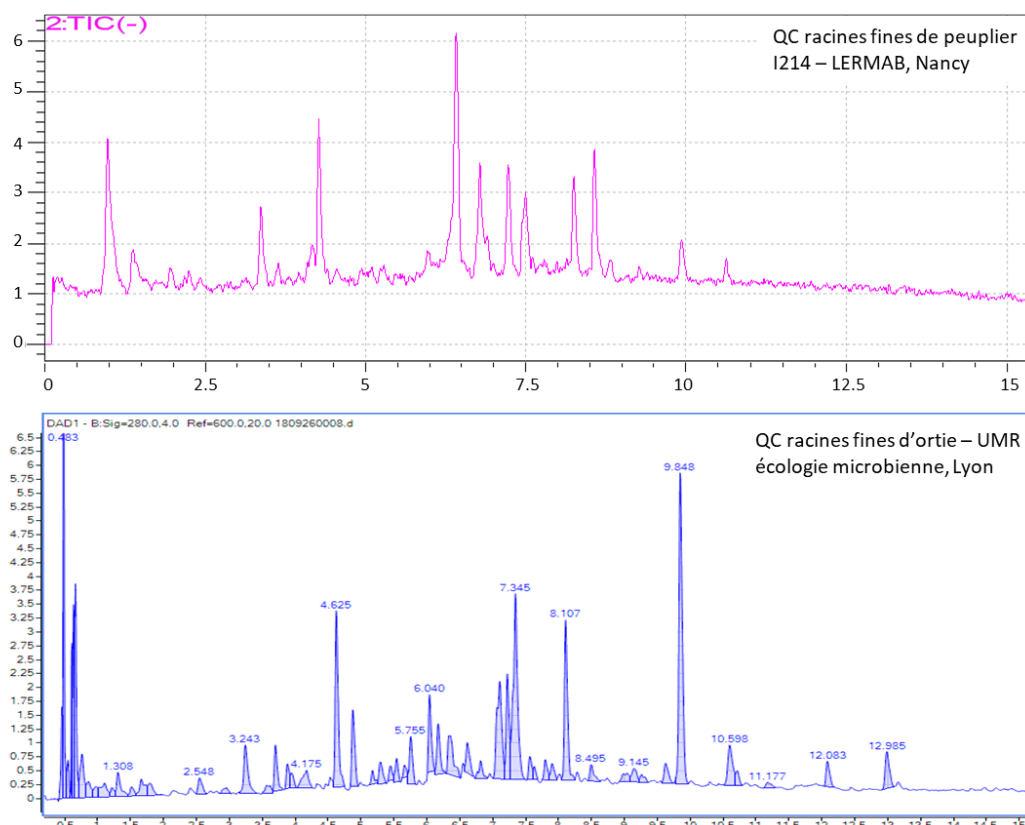


Figure 36. Exemple de chromatogrammes obtenus suite à l'analyse des échantillons QC de peuplier à Nancy (en haut) et des échantillons QC d'ortie à Lyon par UHPLC-UV.

#### 2.4.6 Présentation de l'article et des principaux résultats

Cet article intitulé “Metabolic responses of an *Urtica dioica* – *Populus spp.* agroecosystem to trace-metal contaminated soil” est une première version présentant les résultats de l'étude par métabolomique ciblée. Il sera retravaillé en vue d'être publié dans un journal scientifique.

Les premiers résultats ont permis de détecter des quantités différentes de certains composés présents dans les racines d'ortie et de peuplier, selon les traitements. Toutefois, en raison de facteurs confondants, nous ne pouvons pas affirmer si les variations métaboliques observées pour les cultivars de peuplier seraient liées à des profils métaboliques propres à chacun, ou à des réponses métaboliques liées à la densité d'ortie. Par ailleurs nous avons détecté une influence de la contamination sur le métabolome de l'ortie et du peuplier. La prochaine étape de cette étude consistera à croiser les données issues de la métabolomique avec celles issues du barcoding environnemental afin de faire le lien entre ces deux approches complémentaires.

Pour cette étude, je me suis chargé de l'ensemble des analyses biochimiques nécessaires à la quantification des phénols totaux, tandis que les analyses par UHPLC ont été réalisées en partenariat avec M.L. Toussaint, ingénieure de recherche et responsable de la partie analytique. L'identification des composés a été réalisée dans le cadre des collaborations citées plus haut.

## Polyphenolic responses of an *Urtica dioica* – *Populus* spp. agroecosystem to trace-metal contaminated soil

Contributions des scientifiques à cet article (l'ordre des auteurs n'a pas encore été défini) :  
Yung Loïc, Toussaint Marie-Laure, Hay-de-Bettignies Anne-Emmanuelle, Meiffren Guillaume,  
Dumarcay Stéphane, Chalot Michel, Geneviève Chiapusio

KEYWORDS: Targeted Metabolomic; Polyphenolics; Poplar hybrid; *Urtica dioica*; Phytomanagement; Trace metal

### INTRODUCTION

In plants, the ability to develop in harsh environments, such as polluted ones and to compete with other species is related to their adaptability and their capacity to react against stress (Baker, 1981; Baker and Walker, 1989). In the case of contaminated sites, excessive concentrations of trace-metals TM (e.g., Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn) are toxic and lead to growth inhibition, decrease in biomass and death of the plant (Yadav, 2010). According to the chemical and physical properties of these elements, their harmful effect can be divided into i) generation of reactive oxygen species (ROS) by auto-oxidation and Fenton reaction (Shahid et al., 2014), ii) blocking of essential functional groups in biomolecules: proteins (by the inactivation of the SH-groups in enzymes active centers) and polynucleotides (Mithöfer et al., 2004) and iii) substitution of essential metal ions by other incorrect ones (Rai et al., 2004). Plant damage occurs when the capacity of antioxidant processes and detoxification mechanisms are lower than the amount of ROS production. In the course of evolution, plants have developed complex systems protecting them from ROS through the secondary metabolism, consisting of several enzymes and antioxidants (Michalak, 2006). Phenolics are secondary metabolites that have a major role in antioxidant defence in plant cells (Grace and Logan, 2000) and act as metal chelators (Sakihama et al., 2002). Antioxidant action of phenolic compounds is due to their high tendency to chelate metals. Phenolics possess hydroxyl and carboxyl groups, able to bind particularly Fe and Cu (Jung et al., 2003). They may inactivate TM by chelating and suppressing the superoxide-driven Fenton reaction, which is among the most important sources of ROS (Rice-Evans et al., 1997). Consequently, it has been found that phenolics can also be used as a stress indicator because they fluctuate by the exposure of TM or other stresses in plants (Mithöfer et al., 2004; Popović et al., 2016; Verma and Shukla, 2015). Additionally, phenolics are also known to be involved in allelopathic chemical interactions between plants and microorganisms (Li et al., 2010), and particularly in the case of agroecosystems where various tree, crops and weeds are associated (Kohli et al., 1997; Singh et al., 2001; 2008b). Allelopathy is a major interaction mechanism in agro-forestry systems (AFS) and has been the subject of numerous studies (Batish, 2008; Zeng, 2008b; Regnault-Roger et al., 2008; Singh et al., 2001a; 2006). When exuded in the rhizosphere through roots of a donor plant, phenols can directly or indirectly (i.e., through microorganisms) affect the growth and fitness of target neighbouring plants (Reigosa et al., 2006). Such interactions can explain some species dominance over others (Singh et al., 2001). In particular, studies on cottonwood highlighted phytotoxic effects on various cereal crops through its litter releasing allelochemical phenolic compounds such as salicin (Singh et al., 2001). The rhizosphere is then a crucial narrow zone of soil living plants roots where plant roots compete with root systems of neighbouring plants and also bacteria and fungi. The nature and the concentrations of allelochemicals released by the plant into the rhizosphere is dependent of the plant itself and several other biotic or abiotic factors such as TM (Latif et al., 2017). Surprisingly, very few studies focused on the interactions of plants in a context of phytomanagement.

Phytomanagement is a technique based on vegetal species to rehabilitate and revalorize polluted sites. Fast-growing tree like poplars (*Populus* sp.) allows producing high amount of valorizable plant biomass for the production of renewable energy (Kidd et al., 2015; Pandey et al.,

2016). At the same time, trees are able to limit the dispersal and the risk associated with contaminants while acting as activator of biodiversity (Parraga-Aguado et al., 2014). The stinging nettle *Urtica dioica* L. is frequently accompanying poplar plantations (Cronk et al., 2016) at both natural and trace metals TM-contaminated sites (Yung et al., 2019). Recently, nettle is the subject of growing interest in the context of phytomanagement as it i) constitutes a new resource of high-quality herbaceous fibres (Bacci et al., 2009; Di Virgilio et al., 2015), ii) can promote the biodiversity of local flora and fauna and particularly entomofauna (James et al., 2015; Perrin, 1975) and iii) is able to spontaneously grow at various TM-contaminated sites (Murtic et al., 2019; Paukszto and Mirosławski, 2019; Viktorova et al., 2016). While poplar is one of the most commonly used model plants (Popović et al., 2016), the metabolic profile of nettle has only been studied from a pharmacological or plant-based bioeconomy point of view (Berni et al., 2019; Gül et al., 2012; Jakubczyk et al., 2015; Kukric et al., 2012).

In this context, knowing the polyphenolic profiles of nettle and poplar co-cropped in phytomanagement field trials appears essential to characterize the metabolic responses of plants to TM stress and the suitability of the plant association. The biochemical interactions occurring in nettle-poplar rhizosphere are still challenges. New technical advancement in metabolite detection and identification are proving useful when studying such complex rhizospheric interactions and metabolic profiling is one of these tools (Latif et al 2017). Thus, this study aimed at characterizing the belowground polyphenolic profile of two poplar cultivars and the associated *Urtica dioica* exposed to two degrees of TM soil contamination in a nettle-poplar agrosystem in order to elucidate the contamination effects on those metabolites.

## MATERIALS AND METHODS

### Field site description

The study site located in Fresnes-sur-Escaut in the Hauts-de-France region (France, 50°25'47.9"N 3°35'07.8"E) consists in a nettle-poplar agrosystem on a dredged sediment disposal site, contaminated with TM, operating between 1978 and 1989. Approximately 200 000 m<sup>3</sup> of silt and sand from the dredging of the canal de l'Escaut were deposited on the studied site, resulting in a total thickness of sediment ranging from a few centimetres to several tens of centimetres for the most exposed areas. Further soil analyses had revealed a heterogeneous contamination with As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn within the surface horizons (0-50 cm). The Physico-chemical characteristics, total and Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-extractable concentrations of trace and major elements of topsoil have been described in detail in a previous study (Phanthavongsa et al., 2017). Briefly, the experimental site is divided into two parts depending on the degree of contamination: the low trace-metal (LTM) area and the high trace-metal (HTM) area. The HTM area has mean soil concentrations of Zn (2231 mg/kg), Pb (425 mg/kg), Cu (108 mg/kg) and Cd (63 mg/kg), 20-, 9-, 4- and 100-fold higher than the LTM area, respectively. A phytomanagement field trial was implemented in 2011 with the two poplar cultivars Skado (*P. trichocarpa* × *P. maximowiczii*) and I214 (*P. deltoides* × *P. nigra*) as a short-rotation coppice (SRC; 2200 stems/ha). A detailed description of the experimental design is also available in (Phanthavongsa et al., 2017). Five years after the plantation, the spontaneous herbaceous layer has evolved in a similar way to that of the same experimental plantation set up in eastern France, with a domination of the Stinging nettle (Yung et al., 2019). Briefly, the native stinging nettle had a coverage rate depending on the development of the poplar cultivar, with a high coverage rate reaching 60% within I214 plots and a low coverage (up to 20%) within the Skado plots. Among the plots subdividing the plantation, we selected one plot of each poplar cultivar under both the LTM (n=2 plots) and HTM (n=2 plots) areas.



### ***Sample collections and preparations***

The sampling was conducted in November 2016, consisting of collecting root samples from the upper 20-cm layer of soil from 9 random poplars and 9 adjacent nettles for each of the four studied plots. All samples were sampled over a one-day period to reduce any heterogeneity imparted by climatic conditions. One poplar sample was made by mixing three sub-samples of thin poplar roots from each tree whereas the entire nettle root system from one plant was collected and represented one sample. At the laboratory, all root samples have been carefully sorted and rinsed with three demineralized-water baths to remove soil particles and thin roots and rhizome of nettle were carefully separated. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further chemical analysis. *In fine*, 9 sub samples of Skado poplar roots, 9 of I 214 poplar roots, 9 of nettle roots and 9 of nettle rhizomes were prepared for each studied plot.

### ***Poplar and nettle phenolic extractions***

All samples were freeze-dried and crushed in a grinder into a fine powder. Then, 30 mg of each poplar powder sample and 80 mg of each nettle powder were mixed with 10 ml of methanol/distilled water (50/50 v/v), agitated on a reciprocal shaker (15 rpm) for 1 hr and placed in an ultrasonic bath for 15 min. Samples were finally centrifuged and filtered (0.45  $\mu\text{m}$  syringe filters). Moreover, four QC (Quality Control) samples corresponding to a mix of all Skado root samples, I214 root samples, nettle root samples and nettle rhizome samples were elaborated. All methanol extracts were aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in order to be used for both Folin-Ciocalteu and targeted metabolomics quantifications.

### ***Total phenolic compound quantification***

Total phenolic contents were quantified with the well described protocol using the Folin–Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). Briefly, phenolics were quantified by mixing 0.6 mL of methanol-soluble extract samples with 1.9 mL of distilled-water, 0.36 mL Folin & Ciocalteu reagent (5%) and 0.71 mL sodium carbonate solution (20%). Dilutions of 1/12.5 and 1/37.5 were performed for nettle and poplar, respectively. The total phenolic concentrations were expressed in mg equivalent gallic acid (GAE) (A 760) per g of Dry Material.

### ***Poplar and nettle Metabolite profiling***

Metabolite profiling of methanol-soluble extracts was analysed using a UHPLC-UV equipped with photodiode array detector (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, California USA). A Poroshell C18 analytical column (100x3.0 mm i.d.: particle size, 2.7  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, California USA) was used for the separation of metabolites with an injection volume of 20  $\mu\text{l}$  per sample. The column temperature was maintained at  $30^{\circ}\text{C}$ . The binary mobile phase consisted of a 0.4% acetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with a flow rate of 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . A multi-step linear gradient was employed using 5% B and 95% A at 0 min, 5% B and 95% A at 1.5 min, 45 % B and 55% A at 18 min, 100% A at 21 min, 5% B and 95% A 21 min. UV/vis spectra were recorded from 190 to 600 nm. Qualitative and quantitative analyses were performed using OpenLab software (Agilent Technologies). Chromatographic profiles were evaluated at 280 nm and peak integrations for specific molecules of interest (phenolics) were expressed as recovered peak areas per dry weight (DW) ( $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ).

### ***Poplar and nettle phenol compounds identification***

The four QC (Quality Control) samples were selected to determine poplar and nettle metabolites. An UHPLC/MS/QTOF mass spectrometer equipped with photodiode array detector (Agilent 1290 Infinity, ESI-QTOF 6530, Agilent Technologies, California USA) with the same C18 column and multistep linear gradient was used. Mass spectra were acquired in positive mode, 2 GHz mode for resolution, with electrospray ionization and recorded for the range of  $m/z$  80 – 2000. Nitrogen was used as drying gas; the flow rate was 12  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , fragmentor 100V, drying gas

temperature at 310 °C, a pressure of 40 psi and capillary voltages of 4kV. Data acquisition and data analysis were performed with Mass Hunter Acquisition® (version B.04) software and Mass Hunter Qualitative Analysis® (version B.06) software (Agilent Technologies). Chromatographic profiles and peak identification for specific molecules of interest (phenolics) were evaluated at 280 nm.

### ***Data treatment and statistical analyses***

Statistical analyses were performed with R software v.3.5.1 (R Development Core Team, 2013). All the considered variables were checked for their homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro–Wilk test). Non-normal data were log transformed. Data that did not fit a normal distribution after transformation were analyzed with nonparametrical tests. All statistical tests were considered significant at  $P < 0.05$ . The results are presented as the means with their standard deviation (SD). Differences in total phenolic concentrations between the four studied treatments (i.e., LTM-I214, LTM-Skado, HTM-I214, HTM-Skado) for rhizome and thin roots of nettle and roots of the two poplar cultivars, were assessed using a pairwise Kruskal–Wallis test. For nettle thin roots and the two poplar roots, relationships between phenolic compounds were described using principal components analysis (PCA), based on standardized peak areas. The influence of the contamination factor (i.e., LTM and HTM) between the phenolic composition of each studied plant were assessed using A Monte-Carlo permutation test (with 999 iterations) performed with the ADE4 package. Finally, we investigated the influence of the latter factor on each phenolic taken individually, using a Mann-Whitney-Wilcoxon test or a welch two sample t-test.

## **RESULTS**

### ***Poplar total phenolics root content and polyphenolic profiling***

Poplar roots exhibited a mean concentration of total phenolic content of around 30 mg/kg EGA. The total phenolic content of I214 and Skado roots were equivalent whether or not the level of soil contamination was taking into account in the statistics. This means that the total amount of phenolics was not influenced by the degree of contamination (Figure 1). Surprisingly, the only difference was found to be between I214 and Skado cultivars in LTM plots where phenolics were more recovered in I214 (25% higher than Skado).

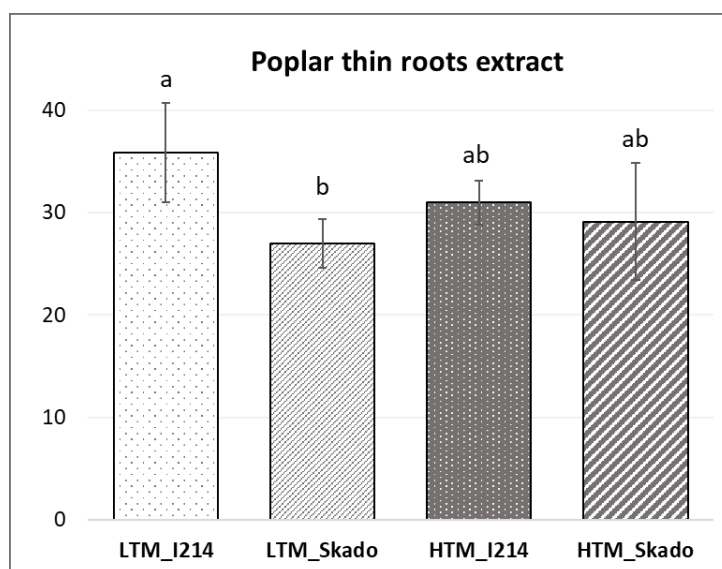


Figure 1: Total phenolics (mean  $\pm$  SD expressed in mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g Dry Matter (DW)) quantified in an aqueous MeOH extract, for the I214 and Skado cultivars in the LTM (LTM\_I214 and LTM\_Skado) and the HTM (HTM\_I214 and HTM\_Skado) areas ( $n = 9$  for each treatment). Bars

with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ( $P < 0.05$ ).

As the quantification of total phenolics only gives general phenolic quantification, we focused on metabolic profiling. Over 60 compounds were separated in the I214 and Skado QC (figure 2) at 280 nm and among them, height compounds have been identified based on UV spectra, MS detection and literature, (Table 1). They were among the major ones (fig 2).

Table 1: Spectral data of identified Poplar Skado and I214 phenolics. <sup>a</sup>Family or proposed name were given based on UV, MS data and literature data.

Compound number	Retention times (min)	Name or family <sup>a</sup>
<b>P03</b>	<b>4.00</b>	<b>Salicin glucoside</b>
<b>P04</b>	<b>4.31</b>	<b>Isosalicin</b>
<b>P28</b>	<b>9.39</b>	<b>Salicortine</b>
<b>P30</b>	<b>9.81</b>	<b>Populoside A</b>
<b>P39</b>	<b>11.03</b>	<b>Salicyloysalicin</b>
<b>P43</b>	<b>11.54</b>	<b>Nigracin</b>
<b>P59</b>	<b>15.23</b>	<b>Tremulacine</b>

All these eight identified compounds were present in methanolic extracts of both I214 and Skado poplars. Then, we focused on statistical analyses to compare i214 and skado cultivars in term of phenolic profiles.

The overall profiles were comparable between the I214 and Skado cultivars but clear differences in term of metabolite abundances between the two poplar cultivars were observed. Indeed, the quantity of phenolics were significantly higher in I214 roots (total peak areas of the compounds:  $4401 \pm 1343$  mAU\*min / 80 mg DW) compared to the skado ones ( $2259 \pm 481$  mAU\*min / 80 mg DW) ( $P < 0.01$ ). PCA also revealed that phenolic profiles were distinct. A Monte-Carlo permutation test (with 999 iterations) revealed significant differences in term of phenolic compounds between the roots of the two cultivars ( $P = 0.001$ ), which were graphically separated by the PC1, accounting for 35.1% of the total variability.

Skado root samples present six major metabolites (*i.e.*, P08, salicortine, Salicyloysalicin, p40, nigracin and tremulacine) with mean peak area over 100 mAU\*min and two over 200 mAU\*min (*i.e.*, P08 and Salicyloysalicin). Concerning I214 root samples, six major compounds were also present in the extract, including tree of the previously mentioned for Skado (*i.e.*, P08, salicortine and salicyloysalicin) and three additional ones (*i.e.*, p35, p42 and p54). Overall, P08 represents the major metabolite recovered in I214 extracts with a peak area around x15 compared to other metabolites. Concerning the Skado extracts, Salicyloysalicin was the most recovered metabolite.

The principal components analysis performed on the poplar-associated phenolic compounds indicated that some compounds strongly drove the dispersion of the samples. Samples corresponding to the Skado cultivar were mainly related to the salicyloysalicin (compound 39) and tremulacin (compound 59). Conversely, the presence of higher quantities of P08 and the following compounds: 01, 02, 14 and 19 in I214 cultivar separated it from the Skado one (Figure 3). The compound p43 (nigracin) was recorded in 90% of the I214 roots whereas it was only detected in 17% of the Skado ones, but in high concentrations (from 244 to 317 mAU\*min).

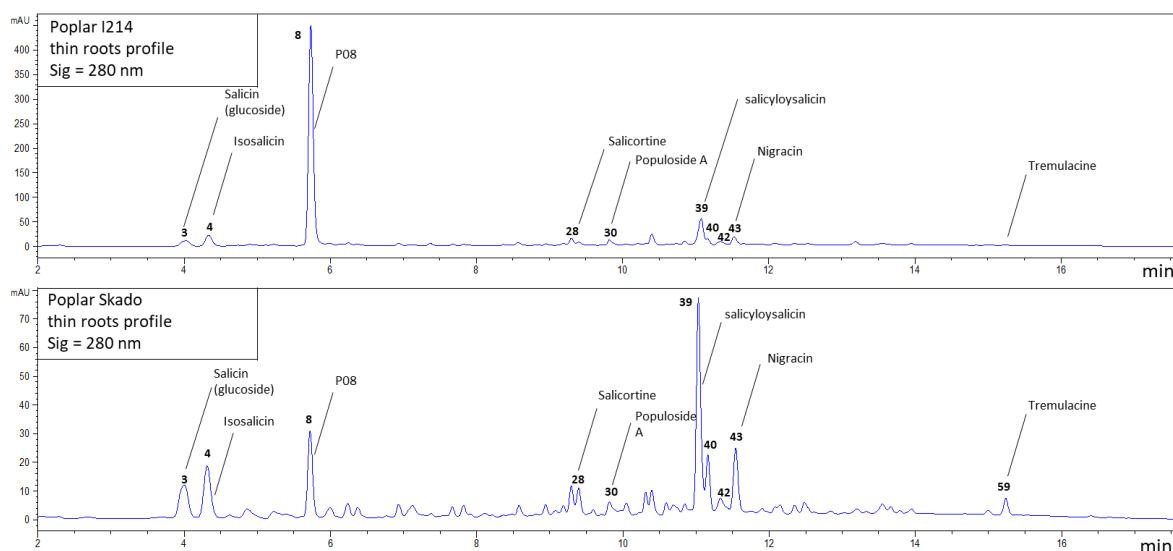


Figure 2: UHPLC-UV chromatograms of aqueous 50 % MeOH extracts of QC (Quality control) samples from roots of I214 and Skado poplar cultivars, respectively, at 280 nm. Only identified metabolites were specified and the other major ones were numbered (P40 and P42).

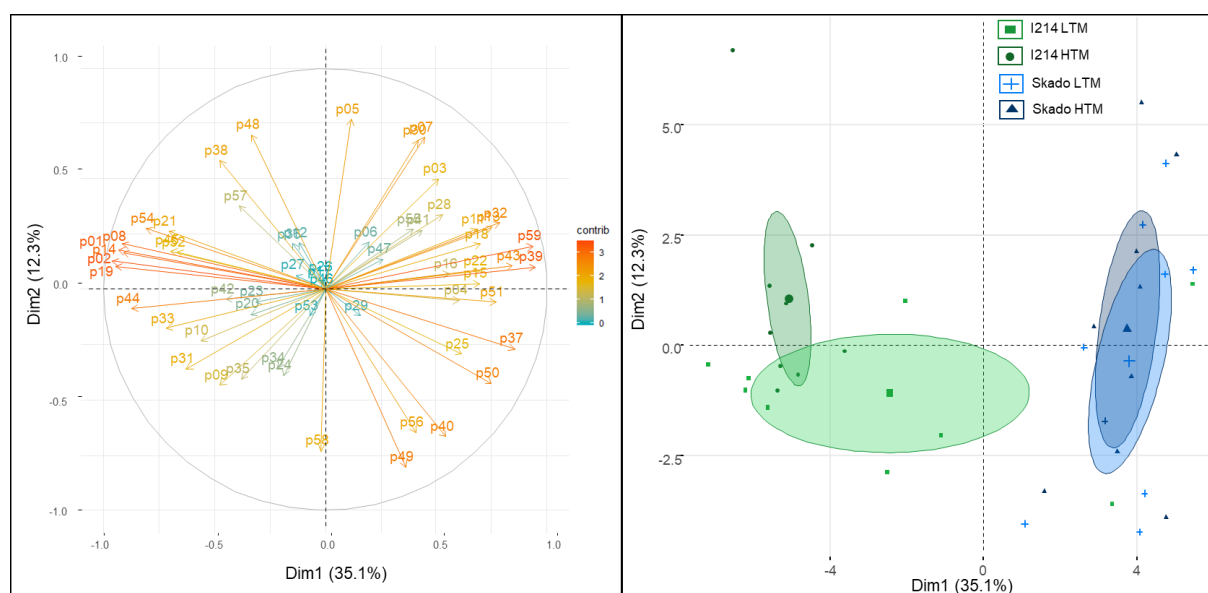


Figure 3: Principal component analysis among metabolites for two poplar cultivars (i.e., I214 and Skado) grown in two contaminated areas (i.e., LTM and HTM areas). A: Projections of element vectors on principal components 1 and 2 with the degree of contribution depending on the colour. P03: Salicin, p04: isosalicin, p28: salicortine, p39: salicyloysalicin, p59: tremulacin. B: Projection of the poplar cultivar and the areas on principal components 1 and 2, with 95% confidence ellipses.

### Poplar polyphenolic root profiles and contamination

A contrasting influence of the degree of contamination between the two cultivars was found. I214 poplars were significantly influenced by the degree of contamination ( $P = 0.001$ ) whereas this influence was not significant for the Skado poplars ( $P = 0.23$ ). Indeed, in the PCA, the PC2, which explained 12.3% of the total variability, only separated the two areas (i.e., LTM and HTM) for the I214 cultivar.

Indeed, all the 59 compounds were detected in poplar roots from the two areas and no striking differences, in term of abundance of these compounds were detected between the two areas (Table 2). Only 10 of the 59 studied ones were significantly influenced by the degree of contamination ( $P < 0.05$ ) for the Skado cultivar. Concerning the I214 cultivar, 20 compounds, in term of abundance, were significantly influenced by the contamination factor. For 17 of these compounds, the measured peak areas were significantly reduced in the HTM area compared to the LTM one (Table 2).

Table 2: 20 phenolics recovered (mean  $\pm$  SD) of peak area (mAU\*min/30 mg DW) that were significantly influenced by the contamination factor, for each poplar cultivar (i.e., I214 and Skado) and according to the degree of contamination (i.e., HTM and LTM) ( $n = 9$  for each treatment). For each compound, the HTM and LTM modalities were compared and significant differences (Signi.) were indicated with stars (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ).

	Salicin 4.00	Isosalicin 4.31	p06 5.22	p12 6.93	p14 7.37	p16 7.82	p21 8.57	p26 9.18	Salicortine 9.39	p35 10.39
<b>I214 cultivar</b>										
HTM	16.1 $\pm$ 3.3	11 $\pm$ 5.3	11 $\pm$ 3.5	35.2 $\pm$ 6.1	31.6 $\pm$ 7.1	16.7 $\pm$ 3.6	46.7 $\pm$ 14.2	12.5 $\pm$ 3.5	104.1 $\pm$ 28.7	99.8 $\pm$ 139
LTM	24.1 $\pm$ 6.3	18.6 $\pm$ 5.7	17.9 $\pm$ 5.2	24.3 $\pm$ 6	16.4 $\pm$ 10.8	21.4 $\pm$ 5.3	18.2 $\pm$ 15.1	17.2 $\pm$ 5.4	160.2 $\pm$ 30.9	282.1 $\pm$ 213.6
Significativity	**	**	**	**	**	*	***	*	**	*
<b>Skado cultivar</b>										
HTM	33.8 $\pm$ 18.5	20.2 $\pm$ 7.7	14.6 $\pm$ 6.6 19.6 $\pm$	33.9 $\pm$ .1	4 $\pm$ 3.2	28.9 $\pm$ 4	19.6 $\pm$ 19.4	15.1 $\pm$ 5.7	167.1 $\pm$ 40	99.8 $\pm$ 89.1
LTM	26.8 $\pm$ 15.7	25.5 $\pm$ 14.1	11.8	27 $\pm$ 5.5	2.2 $\pm$ 2.7	21.6 $\pm$ 8.3	1.8 $\pm$ 5.4	18.9 $\pm$ 12	162 $\pm$ 75.4	72.8 $\pm$ 40.9
Significativity	NS	**	**	**	NS	**	*	NS	**	*
	p37 10.69	Salicoylsalicylin 11.03	p41 11.33	p49 12.15	p50 12.35	p51 12.48	p53 13.19	p55 13.55	p58 14.99	Tremulacin 15.23
<b>I214 cultivar</b>										
HTM	10 $\pm$ 5	59.3 $\pm$ 22.7	7.2 $\pm$ 2 18.7 $\pm$	4.9 $\pm$ 6.2	4.4 $\pm$ 3.5	3.4 $\pm$ 10.3	16.1 $\pm$ 43	14.9 $\pm$ 6.8	3 $\pm$ 2.9	9.5 $\pm$ 5.9
LTM	25.2 $\pm$ 12.9	219.6 $\pm$ 170.2	12.7	21.1 $\pm$ 14.9	14.4 $\pm$ 5.8	44.6 $\pm$ 43.2	83.8 $\pm$ 107	23.1 $\pm$ 6.6	7.6 $\pm$ 4.3	41 $\pm$ 41.8
Significativity	**	**	**	**	***	*	*	*	*	**
<b>Skado cultivar</b>										
HTM	41.2 $\pm$ 9.7	456.4 $\pm$ 77.2	20.6 $\pm$ 20.1	20.4 $\pm$ 15.9	18.8 $\pm$ 4.7	72.3 $\pm$ 34.9	35.5 $\pm$ 42.2	25.8 $\pm$ 8.4 24.5 $\pm$	5 $\pm$ 6.5	108.2 $\pm$ 27.7
LTM	40.6 $\pm$ 6.3	434.6 $\pm$ 84.1	17.9	28.3 $\pm$ 23.6	19.3 $\pm$ 5.6	61.7 $\pm$ 24.2	5.8 $\pm$ 11.6	12.5	4.9 $\pm$ 7.3	108.9 $\pm$ 20.9
Significativity	**	*	**	*	**	NS	*	*	NS	NS

Salicoylsalicin, Salicortine and Tremulacin, which were among the most abundant compounds, were significantly reduced ( $P < 0.001$ ) by 1.5-, 3.7- and 4.3-fold, respectively, in I214 samples from the HTM area. Several other compounds followed similar rates of reduction but with a high between-sample variability that nuanced this trend. Three compounds (i.e., 12, 14 and 21) were slightly more abundant in the roots of I214 poplar grown at the HTM area, but they were not among the more represented ones. These results clearly highlighted different metabolic responses between poplar cultivars according to the level of contamination. Only the I214 cultivar had a reduction of their major metabolites recovered in roots in the HTM areas.

### ***Nettle total phenolic root and rhizome contents and polyphenolic profiling***

The belowground parts of nettle showed lower total phenolic content than poplar with average total phenolic contents of 3.6 and 5.3 mg/g DW GAE for rhizomes and roots, respectively. The total phenolic content in nettle roots and rhizomes did not differ between Skado and I214 cultivars whatever the areas. Only Skado rhizomes produced more phenolics in HTM compared to I214 in LTM areas (Figure 4).

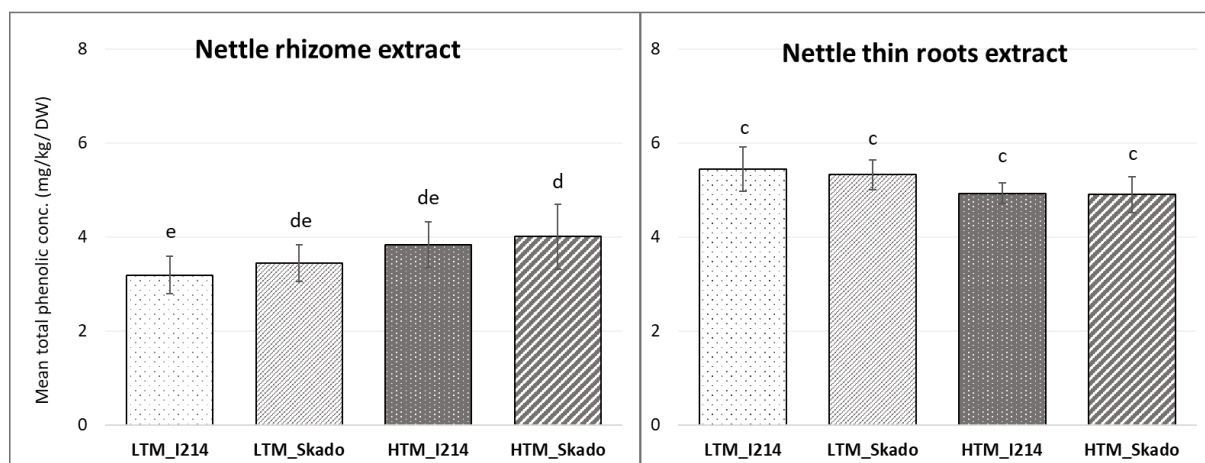


Figure 4: Total phenolics (mean  $\pm$  SD expressed in mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g Dry Matter (DW)) quantified in an aqueous MeOH extract, for nettles collected from the I214 and Skado plots in the LTM (LTM\_I214 and LTM\_Skado) and the HTM (HTM\_I214 and HTM\_Skado) areas ( $n = 9$  for each treatment). Bars with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ( $P < 0.05$ ).

Focusing on nettle metabolites, 25 compounds from the methanolic extracts of nettle roots were separated (Figure 5). Among them, one metabolite (O.6) was identified as the D-glucopyranoside ( $C_{26}H_{34}O_{12}$ ) which derived from Hydroxy benzoic acids. For two other metabolites, only the empirical formulas were found O.11 ( $C_{21}H_{36}O_{11}$ ) and O.21 ( $C_{26}H_{36}O_{11}$ ) and further analyses need to be conducted to go further in their identifications (Table 3).

Table 3: Spectral data of identified nettle phenolics. <sup>a</sup>Family or proposed name were given based on UV, MS data and literature data.

Compound number	Retention times (min)	Name or family <sup>a</sup>
<b>O.6</b>	<b>6.58</b>	<b>D-glucopyranoside</b>
<b>O.11</b>	<b>8.34</b>	<b>(<math>C_{21}H_{36}O_{11}</math>)</b>
<b>O.21</b>	<b>10.18</b>	<b>(<math>C_{26}H_{36}O_{11}</math>)</b>

For nettle rhizomes metabolites, only 10 were similar with the nettle root profiles and no specific metabolites have been detected. Additionally, most of the obtained rhizome-related compounds had lower peak areas than root-related ones. In other words, the phenolic profile of nettle rhizomes appeared to be comparable to that of roots, but with lower quantities, and below our detection limit for some compounds (Figure 5).

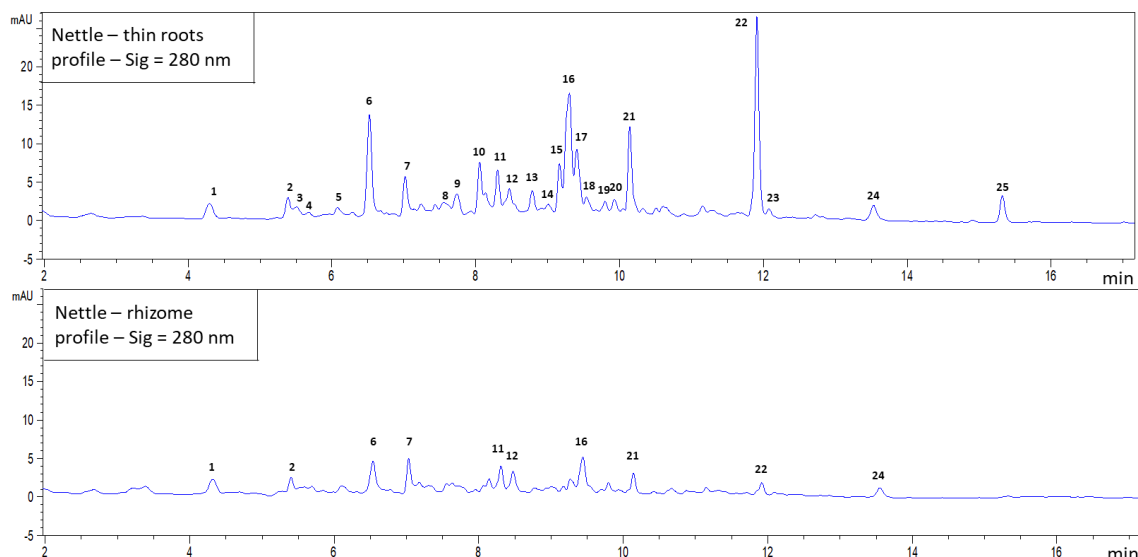


Figure 5: HPLC chromatograms of an aqueous 50 % MeOH extract of QC (Quality control) samples from roots (A) and rhizomes (B) of nettles, at 280 nm. All the 25 considered compounds were specified.

The lower phenolic content in nettle rhizome seems to be confirmed by both the total and the metabolomic approaches. Such results confirm the choice of selecting nettles roots rather than rhizomes in our study not only in terms of quantity but also in terms of possible metabolic interactions in the rhizosphere.

### Nettle polyphenolic root profiles under Skado and I214 plots, according to different level of contamination

Four compounds mainly drove the dispersion of the nettle root samples between Skado and I214 plots and were named O.06 (D glucopyranoside), O.12, O.18, and O.19 (Figure 6).

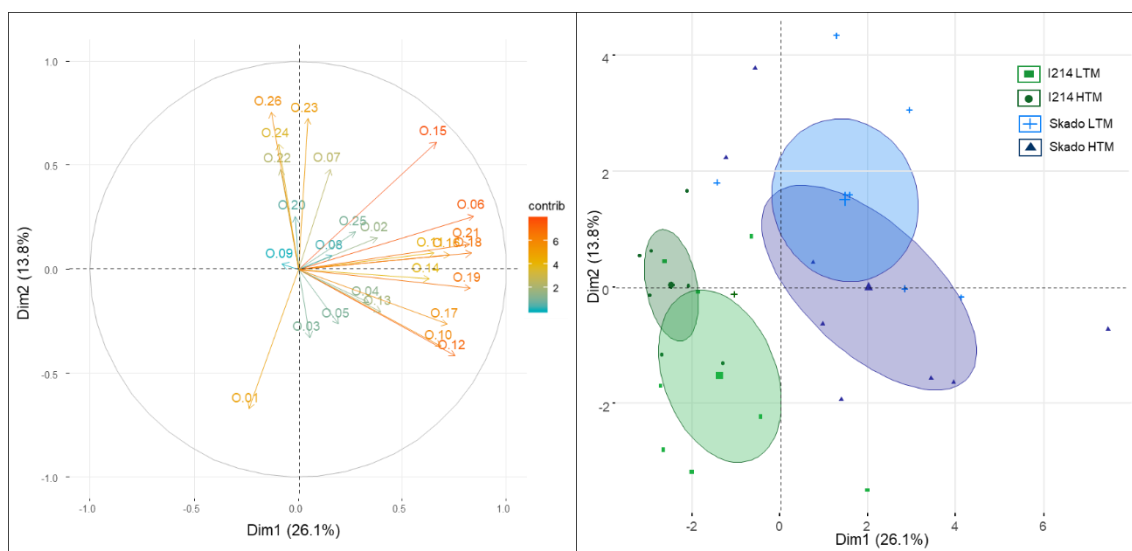


Figure 6: Principal component analysis among metabolites for nettles grown associated with the two poplar cultivar (i.e., I214 and Skado), in two areas with different degree of contamination (i.e., LTM and HTM areas), on a sediment disposal site. A: Projections of element vectors on principal components 1 and 2 with the degree of contribution depending on the color. O.06: D-glucopyranoside, O.11: unidentified  $C_{21}H_{36}O_{11}$ , O.21: unidentified  $C_{26}H_{36}O_{11}$ . B: Projection of the poplar cultivar associated with nettle and the areas on principal components 1 and 2, with 95% confidence ellipses.

Indeed, differences in term of phenolic compounds between roots of nettle from the Skado plots and those from the I214 plots were found (A Monte-Carlo permutation test with 999 iterations,  $P = 0.005$ ). They were graphically separated by the PC1, accounting for 26.1% of the total variability (Figure 6). Nevertheless, taken individually, the concentrations of each phenolic in roots of nettle was in the same order of magnitude when collected in the I214 or Skado plots.

Focusing on the effect of the level of contamination to metabolic profile of root nettles, a general significant effect have been found for nettles recovered under the I214 ( $P = 0.002$ ) and Skado ( $P = 0.003$ ) plots. Indeed, the PC2, explained 13.8% of the total variability.

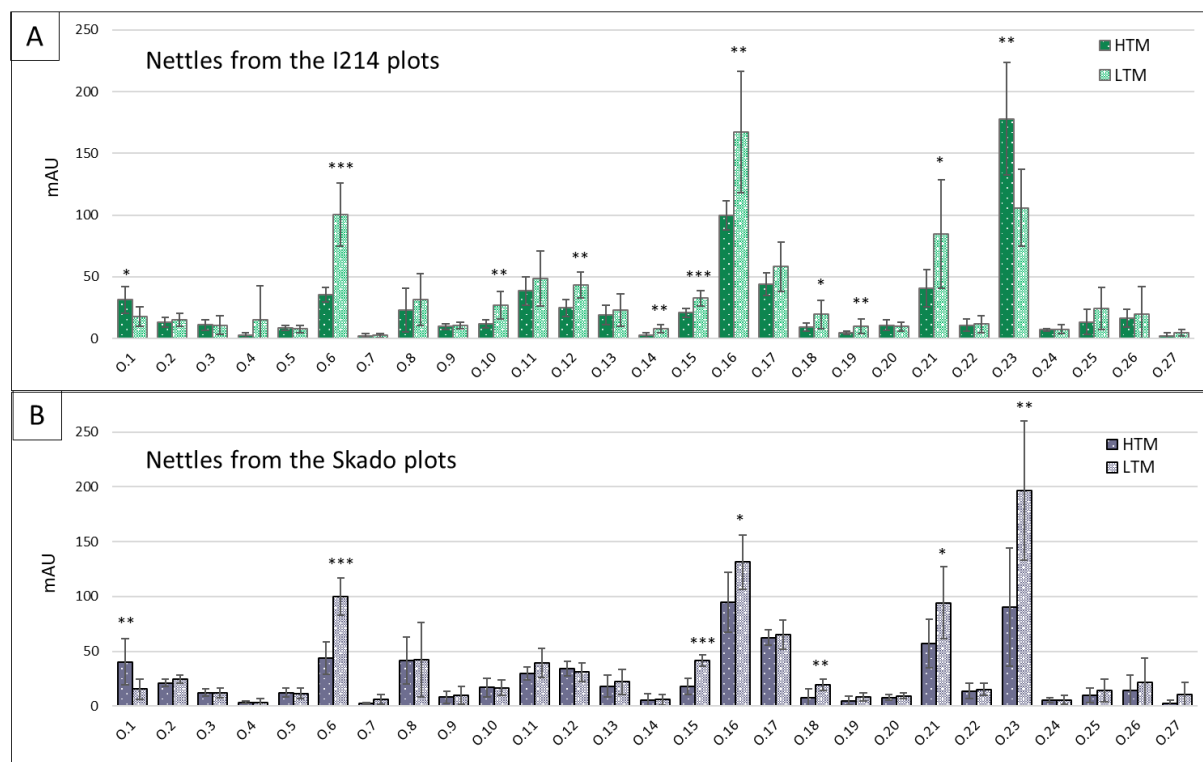


Figure 7: Mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD) of peak area (mAU\*min/30 mg DW) for the 27 phenolic compounds detected in nettle roots from the I214 (A) and Skado (B) plots and according to the degree of contamination (i.e., HTM and LTM) ( $n = 9$  for each treatment). O.06: D-glucopyranoside, O.11: unidentified  $C_{21}H_{36}O_{11}$ , O.21: unidentified  $C_{26}H_{36}O_{11}$ . For each compound, the HTM and LTM modalities were compared and significant differences (Signi.) were indicated with stars (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ).

The contamination factor had no influence on the number of recovered metabolites because all of the 27 considered phenols were detected in the roots of nettles grown in the HTM or in the LTM areas. However, quantitatively, we detected seven compounds (O.01, O.06, O.15, O.16, O.18, O.21 and O.23), which were significantly influenced by the degree of contamination ( $P < 0.05$ ) whatever the plot. For nettles growing under I214, four other compounds were detected (O.10, O.12, O.14 and O.19) (Figure 7). The contamination mainly concerned the major compounds, which tended to be lower in the HTM area. Interestingly, the metabolite O.23 was differently influenced by the contamination, depending on the plot. In the I214 plot, O.23 was more abundant (x1.4) in the nettle roots in HTM areas than in LTM areas ( $P < 0.01$ ), whereas the opposite phenomenon was detected for the Skado plot (x1.6) (Figure 7).



## DISCUSSION

### *Phenolic profiling of poplar hybrids*

In a context of phytomanagement of a co-cropped nettle and poplar, polyphenolic profiles were established for poplar hybrids roots and nettle rhizome and roots under soil TM contamination.

First, we observed comparable results in term of phenolic profiles between the two studied hybrid poplars (*i.e.*, I214 and Skado). However, I214 poplars had a higher quantity of phenolics in roots. In plants, hybridization has long been known to affect the number, diversity, and quantity of secondary metabolites, but 70% of the chemical traits presents in the parental species would usually be recovered in hybrids (Rieseberg et al., 1993). In the hybridization of European poplar species, these proportions of shared traits between parental species and natural hybrids are similar (Caseys et al., 2015). The fact that the two studied hybrids originated from different parental species (Skado: *P. trichocarpa* × *P. maximowiczii* and I-214: *P. deltoides* × *P. nigra*) may explain the observed metabolic differences.

Our results also highlighted several major compound such as salicin, P08, salicortine, populoside A, Salicyloysalicylic acid and nigracin located in poplar roots. Among them, P08 was highly concentrated in the roots of I214 poplars. A study assessing the effect of water stress on root-associated phenolic profile of cuttings of poplar genotypes (*Populus deltoides* and *Populus deltoides* × *Populus nigra*) found high concentration of salicin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acids and several flavonoids (primarily catechin, followed by chrysin, myricetin and kaempferol) (Popović et al., 2016) what is partly consistent with our results. According to Dudonné et al., (2011), poplar bud extract was mainly composed of phenolic acids (caffeic, p-coumaric, ferulic, isoferulic, di-O-methylcaffeic and cinnamic acids), followed by salicylates (salicin) and flavonoid aglycons. All identified compounds in our poplar extracts are among the 160 different phytochemicals that have been already identified in poplar species (Devappa et al., 2015) but some remain unidentified in our extracts. Most of the identified phenolic glucosides (*i.e.*, salicortin, tremulacin and salicin and derivatives) are known to play a defensive role against insect herbivores (Clausen et al., 1989). Concerning populoside A and catechin, they exhibited antioxidant activities due to their scavenging activity against reactive oxygen species (ROS) (Zhang et al., 2006).

### *Phenolic profiling of nettle belowground parts*

According to Folin-Ciocalteu quantifications, rhizome of nettles, consisting in the largest parts of root containing the reserves of plants, had phenol concentrations approximately 30% lower than the thin roots. The obtained orders of magnitude of total phenolic content in our nettle samples were consistent with those from the literature (Kraushofer and Sontag, 2002; Pinelli et al., 2008). Moreover, the phenolic profiles were similar between rhizome and thin roots, meaning that the phenol compounds of rhizome reflect the ones of thin roots, albeit with reduced concentrations. According to these results, the thin roots were the most active belowground part producing phenols, and this is why we selected this compartment for detailed phenolic quantifications. In total, eight major compounds were recovered in nettle root extracts and one of them as D-glucopyranoside (C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>12</sub>) was identified. This latter derived from Hydroxy benzoic acids. According to previous studies, the composition of roots differed from that of the aboveground parts, with lower concentration for the majority of phenols. Orčić et al., (2014) highlighted that the only prominent compounds were secoisolariciresinol (specific to nettle roots), and p-coumaric acid, quinic acid and scopoletin. Pinelli et al. (2008) detected 5-O-caffeoylquinic acid, rutin and isoquercitrin in Italian *U. dioica* samples, while Kavtaradze et al., (2001) identified in Georgian samples caffeic acid, rutin, quercetin and isoquercitrin, among other compounds. Otles and Yalcin, (2012) have also reported rutin, caffeic and chlorogenic acid as major components, but also isorhamnetin, naringin, syringic and vanillic acid. Finally, Grevsen et al., (2008) identified several phenolic acids and derivatives (*e.g.*, 3-O and 5-O-caffeoylquinic acids, 5-O-feruloylquinic acid and 2-O-caffeoylmalic

acid) and several flavonoids (*e.g.*, glucoside, diglucoside and rutinoid, rutinoid of quercetin, rutinoides of kaempferol). Nevertheless, none of these compounds were identified.

### ***Phenolic responses to TM-contamination were identified for both nettle and poplars***

Our approach of environmental metabolomics affords several advantages for studying organism–environment interactions and for assessing organism function and health at the molecular level (Bundy *et al.*, 2008). As metabolomics can highlight metabolite responses, it is finding an increasing number of applications in the environmental sciences, particularly to understanding organismal responses to anthropogenic factors such as pollution (Lin *et al.*, 2006). The metabolomic approach focused on those metabolites whose levels are altered in the case of stress, such as phenolic compounds due to their antioxidant (Grace and Logan, 2000) and metal chelating properties in plant cells (Sakihama *et al.*, (2002). Concerning poplar, these results are not innovative because the metabolic responses of this genus to abiotic stress have been widely studied (Fernández-Martínez *et al.*, 2014; Sablok, 2019), but it is the first time that the metabolite stress response of nettle have been studied.

According to our results, for both nettle and poplar, most of the major phenolic compound as well as several minor ones tended to be reduced in plant grown at the most contaminated area. Since phenols are involved in chelating metals ions and thus reduce ROS production by suppressing Fenton's reaction, their fluctuation in plant compartment in response to TM is a common phenomenon (Shahid *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016; Verma and Shukla, 2015). They were of the opinion that plant react to an excessive content of ROS by increasing phenol production (Sablok, 2019) but our results underlined that phenolics were underproduced in response to contamination. Indeed, accumulation of phenolic compounds in plant tissues is a distinctive characteristic of plant stress, due to an increased enzyme activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), and other enzymes (Cheynier *et al.*, 2013). However, decrease of phenolics also have been observed such as under water stress on young poplar plants, which is known to generate excessive level of ROS (Krasensky and Jonak, 2012), provoked the decrease of a large number of different polyphenols in roots and leaves (Popović *et al.*, 2016).

It is interesting to note that for the two studied poplar cultivars, most of the major compounds responded to the TM contamination, but to a lesser extent for the cultivar Skado, for which the influence of contamination was not confirmed. This suggested that the Skado cultivar was more tolerant to contamination than I214 cultivar or in other words, that phenolic metabolism of I214 responded to contamination rather than Skado metabolism. Indeed, only the I214 cultivar had a reduction of their major metabolites recovered in roots in HTM areas. These results are in agreement with the differences in term of survival rate and growth parameters between the two cultivars previously studied in (Ciadamidaro *et al.*, 2017). Indeed, four year after the plantation, the Skado cultivar exhibited 100% of survival rate against 96% for I214 and the height of the latter were 50% lower than Skado.

### ***Further studies are needed to evaluated the occurrence of allelopathy in the studied agrosystem***

Allelopathy is a major interaction mechanism in AFS between crops, trees and weeds (Batish, 2008; Zeng, 2008b; Regnault-Roger *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2001a; 2006). Indeed, trees incorporated into agroecosystems can influence associated crops and in particular induce a reduction in their productivity (Kohli *et al.*, 1997). Phenolics are among the main allelochemicals involved in chemical interactions occurring in agroecosystems (Gill and Prasad, 2000; Singh *et al.*, 2001). They are known to be involved in plant processes of defence and adaptation, by preventing pests and pathogens and by improving the reproductive capacity of plants while affecting the development of other adjacent plants (Chiapusio *et al.*, 2008). Their releases into the environment is through leaching from fresh (*e.g.*, root exudates) or decomposing parts of the plant, and depend on the plant genotype and their environment (Seigler, 1996).

Our results also suggest that those changes in phenolic composition between I214 and Skado can also affect the belowground chemical interactions. In particular, poplar highlighted phytotoxic effects on various cereal crops through its litter, releasing allelochemical phenolic compounds such as salicin, a compound characteristic of the Salicaceae family detected in the roots of the studied poplar cultivars (Singh et al., 2001a). The toxicity of released allelochemicals in the environment is a function of concentration, and different parameters related to both the donor and recipient plants, including health and metabolic stage (Reigosa et al., 2006). In our field study, the presence of a dense herbaceous layer under poplars, dominated by the native stinging nettle, suggests that nettle-poplar allelochemical interaction needs further investigations. Since the nettle density depended on the poplar cultivar (*i.e.* dense under I214 and sparse under Skado) and the phenolic profiles were different between the two cultivars, field conditions did not allowed us to conclude about a potential allelopathy phenomenon between the poplar and the nettle. It would be necessary to consider the effect of phenolics on rhizospheric microbiota (Verma and Shukla, 2015). Indeed, within the plant environment, different microorganisms can coexist that can establish various interactions with the host plant and that are often the basis for the synthesis of specific phenolic metabolites in response to these interactions (Cheynier et al., 2013). In the rhizosphere, exudated phenolics and other secondary metabolites can also be source of chemotaxis to the selection of organisms around the roots (Nicholson and Hammerschmidt, 1992). Plants may indeed by diffusion (active or passive) excrete the phenolic compounds in the rhizosphere to interfere with the establishment of plant-microorganism interaction such as mycorrhizal symbiosis or plant growth promoting bacteria (Cheynier et al., 2013).

## REFERENCES

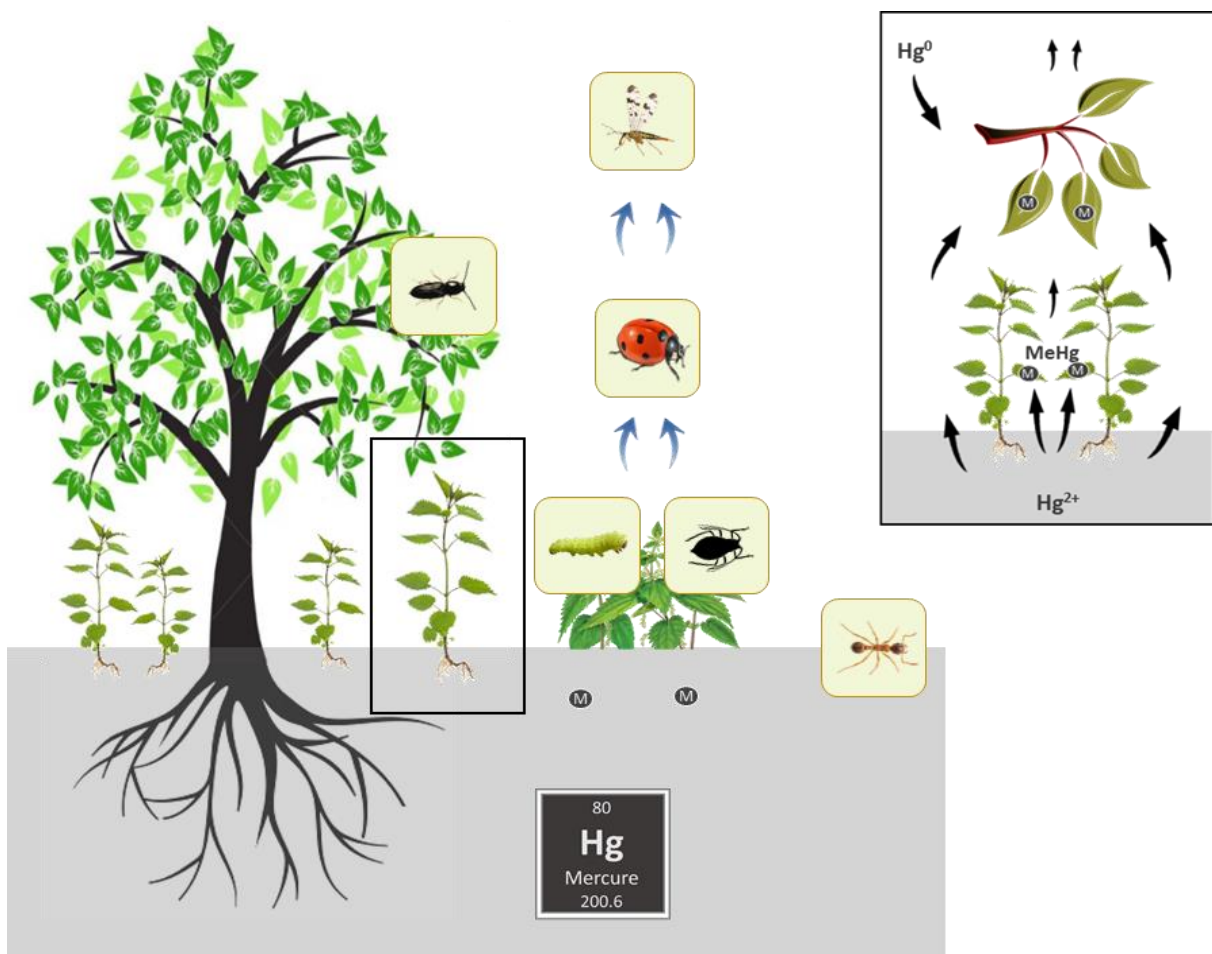
- Bacci, L., Baronti, S., Predieri, S., and di Virgilio, N. (2009). Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy. *Ind. Crops Prod.* 29, 480–484.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3, 643–654.
- Baker, A.J.M., and Walker, P.L. (1989). Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 1, 7–17.
- Berni, R., Cai, G., Hausman, J.-F., and Guerriero, G. (2019). Plant Fibers and Phenolics: A Review on Their Synthesis, Analysis and Combined Use for Biomaterials with New Properties. *Fibers* 7, 80.
- Bundy, J.G., Davey, M.P., and Viant, M.R. (2008). Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3.
- Caseys, C., Stritt, C., Glauser, G., Blanchard, T., and Lexer, C. (2015). Effects of Hybridization and Evolutionary Constraints on Secondary Metabolites: The Genetic Architecture of Phenylpropanoids in European Populus Species. *PLOS ONE* 10, e0128200.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., and Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 1–20.
- Chiapusio, G., Pellissier, F., and Gallet, C. (2008). A la découverte de molécules allélopathiques phytotoxiques dans les agrosystèmes et écosystèmes. In *Biopesticides d'origine Végétale*, C. regnault-roger; B.P.C. Vincent, ed. (Lavoisier), pp. 65–86.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappellini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., and Chalot, M. (2017). Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environ. Exp. Bot.* 139, 48–56.
- Clausen, T.P., Reichardt, P.B., Bryant, J.P., Werner, R.A., Post, K., and Frisby, K. (1989). Chemical model for short-term induction in quaking aspen (*Populus tremuloides*) foliage against herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15, 2335–2346.
- Cronk, Q., Hidalgo, O., Pellicer, J., Percy, D., and Leitch, I. (2016). *Salix* transect of Europe: variation in ploidy and genome size in willow-associated common nettle, *Urtica dioica* L. sens. lat., from Greece to arctic Norway. *Biodivers. Data J.* 4, e10003.
- Devappa, R.K., Rakshit, S.K., and Dekker, R.F.H. (2015). Forest biorefinery: Potential of poplar phytochemicals as value-added co-products. *Biotechnol. Adv.* 33, 681–716.
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Leonardo, S., Praczyk, M., and Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Ind. Crops Prod.* 68, 42–49.
- Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Méryllon, J.-M., and Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4527–4536.

- Fernández-Martínez, J., Zacchini, M., Fernández-Marín, B., García-Plazaola, J.I., and Fleck, I. (2014). Gas-exchange, photo- and antioxidant protection, and metal accumulation in I214 and Eridano *Populus* sp. clones subjected to elevated zinc concentrations. *Environ. Exp. Bot.* *107*, 144–153.
- Gill, A.S., and Prasad, J.V.N.S. (2000). Allelopathic interactions in agroforestry systems. In *Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry*, (Springer, Dordrecht), pp. 195–207.
- Grace, S.C., and Logan, B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *355*, 1499–1510.
- Grevsen, K., Fretté, X.C., and Christensen, L.P. er (2008). Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. *Eur. J. Hortic. Sci.* *73*, 20.
- Gül, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Akpulat, H.A., and Aksu, P. (2012). Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic, Genotoxic Effects of Essential Oil from *Urtica dioica* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *88*, 666–671.
- Jakubczyk, K., Janda, K., Szkyrpan, S., Gutowska, I., and Wolska, J. (2015). [Stinging nettle (*Urtica dioica* L.)--botanical characteristics, biochemical composition and health benefits]. *Pomeranian J. Life Sci.* *61*, 191–198.
- James, D.G., Lauby, G., Seymour, L., and Buckley, K. (2015). Beneficial insects associated with stinging nettle, *Urtica dioica* Linnaeus, in central Washington State. *Pan-Pac. Entomol.* *91*, 82–90.
- Jung, C., Maeder, V., Funk, F., Frey, B., Sticher, H., and Frossard, E. (2003). Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* *252*, 301–312.
- Kavtaradze, N.S., Alaniya, M.D., and Aneli, J.N. (2001). Chemical Components of *Urtica dioica* Growing in Georgia. *Chem. Nat. Compd.* *37*, 287–287.
- Khan, M.Z., Ali, F., Hussain, F., Imdadullah, S.M., and others (2016). Allelopathic Effect of *Populus Nigra* Bark on *Zea Mays* in Agroforestry Ecosystems. *Glob. J. Sci. Front. Res.* *16*.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., et al. (2015). Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *Int. J. Phytoremediation* *17*, 1005–1037.
- Kohli, R.K., Batish, D., and Singh, H.P. (1997). Allelopathy and Its Implications in Agroecosystems. *J. Crop Prod.* *1*, 169–202.
- Krasensky, J., and Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* *63*, 1593–1608.
- Kraushofer, T., and Sontag, G. (2002). Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *Eur. Food Res. Technol.* *215*, 529–533.
- Kukric, Z., Topalic-Trivunovic, L., Kukavica, B., Matos, S., Pavicic, S., Boroja, M., and Savic, A. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Period. Technol.* *257–272*.
- Latif, S., Chiapusio, G., and Weston, L.A. (2017). Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. *Adv. Bot. Res. Plants Commun. Their Biot. Environ.* 19–54.
- Li, Z.-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.-D., and Jiang, D.-A. (2010). Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules* *15*, 8933–8952.
- Masoodi, T.H., Masoodi, N.A., Gangoo, S.A., Mushtaq, S.M., and Ahmad, H. (2013). Comparative field performance of some agricultural crops under a canopy of *Populus deltoides* and *Ulmus wallichiana*. *J. For. Res.* *24*, 783–790.
- Masoodi, T.H., Islam, M.A., Wani, M.A., Mir, S.A., and Gangoo, S.A. (2014). Allelopathic effect of *Populus deltoides* and *Ulmus wallichiana* on biochemical constituents of maize, bean and sunflower. *Karnataka J. Agric. Sci.* *26*.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* *15*, 523.
- Mithöfer, A., Schulze, B., and Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett.* *566*, 1–5.
- Murtic, S., Jurkovic, J., Basic, E., and Hekic, E. (2019). Assessment of wild plants for phytoremediation of heavy metals in soils surrounding the thermal power station.
- Nicholson, R.L., and Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* *30*, 369–389.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., and Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.* *143*, 48–53.
- Otles, S., and Yalcin, B. (2012). Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *Sci. World J.* *2012*, 1–12.
- Pandey, V.C., Bajpai, O., and Singh, N. (2016). Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *54*, 58–73.
- Parraga-Aguado, I., Querejeta, J.-I., González-Alcaraz, M.-N., Jiménez-Cárceles, F.J., and Conesa, H.M. (2014). Usefulness of pioneer vegetation for the phytomanagement of metal(loid)s enriched tailings: Grasses vs. shrubs vs. trees. *J. Environ. Manage.* *133*, 51–58.
- Paukszto, A., and Miroslawski, J. (2019). Using stinging nettle (*Urtica dioica* L.) to assess the influence of long term emission upon pollution with metals of the Tatra National Park area (Poland). *Atmospheric Pollut. Res.* *10*, 73–79.

- Perrin, R.M. (1975). The role of the perennial stinging nettle, *Urtica dioica*, as a reservoir of beneficial natural enemies. *Ann. Appl. Biol.* *81*, 289–297.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., and Bert, V. (2017). Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environ. Exp. Bot.* *143*, 72–81.
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., and Romani, A. (2008). Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 9127–9132.
- Popović, B.M., Štajner, D., Ždero-Pavlović, R., Tumbas-Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., and Orlović, S. (2016). Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiol. Biochem.* *105*, 242–250.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., and Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Sci.* *167*, 1159–1169.
- Regnault-Roger, C., Philogene, B., and Vincent, C. (2008). *Biopesticides d'origine végétale* (2e éd.) (Lavoisier).
- Rice-Evans, C., Miller, N., and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* *2*, 152–159.
- Rieseberg, L.H., Ellstrand, N.C., and Arnold, D.M. (1993). What Can Molecular and Morphological Markers Tell Us About Plant Hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* *12*, 213–241.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* *177*, 67–80.
- Seigler, D.S. (1996). Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions. *Agron. J.* *88*, 876–885.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., and Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* *232*, 1–44.
- Singh, H.P., Batish, D.R., and Kohli, R.K. (2001). Allelopathy in Agroecosystems: An Overview. *J. Crop Prod.* *4*, 1–41.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., and Prasad, S.M. (2016). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Front. Plant Sci.* *6*.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* *16*, 144–158.
- Verma, N., and Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* *2*, 105–113.
- Viktorova, J., Jandova, Z., Madlenakova, M., Prouzova, P., Bartunek, V., Vrchotova, B., Lovecka, P., Musilova, L., and Macek, T. (2016). Native Phytoremediation Potential of *Urtica dioica* for Removal of PCBs and Heavy Metals Can Be Improved by Genetic Manipulations Using Constitutive CaMV 35S Promoter. *PLoS ONE* *11*.
- Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* *76*, 167–179.
- Yung, L., Bertheau, C., Cazaux, D., Regier, N., Slaveykova, V.I., and Chalot, M. (2019). Insect Life Traits Are Key Factors in Mercury Accumulation and Transfer within the Terrestrial Food Web. *Environ. Sci. Technol.*
- Zhang, X., Thuong, P.T., Min, B.-S., Ngoc, T.M., Hung, T.M., Lee, I.S., Na, M., Seong, Y.-H., Song, K.-S., and Bae, K. (2006). Phenolic glycosides with antioxidant activity from the stem bark of *Populus davidiana*. *J. Nat. Prod.* *69*, 1370–1373.

# Chapitre 3

## *Performances écologiques et exposition de l'agrosystème ortie-peuplier et de l'entomofaune associée au mercure*





## 3.1 Présentation du site expérimental

### 3.1.1 L'usine INOVYN (Tavaux) : procédé à l'origine d'une contamination au Hg

L'entreprise INOVYN de Tavaux (39), initialement SOLVAY Electrolyse France est une plate-forme chimique parmi les plus importantes de France créée en 1930. Elle s'étend sur près de 200 ha sur les communes de Tavaux, Damparis et Abergement-La-Ronce. L'usine produit actuellement des matières plastiques telles que le PVC (PolyChlorure de Vinyle) et plusieurs composés chimiques tels que la soude caustique, l'eau de javel, l'acide chlorhydrique, le chloroforme et d'autres solvants organiques chlorés. Ces composés sont principalement issus de l'électrolyse de la saumure permettant de générer du chlore gazeux ( $\text{Cl}_2$ ) et de la soude ( $\text{NaOH}$ ). On parle alors plus précisément du procédé chlore-alcali. L'usine est classée « Seveso » seuil haut, une directive qui impose aux états membres de l'Union Européenne (UE) d'identifier les industries présentant un risque d'accidents majeurs. A Tavaux, c'est principalement le  $\text{NaCl}$ , issu de la saumure produite dans la région environnante, qui est utilisé pour réaliser la réaction d'électrolyse. Jusqu'en 2004, ce procédé d'électrolyse reposait sur l'utilisation de cathodes à Hg. En raison de contraintes réglementaires, cette technique, à l'origine de rejets en Hg dans l'environnement s'est vue remplacée par une électrolyse à membrane, permettant des rendements équivalents tout en évitant ce type de problèmes environnementaux.

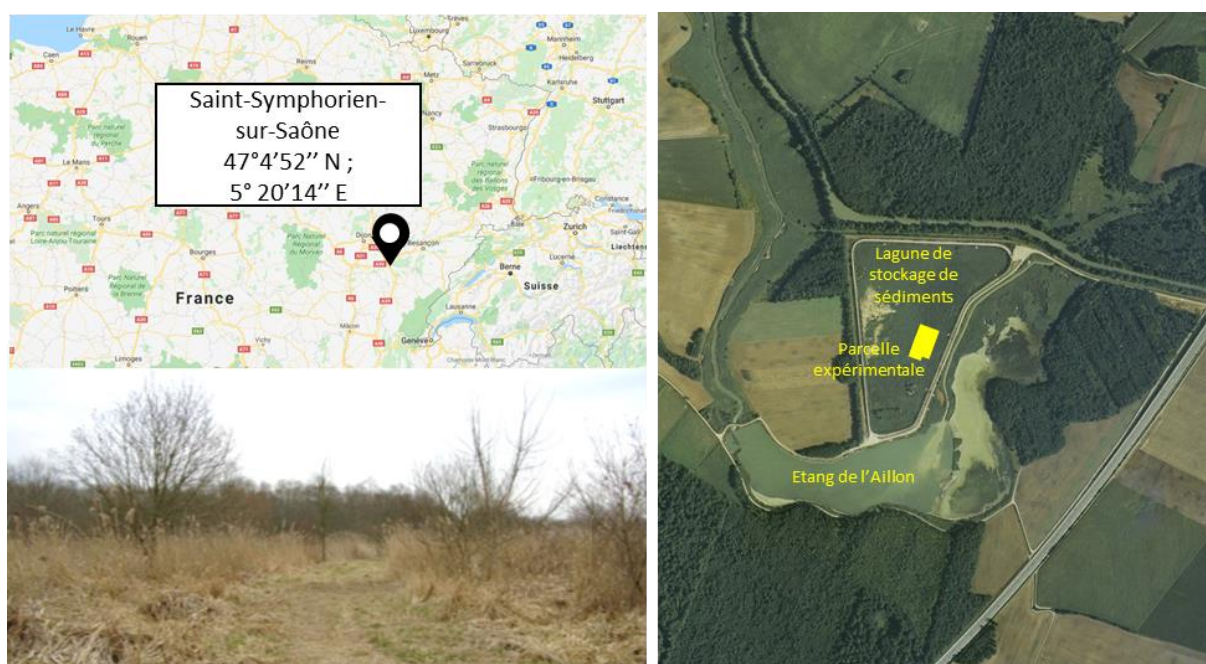


Figure 37. Présentation du site expérimental de Tavaux, situé sur une lagune de stockage de sédiments chlore-alcali appartenant à l'industrie INOVYN, située à Saint-Symphorien-sur-Saône (est de la France).

La commune de Saint Symphorien-sur-Saône située à environ 10 km de l'usine accueille les eaux usées de cette dernière, *via* un canal partiellement couvert, qui se déverse dans des bassins



de décantation. Cette étape permet l'élimination de l'essentiel des polluants provenant de l'usine, excepté le Hg qui s'accumule dans l'étang de l'Aillon (Figure 37). Ce dernier a fait l'objet de curages réguliers pendant près de 40 ans. Les sédiments extraits ont été entreposés jusqu'en 2004 sur une lagune de stockage d'environ 12 ha, située à proximité de l'étang (Latitude 47°4'52'' Nord, longitude : 5° 20'14'' Est). Le dépôt de sédiment a été stoppé en 2010 et une végétation a naturellement recolonisé la lagune. C'est sur cette lagune qu'a été installée en 2011 une parcelle de phytomanagement dans le cadre du projet BIOFILTREE (ANR 2010-2014 géré par le LCE). Ce site expérimental sera mentionné comme « Parcelle de Tavaux » dans l'ensemble du manuscrit pour plus de simplicité.

### 3.1.2 Historique des rejets en Hg par une approche dendrochimique

La lagune de stockage de sédiments sur laquelle la parcelle de Tavaux a été installée a fait l'objet d'une étude dendrochimique visant à tester la technique dans le cas d'une pollution par le Hg. Pour cela, des carottes de bois ont été prélevées sur des arbres qui avaient naturellement colonisé la lagune de stockage de sédiments et en périphérie sur une zone boisée. Ces carottes ont été datées et le Hg a été analysé cerne par cerne, révélant une exposition des arbres au Hg et permettant de retracer l'historique des émissions de Hg par la lagune. Dans la mesure où j'ai collaboré à ce travail au cours de missions préalables à mon doctorat, notamment pour les phases de prélèvement des échantillons et d'exploitation des données, j'ai décidé d'intégrer ce court article à ce manuscrit en guise de présentation du site expérimental de Tavaux.



Case report

## Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant



François Maillard<sup>a</sup>, Olivier Girardclos<sup>a</sup>, Mohamad Assad<sup>a</sup>, Cyril Zappellini<sup>a</sup>, Julia Maria Pérez Mena<sup>a</sup>, Loïc Yung<sup>a</sup>, Christophe Guyeux<sup>b</sup>, Stéphane Chrétien<sup>c</sup>, Gary Bigham<sup>d</sup>, Claudia Cosio<sup>e</sup>, Michel Chalot<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Chrono-Environnement (UMR 6249), Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

<sup>b</sup> Département d'Informatique des Systèmes Complexes, Institut FEMTO-ST (UMR 6174 CNRS), Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Mathématiques de Besançon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

<sup>d</sup> Exponent, Inc., 15375 SE 30th Place, Suite 250, Bellevue, WA 98007, USA

<sup>e</sup> Institute F-A. Forel, University of Geneva, 10 Route de Suisse, CP 416, CH-1290 Versoix, Switzerland

<sup>f</sup> Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

#### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 26 November 2015  
Received in revised form  
9 March 2016  
Accepted 24 March 2016  
Available online 31 March 2016

#### ABSTRACT

Although current Hg emissions from industrial activities may be accurately monitored, evidence of past releases to the atmosphere must rely on one or more environmental proxies. We used Hg concentrations in tree cores collected from poplars and willows to investigate the historical changes of Hg emissions from a dredged sediment landfill and compared them to a nearby control location. Our results demonstrated the potential value of using dendrochemistry to record historical Hg emissions from past industrial activities.

## INTRODUCTION

Mercury (Hg) is a contaminant of concern because of its potential human and ecological health impacts. It is also persistent and can be transported great distances in the atmosphere. A recent paper summarized the natural and anthropogenic sources that have contributed to the increase of Hg concentration in soil and reviewed major remediation techniques and their applications to control soil Hg contamination (Xu et al., 2015). Chlor-alkali plants using Hg cell technology are known current and past sources of Hg emissions to the atmosphere and related contamination of sediment and soils (Biester et al., 2002; Esbri et al., 2015). Due to the process characteristics, Hg is released through air emissions, waste water discharges, and solid waste disposal (OSPAR Commission, 2013). Hg emissions from chlor-alkali wastes have been investigated, albeit not using tree rings, one of the earliest such studies being that of Lindberg and Turner (1977). Sensitive instrumentation and abiotic and biotic passive samplers have been utilized to quantify air concentrations and observe temporal trends (for a review, see Gustin et al. (2015)). However, these data are not representative of past trends. Stamenkovic and Gustin (2009) showed that plants are net sinks and that atmospheric mercury is incorporated into leaf tissue. We recently demonstrated the role of the poplar aboveground biomass in capturing the atmospheric Hg released from the soil (Assad et al., 2016). Molina et al. (2006) hypothesized that variations in Hg uptake by the vegetation cover depends on a large number of factors, including Hg concentrations in the soil and atmosphere, organs, and season. Additionally, when woody species were compared on a mass basis for Hg concentrations, significant differences were observed among species (Laacouri et al., 2013) and thus tree species is an additional factor that must be taken into account. Tree-ring analysis is a potentially useful technique in assessing the historical evolution of atmospheric mercury (Wright et al., 2014). Woody tissue Hg may be indeed a valuable proxy for understanding changing global air Hg concentrations as well as impacts of soil contamination (Hojdová et al., 2011; Bigham et al., 2015). This study was designed to investigate the historical evolution of Hg concentrations in tree rings from trees growing on and near a landfill that received dredged sediments from a Hg cell chlor-alkali facility in France. The objective was also to determine whether the sediments are currently a source of Hg emissions.

## MATERIALS AND METHODS

The site is located in Western Europe along a major river and surrounded by several urban aggregates. Production at the chloralkali facility began in 1950 with wastewater discharged directly to a stream. In 1964 a dam was constructed downstream of the discharge. The impoundment, known as the mitigation pond, enhanced sediment deposition to control transport of Hg-contaminated sediment further downstream. By 1972, it became necessary to remove sediment from the mitigation pond to maintain capacity. A 12-ha area with dikes 5-m high was constructed adjacent to the mitigation pond for disposal of the sediment removed by a hydraulic dredge. Wastewater treatment at the plant facility was installed in 1987, which reduced Hg concentrations in sediments settling in the mitigation pond. Chlorine production at the facility was eventually converted to a non-Hg technology in 2004 and the disposal area, now known as the landfill, ceased receiving sediments the same year. The control site is located in undisturbed forest adjacent to the landfill, as shown in Fig. 1.

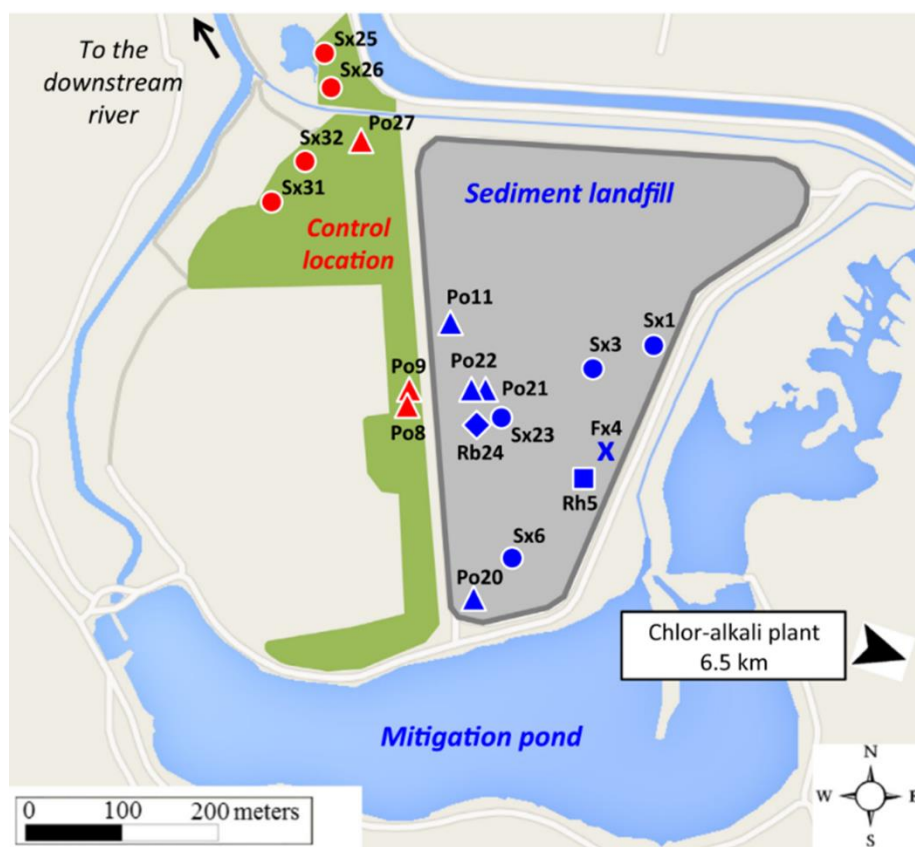


Fig.1. Schematic view of the landfill and locations of trees sampled. Trees from the sediment landfill and control locations are in blue and red, respectively; Salix and Populus are represented by circles and triangles, respectively while Robinia, Rhamnus and Fraxinus are represented by diamond, square and cross, respectively. Roads appear as white whereas waterbodies appear in blue. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Soil Hg concentrations are shown in Table 1. Details of soil analyses for both site locations are provided in Zappelini et al. (2015). Local woody species began to recolonize the sediment landfill beginning in the 1980 s. Two salicaceous species, poplar (*Populus* sp.) and willow (*Salix* sp.), that have naturally colonized the sediment landfill were the primary species sampled for this study. Cores were taken at breast height (1.3 m) from each tree using a stainless steel borer (10 mm diameter). Cores of three other woody species present on the sediment landfill, *Robinia pseudoacacia*, *Rhamnus catharticus* and *Fraxinus excelsior* were also collected at the same period. All samples were frozen at 77 °C for 24 h and then freeze-dried (Cosmos 20K, CRYOTEC). To reduce the variability of elemental concentrations within an individual growth ring (Watmough, 1999), seven and eight trees from the Salicaceae family were sampled on the control site and sediment landfill, respectively (Table 1 and Fig. 1) and multiple cores were collected from each tree. Using a new razor blade for each core, a thin layer was shaved from the core surface in order to make annual rings easier to see. Tree ring number and thickness was recorded beginning at the base of the bark tissue. Rings on each tree core were delineated using a microscope (OLYMPUS SZ-CTV Japan, SZ-60) and each annual ring was cut with a razor blade and stored independently of other tree rings. Hg in every tree ring was measured on an AMA-254 cold vapour atomic absorption (CV-AAS) Hg analyser (Altec Co, Czech Republic), using the standard conditions recommended by the manufacturer (120 s drying, 150 s heating, 45 s cooling). The AMA-254 was regularly calibrated over two ranges, (0.05–40 and 40–500 ng of mercury) before each analysis session. Accuracy was also checked by analysis of a certified reference material (CRM), Oriental

Basma Tobacco Leave (INCT-OBTL-5), with a certified Hg content of 20.971.3 ng/g D Wt (Samczyński et al., 2012), at least once a day. The obtained results (peak area) indicate Hg concentrations of  $20.2 \pm 0.6\%$  over the entire period of analyses in our laboratory, with recoveries in the range of 98–105%. No sample treatment was required prior the analysis, avoiding interferences during sample preparation. The typical working range for this method is 0.05–600 ng, whereas most of our samples fell within the range 0.1–3.0 ng. Variation during CRM measurements was generally about 6% (relative percent difference between sample and duplicates) and always lower than 10%. The instrument detection limit for this method is 0.006 ng of total mercury. Methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg, MMHg) was also measured in poplar leaves by GC–CV–AFS as detailed elsewhere (Regier et al., 2013). Collection of tree cores at control and landfill locations lead to data ranging from year 1951 to year 2013. The resulting matrix included 63 lines (number of years) and 30 columns (number of measures) and contained 574 nonempty coefficients while all other coefficients were missing values. Missing data did not allow us to achieve a principal component analysis (PCA) to determine the driving factors. We therefore applied an alternating steepest method, and a scaled variant, for matrix completion (Tanner and Wei, 2016), allowing us to apply a sparse PCA analysis (Jolliffe, 2002) for determining the statistical significance of our set of data. A particular disadvantage of ordinary PCA is that the principal components are usually linear combinations of all input variables. Sparse PCA overcomes this disadvantage by finding linear combinations that contain just a few input variables.

*Table 1. Summary of the characteristics of the sampled trees, and associated soil Hg concentrations. Each collected tree was given an identification code (ID) for further reference in the text. The column “tree cores” indicates the number of cores collected on each sampled tree.*

Sample area	Plant Genera	Tree ID	min–max rings [Hg] (ng/g)	Time period	Tree cores	Average soil [Hg] (ng/g)
Control location	Populus	Po8	3.30–38.70	1951–2012	3	210–950
		Po9	3.43–40.17	1959–2013	3	
		Po27	1.43–10.73	1997–2013	2	
	Salix	Sx25	3.21–8.16	2003–2013	1	
		Sx26	3.62–12.5	1995–2013	2	
		Sx31	5.90–18.74	1991–2013	2	
		Sx32	3.18–8.25	1994–2013	2	
		Sx32	3.18–8.25	1994–2013	2	
Sediment landfill	Populus	Po11	6.32–18.37	2004–2012	2	3250–4590
		Po20	3.75–16.24	2002–2013	1	
		Po21	2.80–9.62	2006–2013	1	
		Po22	3.56–8.30	2006–2012	1	
	Salix	Sx1	1.99–31.11	1998–2011	2	
		Sx3	6.08–19.47	2004–2011	2	
		Sx6	3.90–60.43	1997–2012	1	
		Sx23	6.05–9.41	2005–2013	2	
		Sx23	6.05–9.41	2005–2013	2	
	Robinia	Rb24	0.75–2.40	2007–2013	1	
	Fraxinus	Fr4	2.54–4.02	2007–2011	2	
Rhamnus	Rh5	1.53–3.88	2005–2011	2		

## RESULTS AND DISCUSSION

Physical analysis showed that soil from the sediment landfill contained a significantly greater proportion of thin silt, whereas control soils contained more clay and coarse sand. Chemical analysis revealed that pH, calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) concentration and exchangeable calcium oxide (CaOex) and total arsenic (As) were all significantly higher in the soil of the sediment landfill, whereas CEC was significantly enhanced in soil of the control site. A redundancy analysis further showed that silt, CaCO<sub>3</sub>, pH and CaOex, as well as total Hg and As were all positively correlated in the sediment landfill (p-value = 0.04, adjusted R<sup>2</sup> = 0.88; Zappellini et al., (2015)). The Hg concentrations in the dendrochemistry samples collected in 2012 and 2013 are presented in Fig. 2. At the control location, an old poplar tree (Po8) allowed for Hg measurements as early as 1951. Additional poplars (Po9 and Po27) and willows (Sx25, Sx26, Sx31 and Sx32) from the control location provided replicate samples after 1959. Basal Hg levels from one poplar collected at the control location (Po8) were around 5 ng/g (dry weight) in the early fifties, this value appears to

represent local background conditions. Hg concentrations in control poplars thereafter peaked at around 35 ng/g dry wood in the early sixties that corresponds to two successive increases in chlorine production capacity at the industrial site in 1956 and 1962 (event A, Fig. 2).

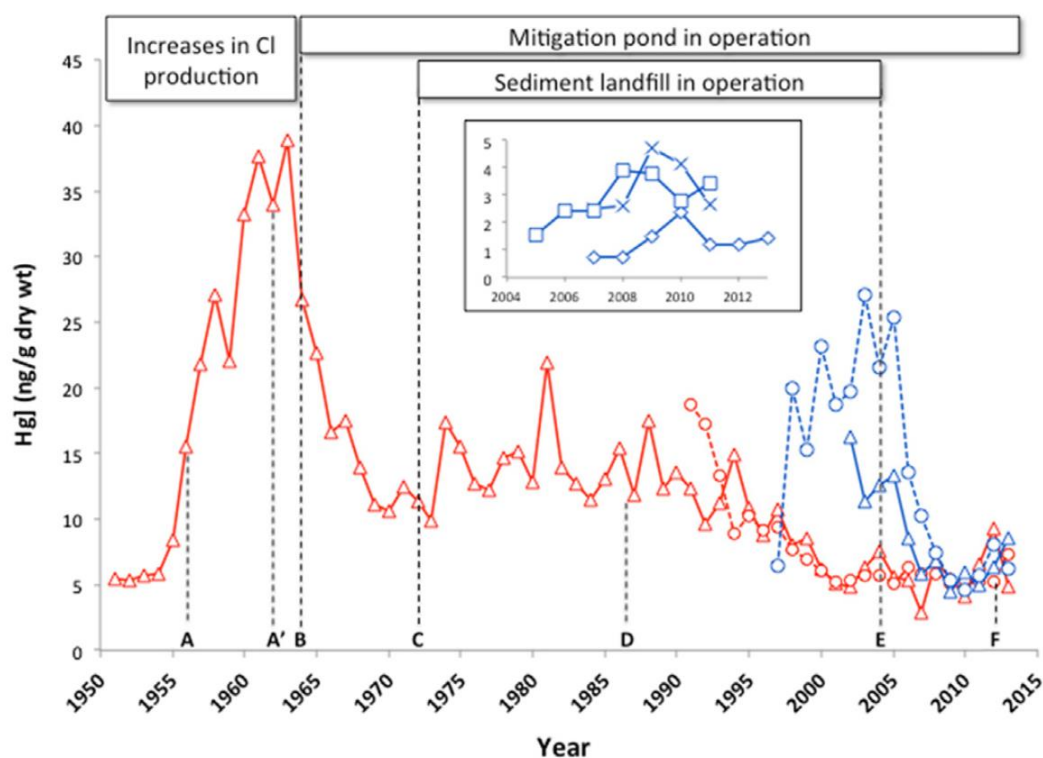


Fig. 2. Yearly Hg concentrations (mean ng/g dry weight) measured in rings of poplar and willow cores from the sediment landfill (blue) and a control location (red). Letters attached to dashed lines indicate the historical events at the site, as detailed in the main text. Major changes at the experimental site are provided in the upper part of the figure. Data corresponding to willow and poplar cores are represented by circles and triangles, respectively. Additional cores were collected and analyzed (insert), from the non-accumulated trees *Robinia pseudoacacia* (diamond), *Rhamnus catharticus* (square) and *Fraxinus excelsior* (cross). Variation was always <10%. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

Records of atmospheric Hg concentrations are available for the period 1998–2011 (OSPAR Commission, 2013), but there are no available records of atmospheric Hg concentrations for the 1950–1980 period and therefore it is difficult to ascertain the source of Hg in trees during this period. It appears to be most probably flooding. Contamination of trees through direct emissions from the plant site is indeed unlikely, given the striking decrease of Hg content in poplar cores observed from 1964 that corresponds to the commissioning of the mitigation pond (Fig. 1) in April 1964 (event B, Fig. 2). This pond was created to ensure final sedimentation of the wastewater before transport further downstream, indicating that the impoundment reduced evasion compared to the river. This suggests that local Hg emissions from the river near the trees were the source of exposure. However, Hg concentrations thereafter leveled off from 1970 until the late eighties to around 12–15 ng/g. This plateau phase that lasted for about 20 years was coincident with the implementation of the sediment landfill (Fig. 1) in 1972 (event C, Fig. 2). Active loading of sediments in the pond may have created a continuous and stable source of volatile Hg to the atmosphere.

After the plateau phase, Hg data from both poplar and willow cores revealed a rapid decrease of Hg content for a period of about 10 years, until background concentrations (5 ng/g) were reached in most samples. This period followed the commissioning of an upstream wastewater treatment plant in 1987 (event D, Fig. 2). This might also have been due to the natural revegetation of the sediments surface that started in 1985, as revealed by aerial photographs. This vegetation cap might have intercepted part of the volatilized Hg, as has recently been described for other metals (Sánchez-López et al., 2015). The vegetation cover could also have changed geochemical conditions in the surface soil that reduced the Hg emission rate, and shading by the forest canopy when present may also have reduced emissions.

The oldest tree on the sediment landfill (Sx6) was 17-yr-old at the time of core sampling, residing on a zone close to the access road around the dump, where organic matter, related to vehicle traffic, may have been deposited. Most of the other trees were 10–12 yr-old. This early colonization event reflects the capacity of salicaceous species to colonize unfavorable environments. New trees that colonized the sediments surface revealed Hg concentrations of about 25 ng/g for willow in early 2000, and around 15 ng/g for poplars at the same period. These concentrations were typically 2–5-fold higher than those measured in the trees from the control location at the same period.

These trees were indeed in closer contact with the potential source of volatile Hg than their counterpart at the control location. From 2005 to 2013, a reduction of Hg concentrations to background levels (<5 ng/g) was recorded in tree cores of both poplar and willow species from the sediment landfill. This reflects the closure of the sediment landfill in 2004 (event E, Fig. 2). Additionally, we measured Hg content in cores of three other woody species present on the sediments landfill, *Robinia pseudoacacia* (Rb24), *Rhamnus catharticus* (Rh5) and *Fraxinus excelsior* (Fr4). Hg was detected only at background levels, between 2 and 4 ng/g (Fig. 2, insert), as compared to the range 5–25 ng/g in salicaceous species for the same period.

As indicated in the material and methods data matrices have first been completed using an up-to-date and mathematically rigorous statistical method called alternating steepest descent ASD algorithm (Tanner and Wei, 2016). The ASD algorithm specifically solves the fixed-rank matrix completion problem: given a predefined rank  $r$  (roughly speaking, a number of interdependencies), the algorithm finds the closest completed matrix of rank  $r$  that fits known data (for the Frobenius norm). The matrix completion allows recovering a matrix from a subset of its entries thanks to interdependency between the entries, typically through low rank structure. A sparse principal component analysis (PCA) after matrix completion allowed us to conclude that trees in direct contact with the Hg source on the sediment landfill were clearly enriched in Hg as compared to trees from the control location, over the entire period of exposure (data not shown).

Hg values in wood samples reported for the landfill and control sites in our study ranged from 1.7 to 39 ng/g, and are similar to other studies where Hg concentrations were reported to be in the range from 0.4 to 37 ng/g (Siwik et al., 2010; Wright et al., 2014). An exception was found by Abreu et al. (2008) who reported Hg concentration as high as 280 ng/g dry wood, although collected from an aquatic environment. The Hg concentrations in the soil at control locations were around 400 ng/g, as compared to a ten-fold higher concentration in the sediment landfill in 2013 (Table 1). This indicates that tree core Hg accumulation was not driven by Hg concentration in soils, but rather by Hg emission to the atmosphere near the trees. When dredged sediment disposal stopped in 2004, trees from the landfill location recorded Hg concentrations similar to the trees at the control location. Becnel et al. (2004) and Graydon et al. (2009) hypothesized that Hg was primarily accumulated in trees by way of the atmospheric pathway and not through the soil. High levels of Hg in the trees present at control locations during the landfill operating period and the lack

of correlation between Hg in tree rings and Hg in soil confirm this hypothesis. The low Hg concentrations detected in tree cores after closure of the sediment landfill, despite the current high Hg concentration in the soil, suggests that the dredged sediment still might be a source, but not at magnitudes as during the facility operational phase.

Two hypotheses can be proposed to explain the elevated Hg concentrations in tree rings during the period of active disposal to the landfill. First, the dredging in the mediation basin and disposal of the Hg-contaminated sediments on the landfill physically increased the rate of Hg emissions. The second hypothesis relies on the paper from [Gustin and Stamenkovic \(2005\)](#) who hypothesized that the addition of soil water in amounts less than that necessary to saturate the soil surface results in an immediate release of elemental Hg from the soil surface. Active recapture of Hg(II) and/ or Hg(0) by poplar leaves is further confirmed by measuring the different forms of Hg into poplar leaves. The proportion of MMHg measured in the leaves of poplar was around 7.5% of total Hg (4 replicates), whereas 14–26% of intracellular Hg was bound to the protein fraction, and 40–75% was bound to the cell wall and membrane components, indicating that Hg was processed within poplar cells, and not only adsorbed onto the surface of leaf tissues. We are currently further investigating the role of intracellular and membrane-bound proteins in the sequestration of Hg in poplar leaves.

We demonstrated, however, the relevance of using dendrochemistry to monitor historical events that reinforces the utility of using tree rings as recorders of past industrial activities.

## FUNDING SOURCES

This study was part of the Pollution Investigation by Trees (PIT), an international research program funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), grant no. ADEME 1072C0020 PIT. Financial supports from Région FrancheComté (programme “Environnement-Homme-Territoire”, grant no. 2014-069) and from Pays de Montbéliard Agglomération (grant no. 13/070-203-2015) to M.C. are acknowledged.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Chris Balouet (Environnement International) for fruitful discussions and for coordinating together with MC the PIT project. This study was part of the Pollution Investigation by Trees (PIT), an international research program funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), grant no. ADEME 1072C0020 PIT. Financial supports from Région Franche-Comté (programme “Environnement-Homme-Territoire”, grant no. 2014-069) and from Pays de Montbéliard Agglomération (grant no. 13/070-203-2015) to M.C. are acknowledged. We thank Anaïs Crevoisier and Yannis Risacher for their contributions to Hg analysis, and Nadia Crini from the environmental and chemical analyses platform (UFC) for her technical assistance.

## REFERENCES

- Abreu, S.N., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Morgado, F., 2008. Tree rings, *Populus nigra* L., as mercury data logger in aquatic environments: case study of an historically contaminated environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 294–299. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-008-9366-0>.
- Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M., Tatin-Froux, F., 2016. Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 146, 1–7.
- Becnel, J., Falgeust, C., Cavalier, T., Gauthreaux, K., Landry, F., Blanchard, M., Beck, M. J., Beck, J.N., 2004. Correlation of mercury concentrations in tree core and lichen samples in southeastern Louisiana. *Microchem. J.* 78, 205–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2004.06.002>.
- Biester, H., Müller, G., Schöler, H.F., 2002. Binding and mobility of mercury in soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants. *Sci. Total Environ.* 84, 191–203.
- Bigham, G., Liang, L., Balouet, J.C., Chalot, M., 2015. Phytoscreening-based assessment of mercury in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5604-2>
- Esbri, J.M., Lopez-Berdonces, M.A., Fernandez-Calderon, S., Higuera, P., Diez, S., 2015. Atmospheric mercury pollution around a chlor-alkali plant in Flix (NE Spain): an integrated analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4842–4850. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3305-x>.
- Graydon, J.A., St. Louis, V.L., Hintelmann, H., Lindberg, S.E., Sandilands, K.A., Rudd, J.W., Kelly, C.A., Tate, M.T., Krabbenhoft, D.P., Lehnher, I., 2009. Investigation of uptake and retention of atmospheric Hg (II) by boreal forest plants using stable Hg isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4960–4966.
- Gustin, M.S., Amos, H.M., Huang, J., Miller, M.B., Heidecorn, K., 2015. Measuring and modeling mercury in the atmosphere: a critical review. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 5697–5713. <http://dx.doi.org/10.5194/acp-15-5697-2015>.
- Gustin, M.S., Stamenkovic, J., 2005. Effect of watering and soil moisture on mercury emissions from soils. *Biogeochemistry* 76, 215–232.
- Hojdová, M., Navrátil, T., Rohovec, J., Žák, K., Vaněk, A., Chrástný, V., Bače, R., Svoboda, M., 2011. Changes in mercury deposition in a mining and smelting region as recorded in tree rings. *Water Air Soil Pollut.* 216, 73–82. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-010-0515-9>.
- Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York, ISBN 978-0-387-22440-4.
- Laacouri, A., Nater, E.A., Kolka, R.K., 2013. Distribution and uptake dynamics of mercury in leaves of common deciduous tree species in Minnesota, U.S.A. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10462–10470. <http://dx.doi.org/10.1021/es401357z>.
- Lindberg, S.E., Turner, R.R., 1977. Mercury emissions from chlorine production solid waste deposits. *Nature* 268, 133–136.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbri, J.M., Higuera, P., 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ. Geochem. Health* 28, 487–498. <http://dx.doi.org/10.1007/s10653-006-9058-9>.
- OSPAR Commission, 2013. *Mercury losses from the chlor-alkali industry in 2011*. ISBN No. 978-1-909159-33-4. Publication Number: 600/2013.
- Regier, N., Larras, F., Bravo, A.G., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., Cosio, C., 2013. Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: Accumulation in shoots from the water might involve copper transporters. *Chemosphere* 90, 595–602. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.043>.
- Samczyński, Z., Dybczyński, R.S., Polkowska-Motrenko, H., et al., 2012. Two new reference materials based on tobacco leaves: certification for over a dozen of toxic and essential elements. *Sci. World J.* . <http://dx.doi.org/10.1100/2012/216380> 16 Pages
- Sánchez-López, A.S., Carrillo-González, R., González-Chávez, M. del C.A., RosasSaito, G.H., Vangronsveld, J., 2015. Phytobarrriers: plants capture particles containing potentially toxic elements originating from mine tailings in semiarid regions. *Environ. Pollut.* 205, 33–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.010>.
- Siwik, E.I.H., Campbell, L.M., Mierle, G., 2010. Distribution and trends of mercury in deciduous tree cores. *Environ. Pollut.* 158, 2067–2073. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.002>.
- Stamenkovic, J., Gustin, M.S., 2009. Nonstomatal versus Stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1361–1372.
- Tanner, J., Wei, K., 2016. Low Rank Matrix Completion by Alternating Steepest Descent Methods. *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 40, 417–419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acha.2015.08.003>.
- Watmough, S.A., 1999. Monitoring historical changes in soil and atmospheric trace metal levels by dendrochemical analysis. *Environ. Pollut.* 106, 391–403.
- Wright, G., Woodward, C., Peri, L., Weisberg, P.J., Gustin, M.S., 2014. Application of tree rings [dendrochemistry] for detecting historical trends in air Hg concentrations across multiple scales. *Biogeochemistry* 120, 149–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10533-014-9987-9>.
- Xu, J., Bravo, A.G., Lagerkvist, A., Bertilsson, S., Sjöblom, R., Kumpiene, J., 2015. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. *Environ. Int.* 74, 42–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.09.007>.
- Zappellini, C., Karimi, K., 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. Biol. Biochem.* 90, 101–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.008>.



### 3.1.3 Description du dispositif expérimental

Dans le cadre du projet BIOFILTREE, le dispositif expérimental mis en place sur le site de Tavaux est similaire à celui de Fresnes-sur-Escaut et consiste en la même plantation de TCR (2200 tiges/ha) de peupliers cultivars « Skado » (*Populus trichocarpa* x *P. maximowiczii* section Tacahamaca) et « I214 » (*P. deltoides* x *P. nigra* section Aigeiros) ainsi que de rangées d'Aulnes (*Alnus glutinosa*) d'environ 7000 m<sup>2</sup> plantés en 2011.

Les arbres plantés sur la parcelle de Tavaux ont évolué de manière quasi-identique à ceux de la parcelle de Fresnes, conduisant à un contraste de densité de la végétation spontanée sous les peupliers, dépendant du cultivar en présence. L'ortie reste également sur ce site l'espèce dominante de la strate herbacée. Une étude phytosociologique couplée à un suivi de l'intensité lumineuse perçue par la strate herbacée a été réalisée sur la parcelle de Tavaux, et sera présentée à la suite du manuscrit.

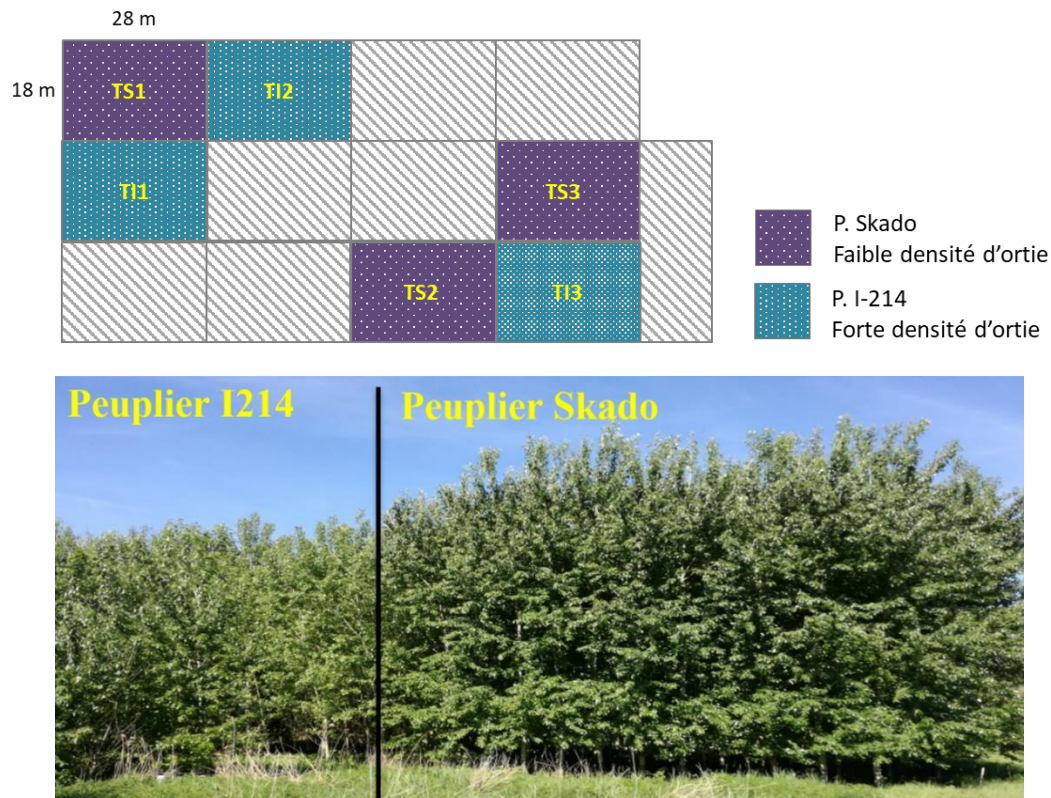


Figure 38. Présentation de la parcelle expérimentale de Tavaux et des 6 placettes de peuplier retenues, à savoir TS1, TS2, TS3 (cultivar Skado avec une faible densité d'ortie) et TI1, TI2, TI3 (cultivar I214 avec une forte densité d'ortie). La photographie prise en juin 2017 témoigne de la différence de développement du peuplier I214 par rapport aux Skado.

Dans le cadre de ce travail de thèse, 6 placettes ont été retenues sur la parcelle de Tavaux, à savoir 3 placettes de monoculture de peupliers Skado (*i.e.* TS1, TS2 et TS3) présentant une strate herbacée peu développée et 3 placettes de monoculture de peupliers I214 (*i.e.* TI1, TI2 et TI3) avec

une strate herbacée dense (Figure 38). Contrairement à la parcelle de Fresnes, celle-ci ne présente pas de modalité liée au degré de contamination en raison de concentrations en Hg homogène sur l'ensemble de la lagune de stockage de sédiments.

### 3.1.4 Description des sols

Le sol de la parcelle de Tavaux est un anthroposol blanchâtre constitué de particules d'oxydes métalliques et de sels (notamment du CaCO<sub>3</sub> et du CaCl<sub>2</sub>) présentant un pH alcalin et une texture majoritairement limoneuse, lui conférant une forte réserve utile en eau (Tableau 18).

Tableau 18. Principaux paramètres physico-chimiques (moyennes) du sol de la lagune de dépôt de sédiment sur laquelle la parcelle de Tavaux a été installée (Assad et al. 2016)

	n	Argile %	Limon fin %	Limon grossier %	Sable fin %	Sable grossier %	pH	CaCO <sub>3</sub> %	P assim. g/kg	C org. g/kg	MO g/kg	N tot. g/kg	C/N	CEC meq/kg	K <sub>2</sub> O g/kg	MgO g/kg	CaO g/kg
Tavaux	6	20.7	74.5	2.2	1	1.6	8	58.2	0.4	19.9	34.4	2.1	9.4	87.5	0.4	0.1	12

Ce sol est également très aéré et perméable. D'une manière générale, ce substrat présente un potentiel agronomique intéressant (Assad et al., 2016). Le développement aisé de la végétation spontanée sur cette lagune conforte cette idée (Zappelini et al., 2015). Des analyses de sols réalisées sur la parcelle Tavaux dans le cadre de travaux préalables (Durand et al., 2017 ; Assad et al., 2016) ont révélés des teneurs en Hg comprises entre 2,9 et 9,1 mg/kg, avec une moyenne de  $5,6 \pm 1,6$  mg/kg. Ces résultats témoignent de concentrations en Hg plutôt homogènes dans les 30 premiers centimètres de sol.

### 3.1.5 Travaux préalablement réalisés

En plus de l'étude dendrochimique préalablement présentée (Maillard et al., 2016), la parcelle expérimentale installée sur la lagune de dépôt de sédiments de Tavaux a fait l'objet de plusieurs travaux de thèse axés sur la microbiologie des peupliers et plus particulièrement sur l'études de ses communautés microbiennes rhizosphériques (Zappelini, 2018) ou phyllosphériques (Durand, 2017) par des approches de barcoding environnemental. Ces projets ont notamment permis une meilleure compréhension de la structuration des communautés microbiennes présentes en contexte de pollution par le Hg (Durand et al., 2017; Zappelini et al., 2015), mais également d'identifier des souches bactériennes favorables à la croissance des plantes résistantes au Hg (Durand et al., 2018). Les mécanismes d'absorption du Hg par les peupliers et divers végétaux cultivés ainsi que les risques sanitaires associés ont également fait l'objet d'une thèse (Assad, 2017). Grâce à cette dernière, nous savons désormais que la voie d'entrée du Hg dans les peuplier se fait principalement par voie atmosphérique (Assad et al., 2016). Ainsi, les travaux préalables, portant sur la parcelle de Tavaux ont été centralisés sur le peuplier et son microbiome, sans considérer le fonctionnement global de l'agrosystème ni ses interactions avec les autres communautés associées.



## 3.2 Contribution du peuplier et de l'ortie à la restauration écologique d'une lagune de stockage de sédiments

### 3.2.1 Préambule

Dans cette section 3.2, la contribution de l'ortie et du peuplier à la restauration écologique du site de Tavaux seront évaluées à partir de 2 inventaires : phytosociologique et entomologique. Cette étude vise également à comparer la diversité entomologique associée à l'ortie issue de la parcelle de Tavaux à celle d'un milieu naturel. Les sections suivantes présenteront d'abord le contexte et la démarche de cette étude, puis développeront plus en détail le choix du matériel et des méthodes ainsi que la mise en place et la conduite de 2 inventaires : phytosociologique et entomologique, réalisés sur la parcelle de Tavaux. Cette partie représente en effet une part conséquente de ce travail de thèse, méritant qu'on s'y attarde plus spécifiquement.

*L'ensemble des autres méthodes utilisées (e.g., identification des insectes, traitement des données) et des résultats de recherche obtenus dans le cadre de ces études sont présentés sous la forme d'un article dans la section 3.2.4. Ces travaux ont également donné lieu à i) une communication orale et par poster au « 4<sup>th</sup> world congress on agroforesterie », à Montpellier et à iii) une communication par affiche aux 4<sup>ème</sup> rencontres nationales de la recherche sur les sites & sols pollués de l'ADEME, à Paris, assurées par moi-même.*

### 3.2.2 Contexte

Les dispositifs de phytomanagement basés sur des TCR de peupliers ont non seulement pour vocation de produire de la biomasse valorisable tout en limitant l'impact des contaminants, mais également de favoriser la restauration écologique de ces milieux. Cette restauration écologique s'articule généralement autour de l'arrivée successive ou conjointe de différentes communautés d'être-vivants. Parmi ces communautés, les insectes jouent un rôle majeur dans ce type d'agrosystèmes en raison de leur caractère auxiliaire ou ravageur pouvant conditionner le développement et la pérennité des espèces cultivées, comme précisé dans la section 1.3.3.2 . En milieu naturel, l'ortie est connue comme étant une plante hôte abritant une importante diversité d'insectes (section 1.4.8.3). Dans la mesure où sa présence s'accompagne généralement d'une importante diversité d'insectes, elle a déjà fait l'objet d'études dans des contextes de gestion intégrée de ravageurs. Compte-tenu de ces observations faites en conditions naturelles, la présence d'ortie dans l'agrosystème étudié semble donc être favorable à la restauration écologique du site. Toutefois, il a été montré dans la synthèse bibliographique que les insectes sont sensibles aux ETM et notamment au Hg et que leur comportement et la structure de leur communauté peuvent être

affectés (section 1.2.5). La parcelle de Tavaux étant en place depuis 2011, il semble important d'évaluer le succès de la restauration écologique du site au travers d'une étude phytosociologique de la végétation spontanée, couplée à une étude entomologique. Il semble également judicieux de comparer la diversité entomologique associée à l'ortie sur un site contaminé au Hg avec celle d'un site naturel afin d'appréhender l'impact de ce contaminant sur la structure de la communauté. Enfin, caractériser fonctionnellement ces insectes du point de vue de leurs rôles écosystémiques dans l'agrosystème semble primordial pour appréhender la pérennité des cultures.

### 3.2.3 Elaboration des protocoles et mise en œuvre des inventaires

Dans le cadre de cette étude nous avons conduit en parallèle des 2 inventaires (phytosociologique et entomologique), reposants sur des campagnes mensuelles d'avril à septembre 2017 et 2018, à l'intérieur des 6 placettes de la parcelle de Tavaux (1500 m<sup>2</sup>). Afin d'obtenir une résolution à l'échelle de la parcelle agroforestière dans sa globalité, les strates herbacées et arborées ont été considérées.

#### 3.2.3.1 Inventaire phytosociologique

L'inventaire phytosociologique s'est basé sur une méthode classique de Braun-Blanquet, permettant d'appréhender la composition floristique ainsi que le taux de recouvrement de chacune des espèces de plante identifiées. Ce protocole s'est montré particulièrement adapté à cette étude et a ainsi été maintenu sur l'ensemble des deux années d'inventaire. Ces résultats ont confirmé les observations visuelles suggérant la dominance de l'ortie dans les placettes I214 et Skado et les taux de recouvrement des espèces herbacées plus importants sous les placettes I214. Ces différences en terme de densité de la strate herbacée ont été considérées comme modalités (I214 vs Skado) dans le cadre de l'inventaire entomologique.

#### 3.2.3.2 Inventaire entomologique de la strate herbacée

Un échantillonnage sur une durée de 3 années consécutives est généralement préconisé (Martikainen and Kaila, 2004) mais cela n'a pas été possible dans le cadre de ce projet de thèse. Ainsi, l'inventaire entomologique a été conduit à l'échelle de la strate herbacée au cours des 2 années. Nageleisen and Bouget, (2009) ont démontré que le maximum de richesse globale est atteint lors d'un piégeage continu centré sur la période d'activité maximale (juin). Il a donc été décidé de faire du piégeage en continu d'avril à septembre 2018. L'échantillonnage des insectes associés à la strate herbacée a été réalisé à partir d'un protocole reposant sur la technique du fauchage. Compte-tenu de la dominance de l'ortie dans la strate herbacée, l'élaboration de ce protocole s'est inspirée

des nombreuses études entomologiques portant sur l'entomofaune de l'ortie. Ainsi, 18 points de prélèvements ont été définis pour chaque type de placette, où les plantes herbacées ont été fauchées selon un protocole calibré. Une fois capturés, les insectes ont été récoltés soit à l'aide de l'aspirateur à bouche, outil le plus efficace pour collecter rapidement les insectes tentant de s'échapper, soit à la pince après avoir introduit un coton imbibé d'acétate d'éthyle dans le filet fauchoir de manière à anesthésier les insectes et faciliter leur collecte. L'anesthésie ne s'est pas montrée très efficace dans la mesure où certains Diptères ont été perdus au moment de l'ouverture du filet. L'essentiel des insectes ont ensuite été stockés et conservés dans l'éthanol à 4°C. Certains taxons, facilement identifiables, ont été retenus pour l'étude associée (section 3.3) et conservés à -20°C en vue d'être lyophilisés et analysés pour leur teneur en Hg.

### *3.2.3.3 Inventaire entomologique de la strate arborée*

Il a été initialement prévu d'orienter l'inventaire à l'échelle arborée sur les insectes présents sur les branches de peupliers. Ainsi, des essais de battage à l'aide d'un parapluie japonais ont été effectués au cours de la première année de l'inventaire, se montrant inadaptés aux arbres présents dans la parcelle. En raison de la forte densité de plantation, les premières branches feuillues sont pour la plupart situées à plusieurs mètres de hauteur, rendant impossible le battage. Par conséquent, l'inventaire n'a pas pu être réalisé sur la strate arborée la première année et une autre méthode de piégeage a dû être envisagée pour la seconde année. Le choix s'est porté sur des pièges d'interception aériens multidirectionnels de type Polytrap® (Figure 39). Ce type de piège est basé sur l'interception des insectes volants et qui présentent un géotactisme positif lors du choc avec un obstacle (*i.e.*, phénomène de se laisser tomber). Ce modèle de piège est maintenant largement utilisé à des fins d'inventaires de Coléoptères par divers organismes tels que le Irstea, l'ONF et l'OPIE.



Figure 39. Présentation du modèle de piège polytrap® utilisé, et d'un piège après confection et installation.

Ainsi, 18 pièges ont été confectionnés selon les préconisations de la littérature et du matériel disponible. Les pièges se composent de 3 parties i) 2 plaques de polyéthylène transparent lisse de 2 mm d'épaisseur emboîtées en croix *via* une fente centrale, permettant d'intercepter les insectes, ii) un entonnoir permettant de diriger les insectes interceptés vers le tube collecteur, et iii) un couvercle permettant de limiter le remplissage du tube collecteur par des précipitations ou des feuilles (Figure 39). Pour chaque placette, les pièges ont été hissés au niveau des premières branches feuillues des peupliers à l'aide d'une corde, par paire, l'un en bordure et l'autre en plein centre. A cela se sont ajoutés 3 pièges situés dans des placettes non étudiées pour la parcelle de Tavaux. L'utilisation d'une paire de piège par site permet de limiter le nombre de données nulles en cas de dysfonctionnement d'un piège. Il a été décidé de ne pas utiliser d'attractant dans les tubes collecteurs (*e.g.*, éthanol). Les pièges ont été relevés et réamorçés tous les 15 jours, ce qui semble être un bon compromis pour espérer capturer le maximum d'espèces tout en minimisant le temps de récolte. Les araignées étant particulièrement abondantes dans l'agrosystème, elles ont été retrouvées dans la plupart des tubes collecteurs ce qui a pu partiellement biaiser les résultats. En effet, certains individus de l'ordre des Diptères et des Hyménoptères ont été endommagés, rendant impossible leur identification.

### 3.2.4 Présentation de l'article et des principaux résultats

Cet article, intitulé “Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a driver of insect diversity at a phytomanaged chlor-alkali site”, est actuellement prêt à être soumis dans le journal *Sciences of the total environment*.

Ces travaux visaient à caractériser les communautés végétales et d'insectes associées à l'agrosystème peuplier-ortie présentes sur le site de Tavaux et à comparer la biodiversité entomologique associée à l'ortie à des résultats issus du milieu naturel.

Un inventaire phytosociologique a permis de mettre en évidence des taux de recouvrement allant de 20 à 70% pour l'ortie ainsi que d'identifier près de 30 plantes accompagnatrices, toutefois présentes en faible abondance. Certaines d'entre-elles (e.g. *Sambucus ebulus*) peuvent concurrencer l'ortie dans les placettes les plus lumineuses.

Un inventaire des insectes associés à l'ortie et aux peupliers, conduit sur 2 années successives, a permis de mettre en évidence une diversité d'insectes aussi riche qu'en milieu naturel, remplissant des fonctions écosystémiques variées et potentiellement profitables à l'ensemble de l'agrosystème étudié. Cette biodiversité auxiliaire (e.g., Chrysopsidae, Coccinellidae) semble liée à la surabondance d'un puceron spécialiste de l'ortie.

Dans le cadre de cette étude, je me suis chargé de l'ensemble des étapes allant de la conception des pièges à la rédaction de l'article. J'ai néanmoins été accompagné par 3 stagiaires de licence 2 et 3 et par un stagiaire de Master qui m'ont assisté sur l'ensemble de cette étude et plus particulièrement sur la phase de tri et d'identification des milliers de spécimens collectés.



# Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a driver of insect diversity at a phytomanaged chlor-alkali site

Loïc Yung<sup>1</sup>, Alexandre Peter<sup>1</sup>, Geneviève Chiapusio<sup>2</sup>, Michel Chalot<sup>1</sup>, Coralie Bertheau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 6249 Chrono-environnement, Université Bourgogne Franche-Comte, F-25200 Montbéliard, France

<sup>2</sup> UMR CARTEL INRA 042 Université de Savoie Mont-Blanc, Domaine Universitaire Technolac, FR- 73376 Le Bourget du lac, France

KEYWORDS: Aphids, Entomological survey, Nettle, Phytomanagement, Poplar

## ABSTRACT

Phytomanagement plantations could contribute to the resilience of ecosystems by acting as activator of biodiversity, promoting the appearance of contaminant-tolerant herbaceous plants and providing food for a large diversity of insects. In agrosystems, depending on their life traits, insects could be beneficial, by providing a large panel of ecosystemic services (e.g., pollination, regulation of pathogens or detrimental insects) or pest, by affecting the development and the sustainability of the culture. As soil contamination affects the structure of insect communities and thus the functioning, knowing this community is crucial to understanding the sustainability of these agrosystems. This study aimed at characterizing the entomofauna within a nettle-poplar agrosystem in a mercury-contaminated chlor-alkali landfill. After characterizing the plant diversity of the herbaceous layer, we conducted a two-year insect survey at the herbaceous and tree layers using sweep net and cross-van interception traps, respectively. Most of the 362 morphospecies collected, accounting for 7305 individuals, were associated with nettle, thus confirming its importance in the ecological restoration of this site. In addition, the taxonomic and functional diversity of insect related to nettle were comparable to those in the natural environment, meaning that nettle also act as a reservoir of insect in the case of the studied contaminated site. As most of the herbivores were specialist of herbaceous plants, they represented no risk for the sustainability of poplar plantation. Among them, the most abundant species was the nettle aphid *Microlophium carnosum*, which promoted the arrival of many natural enemies in the agrosystem and particularly *Nabis* sp. Finally, we denoted the absence of some small predatory Anthocoridae species commonly hosted by nettle, which could be linked with the dominance of the red ants *Myrmica rubra*, potentially tolerant to the mercury contamination.

## INTRODUCTION

Phytomanagement is a technique based on the use of plant species to rehabilitate and revalorize polluted environments. Using fast-growing tree species such as poplar, this phytotechnology allows the production of renewable biomass for the bio-based-economy (Kidd et al., 2015; Pandey et al., 2016). At the same time trees can contribute to the resilience of the ecosystem by acting as activator of biodiversity (Parraga-Aguado et al., 2014) and positively influence other important ecosystem services (Borges et al., 2018). Recent approaches on the optimization of phytomanagement systems point out the importance of assemblages between crops and the spontaneous species (Parraga-Aguado et al., 2013) to favour the ecological rehabilitation of these marginal lands (Boisson et al., 2016). The biodiversity of this spontaneous vegetation is generally restrained by the soil properties, limiting the panel of species able to develop and to compete with the tolerant ones (Macnair, 1987).

The stinging nettle (*Urtica dioica* L.) is frequently observed, spontaneously growing under Salicaceous species (Cronk et al., 2016) including plantations set up in phytomanagement context. Nettle is one of the most represented plant in Europe and in France due to its ability to colonize a vast diversity of environment, including contaminated ones (Balabanova et al., 2015; Shams et al., 2010; Viktorova et al., 2016). Thus, the presence of nettle within a short rotation coppice (SRC) of poplar offers new perspectives as nettle constitutes a potential resource of high-quality herbaceous fibres incorporated in biocomposite for industrial sector (Bacci et al., 2009; Di Virgilio et al., 2015) and can promote the biodiversity of local flora and fauna, particularly entomofauna.

Entomological studies focusing on the nettle entomofauna were done exclusively in non-contaminated sites. The first ones took place in Europe (Davis, 1975, 1989; Perrin, 1975) and characterized this plant as a reservoir of insect hosting a large diversity of insect orders and particularly some species of *Hemiptera* and *Coleoptera* (Davis, 1973). Nettle has been found to host more than one hundred of insect species, and at least thirty of them are classified as specialist, such as several species of *Aphididae*, *Psyllidae* and caterpillars. Many other generalist species belonging to *Miridae*, *Lygaeidae* or *Cicadellidae* families have been found, as well as a complete set of predators and parasitoids such as *Coccinellidae*, *Syrphidae* and *Braconidae* species. More recently, several other studies carried out by James et al., (2015) in the USA and Alhmedi et al., (2007, 2009, 2011) in Belgium, promoted the maintaining of nettle as patch but more efficiently as pure stands (Zabel and Tschardt, 1998) in order to improve the insect biodiversity of agrosystems. Among the numerous specialist herbivorous species hosted by nettles, a particular attention was paid to the nettle aphid *Microlophium carnosum* (Buckton) due to its importance as an alternative prey for the natural competitors of crop pests (Perrin, 1976). Indeed, aphids hosted by nettles may provide a resource during the early season for aphidophagous insects, parasitoids and pathogens (Ekesi et al., 2005), which could also shift to other layers or plants if preys become available (Alhmedi et al., 2007, 2011). Consequently, herbaceous plants could contribute to the regulation of crop pests in the surrounding environment (Stephan et al., 2016). This beneficial insect biodiversity associated to nettle has also been showed in a field production context with a particular clone of nettle selected for its fibre content (Baverstock et al., 2011).

An herbaceous layer including nettle within a Salicaceous plantation in a phytomanagement context could contribute to the stability and the sustainability of agrosystem against biotic impact and particularly against pest insects as previously suggested for plant productions (Baverstock et al., 2011; James et al., 2015; Alhmedi et al., 2011). However, soil and atmospheric quality are commonly altered in contaminated areas, affecting ecosystem functioning through changes in biodiversity (Tilman, 1999). Mogren and Trumble, (2010) concluded that some modifications of behaviours affect the health of insects at contaminated sites leading to a general reduction in species diversity and population sizes, with a predominance of species that can tolerate the contaminants.

The beneficial aspect of the insects associated to herbaceous layer have to be assessed in a particular case of phytomanagement plantations.

The present study aimed at characterizing the insect diversity hosted by the herbaceous layer, colonized by the native stinging nettle, *U. dioica*, in a chlor-alkali contaminated landfill revegetated by two poplar cultivars, and at evaluating the implication of this entomofauna to the sustainability of the whole nettle-poplar agrosystem. We hypothesized that insects related to nettle would have promising benefits on the functioning of this particular agrosystem; however, with mercury (Hg) soil contamination, there would be a reduction in species richness and abundance. The specific objectives were i) to assess insect biodiversity associated to the herbaceous and the tree layers of the agrosystem, ii) to evaluate the influence of the poplar cultivars on the herbaceous plant composition iii) to determine the potential impact of Hg contamination on the insect biodiversity and iv) to ecologically characterize the insect species and to evaluate their role and impact within the agrosystem. Finally, this study will bring new insight on the phytomanagement application and the interest to maintain an herbaceous layer for ecological, environmental and economic benefits.

## MATERIALS AND METHODS

### *Site description*

The study site located in Saint-Symphorien-sur-Saone in the Bourgogne Franche-Comte region (France) consists in a chlor-alkali sediment landfill, which is, at its core, spontaneously colonised by *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., while the north and the south of the area is dominated by *Salix alba* L.. In this site, an experimental phytomanaged field trial was carried out with poplar plantation. Location, history and characteristics of the sediment landfill have been described in detail in previous studies (Zappelini et al., 2015; Assad et al., 2016; Durand et al., 2017). Briefly, the substrate of this 12-ha site is composed of Hg-enriched sediments from a chlor-alkali activity, with concentrations ranging from 4400 to 7100 µg/kg. Such recovered concentrations are 10-fold higher than Hg concentration at an adjacent undisturbed forest soil (Zappelini et al., 2015). A phytomanagement trial was implemented in 2011 with the two poplar cultivars Skado (*P. trichocarpa* × *P. maximowiczii*) and I214 (*P. deltoides* × *P. nigra*) as a short-rotation coppice (SRC; 2200 stems/ha). Five years after, an herbaceous layer, dominated by the stinging nettle, spontaneously grew, with a coverage rate depending on the poplar cultivar. Among the 12 plots subdividing the plantation, we selected three plots under Skado and three plots under I214, each of 504 m<sup>2</sup> (28m x 18m) surface (Figure 1).

### *Phytosociological survey of the herbaceous layer*

The herbaceous floristic diversity has been studied each month from April to September 2017 and 2018. The coverage rate of each herbaceous species has been evaluated using the 7-level Braun-Blanquet scale (r, +, 1, 2, 3, 4, 5 corresponding to 0.5, 2.5, 15, 37.5, 62, 87.5 and 100%, respectively) and their sociability using a 5-level scale (from 1: isolated individuals to 5: dense colonies) (Wikum and Shanholtzer, 1978). The Braun-Blanket method was deployed within the six studied plots according to a transect considering the whole plot surface. To better understand the herbaceous composition, the temperature and the light intensity penetrating the tree canopy and reaching the herbaceous layer were assessed. A total of 12 monitors (HOBO Pendant Temp Light) were set up between June 2017 and October 2018, above the nettle stand (2-meter high) and distributed between the studied plots. One of them was set up in an unplanted area of the sediment landfill in order to assess the solar exposition without interception. The light intensity (lum/ft<sup>2</sup>) was measured every hour and logged by the monitor, and then we calculated the daily average

light intensity for the 2017-2018 period by only considering the daylight hours. For the temperature, all the hours were considered.

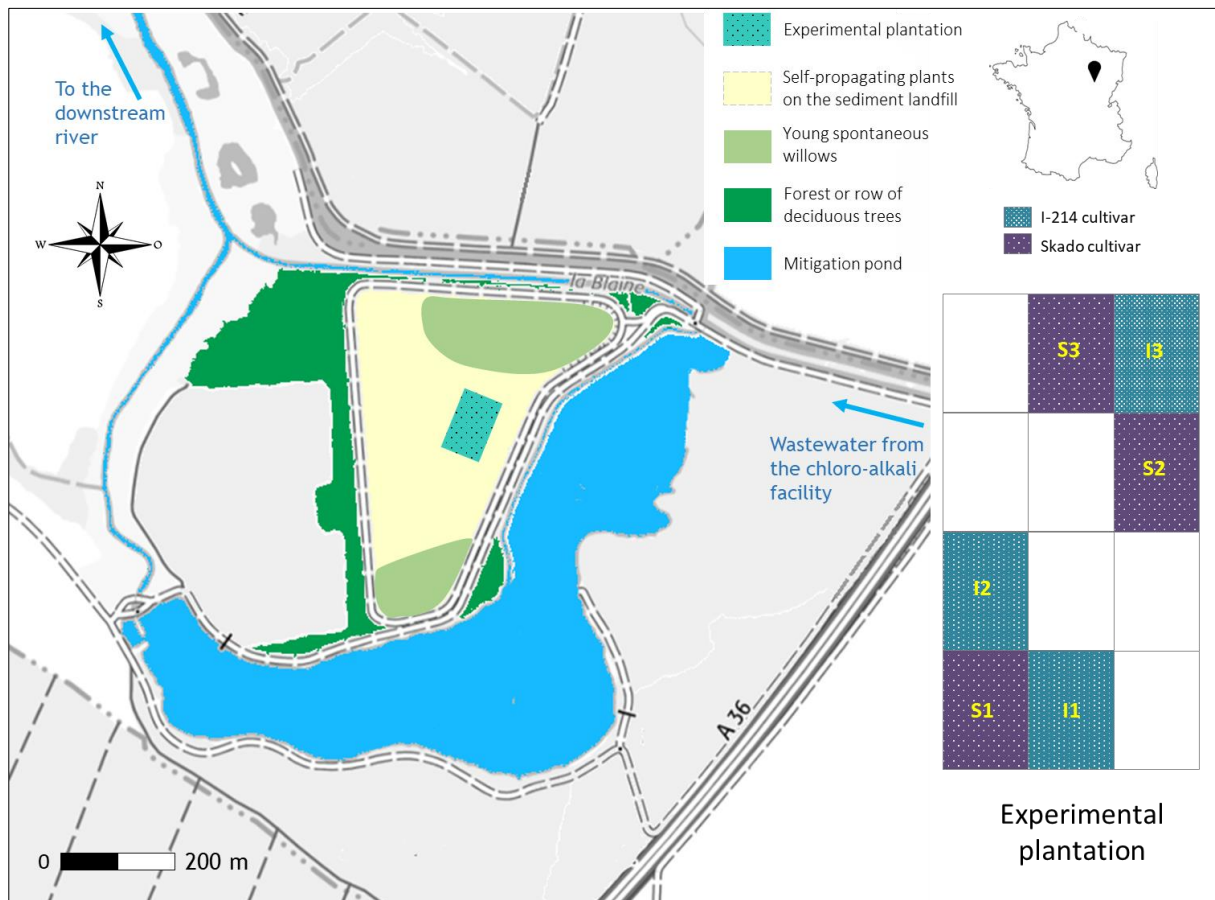


Figure 1: Sediment landfill from a chlor-alkali activity located in the East of France and the characteristics of the surrounding biota. On this sediment landfill, an experimental plantation was set up in 2013 and three plots were selected under both poplar cultivars (I214, I1-3; and Skado, S1-3) for sampling.

### ***Insect sampling methods***

The sampling was conducted in 2017 and 2018, using two sampling methods selected to investigate the insect diversity at both the herbaceous and tree scale. An exhaustive sampling of the entomofauna associated with the herbaceous layer was carried out between April and September (*i.e.*, period of insect's activity) over the two consecutive years to ensure the most representative diversity in insect species. For each selected plots, insects from the herbaceous layer were caught using a sweep net, collected using tweezers and mouth-vacuum and pooled in a collector tube with absolute ethanol or ethyl-acetate as usually used to assure an optimal conservation and identification. We installed two cross-van interception traps (Polytrap™) spaced 5-metres apart in poplar branches within each considered plot. Collection tubes were checked twice a month from April to September 2018 and restarted with ethanol diluted to 20% in accordance with the recommendations of Nageleisen and Bouget, (2009). This harvest frequency seemed to be a relevant compromise for the capture of the maximum number of species while minimizing the harvest time. The use of a trap pair per plot also limits the number of null data in the case of a trap malfunction. All insect samples were stored at -20°C until identification.

### ***Taxonomic identification and ecologic characterization of insects***

All specimens were identified to the lowest possible taxonomic level using several references that included [Giustina et al., \(1989\)](#), [Leseigneur, \(1972\)](#), [Péricart, \(1987\)](#) among others, on-line sources such as [insecte.org](#) and/or by specialists from the Franche-Comté Natural Space Conservatory. Each terminal taxon corresponding to one morphospecies were then classified according to its ecology, role and impact on nettles and/or poplars at both larval and adult stages using published literature. First, insects were classified according to their dietary range (*i.e.*, generalist for species feeding on two or more families or specialist for those feeding on only one family), their habitat (*i.e.*, herbaceous layer, tree layer, litter, soil), their trophic guild (*i.e.*, herbivorous, predators, parasitoids), their feeding guild (*e.g.*, defoliator, sap-sucker, scavenger). Secondly, we characterized insects according to their ecosystemic services and then classified them to assess their potential impact or benefit on the nettle-poplar agrosystem (*i.e.*, known pest, potential pest, pest-regulator and ecosystem beneficial). If a category could not be attributed, because of the insect ecology and biology have no significant influence on the agrosystem (*i.e.*, adult *Ephemeroptera* live only to reproduce and die soon after) the NC tag, for not concerned, was attributed. If the level of identification was too low to deduce functional characteristics, the NA tag, for not available, was chosen.

### ***Data treatment***

The analyses were based on the species richness and abundance of morphospecies according to the month when they were collected, the layer (herbaceous *vs.* poplar tree) and their location (I214 *vs.* Skado plots). In order to have a better understanding of the taxonomic diversity and evaluating its homogeneity or heterogeneity, five indices were calculated. The Pielou's index allows evaluating the individual's specific repartition without the need of specific richness. The Simpson's index, which calculates the probability of two individual being of the same species, was used to calculate the Simpson's diversity index. The Hill index combines the sensibility of the Pielou's index to rare species and the Simpson's index sensibility to abundant species, and per se, is the most synthetical. Finally, we calculated the evenness using the Camargo's index, representing the homogeneity of the species in the dataset. This index shows the same information as Pielou's index, but because its calculation does not base itself on the notion of species richness, it is unbiased and thus allows for a better interpretation of the dataset's heterogeneity ([Smith and Wilson, 1996](#)).

### ***Statistical analyses***

First, to evaluate the completeness of our sampling effort, we calculated and drew rarefaction curves for both sampling technics using the function "rarecurve" available in the vegan package in R. These curves allow estimating the number of expected species in smaller sample and the shape of the curve is a graphic display of the relative estimated species accumulation rates. In order to further characterized and compare the I214 and Skado plots, the web application SpadeR ([Chao et al., 2016](#)) was used. This application was used to evaluate i) the percentage of rare morphospecies (morphospecies with a number of specimen inferior or equal to 10) and their abundance expressed as a percentage, ii) the frequency count related to the number of rare morphospecies observed as singleton, doubleton, etc., iii) a number of species theoretically present according to the prediction made by the ACE-1 models ([Chao and Lee, 1992](#)) as this model is the most robust for our dataset ([Chao and Chiu, 2016](#)), iv) the effective number and a theoretically modelised (according to the latter model) number of shared species between the two modalities.

To represent the structure of the insect communities related to the I214 and Skado modalities, we performed a two-dimensional Non-metric Multi-Dimensional Scaling (NMDS) analyse with 1000 iterations, using the Bray Curtis method ( $k = 3$ ), from the "metaMDS" function of the Vegan package in R. A PERMANOVA was then performed using the "adonis" function of the Vegan package in R to compare the studied modalities.

We determined, by Spearman's rank correlation, the relationships between the abundance of the common nettle aphids and two other species regulating its population level, the common red ants, *Myrmica rubra* L. and the damsel bug *Nabis* sp.. In addition, we investigated the relationships between the abundance of aphids and several groups of insects (*e.g.*, parasitic wasp, predatory mirids) or taxa (*e.g.*, Aphididae, Nabidae, Formicidae) using principal component analysis (PCA).

### ***Comparison of nettle related insect biodiversity between natural vs. Hg contaminated sites***

To precisely evaluate the influence of the Hg contamination on insects' biodiversity, it would have been interesting to carry out the same survey at a non-contaminated nettle-poplar system. However, in classic poplar production focused on economical aspect, the spontaneous vegetation is commonly eliminated to avoid competition with trees, and therefore we were not able to find an appropriate control poplar-nettle plantation. Consequently, we elaborated a reference list of insect related to the stinging nettle, by compiling eight published lists from natural areas (Alhmedi et al., 2006, 2007, 2009, Davis, 1973, 1975, 1989; James et al., 2015; Zabel and Tscharnke, 1998) and the one from this study. Moreover, we set up a "main taxa list" which included insect species considered as the most common on nettles (found in at least 50% of the considered studies). The richness and the potential alteration of the local biodiversity at the Hg contaminated site were assessed using this reference list.

## **RESULTS & DISCUSSION**

Overall, the compiled dataset in the experimental plantation included 7305 individuals and 362 morphospecies, belonging to 13 orders and 99 families. Among them, 61 were common and 302 rare (83% of the total number). The ACE-1 model revealed a maximum number of species ranging between 503 and 683, with an estimation of 574, meaning that we sampled 63% of the whole insect diversity in this site (Table 1). These results are in agreement with those found in Anderson and Ashe (2000) where different estimator models were used, revealing notable differences between observed and estimated values.

*Table 1: Descriptive results including the sample size (number of individuals), the number of observed species, the number of observed rare species, the abundance of rare species and an estimation of the theoretical number of species based on the ACE-1 model and 4 diversity indices, calculated for both the I214 and Skado plots as well as the entire experimental site.*

	Sample size	Observed morphospecies	Observed rare morphospecies	number of rare morphospecies (% of total)	Abundance of rare morphospecies (% of total)	Theoretical number of morphospecies	Pielou's index	1-Simpson's diversity	1-Hill's index	Camargo evenness
<b>Tree and herbaceous layers</b>	7305	363	302	83%	10%	574	0,56	0,88	0,99	0.12
I214 plot	4130	277	238	86%	14%	520	0,55	0,88	0,99	0.11
Skado plot	3175	233	200	86%	15%	468	0,56	0,89	0,99	0.1
<b>Trees layer</b>	552	46	35	76%	12%	122	0.68	0.88	0.97	0.24
<b>Herbaceous layer</b>	5239	175	147	84%	7%	272	0.45	0.79	0.96	0.09
Urtica dioica	3517	48	34	71%	2%	89	0.39	0.63	0.82	0.09

The 2-year survey of the herbaceous layer revealed rarefaction curves with similar trend between plots from a same modality (I1 vs. I2 vs. I3 for I214 and S1 vs. S2 vs. S3 for Skado), suggesting that the sampling effort was comparable for all studied plots (Figure S1). Concerning the survey at

the tree layer, I3 curve diverge from the two other I214 curves, tending to reach an asymptotic profile. Reaching the asymptote indicates that most species were sampled (Gotelli and Colwell, 2001) but in reality, this state is almost impossible to reach because the number of species that need to be sampled would be far too high (Chao and Chiu, 2016). On the contrary, for the same sample size, the S1 plot contained a higher species richness than the two other Skado plots, however, the sampling effort has not been sufficient to suitably record this diversity.

Sweeping in the herbaceous layer captured 6593 individuals from 309 morphospecies whereas cross van traps in tree layer collected 712 individuals belonging to 123 morphospecies, with 50 morphospecies shared between the two layers. These results suggested that herbaceous layer was the main contributor to the insect biodiversity within the experimental plantation (figure 5). The two most abundant taxa collected from the herbaceous layer were the common nettle aphid, *M. carnosum*, and *M. rubra*, a red ants breeding and protecting aphids from predators, accounting for 30% and 16% of the collected insects, respectively. In poplar trees, 36% of taxa were coleopteran, including two morphospecies belonging to the *Agriotes* genus and to the *Nitidulidae* family that accounted both for 16%. Overall, dipteran were particularly abundant, representing 58% and 13% of insects collected in the herbaceous and tree layers respectively. Among the 29 identified families of dipteran, *Chironomidae* accounted for 59% of the abundance of this order. Some members of this family are tolerant to trace metal contamination and appeared abundant in anthropic biota (Pinder, 1986). Consequently, the recorded adult chironomids most likely grew as larvae in the adjacent contaminated mitigation pond before emerging and moving to the agrosystem (Figure 1).

Overall, the insect biodiversity on the experimental plantation could be qualified as relatively good but characterized by the presence of over-abundant species (Table 1). The very low evenness value suggested a clear heterogeneity in insect species distribution. More precisely, the high value for Simpson's diversity index coupled with the mid value for the Pielou's indicated that the insect community seems to be structured with a large number of species with few individuals and many highly abundant species. Indeed, we recorded 201 morphospecies with only one or two individuals, further 15 with more than 50 individuals, 8 with more than 100 individuals and 2 with more than 1000 individuals were collected. The effect of these highly abundant species such as *M. carnosum* and *M. rubra* on the insect community was not so obvious with only the use of the 1-Hill index. These observed indices mainly derived from those obtained for the herbaceous layer highlighting its contribution in the insect biodiversity on the experimental plantation (Table 1).

### ***Herbaceous community under poplar cultivar and their influence on the insect diversity***

In the experimental plantation, we confirmed that spontaneous stinging nettle had the highest coverage rate among all herbaceous plants. This dominated species was accompanied with 18 other plant species (*i.e.*, 9 under the I214 and 17 under the Skado cultivars, Table S1) the most abundant of which were *Galium aparine* L., *Sambucus ebulus* L., *Calystegia sepium* (L.) R.Br. and some Poaceae species such as *P. australis* and *Poa trivialis* L. and this, under both I214 and Skado cultivars (Table 2).

Poplars from the Skado cultivar had a better development than I214 and thus resulted in a dense canopy, inducing a reduction of 82% incidence of light under Skado (mean value in the two consecutive years: 5049 lum/ft<sup>2</sup>), as compared to the unplanted area (27892 lum/ft<sup>2</sup>). The I214 cultivar induced a slightly weaker reduction (70%) of light reaching the herbaceous layer (5043 lum/ft<sup>2</sup>) (Figure S2). The temperature fluctuation were less pronounced under the plantation, with the same trend of temperature between I214 and Skado plots (Figure S2). This difference in solar exposition conducted to a better expansion of the herbaceous layer under I214 where light was more accessible, favouring thus heliophilous species (*e.g.*, *C. sepium*, *Rumex obtusifolius* L. Table S1) compared to Skado, where species related to closed woody environment have been recorded (*e.g.*,

*Rubus fruticosus* L., young *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L., Table S1). Consequently, the coverage rate of nettle under I214 was between 30% and 70% between June and September depending on the plot whereas it did not exceed 35% under Skado. The same is true for *G. aparine*, the most abundant accompanying species, reaching 50% within the brightest plots (Table 2).

Table 2: Mean coverage rate (%) of the herbaceous layer within the I214 and Skado plots for the 6 most abundant species or families (Poacea) of plant recorded from April to September 2017 and 2018, using the Braun-Blanket method. The minor species were gathered in the “Others” group.

	0’/17	05/17	06/17	07/17	08/17	09/17	04/18	05/18	06/18	07/18	08/18	09/18
<b>I214 PLOTS</b>												
<i>Urtica dioica</i>	43.3 ± 11.5	58.3 ± 7.6	46.7 ± 14.4	48.3 ± 11.5	46.7 ± 10.4	68.3 ± 11.5	31.7 ± 5.8	31.7 ± 10.4	40.0 ± 5.0	43.3 ± 7.6	51.7 ± 12.6	60.0 ± 5.0
<i>Galium aparine</i>	20.7 ± 4	18.3 ± 2.9	17.7 ± 2.5	0.7 ± 1.2	0.7 ± 1.2	1.7 ± 2.9	47.3 ± 2.5	43.3 ± 10.4	0	0	0	1.7 ± 2.9
Poacea	12.3 ± 12.5	6.7 ± 2.9	0.7 ± 1.2	0.7 ± 1.2	2.3 ± 2.5	2.0 ± 0.0	2.3 ± 2.5	2.3 ± 2.5	1.7 ± 1.5	1.7 ± 1.5	1.0 ± 1.7	1.0 ± 1.7
<i>Chaerophyllum temulum</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Calystegia sepium</i>	1 ± 1.7	NR	2.7 ± 2.1	8.7 ± 6.4	5.3 ± 9.2	4.3 ± 5.1	0.7 ± 1.2	0.7 ± 1.2	1.7 ± 2.9	1.7 ± 2.9	1.7 ± 2.9	NR
<i>Sambucus ebulus</i>	4.3 ± 5.1	3.3 ± 2.9	14 ± 14.4	15 ± 13.2	15 ± 13.2	12.7 ± 11.2	7.3 ± 5.0	6.3 ± 5.1	5.7 ± 4.0	5.7 ± 4.0	8.3 ± 2.9	10 ± 5.0
Others	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	4.3 ± 1.2	6.7 ± 2.9	8.3 ± 2.9	5.0 ± 0.0	4.0 ± 2.6	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.5	6.0 ± 1.7	5.0 ± 0.0
uncovered	13.3 ± 5.8	8.3 ± 5.8	14.0 ± 4.0	20.0 ± 8.7	21.7 ± 10.4	6.0 ± 2.6	6.7 ± 2.9	12.3 ± 11.2	47.7 ± 11.2	44.3 ± 16.0	31.3 ± 19.0	22.3 ± 2.5
<b>SKADO PLOTS</b>												
<i>Urtica dioica</i>	18.3 ± 2.9	33.3 ± 2.9	16.7 ± 5.8	16.7 ± 5.8	16.7 ± 5.8	11.7 ± 7.6	23.3 ± 2.9	31.7 ± 2.9	21.7 ± 2.9	21.7 ± 2.9	16.7 ± 2.9	15.0 ± 5.0
<i>Galium aparine</i>	10.0 ± 0.0	11.7 ± 2.9	2.0 ± 0.0	NR	NR	NR	31.7 ± 5.8	30.0 ± 13.2	NR	NR	NR	NR
Poacea	6.7 ± 2.9	6 ± 3.6	2.3 ± 1.2	2.3 ± 1.2	2.7 ± 0.6	4.0 ± 1.7	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.5	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
<i>Chaerophyllum temulum</i>	1.7 ± 2.9	1.7 ± 2.9	1.7 ± 2.9	1.7 ± 2.9	1.7 ± 2.9	2.7 ± 2.1	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.5	4.3 ± 1.2	4.3 ± 1.2	1.7 ± 1.5	NR
<i>Calystegia sepium</i>	NR	NR	NR	NR	NR	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Sambucus ebulus</i>	NR	NR	0.3 ± 0.6	1.3 ± 1.5	1.3 ± 1.5	1.0 ± 1.7	3.3 ± 2.9	1.3 ± 1.2	1.3 ± 1.2	1.3 ± 1.2	1.3 ± 1.2	NR
Others	5.0 ± 0.0	5.7 ± 1.2	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
uncovered	60 ± 5	41.7 ± 7.6	72 ± 9.2	73 ± 7.5	72.7 ± 7.0	74.7 ± 9.9	29.0 ± 9.6	25.3 ± 10.1	64.3 ± 3.8	64.3 ± 3.8	73.3 ± 5.0	78.0 ± 5.0

The greatest insect abundance and species richness were observed under the I214 cultivars, which represented 57% of the total abundance of insect individuals and belonging to 277 morphospecies (Table 1). This higher diversity and abundance within the I214 plots were also noticeable for the five most abundant and diverse orders (*i.e.*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Hymenoptera* and *Lepidoptera*). The estimated total number of species followed the same trend. The two modalities shared 147 morphospecies accounting for 53% of the species present under I214 and 63% of those present under Skado. In both cultivar modality, rare species accounted for approximately 86% of the sampled species and for only 15% of the total abundance of insects, suggesting that nettle density did not influenced the abundance of rare species. The NMDS and Permanova analyses revealed no significant difference between the two modalities in term of both species richness and abundance ( $pr = 0.558$ ) (Figure 2). Additionally, values obtained for the four diversity indices calculated also support this result (Table 1). Consequently, the insect communities



within the two modalities were comparable, denoting that the density of nettle and/or the occurrence of other specific but minority plant species, did not influenced the insect community.

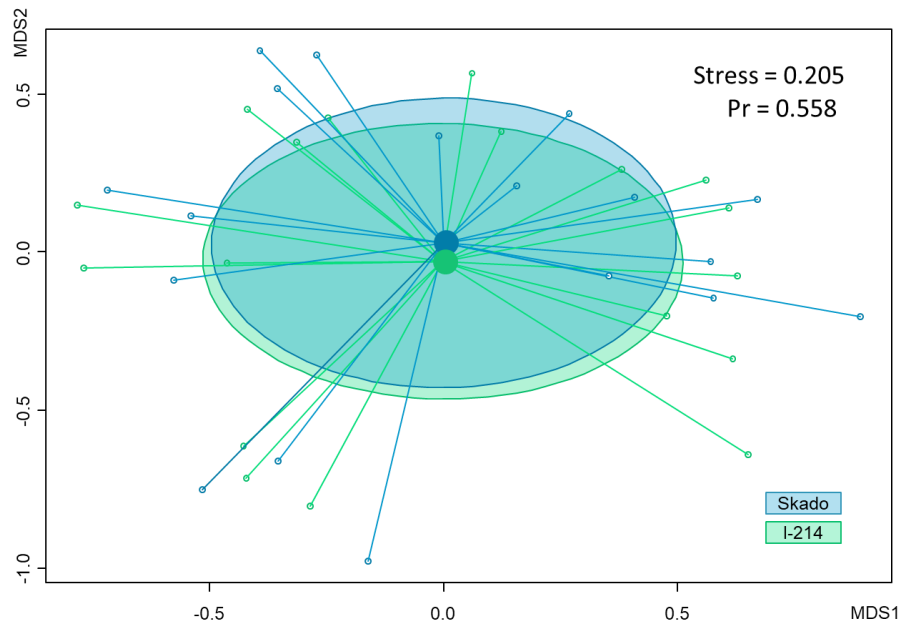


Figure 2: Structure of the insect communities related to the I214 and Skado modalities according to the two-dimensional non-metric Multi-Dimensional Scaling (NMDS) analysis with 1000 iterations, using the Bray Curtis method ( $k = 3$ ). A PERMANOVA analysis revealed no differences between the two studied modalities ( $Pr = 0.558$ ).

As nettle appeared as the main host plant within this nettle-poplar agrosystem, its higher density within the I214 plots had only led to a higher abundance of insects. The Skado plots where nettles were sparse included 72% of the insect abundance recorded under the dense stands of nettles within the I214 plots. This 28% reduction was low compared to the results obtained by Zabel and Tscharncke (1998), which showed that small and isolated nettle habitats had only 58% of the density of arthropods in large nettle stands. This difference could be explained by a limited habitat fragmentation in the experimental plantation as the six considered plots were spaced by only a couple of meters from each other. As suggested by the accumulation rate of I214 and Skado, for a same sample size, the number of species seems to be comparable between Skado and I214, meaning that the sampling size justify the difference in number of species collected between the two modalities (Figure 1).

### ***Impact of Hg contamination on insect biodiversity***

The compiled data resulted in a reference list and a main taxa list of insect associated to nettle comprising 227 and 21 species respectively. Our study included 33% of insects from the reference list and 76% of the main taxa list, which was higher or equal score than the studies conducted in natural conditions (Table 3). These results are similar to previous works (Table 3).

Table 3: Comparison of our study with height previous studies providing a list of insect taxa collected from nettle in natural conditions. The number of observed species and families was reported for each study as percentage of the total of both the “reference list” and the “main taxa list”. The number of exclusive taxa was also presented for each study.

	Yung et al., 2019	Davis, 1973	Davis, 1975	Davis, 1989	Zabel and Tscharntke, 1998	Alhmedi et al., 2006	Alhmedi et al., 2007	Alhmedi et al., 2009	James et al., 2015	
<b>Location</b>	France	England	England	Europe	Germany	Belgium	Belgium	Belgium	USA	
<b>Type habitat</b>	Nettle-Poplar agrosystem on sediment landfill	Arable or grassland habitats	Planted nettle patches	Varied biota	Agricultural areas	Wheat, rapeseed and pea culture	Wheat, rapeseed and pea culture	Wheat, rapeseed and pea culture	Varied biota	<b>Total</b>
<b>Sampling method</b>	Sweep net	Suction sampler	Suction sampler, visual searches, suction trap, sticky trap	Sweeping, beating and visual searches	Univac portable suction sampler	Yellow water trap	Observation	Observation	Sticky traps	
<b>% Families</b>	59	16	30	30	11	8	9	11	42	67
<b>% Taxa</b>	33	11	18	28	11	26	11	10	10	227
<b>Exclusive taxa</b>	48	1	7	25	6	45	6	4	21	/
<b>% Main taxa**</b>	76	57	67	71	76	33	43	43	10	21

Using numerous sampling points all over Europe and many trapping techniques including sweeping, Davis et al. (1989) obtained a noticeable number of species, although lower than ours (Table 2), probably due to a single month sampling. Zabel and Tscharntke (1998) conducted a more localized inventory, with 22 nettle patches sampled in May, July and September using a Univac portable suction sampler. They obtained a low total number of species but the majority of those commonly associated with nettle. Among the 227 insects from the reference list, we collected 48 taxa exclusive to this study, including *Cantharidae* spp., *Panorpa* sp. (Panorpidae), *Micromus variegatus* F. (Hemerobiidae), *Chrysopa dorsalis* Burm. and *Chrysopa perla* L. (Chrysopidae), and the previously mentioned *M. rubra* (Formicidae). Ant have been shown as commonly found in contaminated environment (Grześ, 2010a) with high concentration of trace element in their body (Helms and Tweedy, 2017; Yung et al., 2019). The predominance of *M. rubra* within the studied plantation could be linked to a Hg tolerance, as already demonstrated for Zn (Grześ, 2010b). In addition to *Anthocoris nemorum* L., two other species of *Coccinellidae* commonly found on nettles were missing in our study, which does not seem to be related to the contamination but rather to the competition with *M. rubra*, which prevents ladybugs from laying on nettles. The similar number of exclusive taxa obtained in Alhmedi et al., (2006) was due to the use of yellow water traps, preferentially adapted to collect aphids. Indeed, among their 45 exclusive taxa, 41 belonged to the *Aphididae* family. As the diversity and abundance tend to be reduced in isolated nettle patches (Zabel and Tscharntke, 1998), the fact that nettle was present as a dense colony in our experimental plantation could explain the high number of exclusive taxa compared to other studies focusing on patches. Thus, the Hg contaminated experimental plantation had a comparable insect biodiversity as observed on natural areas, based on literature review.

### Functional roles of the entomofauna in the experimental plantation

Among all the morphospecies collected on the different plants species on the experimental plantation, 162 (45% of the collected insects) are herbivorous during their larval or adult stage, 79 (22%) are predators, 33 are parasitoids (9%) and the others are NC or NA data.

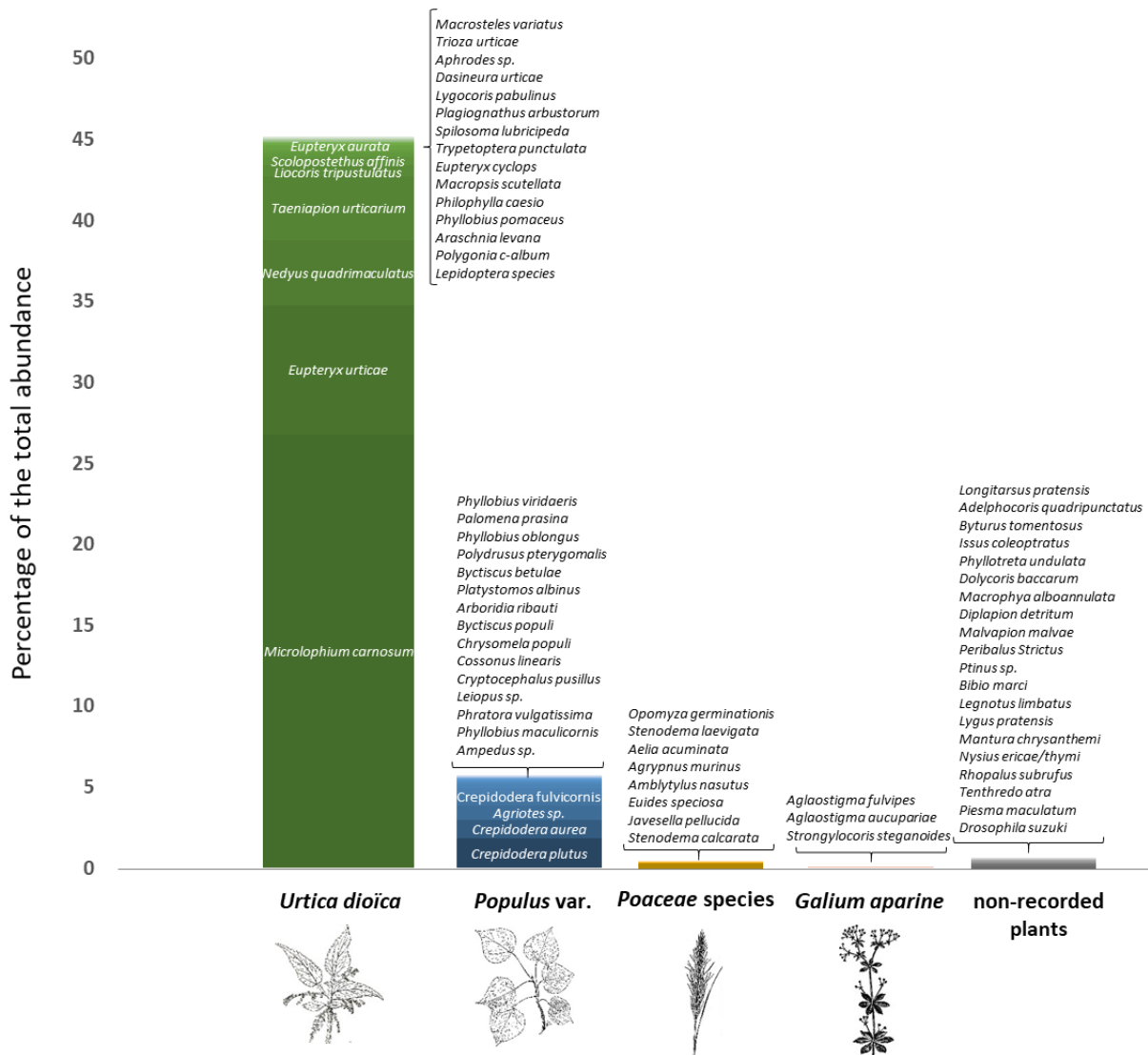


Figure 3: Barplots representing the abundance of insects (percentage as the total number of insects) related to a host plant (i.e., *Urtica dioica*, poplar var. Skado, poplar var. I214, *Gallium aparine*), to an accompanying group of plants (i.e., *Poaceae* species) or to plants that were not recorded within the experimental plantation (i.e., non-recorded plants). The name of the identified insect species are mentioned within or above the barplots for each plant or group of plants.

Nettle constitutes the host-plant of 46% of the insects while poplar represent only 6% and the other accompanying herbaceous species less than 1% (Figure 3). In the herbaceous layer, 45 morphospecies fed on nettles (Figure 3). Among them, 33 were generalists and considered for most of them rare (number of individuals  $\leq 10$ ), except *Eupteryx aurata*, *Liocoris tripustulatus*, *Scolopostethus affinis* known to be hosted by nettles but have also been recorded on other plants, as given at the Biological Record Center (<https://www.brc.ac.uk/>). The 12 others were specialists and abundant on nettle such as *M. carnosum*, *Eupteryx urticae* F., *Nedyus quadrimaculatus* L. and *Taenapion urticarium* H.. Additionally, we recorded 23 morphospecies related to poplar (18 generalists and 5 specialists) (Figure 3). Among them, 249 individuals of *Crepidodera* species (*C. aurea* G., *C. aurata* M., *C. fulvicornis* F., and *C. Plutus* Latreille) were collected from both the

herbaceous and tree layers although they only feed on deciduous trees including poplars (Urban, 2014) thus qualifying them as generalists. The genus *Agriotes*, due to its specific life cycle were swepted in nettles when they emerged from the soil in April, before reaching the poplar leaves. They are abundant on the experimental plantation and generalists of deciduous tree species. *Gallium aparine* L. (Rubiaceae) was the main species accompanying nettle (Table 2), representing up to 50% of the total coverage of the herbaceous layer in some instance. Despite its significant presence, we only recorded three insect morphospecies feeding on it, two specialists and one generalist. The Poaceae species, growing spontaneously on the sediment landfill when no tillage or planting is carried out, represented the main food source for eight of the collected insect morphospecies. As Poaceae species dominated the surrounding area and grew sparsely in the experimental plantation, these insects were most likely casual visitors. Finally, 20 morphospecies, mainly generalists, feeding on plants non-recorded within experimental plantation were also observed. These 28 species associated to Poaceae or non-recorded species accounting for only 1.2% of the total insect abundance, with only *Opomyza germinationis* L. and *Longitarsus pratensis* Panz. which were related to several Poaceae and some species of *Plantago*, respectively, had an abundance higher than 10.

### ***Functional diversity***

The ecological characterization of insects revealed that 85% of them presented a significant role in the nettle-poplar agrosystem, with a potentially beneficial or a detrimental effect. The remaining 15% were taxa that did not have significant influence within the studied agrosystem or taxa for which the lack of identification did not allowed us to functionally characterize them.

Several guilds of insects associated with the studied agrosystem provided essential ecosystem services such as pollination, organic matter decomposition and recycling. However, potentially detrimental insects constituted the majority, accounting for 4089 individuals belonging to 94 morphospecies and representing by herbivorous insects potentially harmful for nettle or poplar (Figure 4). These insects were mainly sap-sucking or stem-borer species associated with the herbaceous layer (59 morphospecies, 3582 individuals. Among them, the common aphid, *M. carnosum*, and some other species of the potential pest group (e.g., *Eupteryx* spp., *Taenapion urticarium*, *Liocoris tripustulatus*, *Nedyus quadrimaculatus*) were the most abundant. Most of them are specialist species, strictly associated with nettle, meaning that a potential risk to host-shift to poplar trees is limited.

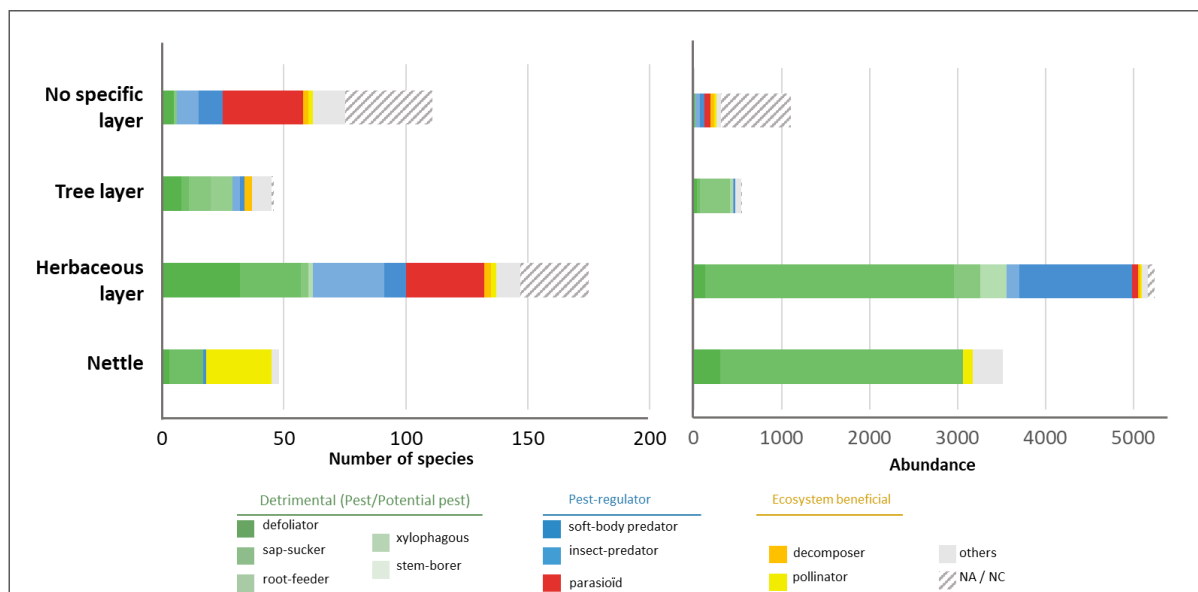


Figure 4: Number of morphospecies (left) and abundance (right) of groups of insects classified as Detrimental (i.e., pest or potential pest), pest-regulator, or ecosystem beneficial and according to their habitat (i.e., tree layer, herbaceous layer, nettle, no specific layer).

The peak of abundance for *M. carnosum* was observed in last May with 1730 individuals corresponding to 16 aphids by nettle stem. The population then dropped to 133 individuals in June and steadily decreased until September. Aphids are generally categorized as serious pests for agrosystems as they can cause severe damages (i.e., injecting toxic secretions during feeding, stunting, twisting of growing shoots) when the population reach the peak (Blackman & Eastop 2006). In nettle plantation, *M. carnosum* can reach proportion more frequently corresponding to pest species on crop monoculture (Perrin, 1976), but this species remained considered as a non-pest aphid (Baverstock et al., 2011). However, the impact of this aphid on nettle should be more precisely assessed in the case of nettle production.

Due to their dense population, *Aphididae* and most particularly *M. carnosum* in this study are an important source of food, promoting the presence of several natural enemies (Perrin, 1975). Consequently, in our study, pest-regulator species were mainly found in the herbaceous layer, grouped into insect-predators (38 species, 1422 individuals) and soft-body predators (29 species, 140 individuals). *Myrmica rubra*, classified in the insect-predator group as it is a generalist predator mainly feeding on diverse families of arthropods as well as on honeydew from bred aphids (Brian, 1973), represented 77% of all the predators collected by sweeping the herbaceous layer. *M. rubra* and the nettle aphid *M. carnosum* are known for their mutualistic relationship. Our observations revealed the aphid population was raised by the *Formicidae* that protect them in exchange of honeydew, a sugar-rich supplement to their diet. In contrast to aphids, the size of the ant population was stable across the season, with approximately 250 individuals collected each month, representing approximately 2.5 individuals by nettle stem. According to the results from an ACP and from Spearman's rank correlations the abundance of aphids seemed to be inversely correlated with the abundance of the second most abundant group (157 individuals) of generalist predators from the *Nabidae* genus (Figure 5).

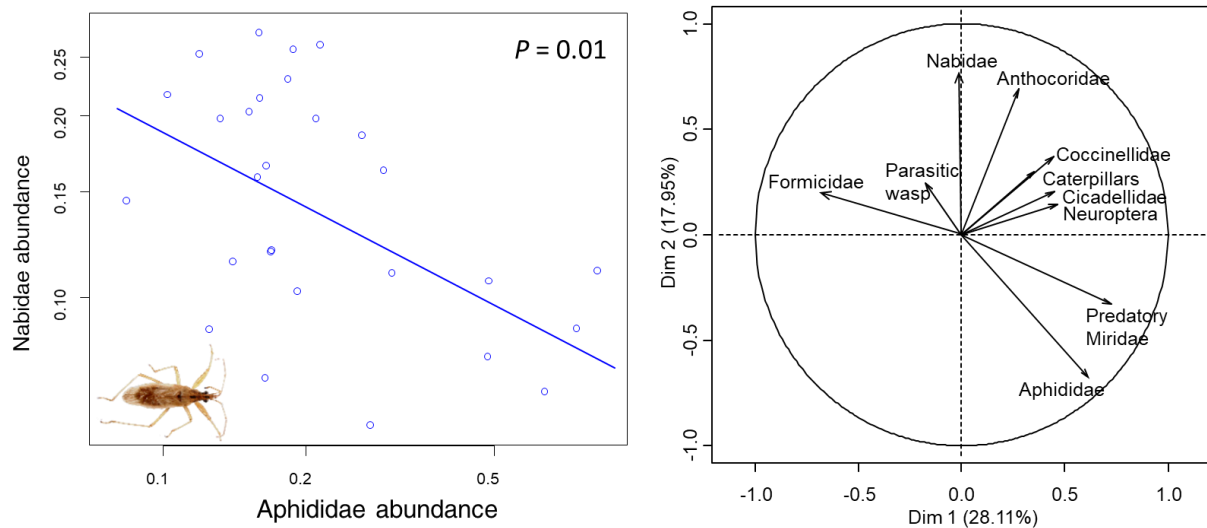


Figure 5: Results from a PCA analysis according to different groups of insects having potential trophic interactions (right), and the relationships between the abundance of Aphididae and Nabidae for which a significant spearman's rank correlations was obtained ( $P = 0.01$ ) (left).

All known nabids are predatory, feeding on co-existing insects and other arthropods that colonizes a wide range of plants including trees, shrubs, weeds (Henry, 2019) and nettles (Davis, 1989; James et al., 2015; Zabel and Tschardt, 1998). These results suggest that some trophic interactions between *Nabidae* spp. and *M. carnosum* may occurred, what could partly explain the fall of the aphid population.

Some species of *Coccinellidae*, *Miridae* or *Anthocoridae* (classified as soft-body predators as they feed on few species and particularly on those with a soft cuticle) are known as natural enemies feeding on aphids. However, in our study, the tested regressions did not allowed us to discern their regulatory potential against aphids. Moreover, among the 25 sampled *Coccinellidae*, there were only two larvae, suggesting either that nettles have not been chosen for the laying or that eggs were possibly preyed. Moreover, *Anthocoridae* species were poorly represented in our study although they have been demonstrated as a major group of predators found on nettles in Europe (Davis 1973, 1989; Perrin 1975) and in America (James et al., 2015). These phenomenons could be linked to the competition with *M. rubra*, which was not recorded in these previous studies. The inverse correlation between Formicidae and the predatory mirids group, which included some small predatory bugs (e.g., *Orius*, *Deraecoris* species) comparable to the previously mentioned *Anthocoridae* species, support these observations (Figure 5). As *Nabidae* were abundant on nettles and negatively correlated with the abundance of aphids ( $P = 0.01$ , Figure 5) we hypothesized that these species would be more competitive against ants than *Anthocoridae* or *Miridae* species.

Additionally, we collected 32 morphospecies of parasitic wasps belonging to six identified families (*Braconidae*, *Diapriidae*, *Eulophidae*, *Figitidae*, *Ichneumonidae* and *Platygastridae*), comprising only few individuals. In agrosystems, parasitoids are important biological control agents that regulate several lepidopteran, coleopteran and dipteran pest defoliators, as well as aphids (Cardinale et al., 2003). Braconid wasp belonging to the *Aphidius* genus have been commonly found feeding on honeydew produced by *M. carnosum* infesting nettles (Alhmedi et al., 2009; Baverstock et al., 2011), but a lack of identification precision did not allow us to confirm their presence in the studied agrosystem. Other groups of beneficial insects not involved in the regulation of potential pests but having a role of pollinator or in the promotion of the turn-over of organic matters represented 18 species for 276 individuals in our study (Figure 4).

The interception traps allowed us to collect 29 herbivorous species feeding on poplar roots (*i.e.*, *Agriotes* spp. and *Idolus picipennis* larvae), leaves (*i.e.*, *Crepidodera* spp. and *Phyllobius* spp. adults), sap (*i.e.*, *Aphrophora alni*) or wood (*i.e.*, *Ptinus dubius*). Among them, we only recorded one individual of *Chrysomela populi*, which is a species known as an economically important pest for poplar SRC in France (Augustin and Léveux, 1993) and more widely across the world (Singh et al., 2004), suggesting that the actual small population did not represent any risk for the cultivated poplars. However, as this species has been recorded, its population needs to be monitored over the coming years. Additionally, none of the most abundant generalist herbivorous insects hosted by nettle was collected at the poplar scale. However, the 249 individuals from the *Crepidodera* genus collected within the whole agrosystem suggested that the significant population could be detrimental for the trees as these species largely damage the leaves of their host trees due to an intense feeding. Urban (2014) showed that *C. aurea* damaged 6.7 cm<sup>2</sup> leaves of *P. tremula* during its first year of life and 14.3 cm<sup>2</sup> after hibernation, which could be detrimental for the tree growth.

Several predators collected from nettles appeared to have the dispersal ability to reach potential preys associated with poplars, since they are not restricted to prey on nettles. Among the most noticeable species, *Propylea quatuordecimpunctata* is commonly used as a biocontrol agent targeting a wide range of aphid species associated with several host plants (Burgio et al., 2004). *Micromus variegatus*, which was abundant in the studied agrosystem, is also known as a biocontrol agent used against aphids with a high market value in North America (van Lenteren et al., 2018). Nabidae, as they were abundant within the agrosystem, would be a promising bio-control agent as suggested in previous studies (Sloderbeck and Yeorgan, 1983; Wiedenmann and O'Neil, 1990). However, all the recorded individuals were swept, meaning that they would only be beneficial for herbaceous crops.

No observation of pseudogall within the bark of poplar, induced by the woolly poplar aphid (*Phloeomyzus passerinii*) has been recorded within the agrosystem. However, since the I214 poplar genotype is very susceptible to *P. passerinii* (Pointeau et al., 2013) and since the agrosystem is within its range, it is likely to be affected. Consequently, in the case of a woolly aphid colonization, species such as *M. variegatus* or *P. quatuordecimpunctata* or some of the collected parasitic wasps are likely to move from nettles to poplar to regulate the population of pests. Similar cases of between-habitat dispersal and biological control have also been suggested for natural patches of nettles (Alhmedi et al., 2007) shown in nettle-predator interactions. For example, in the study of Stephan et al. (2016), the presence of patches of weeds has had a significant impact on the number of sampled eggs from a known pest of willow *Phratora vulgatissima* in tree branches. To encourage the migration of nettle-related predators, Alhmedi et al. (2007) suggested cutting out nettles rapidly after the arrival of aphids. In a context of fibre production, a high fibre nettle variety has been shown to support non-pest aphids and their natural enemies (Baverstock et al., 2011). Optimisation of the fibre production chain suggested that two annual cuts (early and late season) are possible for nettle and can have a beneficial effect on fibre quality (Di Virgilio et al., 2015). Consequently, it would be interesting to match this first harvest with the declining of nettle aphids linked with the arrival of predators.

## CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that the herbaceous layer widely dominated by the stinging nettle contributed to the ecological restoration of the studied sediment landfill. As most of the swept insect species were related to nettle, nettle plays a role of reservoir of insects, with a diversity as rich as that observed in natural conditions. In contrast to previous findings, we did not observe any influence of the density of the herbaceous layer on the insect diversity. In addition, this diversity contributes to several ecosystem services within the studied nettle-poplar agrosystem, and more broadly, to the scale of the local environment. The sustainability of the poplar plantation does not seem to be endangered since herbivorous species hosted by nettle were not present at the tree layer and no serious pest of poplar was recorded. However, a particular attention should be paid to the populations of *Elateridae* and *Chrysomelidae*, which could be source of damages for the trees. In our study, the specific nettle aphid *M. carnosum* promoting the presence of several natural enemies in natural conditions is raised and protected by the red ant *M. rubra*, limiting the presence of some other predatory species commonly found on nettles (e.g., *Anthocoris* sp.). Further work is needed to evaluate whether the predominance of *M. rubra* is linked to the Hg tolerance. However, some abundant pest-regulator taxa related to nettle seemed to have the potential to regulate pest species at both the herbaceous and the tree layers (*Nabidae* and *Hemerobiidae*, respectively), improving the sustainability of the agrosystem. Finally, these results reinforce the potential of nettle as activator of a beneficial insect diversity, even in contaminated areas, and support the interest of producing nettle fibre under trees in phytomanagement applications.



## SUPPORTING INFORMATION.

Table S1: Plant species and their presence (1) or absence (0) within the six studied plots at the experimental site.

Familie	Genus	Species	S1	S2	S3	I1	I2	I3
Apiaceae	<i>Chaerophyllum</i>	<i>temulum</i>	1	1	1	0	0	0
Apiaceae	<i>Aegopodium</i>	<i>podagraria</i>	0	1	1	0	0	0
Apiaceae	<i>Heracleum</i>	<i>sphondylium</i>	1	1	0	1	0	1
Araliaceae	<i>Hedera</i>	<i>helix</i>	1	1	0	1	1	1
Asteraceae	<i>Taraxacum</i>	<i>ruderalia</i>	1	1	1	0	1	0
Asteraceae	<i>Carduus</i>	<i>crispus</i>	1	1	0	0	0	0
Betulaceae	<i>Alnus</i>	<i>glutinosa</i>	0	1	0	0	0	0
Cannabaceae	<i>Humulus</i>	<i>lupulus</i>	0	1	1	0	0	1
Caprifoliaceae	<i>Sambucus</i>	<i>ebulus</i>	0	1	0	1	1	1
Caryophyllaceae	<i>Saponaria</i>	<i>officinalis</i>	1	1	1	1	1	0
Caryophyllaceae	<i>Stellaria</i>	<i>media</i>	0	1	0	0	0	1
Convolvulaceae	<i>Calystegia</i>	<i>sepium</i>	1	0	0	0	0	1
Fagaceae	<i>Quercus</i>	<i>robur</i>	1	1	0	0	0	0
Fagaceae	<i>Fagus</i>	<i>sylvatica</i>	1	0	0	0	0	0
Geraniaceae	<i>Geranium</i>	<i>robertianum</i>	1	0	0	0	0	0
Lamiaceae	<i>Glechoma</i>	<i>hederacea</i>	0	0	0	0	0	1
Poaceae	<i>Brachypodium</i>	<i>sylvaticum</i>	1	1	0	0	0	0
Poaceae	<i>Phragmites</i>	<i>australis</i>	1	0	1	0	1	0
Poaceae	<i>Poa</i>	<i>trivalis</i>	1	1	1	0	0	1
Polygonaceae	<i>Rumex</i>	<i>obtusifolius</i>	0	1	0	0	1	0
Ranunculaceae	<i>Ranunculus</i>	<i>repens</i>	1	0	1	0	1	0
Rosaceae	<i>Geum</i>	<i>urbanum</i>	0	1	0	1	0	0
Rosaceae	<i>Rubus</i>	<i>fruticosus</i>	1	0	0	0	0	0
Rubiaceae	<i>Galium</i>	<i>aparine</i>	1	1	1	1	1	1
Urticaceae	<i>Urtica</i>	<i>dioica</i>	1	1	1	1	1	1
Caprifoliaceae	<i>Lonicera</i>	<i>periclymenum</i>	1	1	1	1	0	0

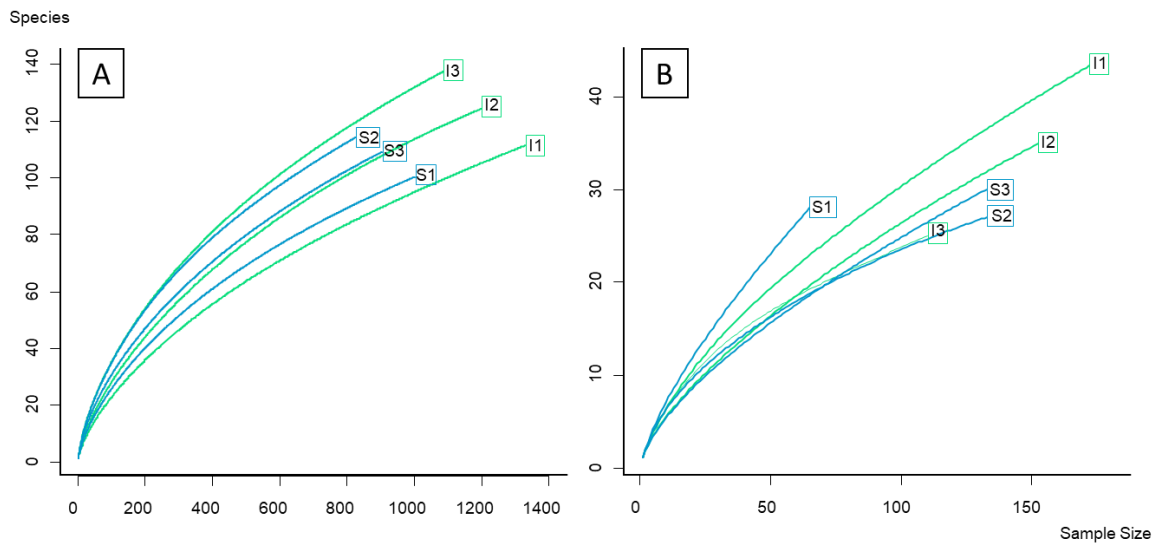


Figure S1: Rarefaction curves at the level of individual plots, based on the abundance of the insect morphospecies collected at the herbaceous (A) and the tree (B) layers during the entire survey.

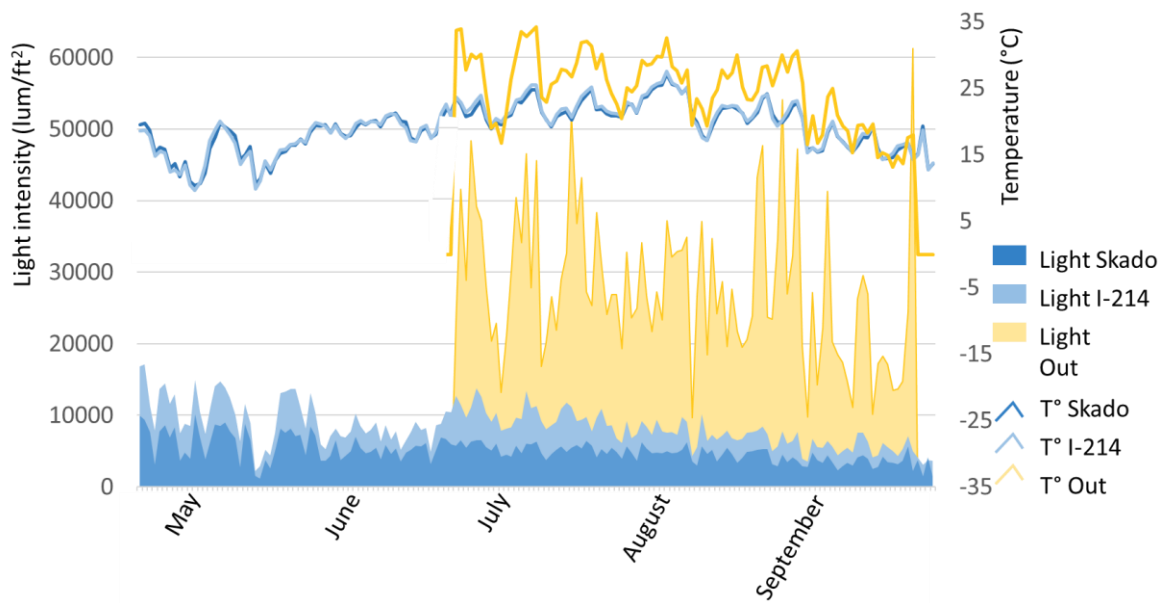


Figure S2: Mean intensity of light (lum/ft<sup>2</sup>) and temperature (°C) recorded in 2017 and 2018 for the April – September period, under the plots of Skado and I214 cultivars and at an unplanted area out of the plantation (Out). For the light, only the daylight hours were considered.

## REFERENCES

- Alhmedi, A., Francis, F., Bodson, B., and Haubruge, E. (2006). Etude de la diversité des pucerons et des auxiliaires adiphages relative à la présence d'orties en bordures de champ. *Notes Fauniques Gembloux* 59.
- Alhmedi, A., Haubruge, E., Bodson, B., and Francis, F. (2007). Aphidophagous guilds on nettle (*Urtica dioica*) strips close to fields of green pea, rape and wheat. *Insect Sci.* 14, 419–424.
- Alhmedi, A., Haubruge, E., and Francis, F. (2009). Effect of stinging nettle habitats on aphidophagous predators and parasitoids in wheat and green pea fields with special attention to the invader *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Entomol. Sci.* 12, 349–358.
- Alhmedi, A., Haubruge, E., D'Hoedt, S., and Francis, F. (2011). Quantitative food webs of herbivore and related beneficial community in non-crop and crop habitats. *Biol. Control* 58, 103–112.
- Anderson, R.S., and Ashe, J.S. (2000). Leaf litter inhabiting beetles as surrogates for establishing priorities for conservation of selected tropical montane cloud forests in Honduras, Central America (Coleoptera; Staphylinidae, Curculionidae). *Biodivers. Conserv.* 9, 617–653.
- Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M., and Tatin-Froux, F. (2016). Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 146, 1–7.
- Augustin, S., and Lévieux, J. (1993). Life history of the poplar beetle *chrysomela tremulae* f. in the central region of france. *Can. Entomol.* 125, 399–401.
- Bacci, L., Baronti, S., Predieri, S., and di Virgilio, N. (2009). Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy. *Ind. Crops Prod.* 29, 480–484.
- Balabanova, B., Stafilov, T., and Bačeva, K. (2015). Bioavailability and bioaccumulation characterization of essential and heavy metals contents in *R. acetosa*, *S. oleracea* and *U. dioica* from copper polluted and referent areas. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 13.
- Baverstock, J., Porcel, M., Clark, S.J., Copeland, J.E., and Pell, J.K. (2011). Potential value of the fibre nettle *Urtica dioica* as a resource for the nettle aphid *Microlophium carnosum* and its insect and fungal natural enemies. *BioControl* 56, 215–223.
- Boisson, S., Le Stradic, S., Collignon, J., Séleck, M., Malaisse, F., Ngoy Shutcha, M., Faucon, M.-P., and Mahy, G. (2016). Potential of copper-tolerant grasses to implement phytostabilisation strategies on polluted soils in South D. R. Congo: Poaceae candidates for phytostabilisation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 13693–13705.
- Brian, M.V. (1973). Feeding and Growth in the Ant *Myrmica*. *J. Anim. Ecol.* 42, 37–53.
- Burges, A., Alkorta, I., Epelde, L., and Garbisu, C. (2018). From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. *Int. J. Phytoremediation* 20, 384–397.
- Burgio, G., Ferrari, R., Pozzati, M., and Boriani, L. (2004). The role of ecological compensation areas on predator populations: an analysis on biodiversity and phenology of Coccinellidae (Coleoptera) on non-crop plants within hedgerows in Northern Italy. *Bull. Insectology* 57, 1–10.
- Cardinale, B.J., Harvey, C.T., Gross, K., and Ives, A.R. (2003). Biodiversity and biocontrol: emergent impacts of a multi-enemy assemblage on pest suppression and crop yield in an agroecosystem. *Ecol. Lett.* 6, 857–865.
- Chao, A., and Chiu, C.-H. (2016). Nonparametric Estimation and Comparison of Species Richness. In ELS, John Wiley & Sons Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–11.
- Chao, A., and Lee, S.-M. (1992). Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *J. Am. Stat. Assoc.* 87, 210–217.
- Chao, A., Ma, K.H., Hsieh, T.C., and Chiu, C.-H. (2016). User's guide for online program SpadeR (Species-richness prediction and diversity estimation in R). *Natl. Tsing Hua Univ. Taiwan*.
- Cronk, Q., Hidalgo, O., Pellicer, J., Percy, D., and Leitch, I. (2016). *Salix* transect of Europe: variation in ploidy and genome size in willow-associated common nettle, *Urtica dioica* L. sens. lat., from Greece to arctic Norway. *Biodivers. Data J.* 4, e10003.
- Davis, B.N.K. (1973). The Hemiptera and Coleoptera of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) in East Anglia. *J. Appl. Ecol.* 213–237.
- Davis, B.N.K. (1975). The Colonization of Isolated Patches of Nettles (*Urtica dioica* L.) by Insects. *J. Appl. Ecol.* 12, 1–14.
- Davis, B.N.K. (1989a). The European distribution of insects on stinging nettles, *Urtica dioica* L.: A field survey. *Bolletino Zool.* 56, 321–326.
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., and Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Ind. Crops Prod.* 68, 42–49.
- Durand, A., Maillard, F., Foulon, J., Gweon, H.S., Valot, B., and Chalot, M. (2017). Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microb. Ecol.*
- Ekési, S., Shah, P.A., Clark, S.J., and Pell, J.K. (2005). Conservation biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*: implications of aphid species, host plant and predator foraging. *Agric. For. Entomol.* 7, 21–30.
- Giustina, W. della, Bonfils, J., and Le Quesne, W.J. (1989). Homoptères Cicadellidae (Paris: Institut national de la recherche agronomique).
- Gotelli, N.J., and Colwell, R.K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* 4, 379–391.
- Grześ, I.M. (2010a). Ants and heavy metal pollution – A review. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 350–355.
- Grześ, I.M. (2010b). Zinc tolerance in the ant species *Myrmica rubra* originating from a metal pollution gradient. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 87–90.
- Helms, J.A., and Tweedy, B. (2017). Invasive fire ants contain high levels of mercury. *Insectes Sociaux* 64, 169–171.
- Henry, T.J. (2019). *Catalog of the Heteroptera or True Bugs, of Canada and the Continental United States* (CRC Press).

- James, D.G., Lauby, G., Seymour, L., and Buckley, K. (2015). Beneficial insects associated with stinging nettle, *Urtica dioica* Linnaeus, in central Washington State. *Pan-Pac. Entomol.* *91*, 82–90.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., et al. (2015). Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *Int. J. Phytoremediation* *17*, 1005–1037.
- van Lenteren, J.C., Bolekmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J., and Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* *63*, 39–59.
- Leseigneur, L. (1972). Coléoptères Elateridae de la faune de France continentale et de Corse. *Bull. Mens. Société Linn. Lyon* *41*, 3–382.
- Macnair, M.R. (1987). Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. *Trends Ecol. Evol.* *2*, 354–359.
- Mogren, C.L., and Trumble, J.T. (2010). The impacts of metals and metalloids on insect behavior. *Entomol. Exp. Appl.* *135*, 1–17.
- Nageleisen, L.M., and Bouget, C. (2009). Forest insect studies: methods and techniques, key considerations for standardisation. An overview of the reflections of the Entomological Forest Inventories working group (Inv. Ent. For.) (ONF).
- Pandey, V.C., Bajpai, O., and Singh, N. (2016). Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *54*, 58–73.
- Parraga-Aguado, I., Gonzalez-Alcaraz, M.N., Alvarez-Rogel, J., Jimenez-Carceles, F.J., and Conesa, H.M. (2013). The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environ. Pollut.* *176*, 134–143.
- Parraga-Aguado, I., Querejeta, J.-I., González-Alcaraz, M.-N., Jiménez-Cárceles, F.J., and Conesa, H.M. (2014). Usefulness of pioneer vegetation for the phytomanagement of metal(loid)s enriched tailings: Grasses vs. shrubs vs. trees. *J. Environ. Manage.* *133*, 51–58.
- Péricart, J. (1987). Hémiptères Nabidae d'Europe occidentale et du Maghreb (Paris: Fédération française des sociétés de sciences naturelles).
- Perrin, R.M. (1975). The role of the perennial stinging nettle, *Urtica dioica*, as a reservoir of beneficial natural enemies. *Ann. Appl. Biol.* *81*, 289–297.
- Perrin, R.M. (1976). The population dynamics of the stinging nettle aphid, *Microlophium carnosum* (Bukt.). *Ecol. Entomol.* *1*, 31–40.
- Pinder, L.C.V. (1986). Biology of freshwater Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* *31*, 1–23.
- Pointeau, S., Ameline, A., Sallé, A., Bankhead-Dronnet, S., and Lieutier, F. (2013). Characterization of antibiosis and antixenosis to the woolly poplar aphid (Hemiptera: Aphididae) in the bark of different poplar genotypes. *J. Econ. Entomol.* *106*, 473–481.
- Shams, K.M., Tichy, G., Fischer, A., Sager, M., Peer, T., Bashar, A., and Filip, K. (2010). Aspects of phytoremediation for chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica*, *Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant Soil* *328*, 175–189.
- Singh, A.P., Bhandari, R.S., and Verma, T.D. (2004). Important insect pests of poplars in agroforestry and strategies for their management in northwestern India. *Agrofor. Syst.* *63*, 15–26.
- Sloderbeck, P.E., and Yeagan, K.V. (1983). Comparison of *Nabis americoferus* and *Nabis roseipennis* (Hemiptera: Nabidae) as Predators of the Green Cloverworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* *12*, 161–165.
- Smith, B., and Wilson, J.B. (1996). A Consumer's Guide to Evenness Indices. *Oikos* *76*, 70–82.
- Stephan, J.G., Albertsson, J., Wang, L., and Porcel, M. (2016). Weeds within willow short-rotation coppices alter the arthropod community and improve biological control of the blue willow beetle. *BioControl* *61*, 103–114.
- Tilman, D. (1999). The Ecological Consequences of Changes in Biodiversity: A Search for General Principles. *Ecology* *80*, 1455–1474.
- Urban, J. (2014). Occurrence, bionomics and harmfulness of *Crepidodera aurea* (Geoffr.) (Coleoptera, Alticidae). *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* *59*, 279–308.
- Viktorova, J., Jandova, Z., Madlenakova, M., Prouzova, P., Bartunek, V., Vrchotova, B., Lovecka, P., Musilova, L., and Macek, T. (2016). Native Phytoremediation Potential of *Urtica dioica* for Removal of PCBs and Heavy Metals Can Be Improved by Genetic Manipulations Using Constitutive CaMV 35S Promoter. *PLoS ONE* *11*.
- Wiedenmann, R.N., and O'Neil, R.J. (1990). Response of *Nabis roseipennis* [Heteroptera: Nabidae] to Larvae of Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* [Col.: Coccinellidae]. *Entomophaga* *35*, 449–458.
- Wikum, D.A., and Shanholtzer, G.F. (1978). Application of the Braun-Blanquet cover-abundance scale for vegetation analysis in land development studies. *Environ. Manage.* *2*, 323–329.
- Yung, L., Bertheau, C., Cazaux, D., Regier, N., Slaveykova, V.I., and Chalot, M. (2019). Insect Life Traits Are Key Factors in Mercury Accumulation and Transfer within the Terrestrial Food Web. *Environ. Sci. Technol.*
- Zabel, J., and Tschantke, T. (1998). Does fragmentation of *Urtica* habitats affect phytophagous and predatory insects differentially? *Oecologia* *116*, 419–425.
- Zappelini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., et al. (2015). Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol. Biochem.* *90*, 101–110.



## 3.3 Exposition au mercure de l'agrosystème et de l'entomofaune associée

### 3.3.1 Préambule

La section 3.3 a pour objectif de mieux appréhender les flux de Hg dans la parcelle de Tavaux et l'implication de l'entomofaune liée à l'agrosystème. Cette étude repose sur l'inventaire entomologique présenté dans la section 3.2.3.2. Les sections suivantes présenteront d'abord le contexte et la démarche de cette étude, puis développeront plus en détail les méthodes utilisées pour le dosage du Hg total (THg) et du méthyl-Hg (MeHg) dans les différentes matrices environnementales considérées.

*L'ensemble des autres méthodes utilisées et des résultats de recherche obtenus dans le cadre de cette étude sont présentés dans un article accepté dans Environmental Science & Technology et sélection par Nature sustainability en tant que research highlight. Ces travaux ont également donné lieu à i) une communication orale au congrès « International Conference on Mercury as a Global Pollutant » (ICMGP) 2019 à Cracovie, assurée par M. Chalot, à ii) une communication par affiche au congrès de la « Society of Environmental Toxicology and Chemistry » (SETAC) Europe 2019 à Helsinki, assurée par moi-même et iii) une communication orale aux 4<sup>ème</sup> rencontres nationales de la recherche sur les sites & sols pollués de l'ADEME, à Paris, assurée par moi-même.*

### 3.3.2 Contexte

Dans le cadre de la section 3.2, nous avons tenté d'appréhender l'exposition des insectes au Hg de manière indirecte, à partir d'une étude de la communauté entomologique associée à l'ortie et d'une comparaison avec des données issues du milieu naturel. Le Hg est connu pour être l'un des contaminants pour lesquels la biomagnification est particulièrement marquée dans les écosystèmes aquatiques et terrestres, dans lesquels les insectes jouent un rôle majeur en raison de leur place à la base des réseaux trophiques. Les facteurs intrinsèques aux insectes, conditionnant leur exposition au Hg et leur influence dans les transferts à l'intérieur des réseaux trophiques, sont bien connus en milieu aquatique mais restent à enrichir en milieu terrestre. Il semble donc pertinent de caractériser l'exposition directe des insectes au Hg par un dosage de ce contaminant dans leurs tissus et ainsi d'appréhender les facteurs conditionnant les flux de Hg au sein de l'agrosystème étudié. Là où les études portant sur les flux de Hg dans les écosystèmes terrestres considèrent des réseaux trophiques étendus (*i.e.*, des plantes jusqu'aux oiseaux, reptiles ou micromammifères), cette étude considère

un réseau trophique à plus petite échelle et bien caractérisé, à l'intérieur duquel les taxons présentent de fortes interactions trophiques. Cela a permis de mieux maîtriser ces interactions et d'identifier les facteurs conditionnant l'accumulation et le transfert du Hg chez ces taxons modèles.

### 3.3.3 Démarche

Nous nous sommes intéressés à l'exposition de l'ortie et des insectes au Hg de manière directe, en réalisant un dosage du Hg. Les taxons d'insectes étudiés proviennent de l'inventaire entomologique présenté dans la section 3.2, ainsi que de prélèvements témoins réalisés sur un site non impacté par la contamination au Hg. Des prélèvements d'ortie ont été réalisés en parallèle sur ces deux sites et analysés de la même manière. L'analyse du Hg total contenu dans des matrices végétales était bien maîtrisée au LCE, toutefois cette technique n'avait jamais été utilisée pour des insectes. Une courte phase de vérification a permis de valider l'applicabilité de cette technique pour des insectes, qu'ils aient été conservés dans l'éthanol à 4°C ou au congélateur à -20°C sans éthanol. Les résultats issus de cette phase de vérification sont présentés en « Supporting information » de l'article disponible dans la section 3.3.5.

### 3.3.4 Analyses du mercure total et du MeHg

Les analyses de Hg total dans les différents échantillons environnementaux (*i.e.*, sol, insectes, plantes, divers extraits) ont été réalisées en utilisant l'AMA 254 (Advanced Mercury Analyser), disponible au LCE (Figure 40), sur le site de Montbéliard. Cet appareil correspondant à un spectromètre d'absorption atomique. Il est équipé d'un passeur automatique permettant une analyse en série des échantillons. L'AMA présente une limite de détection de l'ordre de 0,01 ng de Hg, ce qui permet la mesure précise d'échantillons présentant de faibles concentrations en Hg.



Figure 40. Présentation de l'Analyseur de Mercure Avancé (AMA) 254.

Préalablement à l'analyse, les échantillons solides ont été lyophilisés de manière à retirer leur contenu en eau. La lyophilisation a été choisie car elle limite l'altération des cellules mais également la volatilisation du Hg par rapport aux autres techniques de séchage (Hojdová et al., 2015). Ensuite, différents traitements ont été effectués selon le type de matrice : ii) les sols ont été tamisés à 20 µm, nettoyés de leur contenu en débris de végétaux et quartés, i) les végétaux ont été broyés de manière à obtenir une fine poudre homogène et iii) les insectes ont été analysés sans préparation préalable. Les échantillons sont ensuite déposés dans des nacelles en nickel, préalablement nettoyées par calcination au bec Bunsen pour éliminer toute trace de Hg, le Hg se volatilisant à des températures élevées.

Le principe est le suivant : un volume défini d'échantillon, préalablement pesé avec précision, est inséré dans une nacelle (contenance maximum : 500 µl ou 500 mg) et introduit dans un tube catalytique. Ensuite, un four permet un séchage et une décomposition sous oxygène à 850 °C environ. Le Hg va alors se volatiliser et être entraîné par un gaz vecteur (ici l'oxygène) vers la sortie du tube catalytique pour être piégé sur un amalgameur en or. L'amalgame sera par la suite chauffé pendant un temps très court, avant d'être refroidi, ce qui va libérer des vapeurs de Hg qui seront dirigées vers la cellule de mesure chauffée à température constante. Les atomes de Hg vont absorber une radiation qui est émise par une lampe du système photométrique, ce qui permettra de les doser, à partir d'une gamme étalon qui a été fournie avec l'appareil. Le filtre isole la raie spectrale correspondant à 254 nm, c'est cette longueur d'onde qui caractérise le Hg et donne son nom à l'appareil. Les résultats sont transmis à l'ordinateur qui donne la valeur de l'absorbance et la concentration calculée à partir du poids ou du volume préalablement renseigné.

Avant chaque série d'échantillons, 5 analyses à vide sont réalisées de manière à nettoyer l'ensemble du système (*e.g.*, tube catalytique, amalgame), suivis de 3 analyses de blancs (nacelles vides) et 2 étalons. Ces étalons sont constitués de 100 mg de feuilles de tabac certifiées (CRM) « Oriental Basma Tobacco Leaves » (INCT-OBTL-5), avec un contenu en Hg de  $20.9 \pm 1.3$  ng/g MS, permettent de vérifier la justesse et la répétabilité des analyses.

Le temps moyen d'analyse pour chaque échantillon est de 5 min divisé en quatre phases :

- La première est le séchage : pour les échantillons secs cette phase est réglée à 45s ; par contre pour les échantillons frais ou liquides le temps doit être prolongé ( $\approx 10$  min) et estimé selon la règle :  $t = 0,7 \text{ s} \times 1 \text{ µl}$  (ou 1 mg de matière fraîche).
- La deuxième est la décomposition, dont la durée est fixée à 150 sec pour tout type de matrice (sec, frais, liquide).
- La troisième phase est l'attente qui est fixée à 45 sec pour tout échantillon.



- Ensuite, la quatrième phase est la lecture, d'une durée de 57 sec avant affichage du résultat final sur l'écran de contrôle.

Les analyses de MeHg ont été réalisées par le Dr. Nicole Regier de l'Université de Genève, Institut F.A. Forel dans le cadre d'une collaboration. Après lyophilisation et broyage des échantillons de sol, plantes et d'insectes, entre 0.02 et 0.5 g du broyat a été utilisé pour l'extraction du MeHg, à partir des solutions suivantes : 2 ml de  $\text{CuSO}_4$  (1M), 5ml de  $\text{HNO}_3$  (5M) puis 10 ml de dichlorométhane  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dans des tubes de centrifugation de 50 mL en téflon couverts par du papier aluminium et placés dans un agitateur pendant 60 min sous hotte. Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 25 min entre 10-15°C, puis la phase du solvant (en bas) a été transférée dans des nouveaux tubes, et pesée vide et avec le solvant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les volumes ont été complétés à  $\approx 45$  ml par de l'eau ultra pure avant d'être pesés. Les tubes ont ensuite été placés dans un bain marie à 50° C sous un flux de  $\text{N}_2$  (50 ml/min) pendant 30min (pour dégager le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Les tubes ont ensuite été pesés et conservés à 4°C. Les analyses de MeHg ont ensuite été effectuées par spectrométrie de fluorescence atomique à vapeur froide couplée à la chromatographie gazeuse (GC-CVAFS), via une éthylation au  $\text{NaBEt}_4$ , l'analogue éthylé de  $\text{CH}_3\text{Hg}$ , (méthyléthyle Hg).

### 3.3.5 Présentation de l'article

## Insect Life Traits Are Key Factors in Mercury Accumulation and Transfer within the Terrestrial Food Web

Loïc Yung,<sup>†</sup> Coralie Bertheau,<sup>†</sup> David Cazaux,<sup>‡</sup> Nicole Regier,<sup>§</sup> Vera I. Slaveykova,<sup>§</sup>  
and Michel Chalot<sup>\*,†,‡,§</sup>

Cet article, intitulé “Insect life traits are key factors in mercury accumulation and transfer within the terrestrial food web”, a été valorisé dans le journal *Environmental Science & Technology*, et a été le premier article issu de mon travail de thèse à être publié. Il a également été sélectionné par le journal *Nature Sustainability* et publié en tant que “research highlight” dans le volume d’octobre 2019, sous la forme d’un résumé vulgarisé.



research highlights

nature sustainability

MERCURY POLLUTION  
**Metal bioaccumulation**  
*Environ. Sci. Technol.* 53, 11122–11132 (2019)

Research Highlight | Published: 09 October 2019

MERCURY POLLUTION  
**Metal bioaccumulation**

Aimee Guha Roy ✉

*Nature Sustainability* 2, 902 (2019) | Download Citation ↓

36 Accesses

Ces travaux, qui visaient à mieux appréhender les flux de Hg dans la parcelle de Tavaux et l’implication de l’entomofaune liée à l’ortie, reposent sur l’inventaire entomologique présenté préalablement. Là où ce dernier tente d’identifier un effet de la contamination sur la structure globale des communautés d’insectes associées à l’ortie, celui-ci vise à appréhender leur exposition de manière directe, en quantifiant les quantités de Hg présentes dans leurs tissus. En recroisant ces quantités de Hg avec des facteurs biologiques et écologiques, nous avons été en mesure de faire émerger des traits de vie exposants ces insectes aux Hg. Dans le cadre de cet article, je me suis chargé de l’ensemble des tâches excepté des analyses de MeHg, réalisées par l’Institut F.A. Forel de l’Université de Genève. Ces travaux contribuent à enrichir certains manques dans la compréhension des flux de Hg dans les écosystèmes terrestres, tout en renseignant sur l’incidence d’une parcelle de phytomanagement sur les communautés qu’elle héberge.

## research highlights

MERCURY POLLUTION

### Metal bioaccumulation

*Environ. Sci. Technol.* **53**, 11122–11132 (2019)



Chlor-alkali industries produce the widely used chemicals chlorine and sodium hydroxide. However, they can also generate large amounts of mercury waste. Chlor-alkali landfills can release mercury into the air, so they are frequently revegetated to confine mercury within plant biomass. Insects living among the vegetation are also exposed to mercury, which may accumulate in the food web.

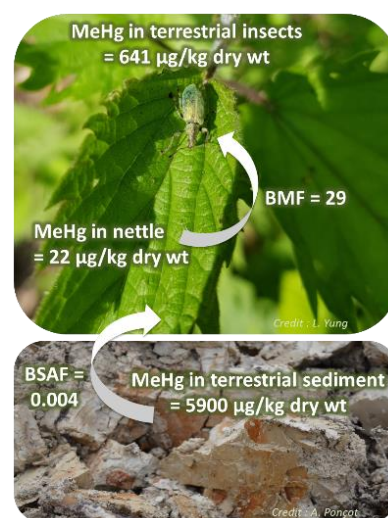
Loïc Yung, from the University of Bourgogne Franche-Comté (France), and colleagues studied twenty-three insect species living in a chlor-alkali landfill five years after revegetation. The landfill contained stinging nettle, which had physiological mercury levels (1% as methylmercury). The insect mercury levels varied widely, with some species containing up to 1 mg kg<sup>-1</sup> dry wt (75% as methylmercury). The authors considered life traits and found that, among nettle-related insects, most mercury exposure occurred from the food web with biomagnification particularly strong at the level of secondary predators. Within nettle-unrelated insects, mercury enrichment was related to habitat, and insects whose life cycles were in direct contact with mercury sources had the highest enrichment. This

research helps illuminate the role of insects in mercury dissemination because insects are common foods for birds and more generalist predators.

### ABSTRACT

As plants and associated insects are at the bottom of some terrestrial food webs, they are the primary contributors to mercury (Hg) fluxes in ecosystems. In addition to the trophic position of these organisms, factors related to their life traits have been hypothesized to influence their exposure to Hg. This study investigates the transfer of Hg in a soil-nettle-insect system and the insect-related factors affecting their Hg concentrations in a revegetated chlor-alkali landfill. Twenty-three insect species were identified and classified according to their life traits, their relationship with nettle and their morphological characteristics. We observed low total mercury (THg) concentrations in nettles, with only 1% methylmercury (MeHg) being detected, while concentrations ranged from 5 to 3700 µg/kg dry wt. in insects with a MeHg percentage of up to 75%. The nettle-related insects were primarily exposed to Hg through the food web with significant biomagnification, particularly at the level of secondary predators.

Within the nettle-unrelated group, the insect habitat was the most explanatory factor, with the highest enrichment being for the insects that spent part of their cycle in direct contact with Hg sources. Therefore, these insects require special attention because they are an essential vector of Hg transfer for terrestrial top predators.



## INTRODUCTION

Landfills in the chlor-alkali industries require stabilization of mercury (Hg) to prevent air pollution by evaporated Hg<sup>1</sup>. Revegetation of these sites offers a suitable solution to confine the Hg released from the soil in plant biomass<sup>2</sup>, as plants are net sinks that incorporate the atmospheric Hg into leaf tissues<sup>3</sup>. These plantations, mainly from Salicaceous species (*i.e.*, willow), favour the appearance of spontaneous herbaceous cover highly dominated by the common stinging nettle, *Urtica dioica* L. (Urticaceae)<sup>4</sup>. In natural conditions, this nettle is considered an invertebrate “super-host” providing food for a large diversity of insects with different biology<sup>5</sup> and is involved in strong trophic interactions<sup>6-8</sup>. In this context, herbivorous insects on revegetated landfills are potentially exposed to Hg and, more precisely, to methylmercury (MeHg), the form of Hg that biomagnifies readily from soil and sediment to plants<sup>9</sup>. The accumulation of MeHg in herbivorous insects can cause serious physiological, neurological, behavioural and reproductive disorders for insects or invertebrate predators, birds and mammals through their diet<sup>10,11</sup>.

Studies and reviews focusing on Hg transfer in the terrestrial food chain and its toxicity on specific groups (*i.e.*, birds, invertebrates, mammals, and microorganisms) have increased since 2010<sup>12,13</sup>. Some recent works, mainly targeting high trophic levels taxa, concluded that elevated MeHg concentrations in high trophic wildlife are ubiquitous across the world’s ecosystems and that there is a lack of accurate information on the impact of Hg in terrestrial ecosystems<sup>14-17</sup>. Investigations in Chinese industrial areas showed that Hg level in the soil-plant-insect system increased from plants to herbivorous insects and to predators, showing a biomagnification primarily conditioned by trophic factors<sup>15,18-21</sup>.

Other factors such as the insect life stages can play a major role in the transfer of Hg through food webs and particularly from aquatic to terrestrial ecosystems<sup>22-24</sup>. Indeed, emerging aquatic insects such as chironomids<sup>25</sup> or dragonflies<sup>26</sup> that move to terrestrial biota can serve as both prey<sup>27</sup> and biovector of contaminants for local terrestrial consumers, including ants or spiders<sup>28,29</sup>. Consequently, the exposition of terrestrial insects is linked to the vicinity to aquatic biota and the Hg bioavailability, conditioned by the physical and chemical factors of these systems (*e.g.*, dissolved organic carbon, quantity of aqueous nutrients)<sup>25,30</sup>. For strictly terrestrial habitats, factors such as insect habitats, have been hypothesized to influence Hg accumulation in terrestrial insects<sup>18,31</sup>, but no studies examining biological and/or ecological factors affecting Hg concentrations in these organisms exist, as previously performed in lakes and wetlands<sup>25,32</sup>.

The present study aimed to study Hg uptake and biomagnification through an original and specific soil-plant-terrestrial insect system in a Hg-contaminated area in France and to estimate the extent to which insect-related factors affected Hg uptake. To that end, we used a chlor-alkali landfill revegetated by poplar plantations where the stinging nettle, *Urtica dioica* L., colonized spontaneously the herbaceous layer, hosting a large diversity of insects. The specific objectives were i) to quantify THg (total Hg) and MeHg in soil, different compartments of nettles and a large number of well-identified insect taxa; ii) to characterize insect taxa by their trophic guilds, feeding guilds, dietary range and habitats at both the larval and adult stages, their relationship with the nettle and their morphological characteristics (*i.e.*, life stage and weight); and iii) to assess the relative importance of these factors on THg and MeHg concentrations in insects at the revegetated landfill.

## MATERIALS AND METHODS

### *Site description*

A phytomanagement field trial was implemented in 2011 on a chlor-alkali sediment landfill located in Saint-Symphorien-sur-Saône in the Bourgogne Franche-Comté region (France). The location, history and phytomanagement set-up at the sediment landfill have been described in detail in previous studies<sup>33,22</sup>. Five years after planting, biotic and abiotic environmental conditions have promoted the emergence of a spontaneous herbaceous cover strongly dominated by stinging nettle (*Urtica dioïca* L.). The control site is a natural area located at Courcelle-les-Montbéliard, 140 km east of the chlor-alkali plant, not directly influenced by the point-source.

### *Sample collection*

To ensure the most representative diversity in insect species, the study was carried out over two consecutive years (2017 and 2018). Six poplar plots were selected at the experimental site, three with the Skado cultivar (*Populus trichocarpa* x *P. maximowiczii*) and three with the I214 cultivar (*P. deltoides* x *P. nigra*). Soil and plant samples were collected in June 2017 and monthly in 2018 from April to September (*i.e.*, during the vegetation period) for the experimental site and in July 2018 for the control site. Three samples of soil and nettle plants were composed of three mixed subsamples taken randomly within each sampling plot. Soil samples consisting of bulk soil were collected from the first 20-cm layer, cleared from roots and other plant materials. Soil and plant samples were placed into plastic and paper bags, respectively, stored into a refrigerated container and shipped to the laboratory, where they were dried at ambient temperature (24 °C) for two weeks before Hg analyses. In parallel, an exhaustive sampling of the entomofauna related to the stinging nettle was carried out in the six studied plots monthly from April to September (*i.e.*, period of insect activity) during the two consecutive years (2017 and 2018). At each plot (chlor-alkali and control sites), insects from six nettle patches of similar size were caught using a sweep net and pooled in a collector tube with absolute ethanol or ethyl-acetate as usually used to assure optimal preservation and identification. All samples were stored at -20°C until identification and Hg analyses.

### *Insect identification and characterization*

Among the whole insect diversity collected from the entomological survey, in the present study we targeted the most abundant taxa, representing 63% of the total insects collected on nettles at the experimental site during the two years. Prior to the analyses, each taxon was identified to the lowest possible taxonomic level using several references that included some identification keys<sup>35,36</sup>, on-line sources, such as insecte.org and/or specialists from the Franche-Comte Natural Spaces Conservatory. Each taxon was classified according to their life traits using published literature (SI Table S1). First, taxa were assigned according to their habitat both at the larval and adult stages, which allowed them to be split into two groups, "the nettle-related group", which included insects hosted by nettles (*i.e.*, insects living on the nettle during their whole life cycle), and the "nettle-unrelated group", which refers to all other insects. We further classified taxa according to their trophic levels (*i.e.*, herbivores, predators I or predators II), their larval and adult feeding guild (*i.e.*, plant parts for herbivores and type of prey for predators) and their dietary range (*i.e.*, insects that are host specific within a family were categorized as "specialists", and those that feed on plants or insects from more than one family were categorized as "generalists"). Finally, to test the influence of the morphological characteristics of insects on THg content, we identified the life stage of each taxon (larvae or adult) and measured the dry weight (mg).

### ***THg and MeHg analyses in soil, plants and insects***

Before analyses, dried nettle stems and leaves were separated and ground into a homogenous powder in a MM40 Mixer Mill (Retsch, Eragny sur Oise, France) for 4 min at 30 Hz and 7 min at 30 Hz for leaves and stems, respectively. Soil samples were manually homogenized and sieved to <4 mm. Insects euthanized with ethyl acetate were freeze-dried, and those euthanized with absolute ethanol were transferred into new plastic tubes and opened overnight at ambient temperature (24 °C) for the evaporation of ethanol. As the mass of some dried insects was <1 mg, they were carefully weighed using a NewClassic MS analytical balance (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Switzerland) with a five decimal resolution. Preliminary tests showed no significant influence of the washing and preservation methods on THg concentrations measured in insects (SI, Figure S1). Moreover, in trophic interactions, the whole insects are usually ingested by predators, including the potential fraction of Hg adsorbed on the cuticle or internally accumulated through associated microorganisms (*e.g.*, fungi and bacteria). Thus, whole insects were directly analysed without pretreatment to be closer to natural conditions. For the small insects, multiple individuals of the same taxa were pooled together to reach a minimal mass of 1 mg. THg concentrations were measured in the soil, plant and insect samples using an AMA-254 cold vapor atomic absorption (CV-AAS) Hg analyser (Altec Co., Czech Republic), as fully described in a previous study<sup>37</sup>. **The instrument detection limit (DL) and the quantification limit (QL) using this method were 0.006 and 0.07 ng of THg, respectively. For samples with non-detected Hg, we calculated a THg concentration using the QL value.**

To ensure that the preservation of different taxa in ethanol did not induce cross-contaminations, ethanol blank samples were regularly analysed. One hundred microliters of ethanol was placed into the sample container and evaporated. No Hg was detected in the ethanol fraction, which shows that Hg was not released into that fraction during storage.

MeHg was extracted from freeze-dried ground material using a HNO<sub>3</sub> leaching / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extraction method, as described by<sup>38</sup>. Briefly, 0.02 to 0.5 g of insect, nettle or soil material were weighed into a 50-mL centrifuge tube and homogenized into 2 mL 1 M CuSO<sub>4</sub>, 5 mL 5 M HNO<sub>3</sub> and 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, shaken for 1 h and centrifuged for 25 min at 3000 rpm. The solvent layer was transferred to a new tube and MeHg back-extracted into 10 mL H<sub>2</sub>O (MilliQ) under 50 mL/min N<sub>2</sub> flow in a water bath at 50°C. MeHg was analysed as described elsewhere<sup>39</sup>. The number of samples is provided in SI Table S2.

### ***Data analysis***

Statistical analyses were performed with R software v.3.5.1 (R Development Core Team, 2013). All variables were checked for their homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro–Wilk test). Non-normal data were log transformed. Data that did not fit a normal distribution after transformation were analysed with nonparametric tests. All statistical tests were considered to be significant at  $P < 0.05$ . The results are presented as the means with their standard error (SE). Differences in THg concentrations in soil, nettles and insects between sites (experimental *vs.* controls) were assessed using the Mann-Whitney-Wilcoxon test. In the experimental site, a comparison of THg and MeHg concentrations between soil, nettle, insect families and between nettle-related and nettle-unrelated insects was performed using a Kruskal-Wallis test and a Mann-Whitney-Wilcoxon test, respectively. A redundancy analysis (RDA) was performed on both the nettle-related and nettle-unrelated groups to assess the correlation between THg concentrations and the insect life traits studied using the “*rda()*” function available in the “*vegan*” package. The significance and rank of each trait was then tested with the “*envfits()*” function (Monte Carlo test with 999 permutations). Then, the effect of each significant insect life trait on THg concentrations for each group was investigated with a Kruskal-Wallis test. For the morphological characteristics of insects, a Mann-Whitney-Wilcoxon test was performed to assess whether THg concentrations differed among insect stages. Pearson’s or Spearman’s correlation

coefficients were calculated to check for relationships between THg content and weight of insects grouped according to their life traits.

The Biota-Soil Accumulation Factor (BSAF) was calculated for the nettles from the experimental site and the control site according to the following equation:

$$\text{BSAF nettle} = \frac{[\text{THg}] \text{ nettle}}{[\text{THg}] \text{ soil}}$$

According to the information collected from the literature on trophic interactions (Table S1), we calculated the Bio-Magnification Factors (BMF) for nettle-related insects from the experimental site according to the following equation:

$$\text{BMF taxa} = \frac{[\text{THg}] \text{ taxa}}{[\text{THg}] \text{ preys}}$$

Trophic Magnification Factors (TMF) were determined for both THg and MeHg at the experimental site. TMF considered all taxa along the five level trophic web (*i.e.*, plants, herbivorous insects, predator I, predator II, predator III) except those from the Elateridae species, which were removed from the herbivorous group as they accumulated large quantities of Hg through their life cycle. Hence, TMF were determined from the slope of a regression between the Hg concentrations and trophic level of insects in the food web and calculated as the antilog of the regression slopes (b):

$$\text{Log [Hg]} = a + bTL$$

TMF refers to the average rate of change in contaminant concentrations from diet-to consumer along the trophic web. In TMF, slope values above zero are indicative of biomagnification (*i.e.*,  $\text{TMF} > 1$ )<sup>40</sup>.

## RESULTS

### *Characterisation of targeted taxa*

The present study covered insects from six orders: Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera and Mecoptera, belonging to 16 common families within these orders (SI Table S1). The 23 targeted insect taxa were identified up to the family level for 100% of them, to the genus level for 96% and to the species level for 74%. The identification of 16 caterpillars could not go beyond the order level. The 23 selected taxa were then classified according to their relationship or lack of relationship with nettle as a host-plant and their life traits (SI Table S1). The nettle-related group included 12 different genera of insects belonging to orders of Hemiptera and Coleoptera and unidentified families of Lepidopteran larvae (SI Table S1). These insects belonged to three different trophic guilds: herbivores, predators I and predators II. Herbivores belonged to taxa feeding on nettle sap, seeds or leaves during their larval or adult stages. Predators I were mainly specialists belonging to the family Coccinellidae and Miridae, which fed almost exclusively on aphids. Predators II were represented by the genus *Nabis*, which included certain species known as generalist predators that hunt herbivorous or other predatory species (*i.e.*, aphids, Lepidopteran or Coleopteran larvae and some Heteropteran and Dipteran adults) on herbaceous layers. The nettle-unrelated group included all the other abundant taxa represented by 8 families (*i.e.*, Formicidae, Panorpidae, Aphrophoridae, Chrysomelidae, Curculionidae, Elateridae, Chironomidae, and Sciomyzidae) and 9 genera. All taxa were sampled on nettles but were not directly related to it. Most of these taxa were characterized by a high mobility and a specific life cycle that occurred at different habitats, such as a larval cycle in the soil, in water or in snails as parasitoids.

### ***Hg concentrations in the soil-plant-insect system***

THg concentrations of soil, plant and insects were significantly higher at the experimental site than at the control site. The THg concentrations measured in soil samples from the experimental site were in the range of 4382 – 7119  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 10-fold higher than THg concentration ( $570 \pm 70$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) at the adjacent undisturbed forest soil<sup>33</sup>. Nettle stems and leaves were significantly more enriched in THg at the experimental site than their counterparts collected at the control site (Table 1). The BSAFs calculated for the experimental site and the control site were 0.004 and 0.011, respectively, suggesting a noticeable dilution at both sites. With an average THg of  $31 \pm 1$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , leaves were significantly ( $P < 0.01$ ) more enriched than stems ( $11 \pm 1$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  THg). A significant enrichment was observed in the nettle leaves during the season, with THg concentrations ranging from  $18 \pm 5$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  in samples collected in April to  $31 \pm 5$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  in samples collected in September ( $P < 0.01$ ).

A total of 312 and 159 analyses of THg concentrations was performed on insects from the experimental and control sites, respectively (Table 1). Average THg concentrations for insects collected at the experimental site were significantly higher than those at the control site ( $P < 0.001$ ), and this difference was found more specifically for 12 of the 14 compared families and orders (Table 1). Taxa (Cicadellidae family and Lepidoptera order), for which no significant differences were observed, had THg concentrations ranging from  $< \text{QL}$  to 271  $\mu\text{g}/\text{kg}$  at the experimental site and from  $< \text{QL}$  to 109  $\mu\text{g}/\text{kg}$  at the control site. No THg was detected in Nabidae from the control site, whereas elevated THg concentrations (ranging from 107 to 1805  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were measured for the same taxa collected at the experimental site, and the same phenomenon was observed for Aphididae and Aphrophoridae, although to a lesser extent. For most insects collected at the control site, THg concentrations remained  $< 53$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , except for the highly mobile flying insects belonging to the Chironomidae and Panorpidae families, which presented the highest background concentrations (Table 1).

The 16 studied families from the experimental site were plotted according to their THg concentration (Figure 1). The highest THg concentrations were measured in Elateridae, Panorpidae and Formicidae followed by Chironimidae and Nabidae, with concentrations higher than 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry wt., which are significantly different from Elateridae ( $3679.8 \pm 372.7$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The measured THg concentrations dropped to 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Sciomizidae and below 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for each other family. Within the Curculionidae family, THg concentrations were variable, ranging from  $< \text{QL}$  to 321  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , with concentrations over 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for *Phyllobius* sp. and up to 56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for the two other considered species (SI Table S1). All other less enriched families had THg concentrations in the same order of magnitude as those measured for nettles. Overall, nettle-unrelated insects showed mean THg concentrations ( $981 \pm 96$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) six times higher than nettle-related insects ( $124 \pm 14$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Figure 1). Within the nettle-related group, mean THg concentrations ranged from  $8.9 \pm 2.4$  for Miridae to  $617.3 \pm 47.2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Nabidae. Concerning the nettle-unrelated group, the lowest mean THg concentrations were obtained for Aphrophoridae and Pentatomidae, whereas the highest concentrations were found in Elateridae. However, the THg enrichment seems not to be only related to the relationship with nettle. Indeed, the nettle-related taxon Nabidae had THg concentrations not significantly different from the nettle-unrelated taxa Panorpidae, Formicidae and Chironimidae (Figure 1).



Table 1. Total mercury (THg) concentrations measured in nettles and the 16 families and order of insects from the sediment landfill and the control site. n represents the number of samples analysed. All concentrations are expressed in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry wt  $\pm$  SE. 'NA' = taxa not collected at the control site. Concentrations measured in the sediment landfill were compared to those measured in the control site using the Wilcoxon rank sum test and the two-sample t-test. The results from the statistical comparisons are represented with the following legend: P-value '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 'NS' not significant. 'a' = data from an adjacent undisturbed forest soil<sup>21</sup>

Organism		Experimental site		Control		Significance test: comparison of the means
		Experimental site THg ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Control sites THg ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
		n	Mean $\pm$ S.E	n	Mean $\pm$ S.E	
Soil		37	5894 $\pm$ 111	7a	570 $\pm$ 70a	***a
Nettles		187	21.4 $\pm$ 1.0	11	6.3 $\pm$ 0.9	***
	Stems	95	11.6 $\pm$ 0.7	5	3.8 $\pm$ 1.1	***
	Leaves	92	31.5 $\pm$ 3.4	6	8.4 $\pm$ 0.7	***
Insects	Taxa	312	388.5 $\pm$ 38.5	159	24.0 $\pm$ 3.7	***
	Elateridae	8	3679.8 $\pm$ 372.7	19	18.1 $\pm$ 4.2	***
	Panorpidae	6	1231.3 $\pm$ 261.0	3	178.6 $\pm$ 96.2	**
	Formicidae	21	871.6 $\pm$ 46.9	16	11.8 $\pm$ 3.4	***
	Nabidae	67	617.3 $\pm$ 47.2	19	<DL	***
	Chironomidae	32	518.1 $\pm$ 29.3	11	131.0 $\pm$ 12.7	***
	Sciomyzidae	5	200.8 $\pm$ 38.9	NA	NA	NA
	Chrysomelidae	16	63.5 $\pm$ 9.4	12	18.0 $\pm$ 4.7	***
	Coccinellidae	13	59.8 $\pm$ 20.4	17	4.7 $\pm$ 1.5	**
	Curculionidae	39	59.3 $\pm$ 15.0	15	6.1 $\pm$ 2.9	***
	Cicadellidae	21	53.2 $\pm$ 9.6	9	52.8 $\pm$ 10.4	NS
	Lepidoptera	18	45.2 $\pm$ 18.1	8	38.7 $\pm$ 10.5	NS
	Rhyparochromidae	17	19.3 $\pm$ 4.1	NA	NA	NA
	Aphididae	22	10.1 $\pm$ 1.2	7	<DL	***
	Miridae	17	8.9 $\pm$ 2.4	13	4.2 $\pm$ 3.3	*
	Pentatomidae	3	7.1 $\pm$ 2.7	6	0.5 $\pm$ 0.3	*
	Aphrophoridae	7	5.7 $\pm$ 1.8	4	<DL	**

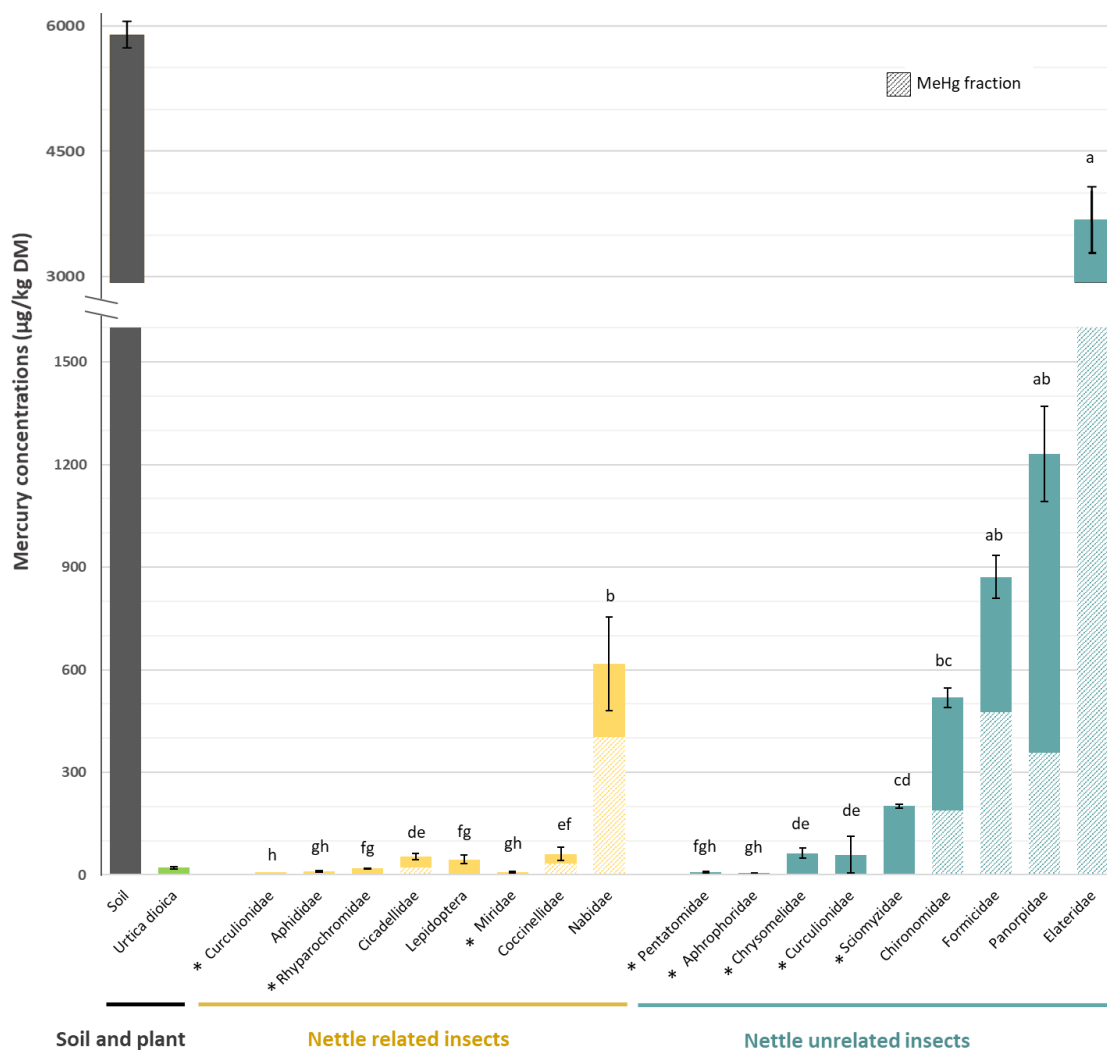


Figure 1. Mean THg concentrations (full bar, µg/kg dry wt.), including the MeHg fraction (hatched bar, %), plotted for soil and nettles (*Urtica dioica*) and for all the investigated insect taxa from the nettle-unrelated and nettle-related groups. \* = The MeHg concentrations were not analysed. Bars with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ( $P < 0.05$ ).

Additionally, no significant difference ( $P > 0.05$ ) was found between the lowest mean THg concentrations in the nettle-unrelated group and those in the nettle-related group. Despite high THg concentrations, the percentage of MeHg in the soil was very low ( $0.03 \pm 0.002\%$ ), slightly increased in nettles ( $1.2 \pm 0.1\%$ ) and considerably increased in insects (ranging from 5.6% to 74.2%). Insect MeHg (average 29.2%, a) being significantly different ( $P < 0.05$ ) from nettle MeHg (8.0%, b), and soil MeHg (average 4.5%, b).

The percentages of MeHg were not significantly different between the nettle-related group and the nettle-unrelated group ( $P > 0.05$ ) with mean values of  $43 \pm 7\%$  and  $49 \pm 5\%$ , respectively. Within the nettle-related group, for the 5 studied families, the percentage of MeHg was higher than 25% and reached 65% for Nabidae, except for Lepidoptera, for which MeHg only represented 6% of THg. Elateridae from the nettle-unrelated group exhibited 74% MeHg, representing over 2700 µg/kg. The Panorpidae family presented the most variable MeHg percentages, ranging from 4 to 70%.

### Overall factors influencing THg concentrations in insects

The present study clearly demonstrated that insect life traits, such as habitat, trophic guild, feeding guild, and dietary range, at both the larval and adult stages significantly influenced the mean THg concentrations of insects living at the landfill ( $P < 0.01$ ). However, the relative importance of each of these life traits on THg concentrations of insects in the two groups (nettle-related vs. nettle-unrelated insects) was different (Table 2).

Table 2. Hierarchical analysis of factors affecting THg concentrations within the nettle-unrelated and nettle-related groups. P-value '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 'NS' not significant.

	Factors	r2	Pr(>r)	Significativity
Nettle-related group				
	Trophic guild	0.39	0.001	***
	Feeding guild (adult)	0.39	0.001	***
	Feeding guild (larvae)	0.39	0.001	***
	Dietary range	0.37	0.001	***
	Habitat (larvae)	0.07	0.017	*
	Habitat (adult)	0	1	NS
Nettle-unrelated group				
	Habitat (adult)	0.22	0.001	***
	Feeding guild (larvae)	0.21	0.001	***
	Habitat (larvae)	0.16	0.002	**
	Feeding guild (adult)	0.06	0.115	NS
	Dietary range	0.05	0.037	*
	Trophic guild	0.02	0.475	NS

According to the RDA, THg concentrations in nettle-unrelated insects were mainly influenced by the adult habitat ( $P < 0.001$ ), then by the dietary range at larval stage ( $P < 0.001$ ) and by larval habitat ( $P < 0.002$ ), while the trophic guild and adult feeding guild factors were not critical. Considering adult habitat, THg concentrations followed the following order: insects living on host plants < insects having their larval cycle in underwater sediments < insects living a part of their life cycle in terrestrial sediments (Figure 2A).

The THg concentrations in *Aphrophora alni* (Aphrophoridae), which perform their complete life cycle on plants (especially Salicaceous species), did not exceed 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry wt. In contrast, taxa with part of their life cycle in soil, such as *Agriotes sp.*, *Phyllobius sp.*, *Chironomus sp.*, *Trypetoptera punctulata*, *Myrmica rubra* and *Panorpa sp.* (SI, Table S1), had average THg contents higher than 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  with a mean percentage of MeHg over 50%. Insects belonging to the genus *Crepidodera*, which also feed on Salicaceae, had the lowest THg content for insects with a part of their life cycle in the soil but still significantly higher than those measured for *Aphrophora alni* ( $P < 0.01$ ) (Figure 1).

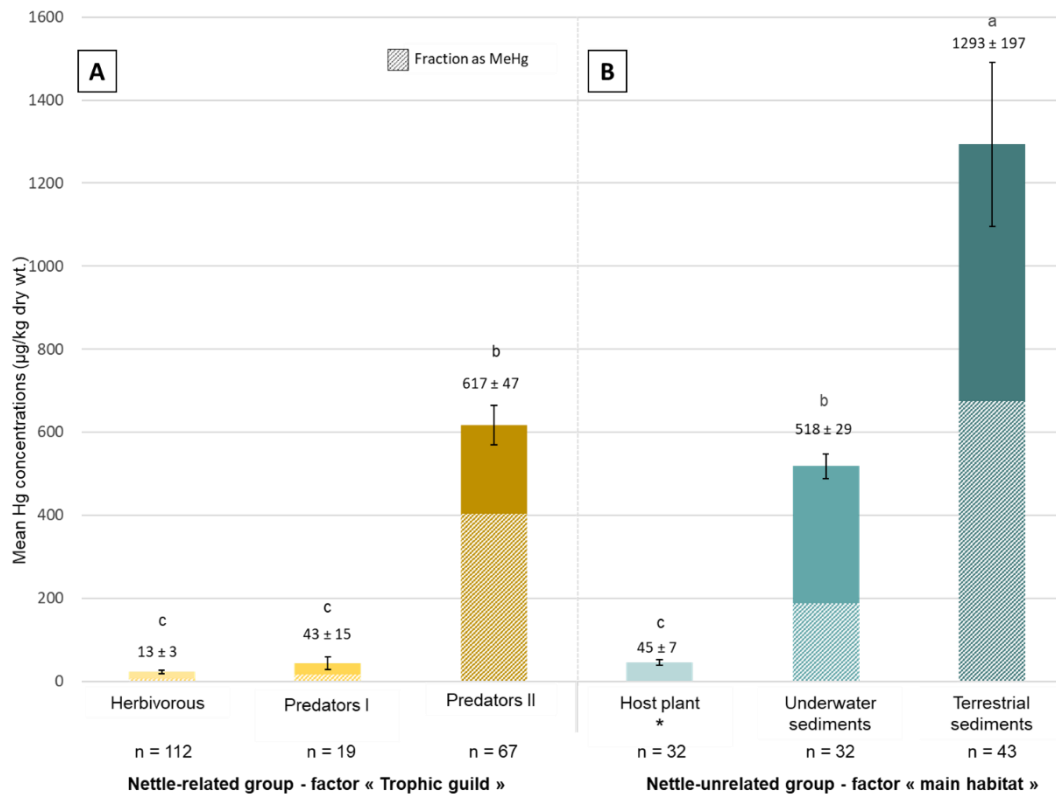


Figure 2. Mean THg concentrations (full bars,  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry wt.)  $\pm$  SE and the MeHg fraction (hatched bars, %), measured in classes related to the main factors influencing the Hg enrichment for both the nettle-related group (factor = trophic guild, A) and external group (factor = main habitat, B). \*: The MeHg concentrations were not analysed. Bars with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ( $P < 0.05$ ).

For nettle-related insects, feeding guild at larval and adult stages ( $P < 0.001$ ), trophic guild ( $P < 0.001$ ) and then dietary range ( $P < 0.001$ ), accounting individually for more than 37% of the total variability, were the most significant life traits (Table 2). Thus, in the nettle-related food web, the THg contents were in the following order: herbivores < soft-body insect predators < generalist insect predators (Figure 2B), with a percentage of MeHg following the same trend: 24% < 37% < 65%. Herbivorous insects presented no significant THg enrichment compared with nettles, but the mean MeHg concentrations increased from 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in nettles to 9.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in herbivorous insects. The biomagnification within the nettle-related group was also observed while considering all the studied taxa (including those from the nettle-unrelated group), with TMF of 2.8 for THg and 6.3 for MeHg.

Each family of insects feeding on nettle sap or nettle seeds had a BMF lower than 1.0, except for leafhoppers (Cicadellidae), which had the highest BMF (4.6) among all herbivorous insects. THg concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) for herbivorous insects increased as follows: seed-feeder ( $13 \pm 3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) < sap-sucking ( $22 \pm 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) < leaf-feeder ( $37 \pm 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) with no significant differences between these feeding guilds. With regard to defoliating insects, Lepidoptera larvae, which included unidentified taxa with potential generalist feeding specificity, had a BMF of 1.4, whereas that of a specialist species of weevils (Curculionidae) hosted by nettles was 0.6. No significant THg enrichment was obtained for predators I, which included ladybirds (Coccinellidae) and a predatory bug (Miridae), compared to herbivorous insects. Damsel bugs (Nabidae), which were the only studied generalist predators II of the nettle-related food web, had average concentrations 15 times (THg) and more than 30 times (MeHg) higher than those measured in the lower trophic guild, resulting in a BMF of 4.8.

The influence of the development stage on THg concentrations was studied on two predatory taxa: the ladybirds, *Harmonia axiridis* (Coccinellidae) and the damsel bugs, *Nabis sp.* (Nabidae). THg concentrations measured in the imago ladybirds (n = 6) were 10-fold higher (P < 0.001) than those measured in larvae (n = 7). In contrast, no significant difference was obtained for Nabidae species between the imago (from 148 to 1786 µg/kg; n = 43) and the larvae (from 108 to 1805 µg/kg; n = 24). A significant positive correlation between the weight of insects and their THg content was observed when all taxa were pooled (rs = 0.62, P < 0.001). The THg content in insects increased proportionally with their weight but differently according to the group studied. We also considered the main life traits, that is, the habitat of nettle-unrelated taxa and the trophic guild for nettle-related taxa. In doing so, the correlation between THg and weight was confirmed for herbivores (rs = 0.60, P < 0.001) and predators (rs = 0.62, P < 0.001) trophic guilds as well as for underwater sediments (rs = 0.44, P < 0.01) and terrestrial sediments (rs = 0.81, P < 0.001) habitats (Figure 3).

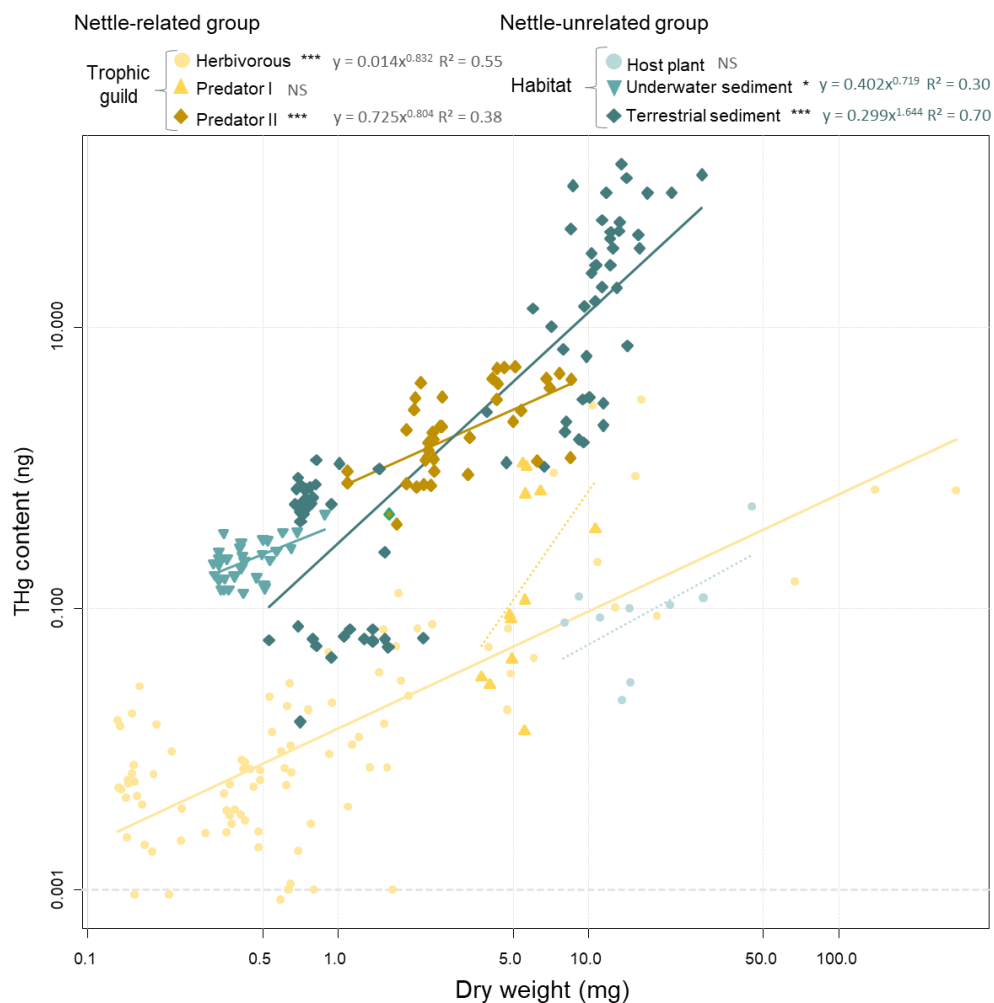


Figure 3. Relationships between the dry weight (mg) and the THg content (ng) of insects measured in six classes, 3 related to the “trophic guild” or 3 related to the “habitat” factors. The results from Pearson’s and Spearman’s correlation tests are presented with the following legend: P-value ‘\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*’ 0.01 ‘\*’ 0.05 ‘NS’ not significant. The regression equations were calculated, as well as the regression coefficient (R2) for each class, for which a correlation was obtained.

The first cluster, characterized by a high equation coefficient ( $a > 0.3$ ), comprised most taxa from the nettle-unrelated insects that spent part of their life cycle in direct contact with Hg sources, i.e. Elateridae, Curculionidae, Chironomidae, Formicidae and Panorpidae species. This cluster also

included nettle-related predators II (*i.e.*, Nabidae species), predators I (Coccinellidae) and herbivores (Lepidoptera), which accumulated only Hg via biomagnification from the diet. The second cluster, characterized by a lower coefficient in the equation (calculated when significant, a  $< 0.1$ ), mainly included nettle-related herbivorous insects and predators I, as well as insects strictly living on Salicaceous species (*i.e.*, Cerpopidae, Pentatomidae). This cluster also included a specific beetle (*i.e.*, Chrysomelidae), which spent a short period of its life cycle in terrestrial sediments.

## DISCUSSION

Our data provided evidence on the terrestrial biomagnification of Hg at the soil-plant-insect food web at a chlor-alkali site. These results reinforce recently published work in which Hg biomagnification not only concerns wetlands but also a wider range of biota, including terrestrial biota<sup>41</sup>. As a result of the chlor-alkali process, Hg enrichment at the sediment landfill were similar to those measured at a mining area in Turkey<sup>42</sup> and the Liaoning Province in China<sup>19,21</sup> but 10-fold lower than the Wanshan Mercury Mining District in China<sup>14</sup>. Mean THg concentration from our soil samples (5.9 mg/kg) was also 20-fold higher than the average value for global agrosystem soils (0.3 mg/kg)<sup>43</sup> and 60-fold higher than the mean concentration in natural surface soil (0.1 mg/kg)<sup>44</sup>. Overall, soils in the vicinities of chlor-alkali plants have Hg concentrations ranging from 0.06 to 100 mg/kg<sup>45</sup>. The methylated form of Hg only represented 0.03% of the THg, which is very low compared to the common rate of 1% to 3% for terrestrial sediments<sup>44</sup>. However, similar rates of MeHg in the previously mentioned Wanshan District (from 0.02 to 0.11%) to the rates of our samples were observed<sup>46</sup>.

Low Hg concentrations were measured for the various tissues of nettles spontaneously growing under the studied poplar plantation, with average THg concentrations not exceeding 100 ng/kg for stems and leaves. These concentrations were in the same order of magnitude than those measured for the Skado poplar cultivar (*i.e.*, 42.5 µg/kg dry wt.)<sup>34</sup>. The obtained concentrations in nettles were lower than the average THg concentration (206 µg/kg) measured in the shoots of 12 native herbaceous plant species collected in the previously mentioned mining area in Turkey<sup>42</sup>. Hg concentrations in mature leaf tissues above 1-8 mg/kg have been reported to be excessive or toxic to plants<sup>45</sup> with a potential 10% yield loss in agronomic species<sup>47</sup>. These thresholds reported in the literature are 10 to 80 times higher than those measured in nettle leaves in our study. A recent study conducted on the same site concluded that Hg entry into poplar leaves was exclusively through an atmospheric pathway<sup>2</sup>. If this property also applies to nettle, it may explain the higher Hg concentrations measured in the nettle leaves compared to the stems.

Insects from the revegetated sediment landfill had Hg concentrations ranging from background values to 5500 µg/kg, which is consistent with studies conducted in industrialized areas with comparable Hg concentrations in terrestrial sediments. Lepidopteran larvae, Formicidae, and Chrysomelidae, had THg concentrations comparable to those measured in previous studies<sup>18,19</sup>. Given the TMF for THg (2.8) and MeHg (6.3) within the 5 trophic levels, our data suggest that Hg biomagnified at the soil-nettle-insect food web (Figure 4). Our results are in agreement with studies that considered a wider range of taxonomic groups, including insects, birds and mammals<sup>14-17</sup>. Our study did not include the latter two higher trophic levels but rather focused on a much higher number of insect taxa and a more accurate level of trophic interactions.

The present study covers a wide taxonomic range of insects for which the accuracy of identification enabled the characterization of several life traits. This functional diversity provided us with a decent overview of the functioning ecosystem and enabled us to study these life traits as factors influencing Hg enrichment in insects. Thus, taxa from the experimental site were enriched in Hg to varying degrees, depending on several factors, including the trophic level, linked to the feeding guild and the feeding specificity. However, the fact that within the nettle-unrelated group, an herbivorous species (Elateridae) had THg concentrations exceeding those of secondary

predators, such as ants or Panorpidae, led us to consider other factors, including those conditioning a direct contact with contaminant sources.

Among all of the taxa considered, Elateridae were the most enriched in both Hg and MeHg, with concentrations in the same order of magnitude as those measured in soil. As herbivorous taxa feeding mainly on the poplar cultivars with a comparable enrichment than nettles<sup>34</sup>, Elateridae should not have been exposed to high amounts of Hg from their diet. These elevated concentrations may be related to direct cuticle contact with the dredged sediments during the larval cycle. As already mentioned for ants<sup>18</sup>, Hg in soil can indeed penetrate their cuticle by uptake or passive diffusion when prolonged dermal contact has occurred. Elateridae larvae, also known as wireworms, have spent most of their life in the soil, including 3-4 months for eggs, 2-5 years as larvae, and can overwinter as adults<sup>48</sup>. The other taxa investigated that may be exposed to Hg through prolonged dermal contact during their larval cycle are Panorpidae that have spent 1-2 years in the soil<sup>49</sup> and Chironomidae spending one to several years in underwater sediments<sup>50</sup>. The landfill we investigated in the present study was indeed constructed in the vicinity of a mitigation pond<sup>37</sup>. The lower THg concentrations measured in adult Chironomidae compared to Elateridae may be related to a greater loss of Hg during metamorphosis, as proven for some metals, including Hg<sup>51</sup>, or to an active detoxification mechanism<sup>52</sup>. Although the THg concentrations in the soil and in Elateridae were in the same order of magnitude, the concentration of MeHg was approximately 2000-fold higher in Elateridae, suggesting the entry of the methylated form of Hg or the potential methylation of inorganic Hg once taken up. The diet of wireworms mainly consists in decomposed plant matter, and its associated fungal and microbial biomass, which are known to be involved in the methylation of Hg in forest floor<sup>53</sup>. A recent study already hypothesized that decomposition of the soil organic matter pool introduces additional MeHg to the diets of detritivore invertebrates<sup>54</sup>. Consequently, the high concentration of Hg measured in Elateridae seemed to be related to both their feeding guild and habitat during their larval stage. Further studies on insect traits related to their development intrinsic, such as the duration of the larval cycle, duration and location during overwinter or diapause, are needed to improve our knowledge regarding Hg accumulation in insects.

Within the nettle-related food web, the THg concentrations increased as follows: nettles < herbivores < predator specialists < predator generalists, with a gap between predator specialists (including Coccinellidae) and predator generalists, suggesting a likely entry of Hg from another source at this level. Nabidae, which were the only predator generalist in the nettle-related insects, only hunt on the herbaceous layer<sup>55</sup> with rare contact with the soil surface. Adult Chironomidae, which most likely grew as larvae in the adjacent contaminated pond<sup>37</sup> where they became contaminated by Hg, were abundant on nettles. In this context, Chironomidae were potential prey for Nabidae and, consequently, biovectors from aquatic to terrestrial environments. A previous study showed that Chironomidae, among emerging insects, were the main contributors to the transfer of biomass and polyunsaturated fatty acids from aquatic to terrestrial ecosystems, representing a superior food quality for terrestrial consumers<sup>22</sup>. With comparable THg concentrations (Figure 1) and similar relationships between THg and biomasses (Figure 3), Chironomidae probably played the role of the biovector of Hg from aquatic sediments to Nabidae (Figure 4). Thus, we demonstrated that the feeding specificity of insects might also be considered an explanatory factor, as generalist insects are exposed to high amounts of Hg while feeding on emerging insects. These results were consistent with those for predatory spiders<sup>24,29,56</sup>, which are also generalist species and fed on Hg-enriched Chironomidae.

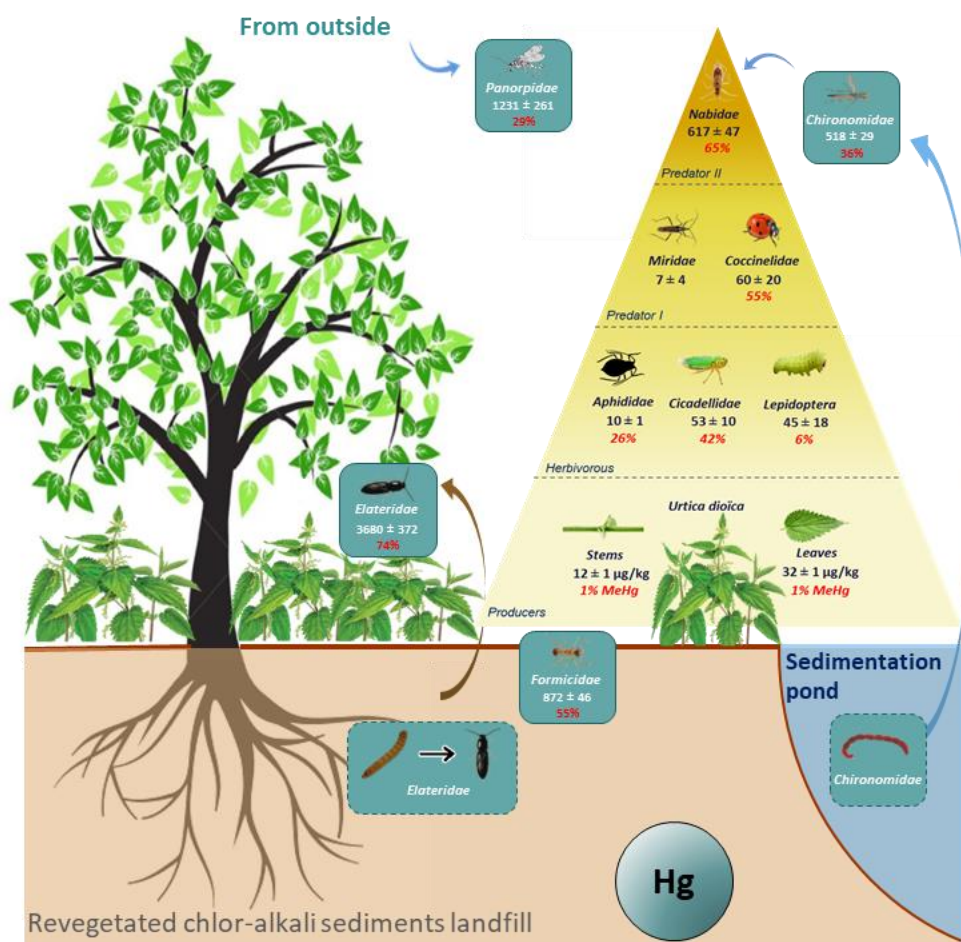


Figure 4: THg concentrations in the nettle-related food web (yellow pyramid) and the implication of nettle-unrelated taxa in the flow of THg (blue boxes). THg concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry wt.) are specified under each name of taxa (mean  $\pm$  SE), as well as the percentage of THg as MeHg in bold red.

Our findings suggest that insects (*e.g.*, Elateridae and Chironomidae) that had direct contact with terrestrial or underwater sediments constitute the main entry source of Hg within the terrestrial nettle-insect food web (Figure 4). These insects may constitute direct food for higher trophic levels (birds, mammals) or food for generalist predator insects. These latter (*i.e.*, Nabidae) are likely to play a role in the export of significant amounts of Hg at higher trophic levels and become another major vector in the transfer of Hg, as recently demonstrated in temperate forest environment<sup>54</sup>. Other insect features of interest, such as dispersal capacity, vulnerability to predation, and nutritional value, would, however, need to be considered to fully assess the role of insects within Hg dissemination in Hg-contaminated areas.



## SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Ecological characteristics of each targeted taxa, including their link with nettle, habitat, trophic guild in the nettle-based food web, feeding guild and dietary range according to the literature

Targeted insects		Habitat	Trophic guild	Feeding guild	Dietary range	Reference
<b>Nettle-related insects</b>						
<i>Aphid</i>						
<i>Aphididae</i>	<i>Microlophium carnosum</i>	plant - nettle	herbivorous	sap-sucking	specialist	Baverstock et al. 2011
<i>Leafhoppers</i>						
<i>Cicadellidae</i>	<i>Eupteryx urticae</i>	plant - nettle	herbivorous	sap-sucking	specialist	Stiling, 1980
<i>Ladybird beetle</i>						
<i>Coccinellidae</i>	<i>Coccinella septempunctata</i> <i>Harmonia axyridis</i>	plant - nettle	predator I	soft-body predator (aphididae)	specialist	Gurney et Hussey, 1970 Koch, 2003
<i>Weevil</i>						
<i>Curculionidae</i>	<i>Nedyus quadrimaculatus</i> <i>Taenapion urticarium</i>	plant - nettle	herbivorous	leaf-miner	specialist	Hoffman, 1958
<i>Caterpillar</i>						
<i>Lepidoptera</i>	ND (larvae)	plant - nettle (& other)	herbivorous	leaf-miner	ND	
<i>Plant bug</i>						
<i>Miridae</i>	<i>Liocoris tripustulatus</i> <i>Deraeocoris ruber</i>	plant - nettle plant - nettle	herbivorous predator I	sap-sucking soft-body predator (aphididae)	specialist specialist	Wheeler, 2001
<i>Damsel bug</i>						
<i>Nabidae</i>	<i>Himacerus mirmicoides</i> <i>Nabis rugosus</i> <i>Nabis sp.</i>	plant - nettle	predator II	insect predator	generalist	Lattin, 1989
<i>Seed bug</i>						
<i>Rhyparochromidae</i>	<i>Scolopostethus affinis</i>	plant - nettle	herbivorous	sap-sucking	specialist	Eyles, 1964
<b>Nettle-unrelated insects</b>						
<i>Spittlebugs</i>						
<i>Aphrophoridae</i>	<i>Aphrophora alni</i>	plant - <i>Salicaceous</i>	herbivorous	sap-sucking	specialist	Weaver and King, 1954
<i>Flea-beetle</i>						
<i>Chrysomelidae</i>	<i>Crepidodera sp.</i>	larvae : forest floor adult : plant - <i>Salicaceous</i>	herbivorous	larvae : root feeder adult : leaf miner	specialist	Urban, 2014
<i>Chironomids</i>						
<i>Chironomidae</i>	<i>Chironomus sp.</i>	larvae : sediments underwater adult : ND	ND	larvae : filter feeder adult : ND	ND	Amitage et al., 2012
<i>Weevil ()</i>						
<i>Curculionidae</i>	<i>Phyllobius sp.</i>	larvae : soil adult : plant - nettle	herbivorous	larvae : root feeder adult : leaf miner	NA	Ioannisiani et al., 1970
<i>Wireworm / Click beetle</i>						
<i>Elateridae</i>	<i>Agriotes sp.</i>	larvae : soil adult : plant <i>Salicaceous</i>	herbivorous	larvae : root feeder adult : leaf miner	generalist	Evans, 1944
<i>Red fire ant</i>						
<i>Formicidae</i>	<i>Myrmica rubra</i>	soil, plant	ND	arthropods predator	generalist	Brian, 1973
<i>Scorpion-fly</i>						
<i>Panorpidae</i>	<i>Panorpa vulgaris</i> <i>Panorpa germanica</i>	larvae : litter, soil adult : terrestrial biota	ND	arthropod scavenger	generalist	Byers and Thornhill, 1983
<i>Green shield bug</i>						
<i>Pentatomidae</i>	<i>Palomena prasina</i>	plant - <i>Salicaceous</i>	herbivorous	sap-sucking	specialist	Javahery, 1967
<i>Marsh fly</i>						
<i>Sciomyzidae</i>	<i>Trypoptera punctulata</i>	larvae : snail adult : terrestrial habitat	ND	larvae : snail parasitoid adult : scavenger	NA	Barker et al., 2004

Table S2. Mean MeHg concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry wt.) and the MeHg fraction as a percentage of the THg concentration, for soil and nettles (*Urtica dioica*) and for all the investigated insect taxa from the experimental site.

Samples	#	Mean MeHg ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Mean %MeHg
Soil	4	1.8	0.0
<i>Urtica dioica</i>	3	0.3	1.2
Aphididae	1	2.6	25.5
Chironomidae	6	187.5	36.2
Coccinellidae	3	13.5	36.9
Cicadellidae	3	22.2	41.7
Elateridae	4	3581.5	74.2
Formicidae	12	571.8	54.5
Lepidoptera	3	2.4	5.6
Nabidae	7	431.9	65.2
Panorpidae	5	357.1	29.0

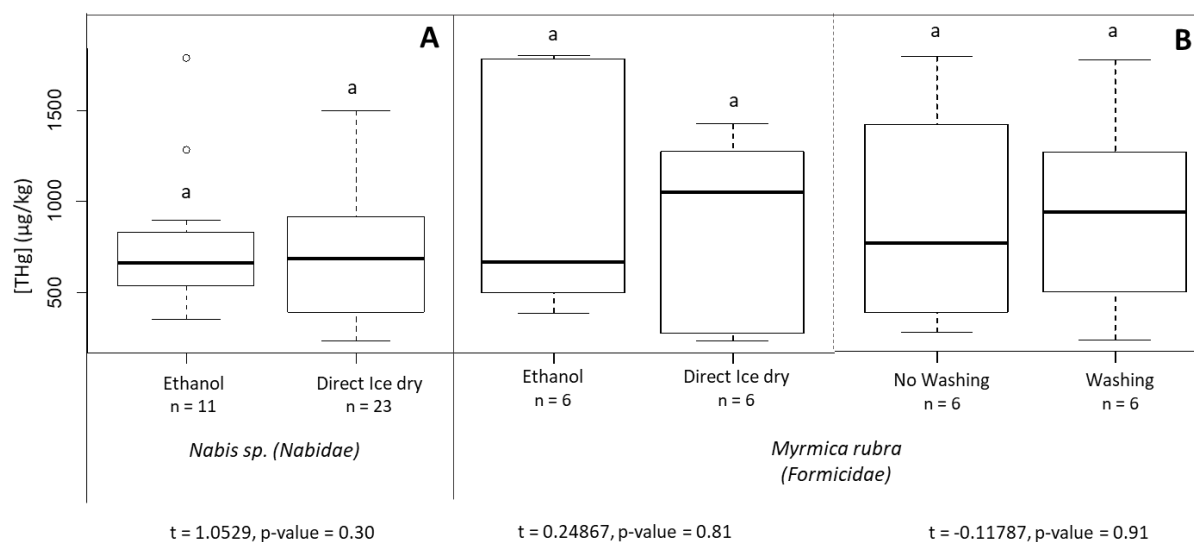


Figure S1. Result from a preliminary tests consisting in the evaluation of the influence of insect conservation methods on the THg concentrations measured in *Nabis sp.* (A) and *Myrmica rubra* (B) conserved in ethanol or directly ice-dried after the collection. Letters indicate results from welch Two sample t-test. The influence of insect conservation methods on the THg concentrations measured was tested on two insect species: *Nabis sp.* and *Myrmica rubra* conserved in ethanol after the collection ( $n = 11$  and  $n = 6$ , respectively) or directly freeze-dried ( $n = 23$  and  $n = 6$ , respectively). Statistical analysis (Supplemental figure 1) showed no significant difference between the two conservation methods for the THg concentrations in the two studied insects ( $t = 1.0529$ ,  $p\text{-value} = 0.30$  for *Nabis sp.* and  $t = 0.24867$ ,  $P = 0.81$  for *Myrmica rubra*).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the funding provided by ADEME, France, under grant No. 1772C0018, PHYTOFIBER Project, and the Fondation de France and ADEME for their financial support to LY under a PhD grant.

## REFERENCES

- (1) Rhee, S.-W. Control of mercury emissions: policies, technologies, and future trends <https://www.dovepress.com/control-of-mercury-emissions-policies-technologies-and-future-trends-peer-reviewed-fulltext-article-EECT> (accessed Apr 8, 2019). <https://doi.org/10.2147/EECT.S73403>.
- (2) Assad, M.; Parelle, J.; Cazaux, D.; Gimbert, F.; Chalot, M.; Tatin-Froux, F. Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 2016, 146, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.103>.
- (3) Stamenkovic, J.; Gustin, M. S. Nonstomatal versus stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43 (5), 1367–1372. <https://doi.org/10.1021/es801583a>.
- (4) Cronk, Q.; Hidalgo, O.; Pellicer, J.; Percy, D.; Leitch, I. Salix transect of Europe: variation in ploidy and genome size in willow-associated common nettle, *Urtica dioica* L. sens. lat., from Greece to arctic Norway. *Biodivers. Data J.* 2016, 4, e10003. <https://doi.org/10.3897/BDJ.4.e10003>.
- (5) Davis, B. N. K. The European distribution of insects on stinging nettles, *Urtica dioica* L.: a field survey. *Bolletino Zool.* 1989, 56 (4), 321–326. <https://doi.org/10.1080/11250008909355658>.
- (6) Alhmedi, A.; Haubruge, E.; Bodson, B.; Francis, F. Aphidophagous guilds on nettle (*Urtica dioica*) strips close to fields of green pea, rape and wheat. *Insect Sci.* 2007, 14 (5), 419–424. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2007.00169.x>.
- (7) Alhmedi, A.; Haubruge, E.; D’Hoedt, S.; Francis, F. Quantitative food webs of herbivore and related beneficial community in non-crop and crop habitats. *Biol. Control* 2011, 58 (2), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.005>.
- (8) James, D. G.; Lauby, G.; Seymour, L.; Buckley, K. Beneficial insects associated with stinging nettle, *Urtica dioica* Linnaeus, in Central Washington state. *Pan-Pac. Entomol.* 2015, 91 (1), 82–90.
- (9) Kidd, K.; Clayden, M.; Jardine, T. Bioaccumulation and biomagnification of mercury through food webs. In *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*; John Wiley & Sons, Ltd, 2011; pp 453–499. <https://doi.org/10.1002/9781118146644.ch14>.
- (10) Rahman, Z.; Singh, V. P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr(VI)), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ. Monit. Assess.* 2019, 191 (7), 419. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7528-7>.
- (11) Nabi, S. Toxic effects of mercury; Springer India, 2014.
- (12) Evers, D. The effects of methylmercury on wildlife: a comprehensive review and approach for interpretation. In *Encyclopedia of the Anthropocene*; Elsevier, 2018; pp 181–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.09985-7>.
- (13) Mahbub, K. R.; Krishnan, K.; Naidu, R.; Andrews, S.; Megharaj, M. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol. Indic.* 2017, 74, 451–462. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.12.004>.
- (14) Abeyasinghe, K. S.; Qiu, G.; Goodale, E.; Anderson, C. W. N.; Bishop, K.; Evers, D. C.; Goodale, M. W.; Hintelmann, H.; Liu, S.; Mammides, C.; Quan, R. C.; Wang, J.; Wu, P.; Xu, X. H.; Yang, X. D.; Feng, X. Mercury flow through an asian rice-based food web. *Environ. Pollut.* 2017, 229, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.067>.
- (15) Rimmer, C. C.; Miller, E. K.; McFarland, K. P.; Taylor, R. J.; Faccio, S. D. Mercury bioaccumulation and trophic transfer in the terrestrial food web of a montane forest. *Ecotoxicology* 2010, 19 (4), 697–709. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0443-x>.
- (16) Ullrich, S. M.; Ilyushchenko, M. A.; Tanton, T. W.; Uskov, G. A. Mercury contamination in the vicinity of a derelict chlor-alkali plant. *Sci. Total Environ.* 2007, 381 (1–3), 290–306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.020>.
- (17) Zhilong, M.; Qiang, W.; Zhongsheng, Z.; Xuehong, Z. Mercury distribution along the food chain of a wetland ecosystem at Sanjiang Plain, Northeast China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2017, 98 (2), 162–166. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-2005-2>.
- (18) Zhang, Z.; Song, X.; Wang, Q.; Lu, X. Mercury bioaccumulation and prediction in terrestrial insects from soil in Huludao City, Northeast China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012, 89 (1), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0649-0>.
- (19) Zhang, Z.-S.; Lu, X.-G.; Wang, Q.-C.; Zheng, D.-M. Mercury, Cadmium and lead biogeochemistry in the soil–plant–insect system in Huludao City. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2009, 83 (2), 255–259. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9688-6>.
- (20) Zheng, D.; Liu, X.; Jin, D.; Li, H.; Li, X. Mercury bioaccumulation in arthropods from typical community habitats in a zinc-smelting area. *Environ. Geochem. Health* 2018, 40 (4), 1329–1337. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-0059-7>.
- (21) Zheng, D.-M.; Wang, Q.-C.; Zhang, Z.-S.; Zheng, N.; Zhang, X.-W. Bioaccumulation of total and methyl mercury by arthropods. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2008, 81 (1), 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9393-x>.

- (22) Martin-Creuzburg, D.; Kowarik, C.; Straile, D. Cross-ecosystem fluxes: export of polyunsaturated fatty acids from aquatic to terrestrial ecosystems *via* emerging insects. *Sci. Total Environ.* 2017, 577, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.156>.
- (23) Blais, J. M.; Macdonald, R. W.; Mackay, D.; Webster, E.; Harvey, C.; Smol, J. P. Biologically mediated transport of contaminants to aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41 (4), 1075–1084. <https://doi.org/10.1021/es061314a>.
- (24) Cristol, D. A.; Brasso, R. L.; Condon, A. M.; Fovargue, R. E.; Friedman, S. L.; Hallinger, K. K.; Monroe, A. P.; White, A. E. The movement of aquatic mercury through terrestrial food webs. *Science* 2008, 320 (5874), 335–335. <https://doi.org/10.1126/science.1154082>.
- (25) Clayden, M. G.; Kidd, K. A.; Chételat, J.; Hall, B. D.; Garcia, E. Environmental, geographic and trophic influences on methylmercury concentrations in macroinvertebrates from lakes and wetlands across Canada. *Ecotoxicology* 2014, 23 (2), 273–284. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1171-9>.
- (26) Buckland-Nicks, A.; Hillier, K. N.; Avery, T. S.; O'Driscoll, N. J. Mercury bioaccumulation in dragonflies (Odonata: Anisoptera): examination of life stages and body regions. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014, 33 (9), 2047–2054. <https://doi.org/10.1002/etc.2653>.
- (27) Baxter, C. V.; Fausch, K. D.; Saunders, W. C. Tangled webs: reciprocal flows of invertebrate prey link streams and riparian zones. *Freshw. Biol.* 2005, 50 (2), 201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01328.x>.
- (28) Akamatsu, F.; Toda, H. Aquatic subsidies transport anthropogenic nitrogen to riparian spiders. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 2011, 159 (5), 1390–1397. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.005>.
- (29) Alberts, J. M.; Sullivan, S. M. P. Factors influencing aquatic-to-terrestrial contaminant transport to terrestrial arthropod consumers in a multiuse river system. *Environ. Pollut.* 2016, 213, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.003>.
- (30) Chaves-Ulloa, R.; Taylor, B. W.; Broadley, H. J.; Cottingham, K. L.; Baer, N. A.; Weathers, K. C.; Ewing, H. A.; Chen, C. Y. Dissolved organic carbon modulates mercury concentrations in insect subsidies from streams to terrestrial consumers. *Ecol. Appl.* 2016, 26 (6), 1771–1784. <https://doi.org/10.1890/15-0025.1>.
- (31) Ortiz, C.; Weiss-Penzias, P. S.; Fork, S.; Flegal, A. R. Total and monomethyl mercury in terrestrial arthropods from the central California coast. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2015, 94 (4), 425–430. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1448-6>.
- (32) Parkman, H.; Meili, M. Mercury in macroinvertebrates from Swedish forest lakes: influence of lake type, habitat, life cycle, and food quality. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1993, 50 (3), 521–534. <https://doi.org/10.1139/f93-061>.
- (33) Zappelini, C.; Karimi, B.; Foulon, J.; Lacercat-Didier, L.; Maillard, F.; Valot, B.; Blaudez, D.; Cazaux, D.; Gilbert, Yergeau, D.; Greer, C.; Chalot, M. Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol. Biochem.* 2015, 90, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.008>.
- (34) Durand, A.; Maillard, F.; Foulon, J.; Gweon, H. S.; Valot, B.; Chalot, M. Environmental metabarcoding reveals contrasting belowground and aboveground fungal communities from poplar at a Hg phytomanagement site. *Microb. Ecol.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0984-0>.
- (35) Giustina, W. della; Bonfils, J.; Le Quesne, W. J. Homoptères Cicadellidae; Faune de France; Institut national de la recherche agronomique: Paris, 1989.
- (36) Péricart, J. Hémiptères Nabidae d'Europe Occidentale et Du Maghreb; Faune de France; Fédération française des sociétés de sciences naturelles: Paris, 1987.
- (37) Maillard, F.; Girardclos, O.; Assad, M.; Zappelini, C.; Pérez Mena, J. M.; Yung, L.; Guyeux, C.; Chrétien, S.; Bigham, G.; Cosio, C.; Chalot, M. Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. *Environ. Res.* 2016, 148, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.034>.
- (38) Liu, B.; Yan, H.; Wang, C.; Li, Q.; Guédron, S.; Spangenberg, J. E.; Feng, X.; Dominik, J. Insights into low fish mercury bioaccumulation in a mercury-contaminated reservoir, Guizhou, China. *Environ. Pollut.* 2012, 160, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.023>.
- (39) Bloom, N. Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapour atomic fluorescence detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1989, 46 (7), 1131–1140. <https://doi.org/10.1139/f89-147>.
- (40) Borgå, K.; Kidd, K. A.; Muir, D. C.; Berglund, O.; Conder, J. M.; Gobas, F. A.; Kucklick, J.; Malm, O.; Powell, D. E. Trophic magnification factors: considerations of ecology, ecosystems, and study design. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2012, 8 (1), 64–84. <https://doi.org/10.1002/ieam.244>.
- (41) Rodenhouse, N. L.; Lowe, W. H.; Gebauer, R. L. E.; McFarland, K. P.; Bank, M. S. Mercury bioaccumulation in temperate forest food webs associated with headwater streams. *Sci. Total Environ.* 2019, 665, 1125–1134. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.151>.
- (42) Sasmaz, M.; Akgül, B.; Yıldırım, D.; Sasmaz, A. Mercury uptake and phytotoxicity in terrestrial plants grown naturally in the Gumuskoy (Kutahya) mining area, Turkey. *Int. J. Phytoremediation* 2016, 18 (1), 69–76. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1058334>.
- (43) He, Z. L.; Yang, X. E.; Stoffella, P. J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2005, 19 (2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>.
- (44) Kabata-Pendias, A. Trace elements in soils and plants, 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, 2011.
- (45) Kabata-Pendias, A.; Mukherjee, A. B. Trace elements from soil to human: With 209 Tables; Springer: Berlin, 2007.

- (46) Meng, B.; Feng, X.; Qiu, G.; Wang, D.; Liang, P.; Li, P.; Shang, L. Inorganic mercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, 31 (9), 2093–2098. <https://doi.org/10.1002/etc.1913>.
- (47) Macnicol, R. D.; Beckett, P. H. T. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil* 1985, 85 (1), 107–129. <https://doi.org/10.1007/BF02197805>.
- (48) Stolpe Nordin, E. Life cycle of *Agriotes* wireworms and their effect in maize cultivation. 2017.
- (49) Byers, G. W.; Thornhill, R. Biology of the Mecoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 1983, 28 (1), 203–228. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001223>.
- (50) Pinder, L. C. V. Biology of freshwater Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* 1986, 31 (1), 1–23.
- (51) Kraus, J. M.; Walters, D. M.; Wesner, J. S.; Stricker, C. A.; Schmidt, T. S.; Zuellig, R. E. Metamorphosis alters contaminants and chemical tracers in insects: implications for food webs. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48 (18), 10957–10965. <https://doi.org/10.1021/es502970b>.
- (52) Beauvais-Flück, R.; Gimbert, F.; Méhault, O.; Cosio, C. Trophic fate of inorganic and methyl-mercury in a macrophyte-chironomid food chain. *J. Hazard. Mater.* 2017, 338, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.028>.
- (53) Beckert, W. F.; Moghissi, A. A.; Au, F. H. F.; Bretthauer, E. W.; Mcfarlane, J. C. Formation of methylmercury in a terrestrial environment. *Nature* 1974, 249 (5458), 674–675. <https://doi.org/10.1038/249674a0>.
- (54) Tsz-Ki Tsui, M.; Liu, S.; Brasso, R. L.; Blum, J. D.; Kwon, S. Y.; Ulus, Y.; Nollet, Y. H.; Balogh, S. J.; Eggert, S. L.; Finlay, J. C. Controls of methylmercury bioaccumulation in forest floor food webs. *Environ. Sci. Technol.* 2019, 53 (5), 2434–2440. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06053>.
- (55) Swanson, D. A Synopsis of the damsel bugs (Heteroptera: Nabidae) of Michigan. *Gt. Lakes Entomol.* 2012, 45, 40–55.
- (56) Gann, G. L.; Powell, C. H.; Chumchal, M. M.; Drenner, R. W. Hg-contaminated terrestrial spiders pose a potential risk to songbirds at Caddo lake (Texas/Louisiana, USA). *Environ. Toxicol. Chem.* 2015, 34 (2), 303–306. <https://doi.org/10.1002/etc.2796>.

#### Supporting information

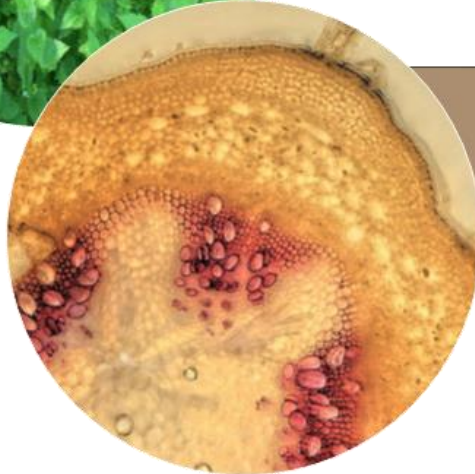
- Baverstock, J.; Porcel, M.; Clark, S. J.; Copeland, J. E.; Pell, J. K. Potential value of the fibre nettle *Urtica dioica* as a resource for the nettle aphid *Microlophium carnosum* and its insect and fungal natural enemies. *BioControl* 2011, 56 (2), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9330-x>.
- Stiling, P. D. Host plant specificity, oviposition behaviour and egg parasitism in some leafhoppers of the genus *Eupteryx* (Hemiptera: Cicadellidae). *Ecol. Entomol.* 1980, 5 (1), 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1980.tb01125.x>.
- Gurney, B.; Hussey, N. W. Evaluation of some coccinellid species for the biological control of aphids in protected cropping. *Ann. Appl. Biol.* 1970, 65 (3), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1970.tb05513.x>.
- Hoffman, A. Coléoptères Curculionidés; Faune de France; Fédération française des sociétés de sciences naturelles: Paris, 1954.
- Koch, R. L. The multicolored asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.* 2003, 3 (32), 1–16. <https://doi.org/10.1673/031.003.3201>.
- Wheeler, A. G. Biology of the plant bugs (Hemiptera: Miridae): pests, predators, opportunists; Cornell University Press, 2001.
- Lattin, J. D. Bionomics of the Nabidae. *Annu. Rev. Entomol.* 1989, 34 (1), 383–400.
- Eyles, A. C. Feeding habits of some Rhyparochrominae (Heteroptera: Lygaeidae) with particular reference to the value of natural foods. *Trans. R. Entomol. Soc. Lond.* 1964, 116 (5), 89–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1964.tb00826.x>.
- Weaver, C. R.; King, D. R. Meadow spittlebug, *Philaenus leucophthalmus* (L.). 1954.
- Urban, J. Occurrence, bionomics and harmfulness of *Crepidodera aurea* (Geoffr.) (Coleoptera, Alticidae). *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 2014, 59 (5), 279–308.
- Armitage, P. D.; Pinder, L. C.; Cranston, P. S. The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges; Springer Science & Business Media, 2012.
- Ioannisiani, T. G.; Biro, A. V.; Lavrova, N. K. Data on the biology of weevils of the genus *Phyllobius* (Coleoptera, Curculionidae). *Zool. Zhurnal* 1970, 49 (3), 384–389.
- Evans, A. C. Observations on the biology and physiology of wireworms of the genus *Agriotes* Esch. *Ann. Appl. Biol.* 1944, 31 (3), 235–250. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1944.tb06733.x>.
- Brian, M. V. Feeding and growth in the ant *Myrmica*. *J. Anim. Ecol.* 1973, 42 (1), 37–53. <https://doi.org/10.2307/3405>.
- Byers, G. W.; Thornhill, R. Biology of the Mecoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 1983, 28 (1), 203–228. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001223>.
- Javahery, M. The biology of some Pentatomoidea and their egg-parasites. 1967.
- Barker, G. M.; Knutson, L.; Vala, J. C.; Coupland, J. B.; Barnes, J. K. Overview of the biology of marsh flies (Diptera: Sciomyzidae), with special reference to predators and parasitoids of terrestrial gastropods. In *Natural enemies of terrestrial molluscs*; Barker, G. M., Ed.; CABI: Wallingford, 2004; pp 159–225. <https://doi.org/10.1079/9780851993195.0159>.

# CHAPITRE 4

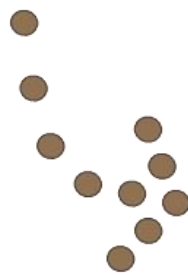
*Potentiel de valorisation de l'ortie issue de friches industrielles contaminées par les ETM*



Projet de thèse



PHYTOFIBER





## 4.1 Préambule

Ce chapitre concerne une partie plus appliquée de ces travaux de thèse, avec notamment une dimension économique liée au potentiel de valorisation des biomasses produites à partir de l'agrosystème étudié. Ces aspects ont été développés dans le cadre du projet PHYTOFIBER soutenu par l'ADEME regroupant différentes équipes de recherche et des industriels. Cette section présente ainsi le contexte et la démarche de création du projet. Dans ce projet l'essentiel de mon travail a consisté à évaluer les teneurs en ETM des végétaux considérés, leur productivité sur les parcelles Tavaux et Fresnes-sur-Escaut et à participer à la conception et la mise en place d'un nouveau dispositif expérimental visant à optimiser la production d'ortie.

*Ces travaux ont donné lieu à un article accepté dans le journal *Industrial Crops and Products* dans lequel j'apparais en tant que deuxième auteur et à une communication orale que j'ai présentée au congrès SETAC Europe 2019 à Helsinki.*

## 4.2 Contexte

Alors que la valorisation du peuplier cultivé sur des sites contaminés est bien connue et maîtrisée, l'ortie n'a jamais été étudiée dans un tel contexte. Nous avons toutefois montré dans la synthèse bibliographique (section 1.4.9) que l'ortie présente un vaste potentiel de valorisation. En effet, les différentes parties de l'ortie peuvent être utilisées pour de nombreuses filières (*e.g.* médical, cosmétique, alimentaire, etc.). Toutefois la plupart de ces filières ne sont pas cohérentes avec des orties provenant de sites contaminés. Ainsi, très rapidement, le choix de la valorisation s'est dirigé vers l'utilisation de la fibre d'ortie pour la fabrication de matériaux composites biosourcés, plus cohérente avec l'origine de l'ortie. Toutefois l'utilisation des fibres d'ortie pour la fabrication de matériaux composites, bien que souvent évoquée, n'a été que très peu étudiée. Les quelques travaux scientifiques récents s'intéressant à son potentiel de valorisation s'accordent sur les nombreux verrous techniques et scientifique empêchant l'utilisation de l'ortie à une échelle industrielle (section 1.4.9).

## 4.3 Démarche

Les dosages de métaux dans les différents compartiments de l'ortie récoltée sur les deux sites étudiés ont été effectués par ICP-AES. Dans la mesure où nous n'avons pas les compétences nécessaires pour aborder les aspects liés à l'extraction des fibres de la tige de l'ortie, l'étude de leur comportement mécanique, la fabrication et l'évaluation des performances des matériaux composites fabriqués avec ces mêmes fibres, des collaborations ont été établies et structurées dans le cadre du projet PHYTOFIBER présenté dans la section qui suit.



## 4.4 Le projet PHYTOFIBER

Le projet PHYTOFIBER a été initié au cours de ma première année de doctorat et repose sur les acquis obtenus pendant ces premiers mois, durant lesquels nous nous sommes intéressés à l'ortie de manière à mieux comprendre sa présence dans les dispositifs de phytomanagement étudiés. Mon travail de thèse constitue un des lots du projet PHYTOFIBER et porte davantage sur des questions de recherche fondamentale liées au fonctionnement de l'agrosystème peuplier-ortie. Le projet PHYTOFIBER, en plus d'intégrer ce volet, s'intéresse de manière plus détaillée au caractère valorisable de la biomasse issue de cet agrosystème et de sa viabilité pour une filière de valorisation innovante. A travers différents lots de ce projet j'ai eu l'opportunité de participer à des activités plus appliquées telles que la coupe et la récolte des orties ou encore participer à la mise en place d'un dispositif expérimental en 2018.

Le projet PHYTOFIBER est un projet national débuté en août 2017 et prévu pour une durée de 36 mois. Il est lauréat de l'appel à projet GRAINE édition 2016 (Gérer, produire et valoriser les biomasses : une bioéconomie au service de la transition écologique et énergétique) proposé par l'ADEME. Ce projet est coordonné par le pôle technologique InTechFibres du centre technique industriel FCBA et intègre comme partenaires le LCE, l'équipe de recherche T2DC (Tenue aux Dommages et Durabilité des (Bio)Composites) de l'institut FEMTO-ST et l'entreprise Unilin SAS.

L'objectif général de PHYTOFIBER est le déploiement d'une filière de valorisation de biomasses issues de sols pollués, axée sur la production de produits manufacturés à base de fibres végétales. Il s'appuie sur les dispositifs de phytomanagement en cours et gérés par le LCE pour l'approvisionnement en fibres ligneuses et herbacées. La structuration du projet PHYTOFIBER est détaillée dans la figure Figure 41 ci-dessous. Le projet comprend 2 lots techniques, un lot dédié à l'étude technico-économique et un lot dédié à la coordination et à la dissémination, comme détaillé ci-dessous.

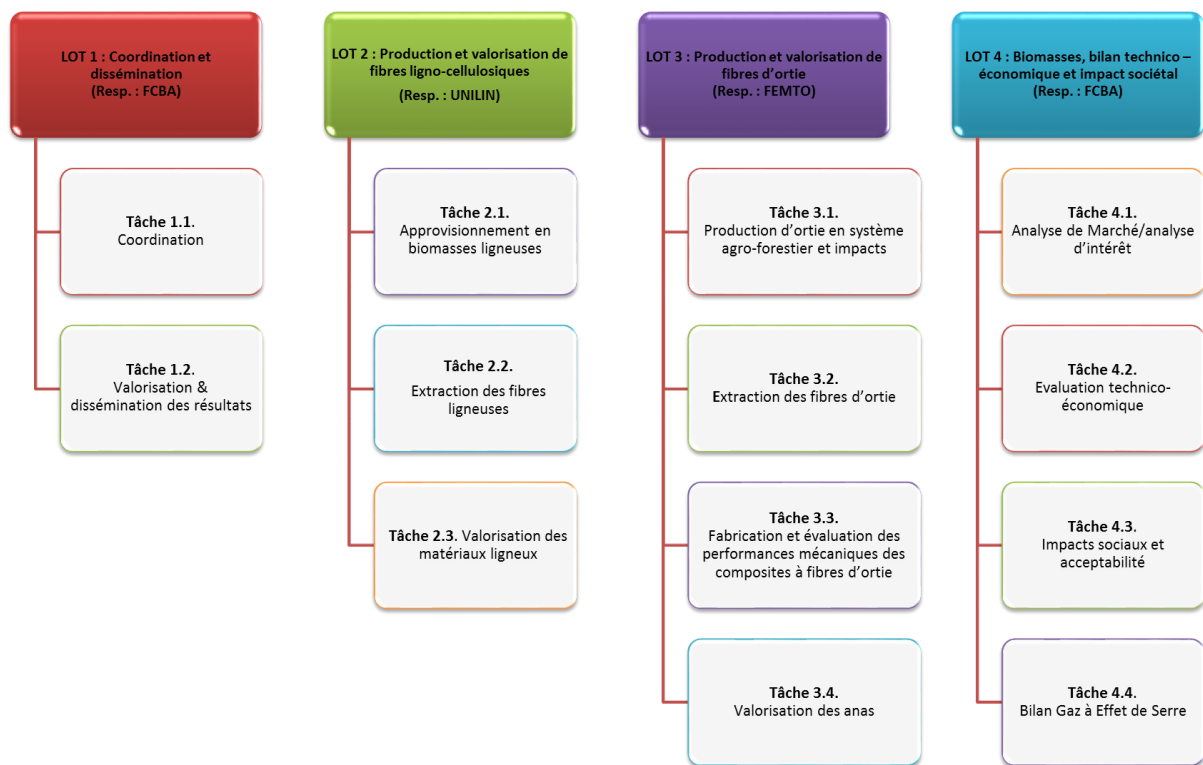


Figure 41. Structuration du projet PHYTOFIBER selon 4 lots et présentation des tâches associées à chacun d'eux

La première valorisation considérée concerne les fibres lignocellulosiques issues de matrices ligneuses et de plantes annuelles. A partir des arbres issus des parcelles contaminées, plusieurs solutions de valorisation, déjà existantes et utilisatrices de bois de trituration, sont considérées. Les panneaux à base de bois et les pâtes pour papier obtenues à partir des procédés les plus répandus, sont les applications envisagés pour les fibres lignocellulosiques au travers l'expérience de FCBA et un partenariat fort avec le groupe UNILIN. De plus, une valorisation des molécules présentes dans les écorces, ou mobilisables dans le bois avant transformation est également à l'étude. Les produits manufacturés ou extraits sont prévus pour favoriser l'économie de proximité, compléter les besoins en bois forestier, stocker le carbone et diversifier les sources d'approvisionnement en bois de trituration des usines.

La deuxième valorisation considérée dans PHYTOFIBER est l'exploitation de l'ortie, présente en masse sur les parcelles de phytomanagement et dont le potentiel de valorisation est peu maîtrisé. Ainsi, des bio-composites produits à partir de fibres cellulose issues de l'ortie, au travers l'expérience de FEMTO-ST, sont en cours d'élaboration. Cet aspect relatif à l'intérêt des fibres d'ortie indigène a fait l'objet d'une publication, présentée dans la section suivante.

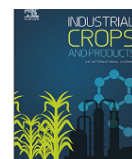
## 4.5 Présentation de l'article et des principaux résultats



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

**Industrial Crops & Products**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)



### Native stinging nettle (*Urtica dioica* L.) growing spontaneously under short rotation coppice for phytomanagement of trace element contaminated soils: Fibre yield, processability and quality

Thomas Jeannin<sup>a</sup>, Loïc Yung<sup>b</sup>, Philippe Evon<sup>c</sup>, Laurent Labonne<sup>c</sup>, Pierre Ouagne<sup>d</sup>, Michael Lecourt<sup>e</sup>, David Cazaux<sup>f</sup>, Michel Chalot<sup>b</sup>, Vincent Placet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> FEMTO-ST Institute, UFC/CNRS/ENSMM/UTBM, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

<sup>b</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS/UFC, Université Bourgogne Franche-Comté, Montbéliard, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA), INP-ENSIACET, Toulouse, France

<sup>d</sup> Laboratoire Génie de Production (LGP), Université de Toulouse-ENIT, Tarbes, France

<sup>e</sup> InTechFibres Division, FCBA, Grenoble, France

<sup>f</sup> Inovyn, Tavaux, France

Cet article, intitulé “Native stinging nettle (*Urtica dioica* L.) growing spontaneously under short rotation coppice for phytomanagement of trace element contaminated soils: fibre yield, processability and ”, a été accepté dans le journal *Industrial Crops & Products* le 20/11/2019. Il est le fruit d'une collaboration avec les partenaires impliqués dans le projet PHYTOFIBER.

L'objectif de ces travaux consistait à appréhender le potentiel de valorisation de la fibre d'ortie indigène se développant spontanément sous les peupliers des sites de Fresnes-sur-Escaut et de Tavaux, pour des applications dans le secteur industriel des biomatériaux. Pour se faire, différents paramètres ont été évalués tels que i) les concentrations en ETM dans les compartiments valorisables, ii) le contenu en fibre et ses propriétés mécaniques, traduisant leur qualité pour les applications retenues et iii) les rendements de l'ortie produite sous les deux dispositifs de phytomanagement. J'ai principalement contribué à cet article par le dosage des ETMs dans les différents compartiments de l'ortie, et notamment dans les fibres que j'ai pu isoler par différents broyages successifs. Enfin, accompagné de l'équipe de Femto, j'ai participé à la récolte de l'ortie à Tavaux et à Fresnes-sur-Escaut, ce qui nous a permis d'évaluer les rendements par la même occasion. Les résultats des dosages d'ETM confirment la possibilité d'utiliser l'ortie issue de sites de phytomanagement pour des applications matériaux. De plus, des propriétés mécaniques particulièrement prometteuses ont été confirmées. Les rendements restent toutefois bien en dessous de ce qu'il est possible d'obtenir dans le cadre de pratiques agronomiques courantes.

# **Native stinging nettle (*Urtica dioica* L.) growing spontaneously under short rotation coppice for phytomanagement of trace element contaminated soils: fibre yield, processability and quality**

Thomas Jeannin<sup>1</sup>, Loïc Yung<sup>2</sup>, Philippe Evon<sup>3</sup>, Laurent Labonne<sup>3</sup>, Pierre Ouagne<sup>4</sup>,  
Michael Lecourt<sup>5</sup>, David Cazaux<sup>6</sup>, Michel Chalot<sup>2</sup>, Vincent Placet<sup>1</sup>(\*)

<sup>1</sup> FEMTO-ST Institute, UFC/CNRS/ENSMM/UTBM, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

<sup>2</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS/UFC, Université Bourgogne Franche-Comté, Montbéliard, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA), INP-ENSIACET, Toulouse, France

<sup>4</sup> Laboratoire Génie de Production (LCP), Université de Toulouse-ENIT, Tarbes, France

<sup>5</sup> InTechFibres division, FCBA, Grenoble, France

<sup>6</sup> Inovyn, Tavaux, France

**Key words:** Nettle fibre, phytomanagement, contaminated soils, fibre yield, tensile properties

## **ABSTRACT**

This work assesses the potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) growing on trace element contaminated soils to produce fibres for material applications. The nettles studied in this work grew spontaneously and dominated the vegetation cover in poplar short rotation coppices planted for the phytomanagement of lands contaminated by trace elements. Two sites were studied, contaminated by Hg for the first one and a mix of As, Cd, Pb and Zn for the second one. Results show that, for the considered soils, the contaminant contents in nettle bast fibres were at low levels, comparable to those collected at unpolluted control areas. It makes it possible to consider this biomass for material use. The measured matter yield was lower than those obtained with traditional fibre crops cultivated in Europe on agricultural lands. However, the tensile properties of the bast fibres mechanically extracted without field retting or prior alkaline treatment were equal to or better than those of industrial hemp and flax, making spontaneous nettles an interesting supplement to traditional European fibre crops for material applications.

## INTRODUCTION

Environmental contamination is a threat to global sustainable development. The United Nations (UN) Sustainable Development Goals (SDGs) have a strong focus on reducing and managing environmental pollution. Among the various soil phytoremediation options, phytostabilisation is a sustainable and profitable use of marginalized lands (Pilon-Smits, 2005) that can remediate soil layers in contact with the roots and at the same time provide tree biomass (Robinson et al., 2006), which can be used to reach the targets for the use of renewable energy sources (Ciadamidaro et al., 2017; Mench et al., 2010). It creates value from contaminated land while minimising environmental risks and even rendering ecosystemic services by promoting biodiversity, improving the carbon storage and limiting soil erosion. Interestingly, it has been observed simultaneous growth of poplars under short rotation coppice (SRC) cropping systems and spontaneous dioecious nettle in phytomanaged land sites, thus constituting a multilevel canopy. Biomass from nettle could be used to extend the productivity of the marginal land from SRC alone, whilst still maintaining a functioning phytomanagement system of land rehabilitation. This nettle biomass could constitute a relevant fibre source and thus contribute to answer the increasing demand in plant fibres for material application, by mitigating at the same time the land-use conflict between the needs of food and non-food production. Indeed, recent literature underlines that the use of marginal land is a sustainable method to expand purpose-grown biomass and essential for meeting the emerging massive requirement for biomass in the future (Mohanty et al., 2018).

*Urtica dioica* L., often called common nettle or stinging nettle, is a herbaceous perennial flowering plant in the family Urticaceae, living up to 10 to 15 years and growing up to 2 m in height (Gravis, 1885). Each stem is formed of a succession of nodes and internodes containing bast fibres in the bark. At each node, two opposite leaves and four cauline stipules are inserted. As for all the fibre crops, the fibre features depend on the living conditions, the plant maturity, the position in the stem (Gravis, 1885). The morphological features of nettle bast fibres were accurately characterised in historical and encyclopaedic works (Gravis, 1885; Vétillart, 1876) and more recently in the scientific literature (Di Virgilio, 2013). The fibres, in limited amount, are distributed in small numbers in the parenchyma in an irregular manner. Most of the fibres are oval in shape, with a diameter generally comprised between 20 and 40  $\mu\text{m}$ . They have a relatively thin wall and thus a very large inner cavity. The fibre wall is mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin, in amount generally comprised in the following ranges 53-86, 4-12.5 and 2-10% respectively, depending on the plant age, maturity, growing and processing conditions (Bacci et al., 2010; Di Virgilio, 2013; Di Virgilio et al., 2015). When nettle is cultivated, dry stalk yields could be comprised between 3 and 12  $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$  (Bacci et al., 2009; Dreyer et al., 1996; Vogl and Hartl, 2003). As the two other European fibre crops (flax and hemp), nettle (*Urtica dioica* L) has a long history as a textile fibre and its potential as reinforcement fibres in composite applications was also investigated more recently (Bacci et al., 2010; Di Virgilio et al., 2015; Dreyer et al., 2002; Franck, 2005; Harwood and Edom, 2012; Vogl and Hartl, 2003). Indeed, its bast fibres have remarkable tensile strength and fineness, along with a low density. Average tensile strength and rigidity up to 1600 MPa and 90 GPa have been reported in literature (Bodros and Baley, 2008; Davies and Bruce, 1998; Lanzilao et al., 2016). The stalks and shives can also be used to manufacture fibreboards (Akgül, 2013). As underlined by Di Virgilio et al., (2015), despite a high market potential, the products made from nettle are currently more a result of curiosity rather large-scale industrial production, mostly due to lack in crop and post-harvest management.

The present study is part of a wider research project, which main objective is the multi-purpose valorisation of wood and plant fibres produced on marginal lands, and focused more precisely on the phytomanagement of trace element (TE) contaminated lands. It aims at investigating the potentialities of nettle fibres growing spontaneously under SRC grown poplar at two phytomanagement sites, for material application. Hg is the main contaminant at the first site due to the chlor-alkali process (Durand et al., 2017), whereas As, Cd, Pb and Zn are the main

contaminants at the second site due to contamination of deposit sediments from the canal Escaut. (Ciadamidaro et al., 2017). This work addresses several issues such as the potential accumulation of TE in the bast fibres. The potential influence of contamination on the plant and fibre yields and on the physical properties of the bast fibres are also studied by comparing the data obtained on the contaminated sites to data from literature collected on non-contaminated soils. Regarding TE accumulation in plants, previous studies (revealed that nettle is a poor TE accumulating specie when grown on contaminated soils, as compared to woody accumulating or hyperaccumulating species (Phanthavongsa et al., 2017). Indeed, in our previous work, Zn and Cu contents in nettle leaves collected at a sediment landfill were within physiological ranges (<100 mg/kg DWt for Zn and <10 mg/kg DWt for Cu), and Cd content was < 10 mg/kg DWt) (Phanthavongsa et al., 2017; Codling and Rutto, 2014; Tack and Verloo, 1996). However, there is no clear conclusion regarding the content in stems and bast fibres. For other fibre crops, such hemp, it was previously demonstrated that bast fibres and shives were not affected by TE contamination (Linger et al., 2002). The fibre features (fineness, strength) were also not altered by the contamination making this type of crop a relevant candidate for phytostabilisation option.

## MATERIALS AND METHODS

### Site description

The experimental sites are located in Tavaux (France, Bourgogne Franche Comté region, lat. 47° 5' 5.98'' N, 5° 19' 44.0322'' E) and Fresnes-sur-Escaut (France, Hauts-de-France region, lat. 50° 25' 4'' N, 3° 35' '' E). Briefly, the Tavaux site (S1)(Fig.2-S1) investigated in the present study was exploited from the 1950s to 2003 as a storage area for sediments originated from effluents produced during the electrolytic processes associated with a Hg cell chlor-alkali activity.

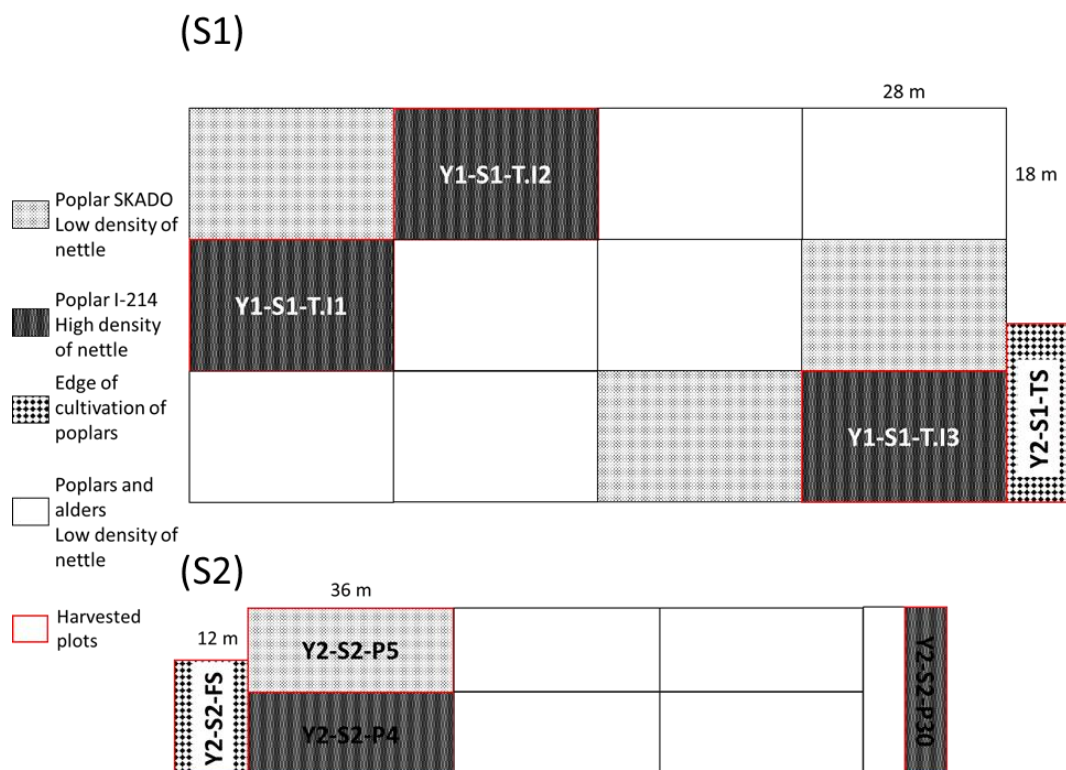


Figure 2: Experimental designs at the two phytomanaged field sites, Tavaux (S1) and Fresnes-sur-Escaut (S2). The sampled plots are in dark grey (I214 plots) and light grey (Skado), on which nettles

were collected. Full description of the sites is provided in (Phanthavongsa et al., 2017). Nettles were also collected in the edge of the poplar plots.

The Fresnes-sur-Escaut (S2)(Fig.1) site was a deposit site of sediments from the canal Escaut. Due to transport of metal ores in the past, sediments were contaminated by TE such as Cd, Zn, As and Pb. Soils at both sites differed in their composition.

Table 1: Main meteorological conditions during the growth period at the two sites.

	S1-Y1	S1-Y2	S2-Y1	S2-Y2
Annual average temperature (°C)	11.9	13.1	10.8	11.3
Total annual sunshine (h)	2068	2122	1290	1699
Total annual rainfall (mm)	758	718	543	632

The full description of the Tavaux and Fresnes-sur-Escaut sites and soils are provided in (Durand et al., 2017) and (Ciadamidaro et al., 2017), respectively. The main meteorological parameters during the growth period at the two sites are summarized in table 1. At both sites, nettle grew spontaneously under the woody cover (Fig. 1).



Figure 1: Photograph of stinging nettle growing spontaneously and in a prevalent manner under short rotation coppice for phytomanagement of trace elements contaminated soils.

Two other uncontaminated site (control) were used as reference to compare contamination values. The control site in France is a natural area located at Courcelle-les-Montbéliard, 140 km east of the site S1, not directly influenced by the point-source. Yung et al., (2019) gives a description of this site. The other control site is located in Belgium at Ghent region at 120 km north-east of the site S2. A description of this site is given in Tack and Verloo, (1996).

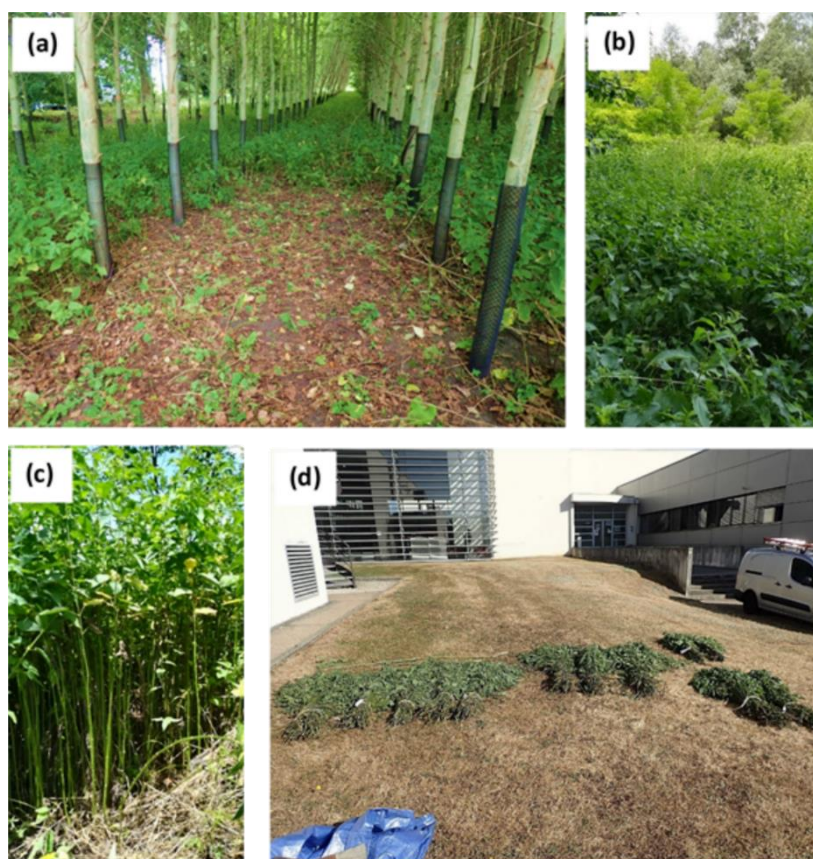
### Experimental design

Within the BIOFILTREE project (Ciadamidaro et al., 2017), four type of field plots were set-up in March (S2) and April (S1) 2011. The four type of plots consisted in i) poplar (Skado clone) monocultures, ii) poplar (I214 clone) monocultures, iii) Skado-alder associations, iv) I214-alder associations, with or without inoculation. Only the poplar monocultures have been considered in the present study. On the two sites, non rooted poplar cuttings (1.5 m length) of the clones Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* section *Tacahamaca*) and I214 (*P. deltoides* x *P. nigra* section

*Aigeiros*) were used, with a final tree density of 2.200 plants.ha<sup>-1</sup>, each plot therefore having a surface of 28 x 18 m for S1 and 36 x 12 m for S2. Both clones were selected for their growth yield and low leaf TE accumulation capacities, from the previous clonal field trial PHYTOPOP (Pottier et al., 2015). Figure 2 represents the implantation of the two described sites. Full description of the sites is provided in (Phanthavongsa et al., 2017).

### ***Nettle harvesting***

During the first year (Y1), half of each plot area (approximately 250 m<sup>2</sup>) was harvested for three selected plots (T.I1, T.I2 and T.I3) on S1 (Fig. 2, Fig.3a, b and c) on the 28th of September 2017. The second year (Y2), an area of 50 m<sup>2</sup> was harvested in the plot TS of S1 on the 8th of June 2018, and an area of 156 m<sup>2</sup> in the plots FS, P4, P5 and P30 on S2 on the 18th of July 2018. The harvesting strategy was mainly driven by observations of the nettle development as well as the competing species. At each harvest, stems were cut at soil level using scythes and shears. The aerial parts of the cut plants were then immediately picked up by hand and baled, without prior field retting. The stems were kept aligned in the bundles (Fig. 3d). The bundles were picked up the same day and stored in indoor spaces for a minimal period of 3 months.



*Figure 3: Photograph the plots and the crops. (a) Plot No. Y1-S1-T.I3 after harvest, (b ,c) Nettles in the plot No. Y1-S2-TS, at the wood-edge, and (d) Crop of Y2-S2-(FS, P4, P5, P30).*

### ***Fresh and dry matter yields***

The nettle bales were weighed in the field just after harvesting to determine the mass of fresh plant materials ( $M_{\text{fresh}}$ ), and then weighed again after air-drying (at least 4 months of conditioning in indoor spaces) to determine the mass of dried plant materials ( $M_{\text{dry}}$ ). The leaves were then manually picked off. The remaining stems were further weighed to determine the mass of dried stems ( $M_{\text{stem}}$ ). The yields were then estimated by calculating the ratio between the masses



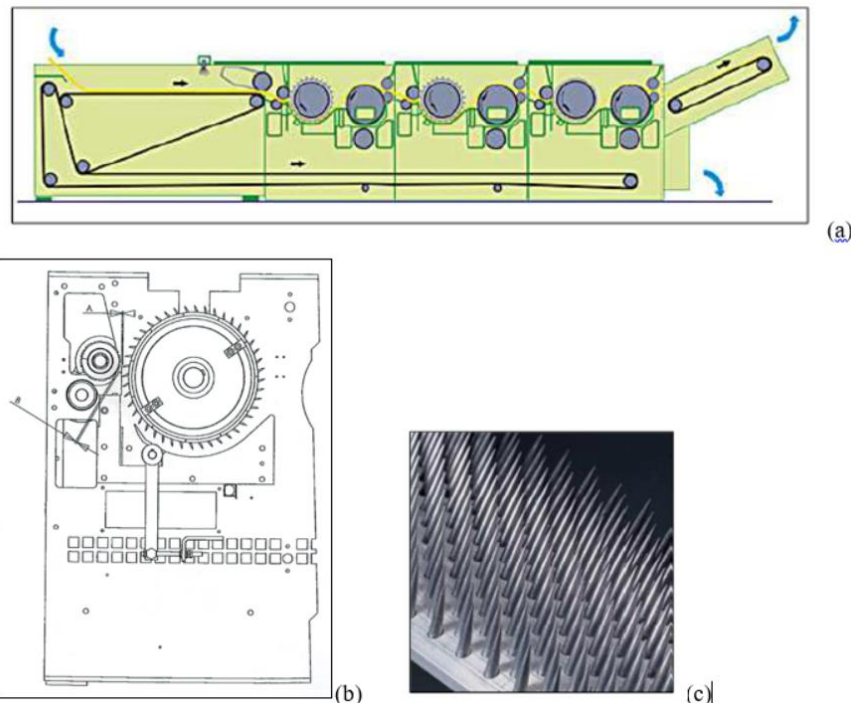
and the plot areas. The yields in fresh matter, dry matter and dry stems are noted  $\eta_{\text{fresh}}$ ,  $\eta_{\text{dry}}$ ,  $\eta_{\text{stem}}$ , respectively.

### ***Stem length and diameter***

Stems were analysed in terms of dimensions by selecting randomly 30 stems in each harvested batch. Stem diameters were measured for each stem in three positions along the stem height (top, middle and base parts of the stem) using a calliper with a precision to 0.01 mm. For each position, two measurements were done according to the two main directions of the transversal cross-section area. The average diameter for this position was then calculated from these two measurements. The mean diameters measured in these respective positions are noted  $D_{\text{top}}$ ,  $D_{\text{mid}}$ ,  $D_{\text{low}}$ . The length ( $L$ ) was measured using a graduated steel rule with a precision of 0.1 cm.

### ***Stalks processing and fibre extraction***

The stems of the Y2-S1 batch were mechanical processed using a Laroche (France) Cadette 1000 “all fibre” extraction device. This machine is a three-drum opener with a 1000 mm wide feed belt (Fig. 4a). At the entrance of each of the three modules, the feeding of the fibrous material was provided by a pair of rolls, one smooth and the other grooved (made of rubber) (Fig. 4b). Then, each module was equipped with a cylinder with nails, i.e. the extracting roller (or fibre extraction roller) (Fig. 4c). Its distance from the metal trough located at the module inlet is adjustable (distance A in Fig. 4b), as well as its rotational speed (from 750 to 1800 rpm). Under the extracting roller, a trap door allowed the evacuation of shives by gravity. The trap door opening is also adjustable and, for this study, it was set at its maximum to favour the shives removal. At the end of the module, there was also a perforated cylinder at which ventilation was applied. The latter had three distinct functions: (i) the de-dusting of the material, (ii) the formation of the fibre lap, and (iii) its transfer to the next module or the outlet. Each de-dusting fan was equipped with a motor having a 2865 rpm maximum rotation speed.



*Figure 4: Laroche (France) Cadette 1000 “all fibre” extraction device used in this study (from Laroche company website). (a) Material path along the opener (in yellow on the drawing), from the feed belt (left) to the exit belt (right). (b) Detailed view (from left to right) of the pair of rolls needed for feeding (smooth roll down and grooved roll up), and the fibre extraction roller (cylinder equipped with nails), all three located at the module inlet. (c) Photograph of the nails of the extracting roller in module 1.*

During the experiments, the operating parameters used were inspired by two previous studies dealing with the mechanical extraction of technical fibres from oleaginous flax (Ouagne et al., 2017) and hemp (Grégoire et al., 2019) straws, respectively. From modules 1 to 3, distance A were 1.9 mm, 1.4 mm and 1.1 mm, respectively. The inlet flow rates of nettle stems were approximately 125 kg/h, corresponding to a 2.5 m/min feed belt speed. The transmission speed of the lap from module 1 to module 2 was 2.2 m/min, and it was 2.1 m/min from module 2 to module 3. Finally, a 1.7 m/min speed was used for the output belt. In each of the three modules, a 750 rpm rotation speed was chosen for the extracting roller. Looking at the de-dusting fans, the rotation speed of the motor was 1500 rpm for module 1, and 2000 rpm for the next two modules. Since the nettle straws were not field retted, three different conditionings before processing were tested to evaluate their influence on the nettle fibre yield and quality. Prior to these treatments, the straws were stored during 3 months.

- Condition 1 (C1): as-received. The nettle straw was processed as-received after the 3 months of storage. Its average moisture content was approximately 10.4%.

- Condition 2 (C2): moistened. The nettle straw was sprayed with water to re-moisturise the matter (during 15 hours). Its average moisture content was thus approximately 22.0%.

- Condition 3 (C3): soda treatment. The nettle straw was immersed for 2 h and at 60 °C in a soda solution (2%) and then thoroughly rinsed with water until reaching a pH value comprised between 7 and 8. The nettle straw was then oven-dried inside a ventilated oven at 50 °C and during 16 h. The moisture content before mechanical processing was 16.5%.

After the mechanical processing step, the fractions of the resulting matters were determined. These matters were divided into three categories: a fibre lap containing the extracted bast fibres, shives and dust. The content of impurities inside the fibre lap (*i.e.* remaining shives and dust) was also evaluated. Indeed, the lap collected at the outlet of the “all fibre” extraction device consisted not only in bast fibres but also in some remaining shives and dust, both trapped inside the lap. From each of the three generated laps, a 50 g sample was collected to determine the content of impurities inside the lap, and thus the real bast fibre content. A mechanical sieving was performed on the lap sample for 5 min in order to drop shives and dust. Then, the residual shives that remained trapped were collected manually. Moisture content of the fibrous materials at the inlet of the “all fibre” extraction device and out of the process was determined according to standard ISO 665:2000.

### ***Fibre diameter***

In order to characterize the morphology of the bast fibres and determine their diameters, fresh transverse cross-sections were cut from the stems using razor blades at different locations and different development and maturity stages. Cytochemical staining of lignin was achieved on sections using the Wiesner reagent (phloroglucinol-HCl) that colored lignin into purple-red and assist in the definition of the fibre wall outlines. The observations were made on a microscope Keyence VHX 5000 series with a magnification of 20.

### ***Single fibre tensile properties***

Single fibre tensile tests were performed on nettle fibres isolated by hand from the batch Y2-TS and Y2-FS, and from the mechanically processed batch Y2-TS. The fibres were first glued on a paper frame and then examined using an optical microscope to determine their external width. The average width of each fibre was computed by obtaining ten measurements equally spaced along its length. A Bose Electroforce 3230 machine was used to perform the monotonic tensile tests up to failure. The paper frame supporting each fibre was clamped onto the testing machine and then cut prior to the beginning of each test. The clamping length was 10 mm. Fibres were tested at a constant crosshead displacement rate of 0.01 mm.s<sup>-1</sup>. The applied force was measured with a load sensor of 22 N with a resolution of approximately 10 mN, and the displacement was measured using an LVDT with a resolution of approximately 0.5 µm. The sample elongation and the load were

recorded continuously. The strain was calculated as the elongation divided by the initial fibre length, taking into account the compliance of the loading frame.

The effective cross-section was determined using the mean external width, assuming that the fibre was perfectly cylindrical and the lumen area neglected. The stress was calculated using the applied force and the evaluated initial cross-section mean value of the fibre. The variation of the cross-section during the tensile loading was neglected. The tensile strength ( $\sigma_R$ ) and the strain at failure ( $\epsilon_R$ ) were determined, and the apparent tangent modulus of rigidity ( $E$ ) was computed on a strain range comprised between 0.2% and the strain at failure. During the fibre preparation, and using only optical microscopy, it is sometimes difficult to discriminate single fibres against small bundle of fibres. As a result, some small bundles of nettle fibres were also tested. This can be easily detected on the shape of the resulting stress-strain curve. In a strain-controlled situation, the force drops abruptly when an individual fibre breaks. Thus, a criterion was introduced to identify during the data processing fibre bundles. This one is based on the detection of sudden stress drop (set at 5 MPa) between two successive measure points.

### ***Determination of TE content***

Before analyses, dried nettle stems and leaves from S1 and S2 and non contaminated soil (control) were separated, air-dried and ground into a homogenous powder in a Mixer Mill, for 4 min at 30 Hz and 7 min at 30 Hz for leaves and stems, respectively. We also isolated nettle fibres for Hg analysis. Cd, Cu, Hg, Pb and Zn concentrations were measured in the soil and different parts of nettles. Soil samples were ice-dried and sieved (0.2 mm particle size). The total element concentrations (Al, Cd, Fe, Mn, Pb, S, Zn) in the soil from S1, S2 and control were measured following the acid digestion of 500 mg of sample (DigiPREP system, SCP Sciences, Courtaboeuf, France) using a mix of 2 mL of 67% nitric acid, 6 mL of 34% hydrochloric acid and 2 mL of 48% hydrofluoric acid (Ciadamidaro et al., 2017).  $\text{CaCl}_2$ -extractable fractions of TE were determined in soil samples after shaking 2.5g of dried soil in 25 ml of a 0.01 M solution of  $\text{CaCl}_2$  during 3 hr ( $140 \text{ g} / \text{min}^{-1}$ ) (Houba et al., 1996). The soil mixtures were filtered on filtration units at  $0.45 \mu\text{m}$  (Millipore). Eluates were acidified to a  $\text{pH} < 2$  for preservation. TE in plant and soil samples were analysed using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Thermo Fischer Scientific, Inc., Pittsburgh, USA). Hg was measured using the atomic absorption spectrophotometry AMA-254 cold vapor atomic absorption (CV-AAS) Hg analyser (Altec Co., Czech Republic), using standard conditions (45 s drying, 150 sheating, 45 s cooling) and the certified reference material (CRM), i.e. Oriental Basma Tobacco leaves (INCT-OBTL-5). All the results are expressed as  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of the dry weight (DW).

### ***Statistical analysis***

The dimensional and mechanical data presented in this paper are the mean values, standard deviations and the parameters of a log-normal distribution law identified by inverse method. The best distribution function for each property was identified using the EasyFit software by minimising the criterion of distances from the distribution diagram. The distribution functions were selected among the classical ones. The log-normal distribution ( $\text{LogN}(\mu, \lambda)$ ) (Eq. 1) was found to be more realistic and is preferred to the other distributions. This distribution is a two-parameter family of continuous probability distributions.  $\mu$  and  $\lambda$  are the expectation and standard deviation of  $x$  and  $\ln(x)$ , respectively.

$$\text{LogN}(\mu, \lambda): f(x) = \frac{1}{x} \frac{1}{\lambda \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{\ln(x) - \mu}{\lambda} \right)^2} \quad (1)$$

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Trace element content of soils and harvested biomasses*

The Fresnes-sur-Escaut soil was highly contaminated by Cd, Pb and Zn, and Cu to a lesser extent, which confirms our previous studies (Ciadamidaro et al., 2017; Phanthavongsa et al., 2017). However the nature of the soil rendered these TE poorly available, with CaCl<sub>2</sub> extractable fraction represented 0.2, 0.4, 0.02 and 0.04% of the total fraction for Cd, Cu, Pb and Zn, respectively (Table 2). Cu, Zn and Pb contents in nettle collected at the Fresnes-sur-Escaut site ranged within physiological levels (Kabata-Pendias, 2011; Kalra et al., 1998), and did not significantly differed between tissues (Table 2). Cd contents in the various nettle tissues were within the ranges found in plants grown in agricultural soils, and always much lower than Cd concentrations measured in poplar or salix leaves (from 2 to 14 mg/kg DW) collected at the same site (Phanthavongsa et al., 2017). Additionally, the TE concentrations in nettle found in our study were within the ranges of concentrations measured in nettles collected at uncontaminated sites in Belgium near the location of the site S2 (Tack and Verloo, 1996). These TE concentrations were also well below the critical levels set up for plant tissues (Kabata-Pendias, 2011), at which growth depression may be observed, *i.e.* 10-20 and 100-500 mg/kg DW for Cd and Zn, respectively.

*Table 2: Trace element concentrations (mg/kg DW) in soil and nettle samples from the two sediment landfills. For comparison, the TE background concentrations, from natural sites in Belgium were obtained from Tack and Verloo (1996) for Cd, Cu, Pb and Zn, and from our control site located in the East of France for Hg.*

Trace element (mg/kg DW)			Cd	Cu	Pb	Zn	Hg
<b>Industrial sediment landfills</b>			<b>Fresnes sur Escaut</b>				<b>Tavaux</b>
Soil (pH = 6.6)	total		15 ± 19	79 ± 33	541 ± 1397	1506 ± 856	6 ± 1
	CaCl <sub>2</sub> ext.		0.03 ± 0.01	0.33 ± 0.06	0.13 ± 0.57	0.71 ± 0.003	NA
Nettle	stems		1.0 ± 0.7	3.3 ± 0.6	1.9 ± 0.4	24.0 ± 6.3	0.01 ± 0.004
Nettle	fibres		1.1 ± 0.4	2.9 ± 1.0	1.3 ± 0.5	47.5 ± 5.0	NA
Nettle	leaves		0.9 ± 0.8	9.4 ± 0.53	2.0 ± 0.2	31.9 ± 1.8	0.03 ± 0.01
<b>Control sites</b>			<b>Belgium</b>				<b>France</b>
Soil	aqua regia ext.		0.5 ± 0.4	12 ± 5	28 ± 17	54 ± 13	0.6 ± 0.1
Nettle	leaves & stems		0.4 ± 0.2	14 ± 5	34 ± 19	113 ± 82	0.006 ± 0.003

The Tavaux soil was contaminated by Hg, with concentrations around 6 mg/kg DW, as previously found (Durand et al., 2017; Maillard et al., 2016). At the Tavaux site, translocation of Hg to nettle tissues remained low, as Hg contents in leaves did not exceed 0.01 mg/kg DW (Table 2). These concentrations were comparable to those measured at our French control site (mean 0.006 mg/kg DW, Table 2). Hg content of nettle fibres was below the limit of quantification. The Hg concentrations in nettle leaves were far below the threshold set to 0.2 mg/kg for concentrations tolerable in agronomic crops and within the ranges measured in food plants (0.006-0.139 mg/kg DW) in various countries (Kabata-Pendias, 2011). The Hg content of food plants grown in chlor-alkali areas were in the range 0.032-0.59 mg/kg DW (Kabata-Pendias, 2011). These authors also set the toxic Hg content in crop leaves within the range 1-3 mg/kg DW.

Overall, our dataset confirmed the limited translocation of TE in nettle biomass, as compared to woody species grown on the same plots, which indicate that fibres from nettle grown at these sites may be used without restriction in industrial processes.

### Fresh biomass and straw yields

Nettle bales were weighed just after harvesting to determine the yields of fresh matter (Table 3). During the first year, only the experimental site of Tavaux (S1) was harvested at the end of summer. Relatively low yields were measured on each plot and were comprised between 0.293 and 0.817 t.ha<sup>-1</sup> for fresh matter, and between 0.028 and 0.091 t.ha<sup>-1</sup> for dry stems.

Table 3: Nettle stem and bast fibre yields (t.ha<sup>-1</sup>) determined at the two contaminated sites.

	Fresh biomass yield	Dry biomass yield	Dry stem yield
Y1-S1-T-I1	0.73	0.15	0.059
Y1-S1-T-I2	0.817	0.154	0.091
Y1-S1-T-I3	0.293	0.059	0.028
Y2-S1-TS	3.5	-	0.55
Y2-S2-P30	2.95	0.91	0.6
Y2-S2-P4	2.38	0.77	0.34
Y2-S2-P5	2.2	1.01	0.67
Y2-S2-FS	3.76	1.98	1.38

This disparity between each plot and particularly for I3 was due to the presence of plant species (*Galium aparine* L., *Sambucus ebulus* L., *Calystegia sepium* L.) which are able to compete with nettle (Strutek and M, 1998), and also to differences in the quantity of incident light (Yung L et al.). These yields values were lower than those mentioned in the literature (Table 4, (Bacci et al., 2009; Bredemann and Garber, 1959; Dreyer et al., 1996; Francken-Welz et al.; Köhler et al., 1999; Lehne et al., 2001; Meirheage, Mars 2011; Rexen, 2002; Schmidtke et al., 1998; Vetter et al., 1996)), which were in the range 1 - 11.5 t.ha<sup>-1</sup> for dry stem in the context of traditional agronomic practices.

Table 4: Stem and bast fibre yields reported in the literature for fibrescrops cultivated on agricultural lands

	Cultivar	Straw yield (t.ha <sup>-1</sup> )	Bast fibre yield (t.ha <sup>-1</sup> )	References
Nettle	/	3 – 4.1	/	(Bredemann and Garber, 1959)
	/	4.4 – 7.3	/	(Vetter et al., 1996)
	Clone 13	4.88 – 11.52	0.14 – 1.28 (2.9 – 11%)	(Dreyer et al., 1996)
	Clone 13	2.19 – 4.93	0.3 – 0.6 (13.6 – 12%)	(Schmidtke et al., 1998)
	/	2.66 -5.52	0.21 - 0.49 (7.9 – 8.9%)	(Köhler et al., 1999)
	/	6.71 - 8.12	1.09 - 1.22 (16.2 – 15%)	(Francken-Welz et al.)
	Clone 13	4.4	0.53 (12%)	(Lehne et al., 2001)
	Clone 5-9	2.3 - 9.7	0.3 - 1.02 (13 – 10.5%)	(Hartl and Vogl, 2009)
	/	1 - 10 (3.4 mean)	/	(Rexen, 2002)
	clone 13	15.4	1.696	(Bacci et al., 2009)
Hemp	/	7	2 – 2.2 (28.6 – 31.4%)	(Meirheage, 2011)
Flax	/	6.9	0.7 – 1.7 (10 – 24.6%)	
Oleaginous flax	/	2	0.5 (25%)	

The second year, at the beginning of the summer, two plots (TS and FS) located at the edge of the poplar coppices were harvested in Tavaux (S1) and Fresnes-sur-Escaut (S2) respectively. Yields in fresh matter were 4 to 10 times higher than those measured under the poplar coppices (Table 3). A new weighing was made, after 4 months of air-drying. The dry biomass yield reached a value of approximately 2 t.ha<sup>-1</sup>. The dry stem yields were also measured after leaf removal. The obtained values varied between 0.55 and 1.38 t.ha<sup>-1</sup>, as a function of the harvesting site.

These yields were comparable to the lower values reported in the literature in the context of traditional agronomic practices. Indeed, literature (Bacci et al., 2009; Dreyer et al., 1996; Francken-Welz et al.; Hartl and Vogl, 2009) reported dry matter yields comprised between 2.3 to 15.4 t.ha<sup>-1</sup> depending on the fertilization conditions. The yields obtained in our site conditions were nevertheless extremely interesting since, in this agro-forestry system, nettle grows naturally and spontaneously, without chemical inputs. The savings associated to the lack of planting / sowing, crop maintenance and inputs may motivate harvesting lower yielding plots. The fraction of leaves consisted in approximately 35 to 60% of the dry biomass, depending of the year and localisation of harvest. Figure 5 represents the statistical distributions of the stem features for each harvested plots. The features measured for the Tavaux (Fig.5a) and Fresnes-sur-Escaut (Fig.5b) sites show that the length or the diameters of the stems were higher for nettle growing at the edge of the poplar coppice (Y2-S1-TS and Y2-S2-FS) than under the coppice. The mean length was approximately 1.14 m at the edge of the coppice and 0.87 m under poplars. These values of native nettle length were 33 to 50% lower than those measured by (Bacci et al., 2009) (1.7m) for a cultivar using traditional practices.

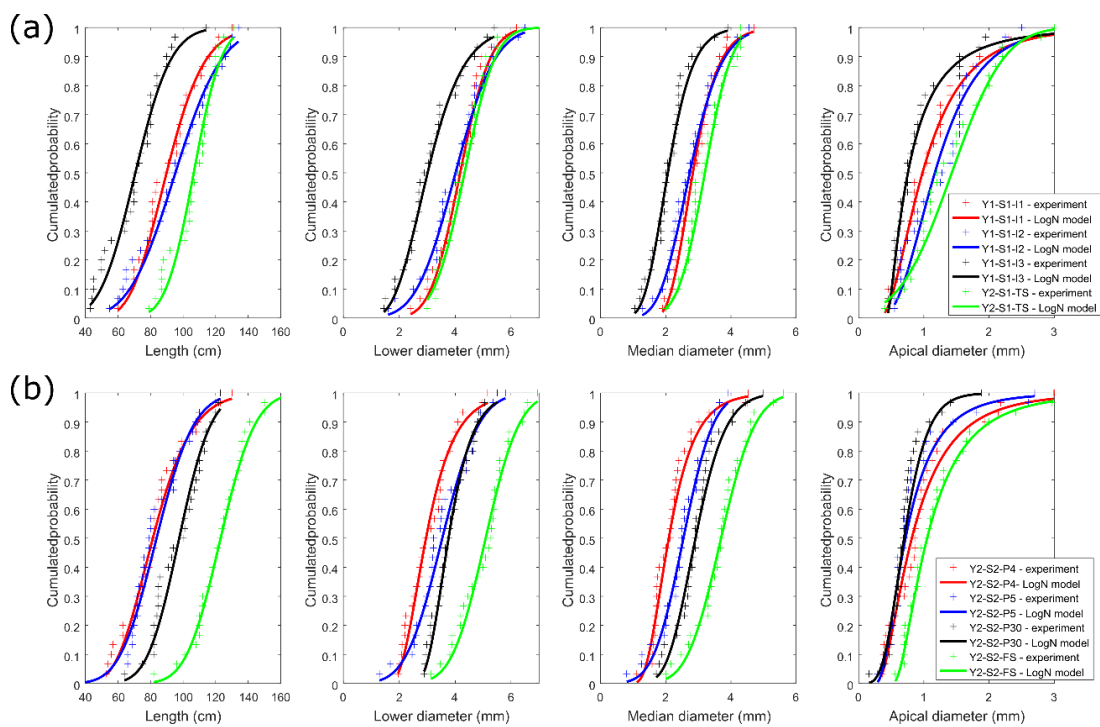


Figure 5: Statistical distribution of the nettle stem features (length and diameter) as a function of the location in the plant and of the harvesting site: S1 (a) and S2 (b).

We further estimated the diameter of the nettle fibres for the plots Y2-S1-TS and Y2-S2-F, with average values of  $37 \pm 11$  and  $34 \pm 12$   $\mu\text{m}$ , respectively. These values are in agreement with the mean diameters measured by others authors (Di Virgilio, 2013) for nettle cultivars (20–47 $\mu\text{m}$ ). On the other hand, the thickness of the fibre wall was very different between the two batches. The batch Y2-S2-FS presented an average wall thickness of  $6.5 \pm 2$ , as compared to a thickness of  $12.5 \pm 3$   $\mu\text{m}$  for the Y2-S1-TS batch. Figure 6 shows transverse cross-sections of nettle stems harvested

in the second year that are representative of each site, S1 (Fig. 6a) and S2 (Fig. 6b), respectively. It can be observed that the nettle bast fibres presented a quite large lumen area for the two batches, when compared to other European crops such as hemp and flax. For the spontaneous nettle, the harvesting time was not selected as a function of a specific maturity stage. However, it is well known for other crop fibres that the harvest time strongly influences the fibre yield and the fibre filling level (Goudenhooff et al., 2018; Musio et al., 2018). So, the influence of the harvest time of the nettle fibre features needs to be investigated in further studies.

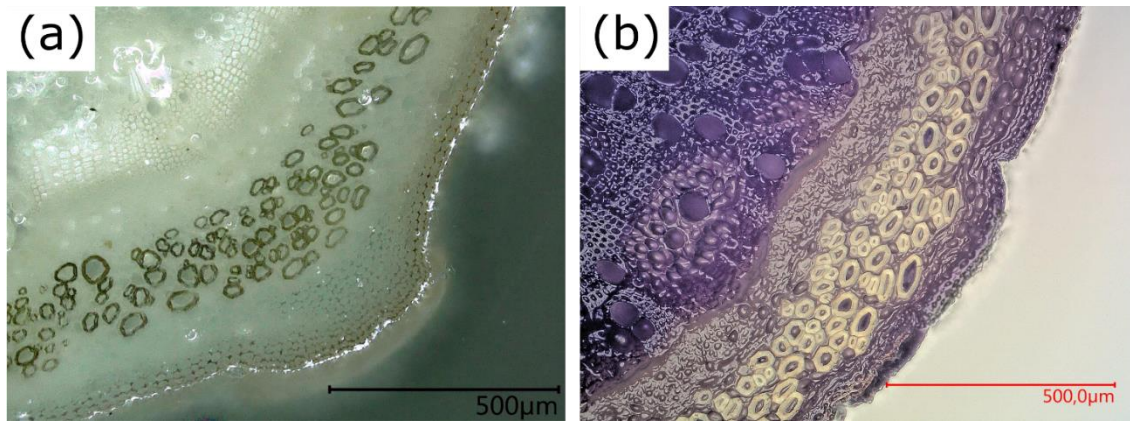


Figure 6: Micrograph of the transverse cross-section of nettle stems. Nettle stems were harvested in second year on S1 (a), and S2 (b) site, respectively.

#### ***Continuous fibre extraction using the “all fibre” extraction device***

From the standard settings described in section 2.5, the “all fibre” extraction device was able to extract the textile fibres contained in the nettle stalks, leading to the separate production of a fibre-enriched mat (*i.e.* the fibre lap), shives and dust (Figure 7). Shives were conveyed separately via the waste evacuation belt, and dust was removed thanks to the de-dusting fans. The three extracting conditions (C1, C2 and C3) showed significant differences in the quality of the nettle fibres obtained in the outgoing mat. Visually, the C1 condition, corresponding to the use of the as-received nettle stalks, resulted in the cleanest and the finest fibres obtained, with extracted bast fibres up to 10 cm in length.



Figure 7: Pictures of the nettle matters after mechanical processing.

The material balance of the three trials conducted is mentioned in Table 5. Firstly, it systematically showed a slight decrease in the moisture content of nettle fibres from the inlet to the outlet, which was very likely explained by the use of the de-dusting fans. Moreover, these fans

allowed a suitable elimination of dust generated during the fibre extraction (2.2-5.0% of the mass of nettle stalks processed), in priority at the level of module 1 and, to a lesser extent, at the level of the two following modules. Depending on the extracting condition, the fibre lap collected at the outlet of the Cadette machine represented between 11 and 48% of the incoming mass. The C2 samples (*i.e.* straw re-moistened before extraction) had the greatest proportion of fibre lap.

Table 5: Material balance for the three trials conducted, including nettle bast fibre content and impurities level in nettle fibre lap, after mechanical processing

Sample	Control sample (C1)	Moistened (C2)	Soda treatment (C3)
Moisture content at the inlet (%)	10.4 ± 0.2	22.0 ± 0.5	16.5 ± 0.3
Moisture content out of the process (%)	9.6 ± 0.2	18.9 ± 0.3	10.3 ± 0.2
Fibre lap (%)	11	48.4	15.4
Shives (%)	86.8	46.6	82.3
Dust (%)	2.2	5	2.3
Content of impurities in fibre lap (%)	17.6	36.5	51
Real content of bast fibres inside the lap (%)	82.4	63.5	49

However, this mass proportion must be corrected by the content of impurities inside the fibre lap (Table 5). The latter was estimated inside the three laps produced, impurities corresponding to (i) shives trapped inside the mat, (ii) dust not properly removed by aspiration, and also (iii) the few fibres not yet separated from shives. The content of impurities was minimal (18%) for the C1 condition (control sample), whereas it doubled for the C2 condition (re-moistened stalk) and reached a particularly high value for the C3 one (stalk pre-treated with soda before mechanical extraction).

In conclusion, the as-received nettle straw (*i.e.* control sample, C1) undoubtedly appeared as the most promising raw material, combining (i) the lower impurity (shives) content inside the fibre lap (18% in weight) and (ii) the finest extracted fibre bundles, some of them reaching about 10 cm in length. For this sample, the bast fibres contained in the outgoing mat represented 9.1% of the initial mass of nettle stalks introduced. Before any further textile step (carding), it would still be necessary to clean this mat to remove impurities (shives, dust) trapped between the extracted fibres. For future experiments, such operations could be performed using an additional sieving step for the fibre mat. This nettle fibre yield obtained for the Y2-S1-TS batch is in accordance with the literature, which reports nettle fibre yields between 3 and 16% (Table 4).

### ***Mechanical properties of fibres***

Figure 8 shows the stress/strain curves obtained from single fibre tensile tests, for three different batches that comprised from 32 to 50 fibres. On Figure 8a, results concern nettle fibres from the Fresnes-sur-Escaut site, manually extracted. Figures 8b and 8c present the results obtained for the nettle fibres obtained on the Tavaux site after manual extraction and after mechanical extraction, respectively. The mean value of the stress at failure for each batch is represented by a dotted line. A large scattering in the response was observed, which is typical of plant fibres (Bourmaud et al., 2018). A significant non-linearity could be observed for most of the tested nettle fibres, which contrasts with the results of Bodros and Baley (Bodros and Baley, 2008)



who reported a linear response for nettle fibres manually extracted from retted stems. Table 6 synthetises the mean tensile properties for each batch.

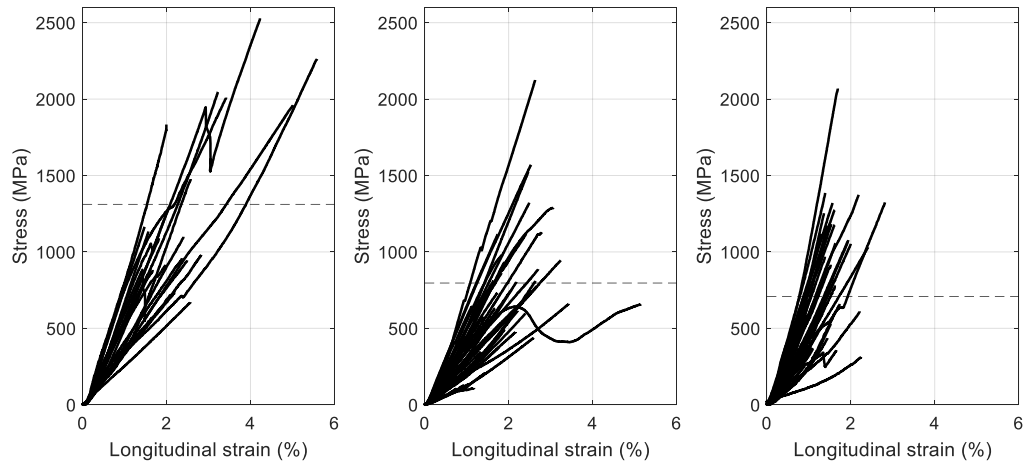


Figure 8: Tensile stress-strain curves of nettle fibres from the batches Y2-S2-FS manually extracted (a), Y2-S1-TS with manual extraction (b) and Y2-S1-TS with mechanical extraction (c).

### ***Influence of the harvesting site***

The average properties, presented in Table 6 (tensile strength, strain at failure and apparent rigidity), of the nettle fibres extracted manually are equal to 711 MPa, 1.37%, 53 GPa and 812 MPa, 2.14%, 36 GPa for Y2-S2-FS and Y2-S1-TS respectively. These values are lower than those reported in the literature for native nettle cultivars (Bodros and Baley, 2008; Lanzilao et al., 2016). These differences can be due to several factors such as the harvesting time or related to the fibre preparation. If the strength was quite similar for the two tested batches, a significant difference could be observed for the strain at failure and the apparent rigidity. Y2-S1-TS nettle fibres had a mean strain at failure 1.5 time greater than the Y2-S2-FS nettle fibres and an apparent rigidity 1.5 time lower.

Table 6: Tensile properties of nettle bast fibres

Mechanical properties of nettle fibres	Y2-S2-FS	Y2-S1-TS	Y2-S1-TS	(Bodros and Baley, 2008)	(Lanzilao et al., 2016)
Fibre extraction	Manual	Mechanical	Manual	Manual	Manual
Diameter ( $\mu\text{m}$ )	27.8 $\pm$ 6.8	28.2 $\pm$ 6	35.4 $\pm$ 9	19.9 $\pm$ 4	24.0 $\pm$ 15.9
Stress at failure (MPa)	1314 $\pm$ 552	711 $\pm$ 427	812 $\pm$ 451	1594 $\pm$ 640	2196 $\pm$ 801
Elastic modulus (GPa)	54 $\pm$ 17	53 $\pm$ 24	36 $\pm$ 19	87 $\pm$ 28	79 $\pm$ 29
Strain at failure (%)	2.62 $\pm$ 1.16	1.37 $\pm$ 0.53	2.14 $\pm$ 0.81	2.11 $\pm$ 0.91	2.8 $\pm$ 0.9

This difference in apparent rigidity can be attributed to the difference in the average fibre wall. It was above-mentioned that the wall thickness of the Y2-S2-FS nettle fibres was twice higher than for Y2-S1-TS. The cross-section area (CSA) of the fibres was calculated considering the fibre cylindrical and by neglecting the lumen area. This clearly led to a significant over-estimation of the

CSA and then an under-estimation of the apparent rigidity and strength. This under-estimation was more important when the lumen area was large. To ensure a more reliable comparison, additional tests taking into account the real CSA of the nettle fibres are necessary.

### *Influence of the fibre extraction method*

The impact of the extraction mode (mechanical or manual) was also evaluated on the Y2-S1-TS batch. An analysis of variance (ANOVA) was realised on the different values. While the impact on the stress at failure was not statistically representative (P-value=0.258), a strong influence was observed on the apparent rigidity and on the strain at failure. Interestingly, we can observe a significant difference also in the diameters of the tested nettle fibres, with means of 35 and 28  $\mu\text{m}$ , measured for the tested nettle fibres obtained after manual extraction and after mechanical extraction, respectively. This difference could be attributed to the better fibre separation achieved with the mechanical extraction. The fibre individualisation is a particularly difficult step when made by hand, which is confirmed during the post-treatment of the tensile tests. Using the introduced criterion, it is observed that the bundles of nettle fibres represented approximately 6% of the tested fibres after mechanical extraction against 30% for the manual extraction. For bundle of fibres, a lower rigidity and strength were generally measured (Placet et al., 2017). This was due to the weakness of layer between the individual fibres. So, based on this reasoning, it could be expected to measure a higher stress at failure for the mechanically processed batch. This potential positive effect induced by the improvement of the fibre individualization can also be counterbalanced by the fact that mechanical extraction also generally induces damages and thus a lowering of the properties at failure (Ouagne et al., 2017).

Finally, the properties obtained for nettle after mechanical processing are promising when compared to the best results obtained for the other European fibre crops, such as flax (see Table 6). (Bensadoun et al., 2017) reported 57 GPa and 791 MPa for the tensile rigidity and strength of industrial flax fibres, respectively, when determined using single fibre tensile test. It is also important to emphasize that for this spontaneous nettle fibres, the harvest time was not optimized and, thus, an improvement of the tensile properties can be expected by adjusting the harvest time to the fibre maturity. In this work, we only considered the apparent properties, which are clearly underestimated when considering the large lumen area of the tested fibres. By taking into account the real CSA, the effective properties of the fibres could be determined.

## **CONCLUSIONS**

This work focused on the sustainability of spontaneously stinging nettle grown on trace-element contaminated soil. Our results demonstrate that the use of trace-element contaminated soils is a relevant option to expand the material purpose-grown biomass and at the same time mitigate the land-use conflict between the needs of food and the increasing demand for plant based fibre raw materials. Trace-element contents in nettle fibres are far below the tolerable threshold for agronomic crops. Tensile properties obtained after an extraction made with an “all fibre” industrial extraction device and without field retting or prior alkaline pre-treatment are comparable to the properties of the best industrial flax fibres.

Our set of results is promising in view of a material use. Indeed, the savings associated to the lack of planting/sowing, crop maintenance and inputs may motivate harvesting lower yielding plots. The question of the mechanization of the harvesting, collecting and transportation and thus of the economic balance are however still opened, as well as the generalization of the results to other phytomanagement sites and configurations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the funding provided by ADEME, France, under grant n°1772C0018, PHYTOFIBER project and the Fondation de France and ADEME for their financial support to LY under a PhD grant, VNF (Voies Navigables de France) and Valérie Bert (INERIS) for providing us with access to the experimental site at Fresnes-sur-Escaut. This work has also been supported by the EIPHI Graduate school (contract "ANR-17-EURE-0002")

## REFERENCES

- Akgül, M., 2013. Suitability of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) stalks for medium density fiberboards production. *Compos Part B: Engineering* 45, 925-929.
- Bacci, L., Baronti, S., Predieri, S., di Virgilio, N., 2009. Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy. *Ind Crop Prod* 29, 480-484.
- Bacci, L., Di Lonardo, S., Albanese, L., Mastromei, G., Perito, B., 2010. Effect of different extraction methods on fiber quality of nettle (*Urtica dioica* L.). *Text Res J* 81, 827-837.
- Bensadoun, F., Verpoest, I., Baets, J., Müssig, J., Graupner, N., Davies, P., Gomina, M., Kervoelen, A., Baley, C., 2017. Impregnated fibre bundle test for natural fibres used in composites. *J Reinfor Plast Compos* 36, 942-957.
- Bodros, E., Baley, C., 2008. Study of the tensile properties of stinging nettle fibres (*Urtica dioica*). *Mat Lett* 62, 2143-2145.
- Bourmaud, A., Beaugrand, J., Shah, D.U., Placet, V., Baley, C., 2018. Towards the design of high-performance plant fibre composites. *Prog Mater Sci* 97, 347-408.
- Bredemann, G., Garber, K., 1959. Die grosse Brennnessel *Urtica dioica* L. : Forschungen über ihren Anbau zur Fasergewinnung. Berlin : Akademie Verlag.
- 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. *Environ Exp Bot* 139, 48-56.
- Codling, E.E., Rutto, K.L., 2014. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) growth and mineral uptake from lead-arsenate contaminated orchards soils. *J Plant Nut* 37, 393-405.
- Davies, G., Bruce, D., 1998. Effect of Environmental Relative Humidity and Damage on the Tensile Properties of Flax and Nettle Fibers. *Text Res J* 68, 623-662.
- Di Virgilio, N., 2013. Stinging nettle: a neglected species with a high potential as multi-purpose crop, Summer school of FIBRA, Catania, Italy.
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., Wielgusz, K., 2015. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Ind Crop Prod* 68, 42-49.
- Dreyer, J., Dreyling, G., Feldmann, F., 1996. Cultivation of stinging nettle *Urtica dioica* L. with high fibre content as a raw material for the production of fibre and cellulose: Qualitative and quantitative differentiation of ancient clones.
- Dreyer, J., Müssig, J., Koschke, N., Ibenthal, W.D., Harig, H., 2002. Comparison of Enzymatically Separated Hemp and Nettle Fibre to Chemically Separated and Steam Exploded Hemp Fibre. *J Ind Hemp* 7, 43-59.
- 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. *Microb Ecol* 74, 795-809.
- Franck, R.R., 2005. Bast and other plant fibres, Boca Raton, USA.
- Francken-Welz, H., Scherr-Triebel, M., Léon, J., Ertragsund Qualitätsbildung von Lein, Hanf und Fasernessel in Abhängigkeit von Bestandesdicke und N-Düngung. *Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften* 12, 177-178.
- Goudenhooff, C., Siniscalco, D., Arnould, O., Bourmaud, A., Sire, O., Gorshkova, T., Baley, C., 2018. Investigation of the Mechanical Properties of Flax Cell Walls during Plant Development: The Relation between Performance and Cell Wall Structure. *Fibers* 6, 6.
- Gravis, A., 1885. Recherches anatomiques sur les organes végétatifs de l'*Urtica Dioica* L.
- Grégoire, M., Barthod-Malat, B., Labonne, L., Evon, P., de Luycker, E., Ouagne, P., 2019. Investigation of the potential of hemp fibre straws harvested using a combine machine for the production of technical load-bearing textiles. *Ind Crop Prod* Under review.
- Hartl, A., Vogl, C.R., 2009. Dry matter and fiber yields, and the fiber characteristics of five nettle clones (*Urtica dioica* L.) organically grown in Austria for potential textile use. *American J Alternative Agri* 17, 195-200.
- Harwood, J., Edom, G., 2012. Nettle Fibre: Its Prospects, Uses and Problems in Historical Perspective. *Text Hist* 43, 107-119.
- Houba, V.J.G., Lexmond, T.M., Novozamsky, I., van der Lee, J.J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci Tot Environ* 178, 21-28.
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants.
- Kalra, Y.P., Soil, Plant Analysis, C., 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press, Boca Raton.

- Köhler, K., Schmidtke, K., Rauber, R., 1999. Eignung verschiedener pflanzenarten zur untersaat in fasernesseln (*Urtica dioica* L.). Beiträge zur 5, 496-500.
- Lanzilao, G., Goswami, P., Blackburn, R.S., 2016. Study of the morphological characteristics and physical properties of Himalayan giant nettle (*Girardinia diversifolia* L.) fibre in comparison with European nettle (*Urtica dioica* L.) fibre. Mat Lett 181, 200-203.
- Lehne, P., Schmidtke, K., Rauber, R., 2001. Ertrag von Fasernesseln im ökologischen Landbau bei unterschiedlicher Nährstoffversorgung. Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss 13, 158-159.
- Linger, P., Müssig, J., Fischer, H., Kobert, J., 2002. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. Ind Crop Prod 16, 33-42.
- Maillard, F., Girardclos, O., Assad, M., Zappellini, C., Pérez Mena, J.M., Yung, L., Guyeux, C., Chrétien, S., Bigham, G., Cosio, C., Chalot, M., 2016. Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. Environ Res 148, 122-126.
- Meirheage, C., Mars 2011. Evaluation de la disponibilité et de l'accessibilité de fibres végétales à usages matériaux en France., in: FRD (Ed.). Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par FRD., p. 84.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S., Schröder, P., Vangronsveld, J., 2010. Successes and Limitations of Phytotechnologies at Field Scale: Outcomes, Assessment and Outlook from COST Action 859.
- Mohanty, A.K., Vivekanandhan, S., Pin, J.-M., Misra, M., 2018. Composites from renewable and sustainable resources: Challenges and innovations. Science 362, 536.
- Musio, S., Müssig, J., Amaducci, S., 2018. Optimizing Hemp Fiber Production for High Performance Composite Applications. Frontiers in plant science 9, 1702-1702.
- Ouagne, P., Barthod-Malat, B., Evon, P., Labonne, L., Placet, V., 2017. Fibre Extraction from Oleaginous Flax for Technical Textile Applications: Influence of Pre-processing parameters on Fibre Extraction Yield, Size Distribution and Mechanical Properties. Procedia Engineering 200, 213-220.
- 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. Environ Exp Bot 143, 72-81.
- Pilon-Smits, E., 2005. PHYTOREMEDIATION. Annual Review of Plant Biology 56, 15-39.
- Placet, V., Day, A., Beaugrand, J., 2017. The influence of unintended field retting on the physicochemical and mechanical properties of industrial hemp bast fibres. J Mater Sci 52, 5759-5777.
- 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. Environ Pollut 199, 73-82.
- Rexen, F., 2002. The stinging nettle: Its reintroduction for fibre production, Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications.
- Robinson, B., Schulin, R., Nowack, B., Roullet, S., Menon, M., Clothier, B., Green, S., Mills, T., 2006. Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. Forest Snow Landscape Res 80, 221-234.
- Schmidtke, K., Rauber, R., Koehler, K., 1998. Ertragsbildung von Fasernesseln (*Urtica dioica* L.). Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss 11, 107-108.
- Strutek, M., M, T., 1998. Review of biology and ecology of *Urtica dioica*. Preslia, Praha 70, 1-19.
- Tack, F.M., Verloo, M.G., 1996. Metal contents in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as affected by soil characteristics. Sci Tot Environ 192, 31-39.
- Vétyllart, M., 1876. Etudes sur les fibres végétales textiles employées dans l'industrie.
- Vetter, A., Wieser, P., Wurl, G., 1996. Untersuchungen zum anbau der Groben Brennessel (*Urtica dioica* L.) und deren eignung als verstärkungsfaser für kunststoffe.
- Vogl, C.R., Hartl, A., 2003. Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: A review. American J Alternative Agri 18, 119-128.
- Yung L, Peter A, Chiapusio G, Chalot M, C, B., Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a driver of insect diversity at a phytomanaged chlor-alkali site. In Preparation.
- Yung, L., Bertheau, C., Cazaux, D., Regier, N., Slaveykova, V.I., Chalot, M., 2019. Insect Life Traits Are Key Factors in Mercury Accumulation and Transfer within the Terrestrial Food Web. Environ Sci Technol 53, 11122-11132.

## 4.6 Perspective de travail : la parcelle PHYTOFIBER

Dans le cadre du projet PHYTOFIBER, le LCE est à la charge du suivi de ses dispositifs expérimentaux afin de garantir un approvisionnement en biomasses ligneuses pour le FCBA et en ortie pour le laboratoire FEMTO-ST. Par conséquent, le LCE est chargé de déterminer, à partir des dispositifs existants, la productivité de l'ortie, son rendement en paille et en fibres ainsi que les teneurs en ETM présents dans ses différents compartiments. Sur la base des travaux initiés dans le cadre de ma thèse, le LCE a également mis au point un nouveau dispositif expérimental sur la lagune de stockage de sédiments de Tavaux, intégrant de nouveaux itinéraires culturaux et des espèces préalablement sélectionnées, en vue d'optimiser la production d'ortie.

Le dispositif installé se voulait davantage centré sur la culture d'ortie et sur les enseignements tirés des études menées sur les parcelles existantes. Il a été conçu de manière à identifier des conditions favorables au développement de l'ortie et à optimiser sa production. Ainsi, 4 modalités de culture liées à la composition de la strate herbacée ont été sélectionnées : i) peuplier planté et élimination de la strate herbacée par fauchages réguliers (PC) ; ii) peuplier accompagné d'une strate herbacée spontanée (y compris l'ortie indigène) (PS) ; iii) peuplier et clone d'ortie cultivés conjointement (PU). Chaque traitement a été répliqué 3 fois excepté le traitement témoin, répliqué 2 fois. Des orties témoins ont également été plantées en périphérie de la parcelle, à l'écart des ligneux. Ensuite, pour chacune de ces modalités, 4 densités de peuplier ont été sélectionnées : 2232 t/ha (D4), ce qui correspond à la densité utilisée dans les TCR préexistants, 1562 t/ha (D3), 868 t/ha (D2) et 534 t/ha (D1), les faibles densités permettront de se rapprocher des SAF Français classiques (de l'ordre de 200 t/ha) (Figure 42). La quantité de lumière perçue par la strate herbacée semble être un facteur déterminant pour le développement de l'ortie, ainsi, en faisant varier la densité du couvert arboré, nous espérons pouvoir définir des conditions de lumière optimales.

Ce dispositif expérimental a été élaboré de manière à être utilisé comme support des prochains projets initiés par le LCE, autour de la production d'ortie sur des sites contaminés. De plus, des suivis réguliers ont été prévus sur la parcelle.

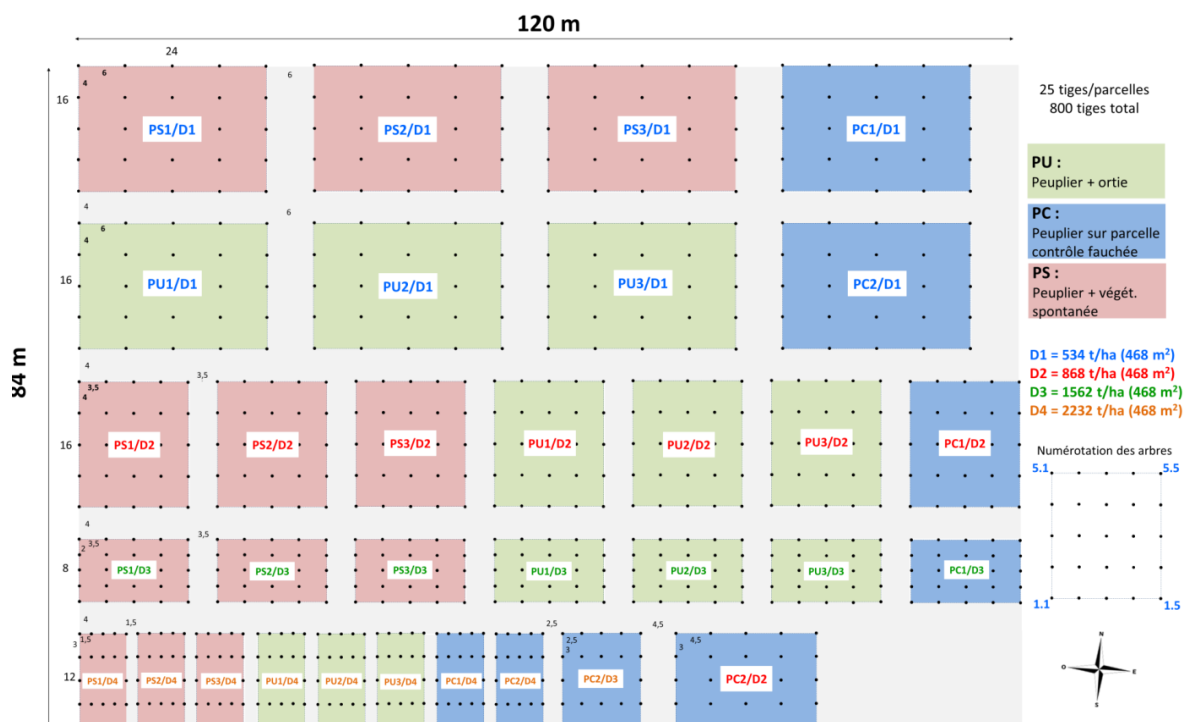


Figure 42. Schéma des modalités de culture pour la parcelle PHYTOFIBER installée sur la lagune de stockage de sédiments de Tavaux

La surface de chacune de ces placettes a été ajustée de manière à ce qu'elle comprenne 25 arbres. Les caractéristiques de la parcelle ont été définies au regard des contraintes liées aux modalités de récolte du bois et des orties. En raison de contraintes liées au fauchage de la strate herbacée, les traitements n'ont pas été randomisés. Les modalités de plantation de l'ortie ont été déterminées en se basant sur les recommandations faites dans les études portant sur l'optimisation de la culture d'ortie (Di Virgilio et al., 2015 ; Jankauskiene et Gruzdeviene, 2010). Ainsi, la densité moyenne retenue pour l'ortie est de 15 000 t/ha. Il a toutefois été nécessaire d'adapter ces modalités de culture à la présence du peuplier, ce qui entraîne de légères variations de densité pour l'ortie, fonction de la densité du peuplier (Tableau 19).

Tableau 19. Caractéristiques du dispositif expérimental PHYTOFIBER installée sur la lagune de stockage de sédiments de Tavaux

	Surface parcelle	Nbre parcelles Pop	Nbre parcelles Ortie	Nbre Pop / placettes	Nbre ortie / placettes	Nbre tiges totales / placettes	Densité Pop (t/ha)	Densité Ortie (t/ha)	Densité totale (t/ha)	Nbre Pop/placette	Nbre Ortie/placette
<b>D1</b>	468	8	3	25	740	765	534	15812	1635	200	2220
<b>D2</b>	280	8	3	25	400	425	868	14286	1518	200	1200
<b>D3</b>	160	8	3	25	236	261	1562	14750	1631	200	708
<b>D4</b>	112	8	3	25	164	189	2232	14643	1688	200	492
<b>Total</b>										<b>800</b>	<b>4620</b>

#### 4.6.1 Choix des variétés cultivées

N'ayant pas pu nous procurer les cultivars de peuplier Skado et I214, le choix s'est porté sur le cultivar DIVA (également appelé SENNA), au regard des préconisations du fournisseur (SARL France PEUPLIERS) ainsi que des caractéristiques du substrat. Ce cultivar, sélectionné en Italie et implanté en 2016, provient de croisements entre peupliers euraméricains (*P. deltoides* x *P. nigra*). Il s'avère particulièrement adapté aux milieux humides sur substrats limoneux et profonds (d'après le groupement d'intérêt scientifique GIS Peuplier (INRA - Irstea - FCBA) - ISP (Italie) - IBW (Belgique) - Alterra (Hollande) - 3C2A (France)). Pour la plantation, des plançons de 2 m ont été préférés à des boutures de manière à optimiser le taux de reprise.

Concernant l'ortie, les 5000 plants nécessaires ont été produits et fournis par le Lycée agricole de Roville-aux-Chênes. L'ortie utilisée appartient à la même espèce que l'ortie indigène (*Urtica dioïca* L.), elle a toutefois été sélectionnée pour être utilisée dans la production de fibre végétale, dans le cadre de projet NewFibre porté par le Cételor (Région Grand-Est) (Figure 43). Cette variété sera nommée ortie « Roville » pour le reste du manuscrit.



Figure 43. Présentation des plantules d'ortie « Roville » plantées sur la parcelle PHYTOFIBER, après multiplication en serre par le Lycée agricole de Roville-aux-Chênes

#### 4.6.2 Préparation du sol et plantation

En accord avec le gestionnaire du site, le secteur retenu pour l'implantation de la parcelle PHYTOFIBER est situé au sud de la lagune de dépôts de sédiment de l'industrie INOVYN (Tavaux). Le secteur a été choisi préférentiellement en raison de sa surface plane, de sa facilité

d'accès (présence d'accès est et ouest) et du nombre limité d'arbres indigènes. Une surface d'un peu plus de 1 ha a ainsi pu être délimitée pour accueillir la plantation (Figure 44).



Figure 44. Vue aérienne de la lagune INOVYN et de l'emplacement sélectionné pour l'installation de la parcelle PHYTOFIBER

Préalablement à la plantation des végétaux, des travaux de fauche et de broyage de la végétation indigène (phragmites et saules principalement) et de préparation du sol (mise à nu et labour du sol) ont été effectués fin janvier 2018 afin de garantir de bonnes conditions d'installation aux cultures (Figure 45).





*Figure 45. Panorama du secteur sélectionné pour l'installation de la parcelle PHYTOFIBER après travaux de fauche et de préparation du sol*

Les plançons de peupliers ainsi que les plantules d'orties ont été plantés, à la main, par leurs fournisseurs, la semaine du 19 mars et la semaine du 23 avril 2018, respectivement (Figure 46). La plantation a pu se faire selon le dispositif expérimental décrit ci-dessus (Figure 42. Schéma des modalités de culture pour la parcelle PHYTOFIBER installée sur la lagune de stockage de sédiments de Tavaux. Des protections d'environ 80 cm de hauteur, utilisées pour limiter le broutage des plantes, ont été installées à la base des plançons de peuplier.



*Figure 46. Visuel de la parcelle PHYTOFIBER après plantation de l'ortie, en mai 2018, sur laquelle on peut voir de nombreux rhizomes de phragmites*

#### 4.6.3 Suivi de la parcelle

De manière à appréhender l'évolution de l'ortie, du peuplier et de la végétation spontanée, un suivi régulier de la parcelle a été effectué au cours de la première saison de végétation. L'intégralité des peupliers a débourré très rapidement à l'issue de leur plantation. Une fois les

feuilles présentes, ils ont été impactés par diverses chenilles de l'ordre des lépidoptères, potentiellement *Malacosoma sp.*, le sphinx du peuplier *Laothoe populi* ou encore le bombyx du peuplier *Poecilocampa populi*. Des cassures ont également été constatées au-dessus des protections à gibiers. Les dommages causés par les insectes et le gibier ont très certainement eu pour conséquence de retarder la croissance des peupliers. Toutefois, en raison d'une bonne adaptation au sol et de conditions météorologiques favorables, aucun cas de mortalité n'a été observé chez le peuplier au cours des 6 premiers mois.

Un bilan plus complet de l'état des peupliers a été effectué en janvier 2019, révélant un taux de mortalité inférieur à 10% pour la première année, malgré des traces visibles liées aux gibiers et aux insectes défoliateurs (*i.e.*, cassures au-dessus des protections, jeunes tiges broutées, feuilles lourdement endommagées) sur près de 3% des arbres. Une note sur 5, reflétant le développement des peupliers, basé notamment sur leur taille et le nombre de branches, leur a également été attribuée (Tableau 20). Les modalités liées à la nature de la strate herbacée se semblent pas influencer sur ces différents paramètres traduisant l'état de santé des peupliers, toutefois, il semblerait que les placettes pour lesquelles la densité des peupliers est la plus faible, aient été les plus impactées (Tableau 20). Ces observations restent néanmoins à nuancer dans la mesure où les observations faites sur le terrain laissent entrevoir que les arbres localisés en bordure de parcelle, quel que soit la densité, ont été les plus impactés, potentiellement en raison de leur plus grande accessibilité pour le gibier.

Tableau 20. Etat des lieux du taux de survie des peupliers et de leur état de santé à l'issue de la première année de plantation

	Survie (%)	Non endommagés (%)	Développement général (/5)
<b>Control (fauchée)</b>	<b>0.92 ± 0.05</b>	<b>0.99 ± 0.02</b>	<b>3.25 ± 0.89</b>
D1	0.92 ± 0.06	0.98 ± 0.03	2.00 ± 0.00
D2	0.94 ± 0.03	0.98 ± 0.03	3.00 ± 0.00
D3	0.92 ± 0.11	1.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
D4	0.92 ± 0.06	1.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
<b>Végét. indigène</b>	<b>0.90 ± 0.08</b>	<b>0.96 ± 0.04</b>	<b>3.42 ± 1.00</b>
D1	0.89 ± 0.06	0.95 ± 0.05	2.67 ± 1.15
D2	0.91 ± 0.08	0.92 ± 0.04	3.00 ± 1.00
D3	0.85 ± 0.10	1.00 ± 0.00	4.00 ± 1.00
D4	0.95 ± 0.09	0.99 ± 0.02	4.00 ± 0.00
<b>Ortie plantée</b>	<b>0.91 ± 0.07</b>	<b>0.97 ± 0.04</b>	<b>3.50 ± 0.90</b>
D1	0.88 ± 0.07	0.92 ± 0.00	2.33 ± 0.58
D2	0.85 ± 0.05	0.99 ± 0.02	3.33 ± 0.58
D3	0.93 ± 0.08	1.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
D4	0.96 ± 0.04	0.96 ± 0.04	4.33 ± 0.58
<b>Total général</b>	<b>0.91 ± 0.07</b>	<b>0.97 ± 0.04</b>	<b>3.41 ± 0.91</b>

Très rapidement après la plantation, les espèces indigènes herbacées, présentes avant le fauchage, ont recolonisé l'intégralité de la parcelle (Figure 47). Cette végétation indigène se compose principalement de *Phragmites australis*, *Sambucus ebulus*, *Cirsium vulgare*, *Galium aparine* et *Atriplex hortensis*. La réapparition aussi rapide de ces espèces est principalement liée à la présence de rhizomes dans le sol, n'ayant pas pu être éliminés au cours de la préparation du sol (Figure 46).



Figure 47. Visuel de la parcelle PHYTOFIBER après colonisation par la végétation indigène, en juin 2018.

Afin de limiter l'impact de cette végétation sur le développement des peupliers, l'ensemble de la parcelle PHYTOFIBER a été fauché en juillet 2018, y compris les orties plantées (Figure 48). Il est peu probable que cette coupe ait impacté significativement le développement de l'ortie dans la mesure où cette dernière était implantée depuis près de 4 mois, ce qui semble suffisant pour développer un système racinaire robuste lui permettant une reprise.



Figure 48. Visuel de la parcelle PHYTOFIBER après fauchage de la végétation indigène, en juin 2018.

Des visites en mai 2019 ont permis de valider la présence de l'ortie « Roville » malgré une végétation indigène à nouveau très dense. Néanmoins, la distinction entre l'espèce d'ortie cultivée et l'espèce indigène est peu aisée. En effet, cette dernière, déjà présente à l'origine du projet, semble de plus en plus présente à mesure que des fauches sont effectuées. Ainsi, l'ortie semble moins impactée par la fauches que les autres espèces adventices, ce qui peut représenter un levier pour limiter ces dernières.

#### 4.6.4 Futur de la parcelle et pistes d'amélioration

Les principales difficultés rencontrées la première année concernent l'attaque des peupliers ainsi que la recolonisation des espèces adventices indigènes et soulèvent de nombreuses questions et piste d'amélioration pour ce type de dispositif.

Les dommages causés par les gibiers sont probablement les plus impactant pour les peupliers, en effet, les cassures observées au-dessus de la protection contraignent les peupliers à mobiliser de l'énergie de manière à reconstituer une tige apicale. A cela s'ajoute le broutage des feuilles et des jeunes pousses limitant ainsi les performances de la photosynthèse. Ces dommages ont été causés malgré la présence de protections. Par conséquent, il est envisagé d'installer une clôture autour de la parcelle, limitant ainsi l'entrée du gibier. Malgré ces attaques, le taux de mortalité observé la première année demeure relativement faible et les arbres ont montré une rapide résilience. De plus, cette faible mortalité ne devrait pas altérer significativement la densité de peuplier initialement souhaitée.

Quant à l'ortie « Roville » plantée la première année, elle s'est vue rapidement étouffée par la végétation indigène composée en majorité d'espèces adventices vivaces, dont les parties racinaires bien établies leur permet de recoloniser la strate herbacée après une fauche. Les fauches ayant eu lieu après la préparation du sol laissent toutefois suggérer que l'ortie profite davantage d'une coupe que les autres espèces adventices, ce qui pourrait à terme lui permettre de prendre le dessus. Ces difficultés liées aux adventices ont soulevé un questionnant concernant le moment le plus propice pour la plantation des orties sous les peupliers. Nous envisageons notamment de replanter des plantules d'ortie lorsque la canopée des peupliers entrainera un léger ombrage à la strate herbacée, ce qui limite les phénomènes de compétition entre les espèces héliophiles et l'ortie, comme montré préalablement. De plus, la distinction entre l'ortie indigène et l'ortie « Roville » est difficilement réalisable sur le terrain, il a donc été prévu, dans le cadre d'un projet de thèse succédant à celui-ci, de mieux caractériser ces deux variétés d'ortie d'un point de vue morphologique et génétique.

Cette parcelle fera l'objet d'un suivi pluriannuel de manière à suivre l'évolution de l'état de santé des espèces cultivées et de limiter l'impact des agents extérieurs. Ce dispositif aura pour principale vocation de répliquer, à l'échelle terrain et pour une pollution par le Hg, l'expérimentation que j'ai conduite en mésocosme (section 2.2). Toutefois, en raison de l'instabilité actuelle du dispositif, ces expérimentations pourront être conduites lorsque les modalités prévues initialement seront présentes. Ce dispositif pourra également être sollicité afin de fournir de l'ortie à l'équipe de FEMTO-ST impliquée dans le projet PHYTOFIBER afin de confronter les propriétés des fibres de l'ortie « Roville » avec celles de la variété indigène préalablement étudiée.

# Chapitre 5

## Discussion Générale et Conclusions

### Objectif général

Comprendre le fonctionnement et évaluer les performances écologiques, environnementales et économiques de l'agrosystème peuplier-ortie dans un contexte de phytomanagement de sites contaminés par les ETM

### Objectifs spécifiques

Comprendre le fonctionnement à l'interface rhizosphérique et évaluer le rôle des microorganismes fongiques

Caractériser la biodiversité floristique et entomologique associée à l'agrosystème

Identifier les filières de valorisation adaptées au contexte d'étude et optimiser le potentiel de production de l'agrosystème

### Sites expérimentaux



Fresnes-sur-Escout  
Cd, Pb, Cu, Zn



Tavaux  
Hg

### Faits scientifiques marquants

L'ortie n'accumule pas les ETM dans ses parties aériennes mais les stockent dans ses racines

En co-culture, l'ortie et le peuplier « partagent » des communautés fongiques (EMF, DSE)

L'ortie est un « réservoir à insecte » de la même manière qu'en contexte naturel

Les interactions ortie-peuplier semblent se faire par l'intermédiaire des microorganismes

Les insectes associés à l'agrosystème contribuent à la dissémination du Hg

La teneur en fibre de l'ortie indigène et leurs caractéristiques sont comparables à celles d'orties cultivées mais les rendements sont bien inférieurs



## 5.1 Combiner l'agroforesterie et le phytomanagement, quels sont les enjeux ?

### 5.1.1 Une approche innovante

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit vise à mieux appréhender le fonctionnement et les performances du dispositif agroforestier peuplier-ortie, à partir de peupleraies expérimentales mises en place sur des sites contaminés par les ETM, dans lesquelles l'ortie indigène a colonisé la strate herbacée. L'originalité de ce projet de thèse, à l'échelle nationale et internationale et de l'ensemble des acteurs et scientifiques du domaine des phytotechnologies, réside principalement dans cette approche agroforestière appliquée à un contexte de phytomanagement. En effet, cette combinaison (phytomanagement-agroforesterie), bien que suggérée (Gene Garrett and Buck, 1997; Rockwood et al., 2004), n'a jamais fait l'objet de travaux approfondis, comme décrit dans la synthèse bibliographique.

Les deux plantes cibles de ces travaux ont été le peuplier (cultivars Skado et I214) et l'ortie. Le peuplier est utilisé et reconnu en phytomanagement alors que l'utilisation de l'ortie est innovante. L'ortie est connue comme étant une plante qui affectionne les lieux anthropisés riches en azote et notamment les sites contaminés, elle n'a toutefois jamais été utilisée dans des projets de phytomanagement. Ainsi, en tant que projet « starter », mon travail s'est intéressé à ce système agroforestier (SAF) dans sa globalité à partir d'approches multidisciplinaires afin de comprendre son fonctionnement et son comportement vis-à-vis des ETM. La viabilité de cette association est étroitement liée à notre capacité à anticiper et maîtriser les aspects négatifs qui concernent la plupart des SAF, tels que i) la compétition entre les espèces ligneuses et les cultures sous-jacentes pour l'obtention de ressources, ii) les effets allélopathiques des ligneux sur les cultures, iii) la croissance rapide de certaines espèces ligneuses occupant l'espace des cultures ou iv) l'entrée d'espèces adventices, de ravageurs ou autres pathogènes favorisée par l'une des espèces cultivées (Kidd and Pimental, 2012). Mais à cela s'ajoute également les enjeux classiquement liés au succès du phytomanagement des sites contaminés, tels que i) la tolérance des plantes aux ETM, ii) leur efficacité quant à l'extraction ou la stabilisation des ETM biodisponibles ou encore iii) leur aptitude à promouvoir la biodiversité.

### 5.1.2 Une démarche reposant principalement sur des sites expérimentaux

Mes travaux de thèse reposent en grande partie sur les deux peupleraies expérimentales mises en place en 2011 sur deux sites contaminés par les ETM (*i.e.*, lagune de dépôt de sédiments de Tavaux et site de dépôt de sédiments de Fresnes-sur-Escaut), dans le cadre du projet



BIOFILTEREE. L'objectif principal de ce projet consistait en la production de biomasse valorisable sur des sols présentant des propriétés physico-chimiques particulières. Les enjeux environnementaux consistaient en la stabilisation des ETM afin de limiter leur dissémination.

Sur le sol du site de Fresnes-sur-Escaut, les principaux contaminants présents (Cd, Pb, Cu et Zn) sont parmi les plus représentés sur le territoire Français. Ce site présente un gradient de contamination, avec des concentrations dans la zone la plus contaminée jusqu'à 100 fois supérieures pour le Cd, ce qui nous a permis d'appréhender l'influence de ces deux degrés de contamination sur le fonctionnement de l'agrosystème. Les particularités du sol de Tavaux (*i.e.*, anthroposol blanchâtre constitué de particules d'oxydes métalliques et de sels, contaminé par le Hg) sont directement liées au procédé chlore-alkali utilisé par les industries chimiques dès les années 1930. Là où les ETM présents sur la parcelle de Fresnes-sur-Escaut vont principalement être absorbés par la végétation ligneuse *via* la solution du sol, l'entrée du Hg dans les arbres du site de Tavaux se fait essentiellement par voie atmosphérique. Le Hg présente également un important potentiel de biomagnification, justifiant l'intérêt d'appréhender son devenir dans les réseaux trophiques afin d'évaluer l'exposition des écosystèmes à ce cet ETM. Le site de Fresnes-sur-Escaut présente un gradient de contamination, avec des concentrations dans la zone la plus enrichie jusqu'à 100 fois supérieures pour le Cd, ce qui nous a permis d'appréhender l'influence de ces deux degrés de contamination sur le fonctionnement de l'agrosystème. A partir de leurs caractéristiques contrastées, ces deux sites expérimentaux ont permis de développer des approches différentes sur chacun d'eux.

Les deux parcelles expérimentales mises en place en 2011 ont évolué conjointement et ont été toutes deux colonisées par l'ortie, en densité variable selon le cultivar de peuplier présent. Nous avons considéré ce contraste de densité comme une modalité en vue d'appréhender l'influence de l'ortie sur différents paramètres liés au fonctionnement (*i.e.*, réponse métabolique des plantes) ou aux communautés associées au peuplier (*i.e.*, insectes, micro-organismes fongiques). Toutefois cette influence de l'ortie sur le peuplier reste complexe à appréhender à partir des dispositifs *in-situ* préexistants dans la mesure où la densité d'ortie est directement dépendante du cultivar de peuplier et que ces derniers ont probablement des spécificités. Pour pallier à cela, nous avons conduit l'expérience en mésocosme présentée dans la section 2.2. Cette étude est complémentaire aux expérimentations *in-situ*, mais ne permet pas de reproduire l'ensemble des facteurs présents en conditions réelles (Mench et al., 2009). C'est pourquoi la parcelle expérimentale PHYTOFIBER a été conçue de manière à appréhender l'influence de l'ortie sur le peuplier, à une échelle réelle (1 ha de plantation).

### 5.1.3 Le peuplier assure un environnement favorable au développement de l'ortie

L'apparition spontanée de l'ortie sous des espèces ligneuses et plus particulièrement sous des Salicacées n'est pas un phénomène exclusif aux sites étudiés, toutefois leurs caractères anthropisés et perturbés sont favorables au développement de l'ortie (section 1.4.8). Les facteurs propices à l'apparition de cette dernière sous les peupliers ont principalement été étudiés sur le site de Tavaux mais il est probable que ces mêmes facteurs aient conditionné son apparition dans la parcelle de Fresnes-sur-Escaut également.

Dans la mesure où l'ortie n'est que peu présente à l'écart de la peupleraie, nous avons émis l'hypothèse que le peuplier lui garantissait un environnement favorable, et notamment des conditions abiotiques lui permettant de s'installer et de coloniser la strate sous-jacente. Nous avons pu montrer l'importance de la lumière pour le développement de l'ortie.

→ la lumière, principalement conditionnée par la densité de la couverture arborée du peuplier, représente un facteur déterminant dans la compétitivité de l'ortie (section 3.2.4).

En effet, nous avons observé qu'en pleine lumière, le développement de l'ortie est entravé par d'autres espèces rudérales, plus héliophiles et potentiellement plus compétitives (*e.g.*, *Sambucus ebulus*, *Calystegia sepium*) tandis que ces espèces disparaissent lors d'une réduction de la lumière incidente (de l'ordre de 40%), au profit de l'ortie qui peut alors se développer sous forme de denses colonies quasi-monospécifiques (présence de *Gallium aparine* généralement). Dans un contexte de phytomanagement, mieux connaître les optimums écologiques de l'ortie, notamment en terme de luminosité, représente un enjeu important pour lui assurer un développement optimal. Au cours des premières années suivant la plantation des peupliers, leur caractère drainant a probablement participé à l'assèchement du sol, écartant ainsi les phragmites de la peupleraie et favorisant l'installation de l'ortie. L'apport de MO et de nutriments dans les horizons de surface du sol, *via* la chute des feuilles est également favorable à la dominance de l'ortie. Ce phénomène n'a pas été investigué, toutefois, la forte abondance de l'ortie autour de la peupleraie pourrait appuyer cette hypothèse.



## 5.2 La rhizosphère, un compartiment charnière pour le fonctionnement de l'agrosystème

En raison des interactions étroites se produisant au niveau rhizosphérique dans le cas des SAF et compte tenu du contexte de contamination du sol, comprendre le fonctionnement des plantes à cette interface particulière apparaît essentiel. En effet, l'interface rhizosphérique des dispositifs étudiés apparaît comme le lieu d'interactions complexes entre les plantes et les micro-organismes. Par ailleurs, dans un contexte d'agroforesterie, ces interactions allélopathiques plantes-plantes ou plantes-micro-organismes peuvent s'avérer néfastes ou bénéfiques pour la pérennité des agrosystèmes, renforçant ainsi la nécessité de les caractériser. Il est connu que certains arbres dits « allélopathiques » choisissent leurs espèces herbacées de sous bois et que les relations deviennent complémentaires. C'est pourquoi, dans la section 2, nous avons étudié le microbiome fongique associé aux racines d'ortie et de peuplier par l'intermédiaire d'une étude de barcoding environnemental et une étude par métabolomique ciblée afin d'appréhender la nature des interactions chimiques qui se produisent à cette interface. Nos observations confortent également le besoin de lever certains verrous scientifiques concernant l'écologie des communautés fongiques afin de mieux appréhender leurs fonctions dans le cas d'agrosystèmes particuliers.

### 5.2.1 L'interface rhizosphérique : un lieu d'interactions tripartites complexes entre les plantes et les micro-organismes associés

Des études en mésocosme (section 2.2), pour lesquelles nous avons utilisé des sols issus du site de Fresnes, nous ont permis de mettre en avant d'importants taux d'ectomycorhization (moyenne 53%) sur des jeunes peupliers *via* l'observation de gaines fongiques sur les apex racinaires. Ces résultats ont pu être corroborés par le barcoding environnemental réalisé sur des échantillons *in-situ* et montrant que les champignons EM représentent la guildes la plus abondante associée aux racines de peupliers.

→ Par ailleurs, nous avons observé une réduction significative du taux d'ectomycorhization du peuplier lorsqu'il est en co-culture avec l'ortie (section 2.2).

Ces résultats semblent converger vers ceux obtenus par Vierheilig et al., (1996) et Broekaert et al., (1989), attribuant des propriétés antifongiques à la protéine UDA située dans les racines d'ortie. Nos résultats confirment également leur aptitude à inhiber des symbioses fongiques chez des plantes voisines, ce qui a préalablement été entrevu par Fontenla et al., (1999). Bien que seule la protéine UDA n'ait été mentionnée dans la littérature, d'autres métabolites et notamment les polyphénols pourraient être impliqués dans ces phénomènes, ce qui nous a conduit à mener l'étude par

métabolomique ciblée. Lors de cette étude en mésocosme, nous avons également pu détecter la présence de champignons endophytes de type DSE dans des racines de peuplier et d'ortie *via* l'observation de microsclérote mélanisées.

→ Toutefois la présence des DSE à l'intérieur des racines d'ortie n'a été observée que dans le cas d'une co-culture avec le peuplier.

Compte-tenu des propriétés antifongiques initialement attribuées aux racines d'ortie, la présence de ces DSE apparaît surprenante, et d'autant plus que leur présence semble être liée au peuplier. Jusqu'à récemment, le caractère mutualiste ou pathogène des DSE envers les plantes demeurait controversé, mais de récentes études tendent à confirmer leur caractère auxiliaire, favorisant notamment la nutrition et la tolérance des plantes envers les ETM et les champignons phytopathogènes (Berthelot et al., 2019).

Perspective de travail : étudier plus spécifiquement les interactions entre les racines d'ortie et les champignons endophytes de type DSE associés au peuplier pouvant se produire lorsque ces plantes sont en co-culture.

Hypothèse de travail : pour répondre à des stress induits par le peuplier (*e.g.*, compétition pour les nutriments, apport de phytopathogènes) l'ortie développerait des interactions avec les DSE présents dans la rhizosphère en « recrutant » potentiellement une fraction associée au peuplier.

Méthode : réalisation d'un test en mésocosme, basé sur un sol stérile reprenant les modalités de culture de cette étude et dans lequel les plantes seraient inoculées avec des souches de DSE.

Enfin, en raison de l'importance des champignons ectomycorhiziens et des DSE pour le développement des plantes en présence d'ETM (Otero-Blanca et al., 2018), il apparaît essentiel de conforter ces résultats obtenus en mésocosme par des expérimentations conduites *in-situ* à partir de la parcelle PHYTOFIBER.

→ L'étude par barcoding environnemental a permis de détecter un nombre important de séquences attribuées à des EMF et plus particulièrement à *I. rimosa* dans les racines d'ortie étudiées.

Ces résultats surprenants allaient à l'encontre de notre hypothèse de départ selon laquelle l'ortie ne serait pas associée à des champignons symbiotiques en raison des observations faites dans la littérature (*e.g.*, inhibition du développement de *Glomus mossae*, absence de structures ectomycorhiziennes) (section 1.4.8.2). De plus, nous avons démontré que l'ensemble des taxons d'EMF détectés dans les racines d'ortie l'étaient également dans les racines des peupliers, et ce de manière proportionnelle.

Perspective de travail : comprendre la nature des interactions entre les EMF et l'ortie.

Hypothèse de travail : les EMF associés aux espèces ligneuses pourraient coloniser les racines de plantes non-mycorhiziennes accompagnatrices comme l'ortie, sous la forme de champignons endophytes, lorsqu'elles sont co-cultivées.

Méthode : l'approche adoptée dans des travaux visant à mieux caractériser les différentes niches écologiques du champignon ectomycorhizien *Tuber melanosporum* (Schneider-Maunoury et al., 2018) pourrait s'appliquer à cette étude et permettre de conclure quant à cette hypothèse proposée. La première étape pourrait consister en la recherche de preuves morphologiques plus directes de l'endophytisme des EMF dans des racines d'ortie, ce qui peut se concrétiser par des expériences d'hybridation fluorescente *in-situ* (FISH). Cette technique utilise des sondes spécifiques fluorescentes afin de détecter la présence d'organismes à l'intérieur des cellules. Enfin, une approche par RNAseq visant à détecter l'expression de certains gènes codant pour des fonctions métaboliques propres aux EMF pourrait permettre de vérifier le caractère fonctionnel de ces champignons présents en tant qu'endophyte.

Ces expériences complémentaires permettraient d'enrichir les travaux actuels visant à reconsidérer les niches écologiques des communautés fongiques (Selosse et al., 2018).

A partir de l'étude des champignons rhizosphériques, nous avons ainsi pu appréhender des interactions complexes et potentiellement tripartites (*i.e.*, peupliers – champignons mycorhiziens – orties) au sein de la rhizosphère de cet agrosystème peuplier-ortie, ouvrant de nombreuses pistes de recherche fondamentale et appliquée. De plus, nos résultats semblent nuancer le caractère antifongique de l'ortie, attribué dans le cadre d'études précédentes. Cette étude s'est focalisée sur les communautés fongiques, toutefois une approche similaire orientée sur les bactéries semblerait également pertinente compte-tenu de leur importance comparable dans la rhizosphère. Il est à noter cependant que la plupart des études menées au LCE sur les communautés bactériennes soulignent leur moindre réactivité aux modifications de l'environnement biotique ou abiotique, comparé aux communautés fongiques.

### 5.2.2 La nature de ces interactions complexes reste à appréhender

Compte-tenu du potentiel allélopathique du peuplier dans les SAF (Khan et al., 2016), nous avons initialement émis l'hypothèse que des interactions allélopathiques directes ou indirectes au moyen de composés phénoliques se produisent lorsque l'ortie et le peuplier sont associés. Nous avons testé cette hypothèse *via* la mesure des phénols totaux en tant que première approche, suivie d'une analyse par métabolomique ciblée sur ces polyphénols, présents dans les racines de peuplier et d'ortie issus de la parcelle de Fresnes. Nos résultats n'ont à ce jour pas permis d'entrevoir un phénomène d'allélopathie directe entre ces deux espèces. Toutefois, l'influence réciproque de

l'ortie et du peuplier sur la structure de leur microbiome fongique respectif, discutée dans la section 5.2.1, semblent suggérer un phénomène d'allélopathie indirect.

L'étude par métabolomique a quant à elle permis de déceler des quantités différentes de certains composés présents dans les racines d'ortie et de peuplier, selon les traitements. Toutefois, en raison des facteurs confondants préalablement mentionnés (*i.e.*, densité d'ortie dépendante du cultivar de peuplier),

→ l'étude *in-situ* ne nous a pas permis d'affirmer que les variations métaboliques observées pour les cultivars de peuplier seraient liées à des profils métaboliques propres à chacun, ou à des réponses métaboliques liées à la densité d'ortie.

Cette étude n'est pas achevée, la prochaine étape consistera à croiser les données issues de la métabolomique avec celles issues du barcoding environnemental et à identifier des composés potentiellement impliqués dans l'inhibition des symbioses fongiques discutée dans la section précédente.

*Perspective de travail* : conclure quant à la nature des interactions chimiques ortie-peuplier en croisant les données du microbiome fongique rhizosphérique avec les données du métabolome des plantes

*Hypothèse de travail* : certains des métabolites séparés par UHPLC-UV présenteraient un rôle dans les interactions peuplier-champignon-ortie.

*Méthode* : en poursuivant nos travaux initiés sur l'identification des composés qui varient, nous serons en mesure de mieux caractériser leur fonction. De plus, les données issues de la métabolomique seront mises en lien avec celles issues du barcoding environnemental, ces deux approches ayant été mises en œuvre sur les mêmes échantillons provenant de la parcelle de Fresnes-sur-Escout. Cette approche pourrait notamment permettre de détecter des corrélations entre les communautés microbiennes rhizosphériques et les concentrations en métabolites.

Dans l'éventualité où cette approche *in-situ* ne permette pas de conclure, une approche comparable sur les échantillons issus du test en mésocosme pourrait être adoptée. En raison de modalités plus contrastées, l'effet de l'ortie sur le profil métabolique du peuplier et inversement pourraient être appréhendés, avec toutefois la contrainte de ne pas être représentatif des conditions *in-situ*.

## 5.3 L'ortie et le peuplier, une combinaison performante pour le phytomanagement des sites contaminés par les ETM.

### 5.3.1 L'ortie, une plante excluante adaptée à la phytostabilisation des sites contaminés par les ETM

A partir de la synthèse bibliographique, nous avons pu voir que l'ortie n'a jamais fait l'objet d'études approfondies en vue d'être utilisée dans un contexte de phytomanagement (section 1.3.2.1). Toutefois, plusieurs travaux se sont intéressés à sa capacité à absorber et à accumuler les ETM, aboutissant parfois à des conclusions contrastées (Khan and Joergensen, 2006; Nica et al., 2012; Paukzto and Mirosławski, 2019; Viktorova et al., 2016). A partir de l'analyse par ICP-AES ou AMA-254 de divers tissus d'ortie indigène prélevés directement sur les deux sites expérimentaux ou après avoir été cultivés en mésocosme, nous avons pu démontrer que

→ l'ortie accumule le Cd, Cu, Zn et Pb exclusivement dans ses racines et transloque de faibles quantités vers ses parties aériennes (section 2.2). Concernant le Hg, des teneurs très en deçà des teneurs potentiellement toxiques ont été mesurées (section 3.3).

Ces résultats laissent ainsi supposer que l'ortie serait une plante adaptée à la phytostabilisation des sites contaminés par les ETM. Toutefois, en raison de son système racinaire très superficiel, cette stabilisation *via* les racines ne semble effective que dans les premiers centimètres de sol, ce qui appuie la nécessité de la combiner avec une espèce ligneuse.

Par ailleurs, l'étude en mésocosme nous a permis de déceler que

→ l'ortie présente des signes de tolérance aux ETM

dans la mesure où nous n'avons pas détecté d'impact du sol fortement contaminé sur la biomasse produite et sur son rendement photosynthétique, comparativement au sol plus légèrement contaminé. Il est probable que certains composés phénoliques dont la quantité dans les racines s'est vue influencée par le niveau de contamination (section 2.4) puissent être impliqués dans cette tolérance.

### 5.3.2 L'ortie et le peuplier, des espèces ingénieurs pour la restauration écologique des sites dégradés

A partir des études menées sur les deux sites expérimentaux, l'ortie et le peuplier sont apparus comme étant des espèces déterminantes pour la complexification et la diversification des



espèces présentes de ces écosystèmes perturbés. Leur participation à la restauration écologique a principalement été investiguée sur le site de Tavaux, à partir d'une étude entomologique. Le choix s'est porté sur cette communauté en raison de son étroite relation avec les plantes et de sa place dans les premiers maillons trophiques, conditionnant ainsi l'apparition des maillons supérieurs. L'anthroposol étudié présente des propriétés agronomiques suffisantes pour permettre une revégétalisation naturelle du site. Toutefois, une étude préliminaire ainsi que nos propres investigations ont indiqué que la diversité floristique de cette lagune est relativement pauvre et principalement représentée par des espèces caractéristiques des milieux humides. Ainsi, les roseaux communs (*Phragmites australis*) et les saules (*Salix* spp.) composent l'essentiel de la lagune (Zappelini et al., 2015). Contrairement à certains sites industriels (Zapata-Carbonell et al., 2019), la revégétalisation de cette lagune de dépôt de sédiments n'était donc pas le principal enjeu. Toutefois promouvoir la biodiversité à tous les niveaux, reste une priorité dans le domaine du phytomanagement.

Nous avons discuté plus haut (section 5.1.3) de l'importance du peuplier dans l'apparition et le développement de l'ortie, faisant de lui le « starter » à l'origine de la dynamisation de l'écosystème, principalement assurée par l'ortie. En effet, *via* un inventaire entomologique conduit sur deux ans dans la parcelle de Tavaux,

→ nous avons pu mettre en évidence une diversité entomologique aussi riche qu'en milieu naturel non contaminé par le Hg et remplissant des fonctions écologiques variées et profitables à l'ensemble de l'agrosystème étudié (section 3.2).

D'après les résultats obtenus, l'ortie conditionne la présence de la majorité des insectes de l'agrosystème, devant le peuplier et les autres espèces herbacées accompagnatrices, ce qui renforce son caractère de « réservoir à insectes » sur le site étudié. Ces observations restent toutefois à nuancer dans la mesure où l'effort d'échantillonnage sur le peuplier est probablement inférieur à celui sur ortie. Par ailleurs, parmi les espèces phytophages majoritaires identifiées sur l'ortie, aucune ne semble nuisible au peuplier de par leur caractère spécialiste.

Basé sur les observations faites en milieu naturel (Baverstock et al., 2011; Perrin, 1976), le puceron de l'ortie *M. carnosum* apparaît comme une composante essentielle de la biodiversité entomologique en raison de son potentiel à attirer des insectes auxiliaires. Dans le cadre de nos travaux, nous avons capturé, sur l'ortie, 67 espèces d'insectes prédateurs du puceron dont certaines capables de passer de la strate herbacée à la strate arborée pour se nourrir (e.g., *Micromus variegatus*, *Chrysoperla perla*, *Coccinella septempunctata*, *Panorpa* spp.). Ce résultat confirme ainsi le rôle du puceron dans notre agrosystème et nous a ouvert des perspectives de recherche.

Perspective de travail : identifier de manière directe une potentielle influence positive des auxiliaires attirés par *M. carnosum* pour les peupliers.

Hypothèse de travail : les insectes auxiliaires attirés par *M. carnosum* seraient susceptibles de changer de strate afin de consommer des proies potentiellement nuisibles pour le peuplier.

Méthode : afin de détecter des preuves directes de leur consommation d'espèces pouvant potentiellement nuire au peuplier, il serait pertinent d'employer une approche similaire à celle de [Stephan et al., \(2016\)](#), reposant sur des tests de prédation *in-situ*, basés sur la récolte, l'introduction et le suivi d'œufs de coléoptère potentiellement nuisibles (*e.g. crepidodera spp.* dans notre contexte), déposés sur des feuilles de peuplier.

Parmi les principaux prédateurs, la fourmi rouge *Myrmica rubra* était l'espèce la plus abondante suivie par des punaises prédatrices de la famille des Nabidae. Certains petits prédateurs communément retrouvés sur l'ortie (*e.g., Anthocoris nemorum*) n'ont pas été détectés. Ce phénomène peut être lié à la surabondance de *M. rubra* sur les tiges d'ortie du site de Tavaux, élevant et protégeant le puceron *M. carnosum*. Par ailleurs, la surabondance de cette espèce de fourmis sur l'ortie n'a pas été mentionnée en milieu naturel et n'a pas été observée sur la parcelle de Fresnes-sur-Escaut au cours des différentes phases d'échantillonnage des orties. L'absence de certains prédateurs communément retrouvés sur l'ortie laisse supposer que ces derniers ne sont pas suffisamment compétitifs pour prédater les pucerons protégés par les fourmis, tandis que les espèces de Nabidae le sont davantage. Par ailleurs, la surabondance de *M. rubra* est potentiellement liée aux caractéristiques du site et à une éventuelle tolérance au Hg la rendant particulièrement compétitive dans ce système. Il semble difficile d'appréhender cette possibilité autrement qu'en menant une étude plus poussée à l'échelle des fourmis et des autres prédateurs sur la parcelle étudiée ou en recherchant sa présence sur des orties en milieu naturel. Si cette hypothèse venait à être confirmée, la surabondance de cette fourmi serait une conséquence de la contamination, impactant ainsi le fonctionnement et la biodiversité de cet agrosystème peuplier-ortie.

Nous avons pu démontrer que la restauration écologique du site est essentiellement déclenchée par certaines espèces « clé de voute » de l'agrosystème, telle que l'ortie qui est associée à une importante diversité entomologique ou encore son puceron favorable à l'apparition d'auxiliaires. Toutefois, la surabondance de la fourmi *M. rubra* semble avoir empêché l'apparition de certaines espèces auxiliaires associées aux pucerons et par conséquent altéré cette diversité entomologique.

### 5.3.3 L'ortie et sa biodiversité ne sont pas les acteurs principaux de la dissémination des ETM

Nous avons vu dans le chapitre 1 (section 1.2.5) que les insectes sont particulièrement exposés aux ETM et tout particulièrement au Hg, contaminant connu pour son potentiel de

biomagnification dans les réseaux trophiques terrestres aussi bien en milieu contaminé (Zheng et al., 2018) que naturel (Rimmer et al., 2010). Compte-tenu des faibles teneurs en Hg mesurées dans l'ortie, nous avons initialement émis comme hypothèse que le phénomène de biomagnification du Hg serait peu prononcé à l'intérieur du système plante-insecte associé à l'agrosystème peuplier-ortie. Notre approche écotoxicologique menée sur le site de Tavaux a permis de mettre en lumière

→ un phénomène de biomagnification peu prononcé dans les premiers maillons (plante – phytophages – prédateurs spécialistes) du réseau trophique associé à l'ortie mais qui s'intensifie pour les prédateurs généralistes (section 3.3).

En effet, de faibles concentrations en THg ont été mesurées dans les 3 premiers maillons trophiques (*i.e.* : ortie < insectes phytophages < prédateurs spécialistes), tandis que cette concentration augmente d'un facteur 15 dans le maillon correspondant aux prédateurs généralistes (*i.e.*, espèces de la famille des Nabidae).

Perspectives de travail : identifier les proies de ces prédateurs généralistes et les implications dans ce phénomène de biomagnification.

Hypothèse de travail : l'entrée du Hg dans le système ortie-insecte serait liée aux chironomes (*Chironomus sp.*), très abondants dans tout le secteur, y compris sur l'ortie.

Méthode : Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser le contenu intestinal des punaises prédatrices (Nabidae), par la technique du barcoding, de manière à identifier précisément les différentes proies consommées.

En plus de cela, dans le cadre de perspectives à plus long terme, il serait pertinent d'investiguer l'exposition des maillons supérieurs susceptibles de consommer des insectes (*e.g.*, batraciens, oiseaux) afin de suivre, avec plus d'amplitude, ce phénomène de biomagnification.

Par ailleurs, en plus d'avoir observé une nette biomagnification du MeHg dans le système associé à l'ortie,

→ nous avons mesuré des quantités particulièrement élevées en MeHg (3600 µg/kg) dans d'autres insectes phytophages (*e.g.*, Elateridae), exposés au Hg via un contact direct en raison d'une partie de leur cycle biologique dans le sol.

Toutefois le sol ne présentant que de faibles teneurs en MeHg (1.8 µg/kg), l'origine de ces teneurs particulièrement élevée en MeHg nécessite d'être identifiée par des études complémentaires.

Perspective de travail : identifier les phénomènes à l'origine des concentrations en MeHg particulièrement élevées dans les tissus de certains taxons d'insectes.

Hypothèse de travail : cette concentration particulièrement élevée en Hg sous forme de MeHg serait liée à un phénomène de méthylation bactérienne à l'intérieur du système digestif de ces insectes

Méthode : il est envisagé d'appréhender également cela *via* une approche de barcoding environnemental réalisée sur le microbiome intestinal de ces espèces afin de rechercher la présence de bactéries sulfato-réductrices ou Fe-réductrices. Si ce type de bactéries est retrouvé dans leur contenu intestinal, il pourrait également être pertinent d'appréhender leur caractère fonctionnel *via* de la génomique ciblée, par exemple sur les gènes *hgcAB* impliqués dans ce phénomène de méthylation (Gilmour et al., 2013).

Ces résultats nous ont montré que les insectes hébergés par l'agrosystème peuplier-ortie sont exposés au Hg, avec des teneurs dépendantes de leurs traits de vie. De ce point de vue, ces résultats nuancent l'intérêt d'utiliser l'ortie pour favoriser la biodiversité entomologique sur des sites contaminés. Nous avons toutefois démontré que les espèces qui lui sont associées ne sont pas les plus exposées au Hg mais que les principaux biovecteurs sont des taxons bien identifiés et associés au peuplier (*i.e.*, Elateridae) ou présents localement quelle que soit la nature de la végétation (*i.e.*, Chironomidae).

#### 5.3.4 Une co-culture ortie-peuplier est-elle adaptée à la production de biomasse ?

L'un des enjeux prioritaires de l'agroforesterie étant de maîtriser les associations végétales afin de garantir des rendements viables, nous avons tenté d'appréhender l'influence de l'ortie sur le développement du peuplier, et inversement, *via* l'étude en mésocosme.

- ➔ Les résultats obtenus en mésocosme tendent à confirmer un impact négatif du peuplier sur le développement de l'ortie, tandis que
- ➔ La quantité de biomasse (aérienne et racinaire) produite par le peuplier ne semble pas être affectée par la présence de l'ortie

Néanmoins, dans le cadre de ce test en mésocosme, les deux plantes se sont développées conjointement dans un faible volume de sol (600 cm<sup>3</sup>), surévaluant ainsi la proximité entre les deux plantes par rapport aux conditions *in-situ*, ce qui peut être à l'origine d'effets non présents sur le terrain. Il semble donc primordial de confirmer ces premiers résultats à partir d'expériences *in-situ*, conduites sur la parcelle PHYTOFIBER, implantée en 2018 pour répondre à cette problématique.

### 5.3.5 Pour être productif, ce dispositif nécessite d'être façonné

Différentes filières de valorisation ont été envisagées pour l'ortie, mais nous avons décidé de nous focaliser sur la valorisation de sa fibre. Ce choix a principalement été motivé par la demande croissante en fibres végétales destinées à une utilisation industrielle.

- Des concentrations en ETM bien inférieures aux seuils tolérables pour les cultures agronomiques ont été mesurées dans les tiges d'orties (section 4.5).
- De plus, la teneur en fibre de cette ortie indigène et leurs caractéristiques sont comparables à celles d'orties cultivées.

Compte tenu des faibles concentrations en ETM, une application semble envisageable. De plus les propriétés particulièrement encourageantes des fibres extraites de l'ortie indigène suggèrent de la cultiver à plus grande échelle.

- Les rendements de l'ortie indigène cultivée avec le peuplier restent nettement inférieurs à ceux obtenus dans le cadre de pratiques agronomiques traditionnelles.

Il faut néanmoins rappeler que l'ortie étudiée est totalement spontanée et par conséquent le système possède une marge de progression très importante. En conservant une démarche agroécologique, de nombreuses pistes sont envisagées pour optimiser le potentiel productif de l'ortie à partir de ce système.

*Perspective de travail* : optimiser les rendements de l'ortie cultivée sous un couvert de peuplier selon une approche agroécologique

*Hypothèse de travail* : le caractère spontané de l'ortie issue du système étudié laisse place à une marge de progression très importante

*Méthode* : la conception de la parcelle PHYTOFIBER s'est inscrite dans cette démarche, afin d'être utilisée comme support dans des essais visant à tester différents leviers pour optimiser les rendements de l'ortie. A partir des différentes densités de peupliers plantés, il sera possible d'identifier la plus adaptée au développement de l'ortie. De plus, cette parcelle nous permettra de comparer les rendements, le contenu en fibre et les propriétés mécaniques de l'ortie indigène avec ceux du cultivar Roville, préalablement sélectionné pour ce type d'application. Cela permettra d'appréhender si les faibles rendements obtenus à partir des dispositifs préexistants sont inhérents à l'ortie indigène ou s'ils sont dus aux caractéristiques du sol.

La conception de la parcelle PHYTOFIBER s'est inscrite dans cette démarche, afin d'être utilisée comme support dans des essais visant à tester différents leviers pour optimiser rendements de l'ortie. A partir des différentes densités de peupliers plantés, il sera possible d'identifier la plus adaptée au développement de l'ortie. De plus, cette parcelle nous permettra de comparer les rendements, le contenu en fibre et les propriétés mécaniques de l'ortie indigène avec ceux du cultivar Roville, préalablement sélectionné pour ce type d'application. Cela permettra

d'appréhender si les faibles rendements obtenus à partir des dispositifs préexistants sont inhérents à l'ortie indigène ou s'ils sont dus aux caractéristiques du sol.

En outre, une attention particulière devra être accordée aux populations de pucerons, qui, au-delà de promouvoir des insectes auxiliaires, peuvent s'avérer particulièrement dommageables pour leurs hôtes lorsque la population atteint son pic. De la même manière, dans le cadre d'un système axé sur la production d'ortie, il apparaît nécessaire de suivre l'évolution des plantes susceptibles de concurrencer l'ortie, voire de les éliminer mécaniquement si leur impact sur l'ortie se fait trop important.

Les expériences conduites à partir des parcelles préexistantes nous ont permis de confirmer la possibilité de faire deux récoltes d'orties annuelles et d'entrevoir les périodes optimales à partir de l'état de maturité des fibres. Comme suggéré par [Alhmedi et al., \(2007\)](#), il semble pertinent de faire la première récolte en mai, peu de temps après le pic de population du puceron, afin de permettre l'arrivée des auxiliaires qui lui sont associés tout en encourageant leur migration vers d'autres proies de l'agrosystème au moment de la coupe. Néanmoins, nos résultats ont montré que le mois de mai correspond également au pic d'abondance de la majorité des autres espèces. La récolte étant une perturbation majeure pour la faune locale, la conciliation des aspects économiques (*e.g.*, qualité des fibres) avec les aspects écologiques (*e.g.*, biodiversité présente) apparaît donc comme un enjeu majeur. Pour cela, un suivi plus précis des populations d'insectes et de la maturité des fibres, entre début avril et fin mai, pourrait permettre d'identifier une date de récolte optimale. Mais une seule coupe, réalisée en fin de saison de végétation (*i.e.*, août - septembre) semble plus favorable si l'aspect écologique prévaut.

Enfin, les questions liées à la mécanisation de la récolte, à la collecte et au transport de la biomasse, directement liées à l'équilibre économique de ce système seront des points à considérer dans le cadre des projets PHYTOFIBER et NETFIB et ce, au regard des contaminants présents.

# Conclusions Générales

---

Ces travaux, pionniers dans le domaine des phytotechnologies, ont pour la première fois mis en lumière la possibilité et l'intérêt d'adopter une démarche agroforestière pour le phytomanagement de sites pollués par les ETM. A partir d'une approche multidisciplinaire déployée sur deux sites expérimentaux situés en France, dans lesquels l'ortie s'est développée spontanément, nous avons validé la viabilité du dispositif agroforestier peuplier-ortie pour ce type d'application.

Ces travaux ont permis de faire émerger certains facteurs clés, tels que la luminosité, favorables à un développement spontané de l'ortie sous des peupliers. Nous avons également révélé un fonctionnement complexe de cet agrosystème à l'interface rhizosphérique, compartiment charnière dans lequel les micro-organismes fongiques semblent jouer le rôle d'intermédiaire dans les interactions entre ces deux plantes.

Par ailleurs, nous avons pu évaluer le potentiel de ce dispositif pour répondre aux enjeux du phytomanagement et promouvoir des services écosystémiques (Figure 49). Ainsi, la valeur ajoutée de l'ortie réside dans i) sa capacité à stabiliser les contaminants au niveau de ses parties souterraines afin d'éviter certains phénomènes entraînant une dissémination des ETM, ii) sa capacité à promouvoir une diversité entomologique auxiliaire et favorable à la restauration écologique de ces sites et enfin, iii) la qualité de ses fibres et la possibilité de les utiliser pour des applications "matériaux". Bien que les rendements de l'ortie sur les sites étudiés soient relativement faibles en raison du caractère spontané de la plante, la marge de progression en terme de productivité reste importante.

Enfin, en plus d'offrir de nouvelles pistes de recherche fondamentale et appliquée, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives pour le phytomanagement des sites pollués dans la mesure où l'approche employée ici pourrait s'appliquer à de nombreuses typologies de sites pollués et à un vaste panel de combinaisons de plantes.

# Refonctionnalisation & complexification

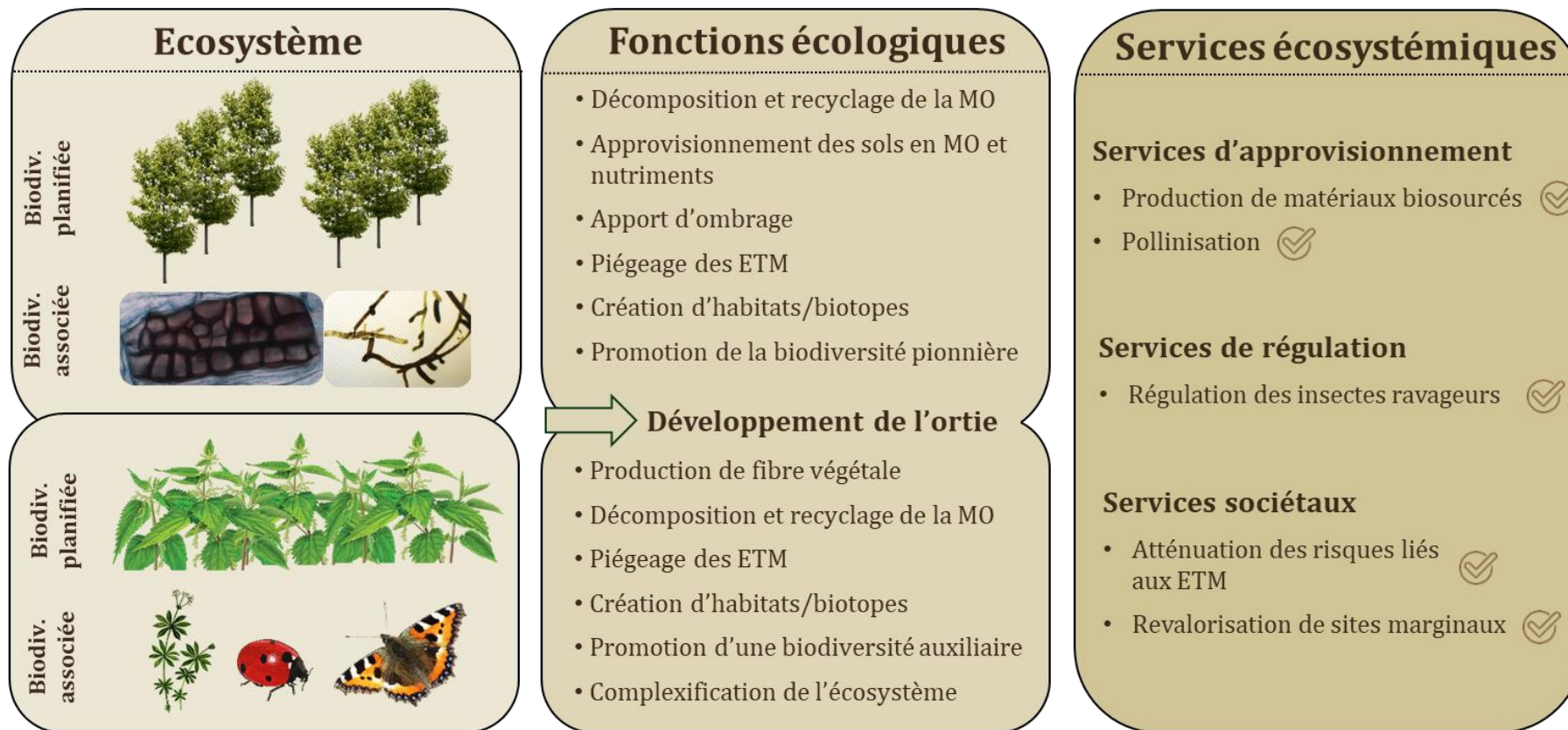


Figure 49 : Principales fonctions écologiques de l'agrosystème peuplier-ortie et services écosystémiques associés, liste des services écosystémiques repris du programme EFSE (Tibi and Therond, 2017).



# Références Bibliographiques

---

- Abeysinghe, K.S., Qiu, G., Goodale, E., Anderson, C.W.N., Bishop, K., Evers, D.C., Goodale, M.W., Hintelmann, H., Liu, S., Mammides, C., et al. (2017). Mercury flow through an Asian rice-based food web. *Environ. Pollut.* *229*, 219–228.
- ADEME (2012). Phytotechnologies appliquées aux sites pollués: recueil des interventions : journée technique nationale, 17 octobre 2012, Paris 7e (Angers: ADEME).
- Adhikari, B.M., Bajracharya, A., and Shrestha, A.K. (2016). Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Sci. Nutr.* *4*, 119–124.
- Algreen (2015). The Feasibility of Tree Coring as a Screening Tool for Selected Contaminants in the Subsurface. PhD Thesis. Technical University of Denmark.
- Algreen, M., Trapp, S., and Rein, A. (2014). Phytoscreening and phytoextraction of heavy metals at Danish polluted sites using willow and poplar trees. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *21*, 8992–9001.
- Algreen, M., Trapp, S., Jensen, P.R., and Broholm, M.M. (2015a). Tree Coring as a Complement to Soil Gas Screening to Locate PCE and TCE Source Zones and Hot Spots. *Groundw. Monit. Remediat.* *35*.
- Algreen, M., Kalisz, M., Stalder, M., Martac, E., Krupanek, J., Trapp, S., and Bartke, S. (2015b). Using pre-screening methods for an effective and reliable site characterization at megasites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Alhmedi, A., Haubruge, E., Bodson, B., and Francis, F. (2007). Aphidophagous guilds on nettle (*Urtica dioica*) strips close to fields of green pea, rape and wheat. *Insect Sci.* *14*, 419–424.
- Alhmedi, A., Haubruge, E., and Francis, F. (2009). Effect of stinging nettle habitats on aphidophagous predators and parasitoids in wheat and green pea fields with special attention to the invader *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Entomol. Sci.* *12*, 349–358.
- Alhmedi, A., Haubruge, E., D’Hoedt, S., and Francis, F. (2011). Quantitative food webs of herbivore and related beneficial community in non-crop and crop habitats. *Biol. Control* *58*, 103–112.
- Ali, H., Khan, E., and Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* *91*, 869–881.
- Alkorta, I., Becerril, J.M., and Garbisu, C. (2010). Phytostabilization of metal contaminated soils. *Rev. Environ. Health* *25*, 135–146.
- Altieri, M.A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* *74*, 19–31.
- Altieri, M.A., and Doll, J.D. (1978). The Potential of Allelopathy as a Tool for Weed Management in Crop Fields. *PANS* *24*, 495–502.
- Alvarenga, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., and Cunha-Queda, A.C. (2009). Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. *Chemosphere* *74*, 1292–1300.
- Amal Ait, H.S., El Otmani, I.S., Derfoufi, S., and Benmoussa, A. (2016). Mise en valeur du potentiel nutritionnel et thérapeutique de l’ortie dioïque (*Urtica dioica* L.). HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., and Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* *76*, 160–202.
- Arienzo, M., Adamo, P., and Cozzolino, V. (2004). The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Sci. Total Environ.* *319*, 13–25.
- Asad, M., MENANA, Z., Ziegler-Devin, I., Bert, V., Chalot, M., Herzig, R., Mench, M., and Brosse, N. (2017). Pretreatment of trace element-enriched biomasses grown on phytomanaged soils for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* *107*, 63–72.
- Assad, M. (2017). Transfert des éléments traces métalliques vers les végétaux : mécanismes et évaluations des risques dans des environnements exposés à des activités anthropiques.
- Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M., and Tatin-Froux, F. (2016). Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* *146*, 1–7.
- Assunção, A.G.L., Schat, H., and Aarts, M.G.M. (2018). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* *351*–360.
- Augšpole, I., Duma, M., Ozola, B., and Cinkmanis, I. (2017). Phenolic profile of fresh and frozen nettle, goutweed, dandelion and chickweed leaves. p.
- Austruy, A., Yung, L., Ambrosi, J.P., Girardclos, O., Keller, C., Angeletti, B., Dron, J., Chamaret, P., and Chalot, M. (2019). Evaluation of historical atmospheric pollution in an industrial area by dendrochemical approaches. *Chemosphere* *220*, 116–126.
- Bååth, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water. Air. Soil Pollut.* *47*, 335–379.
- Babin-Fenske, J., and Anand, M. (2011). Patterns of insect communities along a stress gradient following decommissioning of a Cu–Ni smelter. *Environ. Pollut.* *159*, 3036–3043.
- Bacci, L., Baronti, S., Predieri, S., and di Virgilio, N. (2009). Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy. *Ind. Crops Prod.* *29*, 480–484.

- Bacci, L., Di Lonardo, S., Albanese, L., Mastromei, G., and Perito, B. (2011). Effect of different extraction methods on fiber quality of nettle (*Urtica dioica* L.). *Text. Res. J.* *81*, 827–837.
- Bağcı, E. (2002). Fatty Acid Composition of the Aerial Parts of *Urtica dioica* (Stinging nettle) L. (Urticaceae). In *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*, B. Şener, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 323–327.
- Baize, D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France): Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET (Quae).
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* *3*, 643–654.
- Baker, A.J.M., and Walker, P.L. (1989). Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Speciat. Bioavailab.* *1*, 7–17.
- Balouet, J.C., Burken, J.G., Karg, F., Vroblesky, D., Smith, K.T., Grudd, H., Rindby, A., Beaujard, F., and Chalot, M. (2012). Dendrochemistry of Multiple Releases of Chlorinated Solvents at a Former Industrial Site. *Environ. Sci. Technol.* *46*, 9541–9547.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., and Morel, J.L. (2015). Improving the Agronomy of *Alyssum murale* for Extensive Phytomining: A Five-Year Field Study. *Int. J. Phytoremediation* *17*, 117–127.
- Bassett, I.J., Crompton, C.W., and Woodland, D.W. (1977). The biology of canadian weeds: 21. *Urtica dioica* L. *Can. J. Plant Sci.* *57*, 491–498.
- Batish, D.R. (2008a). Ecological basis of agroforestry (Boca Raton, Fla.: CRC Press).
- Baumgardner, D.J. (2016). Stinging nettle: the bad, the good, the unknown. *J. Patient-Centered Res. Rev.* *3*, 48–53.
- Baverstock, J., Porcel, M., Clark, S.J., Copeland, J.E., and Pell, J.K. (2011). Potential value of the fibre nettle *Urtica dioica* as a resource for the nettle aphid *Microlophium carnosum* and its insect and fungal natural enemies. *BioControl* *56*, 215–223.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., and Kausserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* *10*, 189.
- Bennouar, Y., and Chekakta, S. (2017). Etude phytochimique et biologique chez l'espèce *Urtica dioica* au niveau des deux parties : racinaire et aérienne. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *84*, 11–18.
- Bert, V. (2012). Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués état de l'art et guide mise en œuvre (Les Ulis: EDP Sciences).
- Bert, V. (2017). Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués : nouveaux résultats de recherche et démonstration.
- Bert, V., Macnair, M.R., Laguerie, P.D., Saumitou-Laprade, P., and Petit, D. (2000). Zinc tolerance and accumulation in metalcolous and nonmetalcolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytol.* *146*, 225–233.
- Bert, V., Allemon, J., Sajet, P., Dieu, S., Papin, A., Collet, S., Gaucher, R., Chalot, M., Michiels, B., and 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 Bioenergy* *96*.
- Berthelot, C., Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M., and Blaudez, D. (2016). Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiol. Ecol.* *92*.
- Berthelot, C., Chalot, M., Leyval, C., and Blaudez, D. (2019). From Darkness to Light: Emergence of the Mysterious Dark Septate Endophytes in Plant Growth Promotion and Stress Alleviation. In *Endophytes for a Growing World*, (Cambridge University Press), pp. 143–164.
- Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., and Shirali, P. (2007). Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environ. Pollut.* *147*, 546–553.
- Bigam, G., Liang, L., Balouet, J.C., and Chalot, M. (2015). Phytoscreening-based assessment of mercury in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Bisht, S., Bhandari, S., and Bisht, N.S. (2012). *Urtica dioica* (L): an undervalued, economically important plant. *Agric Sci Res J* *2*, 250–2.
- Bodros, E., and Baley, C. (2008). Study of the tensile properties of stinging nettle fibres (*Urtica Dioica*). *Mater. Lett.* *62*, 2143–2145.
- Bojović, B.M., Jakovljević, D.Z., and Stanković, M.S. (2015). Allelopathic effect of aqueous extracts of *Urtica dioica* L. on germination and growth of some cereals. In *2nd International Conference on Plant Biology and 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Petnica, Serbia. Abstract Book*, p.
- Bondada, B.R., Tu, S., and Ma, L.Q. (2004). Absorption of foliar-applied arsenic by the arsenic hyperaccumulating fern (*Pteris vittata* L.). *Sci. Total Environ.* *332*, 61–70.
- Borgå, K., Kidd, K.A., Muir, D.C.G., Berglund, O., Conder, J.M., Gobas, F.A.P.C., Kucklick, J., Malm, O., and Powell, D.E. (2012). Trophic magnification factors: considerations of ecology, ecosystems, and study design. *Integr. Environ. Assess. Manag.* *8*, 64–84.
- Boshoff, M., De Jonge, M., Dardenne, F., Blust, R., and Bervoets, L. (2014). The impact of metal pollution on soil faunal and microbial activity in two grassland ecosystems. *Environ. Res.* *134*, 169–180.

- Bowen, H.J.M. (1979). Environmental chemistry of the elements. Environ. Chem. Elem.
- Boyd, R.S., and Jaffre, T. (2001). Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebertia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy: South Afr. J. Sci. 97, 535–538.
- Boyd, R.S., and Wall, M.A. (2001). Responses of Generalist Predators Fed High-Ni *Melanotrichus boydi* (Heteroptera: Miridae): Elemental Defense Against the Third Trophic Level. Am. Midl. Nat. 146, 186–198.
- Boyd, R.S., Wall, M.A., and Jaffré, T. (2006). Nickel levels in arthropods associated with Ni hyperaccumulator plants from an ultramafic site in New Caledonia. Insect Sci. 13, 271–277.
- Bredemann, G. (1959). Die große Brennessel *Urtica dioica* L. Forschung über ihren Anbau zur Fasergewinnung. Akademie-Verlag.
- Broekaert, W.F., VAN Parijs, J., Leyns, F., Joos, H., and Peumans, W.J. (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. Science 245, 1100–1102.
- Brooks, R.R. (2008). Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. In Plants and the Chemical Elements, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 87–105.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., and Glick, B.R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46, 237–245.
- Burges, A., Epelde, L., Benito, G., Artetxe, U., Becerril, J.M., and Garbisu, C. (2016). Enhancement of ecosystem services during endophyte-assisted aided phytostabilization of metal contaminated mine soil. Sci. Total Environ. 562, 480–492.
- Burges, A., Alkorta, I., Epelde, L., and Garbisu, C. (2018). From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. Int. J. Phytoremediation 20, 384–397.
- Burken, J.G., Vroblesky, D.A., and Balouet, J.C. (2011). Review: Phytoforensics, Dendrochemistry, and Phytoscreening: New Green Tools for Delineating Contaminants from Past and Present. Environ. Sci. Technol. 45, 6218–6226.
- Butler, C.D., and Trumble, J.T. (2008). Effects of pollutants on bottom-up and top-down processes in insect–plant interactions. Environ. Pollut. 156, 1–10.
- Butler, C.D., Beckage, N.E., and Trumble, J.T. (2009). Effects of terrestrial pollutants on insect parasitoids. Environ. Toxicol. Chem. 28, 1111–1119.
- Candais, C. (2019). le retour à la nature avec la cueillette de plantes sauvages alimentaires : bienfaits ou danger ? Université de Nantes.
- Carrillo-González, R., Šimůnek, J., Sauvé, S., and Adriano, D. (2006). Mechanisms and Pathways of Trace Element Mobility in Soils. In Advances in Agronomy, (Academic Press), pp. 111–178.
- Carvalho, A.R., Costa, G., Figueirinha, A., Liberal, J., Prior, J.A.V., Lopes, M.C., Cruz, M.T., and Batista, M.T. (2017). *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Res. Int. 99, 485–494.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., and Palmer, T.M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. Sci. Adv. 1, e1400253.
- Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., and Garcerá, M.D. (2004). Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). J. Insect Physiol. 50, 737–749.
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S., and Pascual, C. (2012). Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. Environ. Sci. Technol. 46, 13361–13369.
- Chalot, M., Girardclos, O., Ciadamidaro, L., Zappellini, C., Yung, L., Durand, A., Pfendler, S., Lamy, I., Driget, V., and Blaudez, D. (2019). Poplar rotation coppice at a trace element-contaminated phytomanagement site: A 10-year study revealing biomass production, element export and impact on extractable elements. Sci. Total Environ. 134260.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., and Sparks, D.L. (2007). Improved Understanding of Hyperaccumulation Yields Commercial Phytoextraction and Phytomining Technologies. J. Environ. Qual. 36, 1429–1443.
- Chateau, L., Milton, Y., Petit, S., Pauget, B., and Challaye, C. (2018). La reconversion des friches polluées au service du renouvellement urbain : enseignements technico-économiques - Bilan des opérations aidées dans le cadre du dispositif ADEME d'aide aux travaux de dépollution pour la reconversion des friches polluées (période 2010-2016) (ADEME).
- Chiapusio, G., Pellissier, F., and Gallet, C. (2008). A la découverte de molécules allélopathiques phytotoxiques dans les agrosystèmes et écosystèmes. In Biopesticides d'origine Végétale, C. regnault-roger; B.P.C. Vincent, ed. (Lavoisier), pp. 65–86.
- Chick, T.A. (Consulting F., and Kielbaso, J.J. (1998). Allelopathy as an inhibition factor in ornamental tree growth: implications from the literature. J. Arboric. USA.
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappellini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., and Chalot, M. (2017). Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. Environ. Exp. Bot. 139, 48–56.
- Cole, M.M. (1973). Geobotanical and Biogeochemical Investigations in the Sclerophyllous Woodland and Shrub Associations of the Eastern Goldfield Area of Western Australia, with Particular Reference to the Role of *Hybanthus floribundus* (Lindl.) F. Muell. As a Nickel Indicator and Accumulator Plant. J. Appl. Ecol. 10, 269–320.

- Coles, J.A., Farley, S.R., and Pipe, R.K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Organ.* 22, 59–65.
- Crawford, L.A., Hodkinson, I.D., and Lepp, N.W. (1995). The Effects of Elevated Host-Plant Cadmium and Copper on the Performance of the Aphid *Aphis fabae* (Homoptera: Aphididae). *J. Appl. Ecol.* 32, 528–535.
- Cronk, Q., Hidalgo, O., Pellicer, J., Percy, D., and Leitch, I. (2016). Salix transect of Europe: variation in ploidy and genome size in willow-associated common nettle, *Urtica dioica* L. sens. lat., from Greece to arctic Norway. *Biodivers. Data J.* 4, e10003.
- Cundy, A., Bardos, P., Puschenreiter, M., Witters, N., Mench, M., Bert, V., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Weyens, N., and Vangronsveld, J. (2015). Developing Effective Decision Support for the Application of “Gentle” Remediation Options: The GREENLAND Project. *Remediat. J.* 25, 101–114.
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Church, A., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Neu, S., Mench, M., Witters, N., and Vangronsveld, J. (2013). Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for “gentle” remediation approaches: The European context. *J. Environ. Manage.* 129, 283–291.
- Cunha, M. do C.L. e, Nardi, L.V.S., Pereira, V.P., Bastos Neto, A.C., and Vedana, L.A. (2014). Evaluation of biological absorption coefficient of trace elements in plants from the pitinga mine district, amazonian region. *Rev. Inst. Geológico* 35.
- Dahiya, A. (2014). *Bioenergy: Biomass to Biofuels* (Academic Press).
- Dallinger, R., and Rainbow, P.S. (1993). *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (CRC Press).
- Dar, M.I., Green, I.D., Naikoo, M.I., Khan, F.A., Ansari, A.A., and Lone, M.I. (2017). Assessment of biotransfer and bioaccumulation of cadmium, lead and zinc from fly ash amended soil in mustard–aphid–beetle food chain. *Sci. Total Environ.* 584–585, 1221–1229.
- Dar, M.I., Green, I.D., and Khan, F.A. (2019). Trace metal contamination: Transfer and fate in food chains of terrestrial invertebrates. *Food Webs* 20, e00116.
- Dary, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A.J., and Pajuelo, E. (2010). “In-situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177, 323–330.
- Davies, G.C., and Bruce, D.M. (1998). Effect of environmental relative humidity and damage on the tensile properties of flax and nettle fibers. *Text. Res. J.* 68, 623–629.
- Davis, B.N.K. (1973). The Hemiptera and Coleoptera of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) in East Anglia. *J. Appl. Ecol.* 10, 213–237.
- Davis, B.N.K. (1975). The Colonization of Isolated Patches of Nettles (*Urtica dioica* L.) by Insects. *J. Appl. Ecol.* 12, 1–14.
- Davis, B.N.K. (1989). The European distribution of insects on stinging nettles, *Urtica dioica* L.: A field survey. *Bolletino Zool.* 56, 321–326.
- De Vico, G., Guida, V., and Carella, F. (2018). *Urtica dioica* (Stinging Nettle): A Neglected Plant With Emerging Growth Promoter/Immunostimulant Properties for Farmed Fish. *Front. Physiol.* 9.
- Degryse, F., Smolders, E., and Parker, D.R. (2009). Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications—a review. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 590–612.
- Delahaye, J. (2015). Utilisations de l’ortie - *Urtica dioica* L.
- Deng, L., Li, Z., Wang, J., Liu, H., Li, N., Wu, L., Hu, P., Luo, Y., and Christie, P. (2016). Long-term field phytoextraction of zinc/cadmium contaminated soil by *Sedum plumbizincicola* under different agronomic strategies. *Int. J. Phytoremediation* 18, 134–140.
- Desjardins, D., Brereton, N.J.B., Marchand, L., Brisson, J., Pitre, F.E., and Labrecque, M. (2018). Complementarity of three distinctive phytoremediation crops for multiple-trace element contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 610–611, 1428–1438.
- Devkota, B., and Schmidt, G.H. (2000). Accumulation of heavy metals in food plants and grasshoppers from the Taigetos Mountains, Greece. *Agric. Ecosyst. Environ.* 78, 85–91.
- Dhouibi, R., Affes, H., Ben Salem, M., Hammami, S., Sahnoun, Z., Zeghal, K.M., and Ksouda, K. (2019). Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., and Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Ind. Crops Prod.* 68, 42–49.
- Direction générale de la Prévention des Risques (2017). *Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués.*
- Domínguez, M.T., Madrid, F., Marañón, T., and Murillo, J.M. (2009). Cadmium availability in soil and retention in oak roots: Potential for phytostabilization. *Chemosphere* 76, 480–486.
- Draghi, F. (2005). L’ortie dioïque (*Urtica dioica* L.): étude bibliographique. PhD Thesis. UHP-Université Henri Poincaré.
- Dreyer, J., Müssig, J., Koschke, N., Ibenhal, W.-D., and Harig, H. (2002). Comparison of Enzymatically Separated Hemp and Nettle Fibre to Chemically Separated and Steam Exploded Hemp Fibre. *J. Ind. Hemp* 7, 43–59.
- Duncan, C.M., and Brusseau, M.L. (2018). An assessment of correlations between chlorinated VOC concentrations in tree tissue and groundwater for phytoscreening applications. *Sci. Total Environ.* 616–617, 875–880.
- Durand, A. (2017). Diversité et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes inféodées au peuplier et issues d’une friche industrielle enrichie en mercure. PhD Thesis. Université Bourgogne Franche-Comté.

- Durand, A., Maillard, F., Foulon, J., Gweon, H.S., Valot, B., and Chalot, M. (2017). Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microb. Ecol.*
- Durand, A., Maillard, F., Alvarez-Lopez, V., Guinchard, S., Bertheau, C., Valot, B., Blaudez, D., and 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. *Sci. Total Environ.* 622–623, 1165–1177.
- Dvorak, M., Lackner, R., Niederwanger, M., Rotondo, C., Schnegg, R., Ladurner, P., Pedrini-Martha, V., Salvenmoser, W., Kremser, L., Lindner, H., et al. (2018). Metal binding functions of metallothioneins in the slug *Arion vulgaris* differ from metal-specific isoforms of terrestrial snails. *Met. Integr. Biometal Sci.* 10, 1638–1654.
- Dziamski, A., and Stypczyńska, Z. (2015). Allelopathic effect of preparations of *Betula pendula* Roth., *Chamomilla recutita* L. and *Urtica dioica* L. on the initial growth of *Hordeum vulgare* L. *Acta Agrobot.* 68, 3–8.
- Ekesi, S., Shah, P.A., Clark, S.J., and Pell, J.K. (2005). Conservation biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*: implications of aphid species, host plant and predator foraging. *Agric. For. Entomol.* 7, 21–30.
- Eqani, S.A.M.A.S., Kanwal, A., Bhowmik, A.K., Sohail, M., Ullah, R., Ali, S.M., Alamdar, A., Ali, N., Fasola, M., and Shen, H. (2016). Spatial distribution of dust-bound trace elements in Pakistan and their implications for human exposure. *Environ. Pollut.* 213, 213–222.
- Esposito, S., Bianco, A., Russo, R., Di Maro, A., Isernia, C., and Pedone, P.V. (2019). Therapeutic Perspectives of Molecules from *Urtica dioica* Extracts for Cancer Treatment. *Molecules* 24, 2753.
- Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Günthardt-Goerg, M.S., and Schulin, R. (2013). Metal uptake and allocation in trees grown on contaminated land: implications for biomass production. *Int. J. Phytoremediation* 15, 77–90.
- Evangelou, M.W.H., Papazoglou, E.G., Robinson, B.H., and Schulin, R. (2015). Phytomanagement: Phytoremediation and the Production of Biomass for Economic Revenue on Contaminated Land. In *Phytoremediation*, A.A. Ansari, S.S. Gill, R. Gill, G.R. Lanza, and L. Newman, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 115–132.
- Fageria, N.K., Filho, M.P.B., Moreira, A., and Guimarães, C.M. (2009). Foliar Fertilization of Crop Plants. *J. Plant Nutr.* 32, 1044–1064.
- Fässler, E., Robinson, B.H., Stauffer, W., Gupta, S.K., Papritz, A., and Schulin, R. (2010). Phytomanagement of metal-contaminated agricultural land using sunflower, maize and tobacco. *Agric. Ecosyst. Environ.* 136, 49–58.
- Fernandez, V., and Brown, P.H. (2013). From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Front. Plant Sci.* 4.
- Fischer, A., Brodziak-Dopierała, B., Loska, K., and Stojko, J. (2017). The Assessment of Toxic Metals in Plants Used in Cosmetics and Cosmetology. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14.
- Fischer, H., Werwein, E., and Graupner, N. (2012). Nettle fibre (*Urtica dioica* L.) reinforced poly(lactic acid): A first approach. *J. Compos. Mater.* 46, 3077–3087.
- Fontenla, S., García-Romera, I., and Ocampo, J.A. (1999). Negative influence of non-host plants on the colonization of *Pisum sativum* by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1591–1597.
- Foulon, J. (2016). Impact du phytomanagement de sites pollués par les éléments traces métalliques sur les micro-organismes du sol.
- Franck, R.R. (2005). *Bast and Other Plant Fibres* (Elsevier).
- Gadd, G.M. (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46, 834–840.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643.
- Gadd, G.M., and Gadd, G.M. (2001). *Fungi in Bioremediation* (Cambridge University Press).
- Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., and Shi, W. (2010). Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *J. Environ. Sci.* 22, 1040–1048.
- Galelli, A., and Truffa-Bachi, P. (1993). *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome. *J. Immunol.* 151, 1821–1831.
- Galende, M.A., Becerril, J.M., Barrutia, O., Artetxe, U., Garbisu, C., and Hernández, A. (2014). Field assessment of the effectiveness of organic amendments for aided phytostabilization of a Pb–Zn contaminated mine soil. *J. Geochem. Explor.* 145, 181–189.
- Gall, J.E., Boyd, R.S., and Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environ. Monit. Assess.* 187.
- Garbisu, C., and Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresour. Technol.* 77, 229–236.
- García, G., Zanuzzi, A.L., and Faz, Á. (2005). Evaluation of heavy metal availability prior to an in-situ soil phytoremediation program. *Biodegradation* 16, 187–194.
- Garmendia, A., Raigón, M.D., Marques, O., Ferriol, M., Royo, J., and Merle, H. (2018). Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. *PeerJ* 6, e4729.
- Gatti, E., Di Virgilio, N., Baronti, S., and Bacci, L. (2008). Development of *Urtica dioica* L. propagation methods for organic production of fiber. In 16th IFOAM Organic World Congress, June, pp. 16–20.
- Gayon, P.R. (1968). *Les Composés phénoliques des végétaux...* (Dunod).
- Ge, Y., Murray, P., and Hendershot, W.H. (2000). Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environ. Pollut.* 107, 137–144.

- Gene Garrett, H.E., and Buck, L. (1997). Agroforestry practice and policy in the United States of America. *For. Ecol. Manag.* *91*, 5–15.
- Giller, K.E., Witter, E., and Mcgrath, S.P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* *30*, 1389–1414.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol. Biochem.* *41*, 2031–2037.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., and Trenzcek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* *42*, 611–643.
- Gilmour, C.C., Podar, M., Bullock, A.L., Graham, A.M., Brown, S.D., Somenahally, A.C., Johs, A., Hurt, R.A., Bailey, K.L., and Elias, D.A. (2013). Mercury Methylation by Novel Microorganisms from New Environments. *Environ. Sci. Technol.* *47*, 11810–11820.
- Gintenreiter, S., Ortel, J., and Nopp, H.J. (1993). Bioaccumulation of cadmium, lead, copper, and zinc in successive developmental stages of *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae, Lepid)—a life cycle study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *25*, 55–61.
- Göhre, V., and Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* *223*, 1115–1122.
- Gorur, G. (2007). Effects of host plant contaminated with heavy metals on the life history traits of aphids (*Brevicoryne brassicae* L.). *Pol. J. Ecol.* *55*, 113.
- Green, I.D., and Walmsley, K. (2013). Time-response relationships for the accumulation of Cu, Ni and Zn by seven-spotted ladybirds (*Coccinella septempunctata* L.) under conditions of single and combined metal exposure. *Chemosphere* *93*, 184–189.
- Green, I.D., Merrington, G., and Tibbett, M. (2003). Transfer of cadmium and zinc from sewage sludge amended soil through a plant–aphid system to newly emerged adult ladybirds (*Coccinella septempunctata*). *Agric. Ecosyst. Environ.* *99*, 171–178.
- Green, I.D., Jeffries, C., Diaz, A., and Tibbett, M. (2006). Contrasting behaviour of cadmium and zinc in a soil–plant–arthropod system. *Chemosphere* *64*, 1115–1121.
- Greger, M. (1999). Metal Availability and Bioconcentration in Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, M.N.V. Prasad, and J. Hagemeyer, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–27.
- Grevsen, K., Fretté, X.C., and Christensen, L.P. (2008). Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. *Eur. J. Hort. Sci.* *73*, 20.
- Grime, J.P., Hodgson, J.G., and Hunt, R. (1988). *Comparative Plant Ecology: A Functional Approach to Common British Species* (Springer Netherlands).
- Grosse-Veldmann, B. (2016). Systematics, Taxonomy, and Evolution of *Urtica* L. (Urticaceae).
- Grosse-Veldmann, B., and Weigend, M. (2015). Weeding the nettles III: Named nonsense versus named morphotypes in European *Urtica dioica* L. (Urticaceae). *Phytotaxa* *208*, 239–260.
- Grosse-Veldmann, B., and Weigend, M. (2018). The geometry of gender: hyper-diversification of sexual systems in *Urtica* L. (Urticaceae). *Cladistics* *34*, 131–150.
- Grosse-Veldmann, B., Nürk, N.M., Smissen, R., Breitwieser, I., Quandt, D., and Weigend, M. (2016). Pulling the sting out of nettle systematics – A comprehensive phylogeny of the genus *Urtica* L. (Urticaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* *102*, 9–19.
- Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A., and Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *27*, 1231–1240.
- Grześ, I.M. (2010). Ants and heavy metal pollution – A review. *Eur. J. Soil Biol.* *46*, 350–355.
- Guarrera, P.M., and Savo, V. (2013). Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local and popular traditions of Italy: A review. *J. Ethnopharmacol.* *146*, 659–680.
- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., and Isasa, M.E.T. (2003). Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Food Compos. Anal.* *16*, 111–119.
- Gül, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Akpulat, H.A., and Aksu, P. (2012). Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic, Genotoxic Effects of Essential Oil from *Urtica dioica* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *88*, 666–671.
- Guo, Y., Wu, H., Sun, X., Qian, X., and Shen, Y. (2005). Analysis on the properties of nettle fiber. *J. Text. Res.*
- Gurr, G.M., Wratten, S.D., and Luna, J.M. (2003). Multi-function agricultural biodiversity: pest management and other benefits. *Basic Appl. Ecol.* *4*, 107–116.
- Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L.J., and Poole, P.S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* *245*, 83–93.
- Haferburg, G., and Kothe, E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* *47*, 453–467.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* *53*, 1–11.
- Hammer, D., and Keller, C. (2003). Phytoextraction of Cd and Zn with *Thlaspi caerulescens* in field trials. *Soil Use Manag.* *19*, 144–149.
- Hammer, D., Kayser, A., and Keller, C. (2003). Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use Manag.* *19*, 187–192.
- Harrad, S.J., and Smith, D.J.T. (1997). Bioaccumulation Factors (BAFs) and Biota to Sediment Accumulation Factors (BSAFs) for PCBs in pike and eels. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *4*, 189–193.

- Harwood, J., and Edom, G. (2012). Nettle Fibre: Its Prospects, Uses and Problems in Historical Perspective. *Text. Hist.* *43*, 107–119.
- He, J., Strezov, V., Kan, T., Weldekidan, H., and Kumar, R. (2019). Slow pyrolysis of metal(loid)-rich biomass from phytoextraction: characterisation of biomass, biochar and bio-oil. *Energy Procedia* *160*, 178–185.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M., and Hendriks, A.J. (2001). Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environ. Pollut.* *113*, 385–393.
- Herzig, R., Nehnevajova, E., Pfister, C., Schwitzguebel, J.-P., Ricci, A., and Keller, C. (2014). Feasibility of labile Zn phytoextraction using enhanced tobacco and sunflower: results of five- and one-year field-scale experiments in Switzerland. *Int. J. Phytoremediation* *16*, 735–754.
- Hinsinger, P., Plassard, C., and Jaillard, B. (2006). Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *J. Geochem. Explor.* *88*, 210–213.
- Hladun, K.R., Smith, B.H., Mustard, J.A., Morton, R.R., and Trumble, J.T. (2012). Selenium Toxicity to Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Pollinators: Effects on Behaviors and Survival. *PLOS ONE* *7*, e34137.
- Hojdová, M., Rohovec, J., Chrástný, V., Penížek, V., and Navrátil, T. (2015). The Influence of Sample Drying Procedures on Mercury Concentrations Analyzed in Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *94*, 570–576.
- Hopkin, S.P. (1989). Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. *Ecophysiol. Met. Terr. Invertebr.*
- Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., and Fujita, M. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation.
- Isbell, F., Adler, P.R., Eisenhauer, N., Fornara, D., Kimmel, K., Kremen, C., Letourneau, D.K., Liebman, M., Polley, H.W., Quijas, S., et al. (2017). Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. *J. Ecol.* *105*, 871–879.
- Islam, A.M., and Kato-Noguchi, H. (2013). Allelopathic potential of five Labiatae plant species on barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *Aust. J. Crop Sci.* *7*, 1369.
- Jalas, J., and Suominen, J. (1988). *Atlas Florae Europaeae: Volume 3: Distribution of Vascular Plants in Europe* (Cambridge University Press).
- Jama, B., Getahun, A., and Ngugi, D.N. (1991). Shading effects of alley cropped *Leucaena leucocephala* on weed biomass and maize yield at Mtwapa, Coast Province, Kenya. *Agrofor. Syst.* *13*, 1–11.
- James, D.G., Lauby, G., Seymour, L., and Buckley, K. (2015). Beneficial insects associated with stinging nettle, *Urtica dioica* Linnaeus, in central Washington State. *Pan-Pac. Entomol.* *91*, 82–90.
- Janssen, M.P.M., Bruins, A., De Vries, T.H., and Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *20*, 305–312.
- Jiang, Y., Lei, M., Duan, L., and Longhurst, P. (2015). Integrating phytoremediation with biomass valorisation and critical element recovery: A UK contaminated land perspective. *Biomass Bioenergy* *83*, 328–339.
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace elements in soils and plants* (Boca Raton: CRC Press).
- Kalia, A., Joshi, B., and Mukhija, M. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *Int. J. Green Pharm.* *8*, 201.
- Kallenborn, R., and Blais, J.M. (2015). Tracking contaminant transport from biovectors. In *Environmental Contaminants*, (Springer), pp. 461–498.
- Kara, D. (2009). Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chem.* *114*, 347–354.
- Karus, M. (2004). First International Conference of the European Industrial Hemp Association (EIHA). *J. Ind. Hemp* *9*, 117–127.
- Kayser, A., Wenger, K., Keller, A., Attinger, W., Felix, H.R., Gupta, S.K., and Schulin, R. (2000). Enhancement of Phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from Calcareous Soil: The Use of NTA and Sulfur Amendments. *Environ. Sci. Technol.* *34*, 1778–1783.
- Khan, A.G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* *18*, 355–364.
- Khan, K.S., and Joergensen, R.G. (2006). Decomposition of heavy metal contaminated nettles (*Urtica dioica* L.) in soils subjected to heavy metal pollution by river sediments. *Chemosphere* *65*, 981–987.
- Khan, M., Zakaria, M., Ali, F., Hussain, F., and Musharaf, I.S. (2016). Allelopathic Effect of *Populus nigra* Bark on *Zea mays* in agroforestry ecosystems. *GJSFR* *16*, 21–27.
- Kidd, C.V., and Pimental, D. (2012). *Integrated Resource Management: Agroforestry for Development* (Elsevier).
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., et al. (2015). Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *Int. J. Phytoremediation* *17*, 1005–1037.
- King, D.J., Doronila, A.I., Feenstra, C., Baker, A.J.M., and Woodrow, I.E. (2008). Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four Eucalyptus species: Growth, arsenic uptake and availability after five years. *Sci. Total Environ.* *406*, 35–42.
- Kohli, R.K., Batish, D., and Singh, H.P. (1997). Allelopathy and Its Implications in Agroecosystems. *J. Crop Prod.* *1*, 169–202.
- 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., et al. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* *22*, 5271–5277.

- Kong, C.H., Wang, P., Gu, Y., Xu, X.H., and Wang, M.L. (2008). Fate and Impact on Microorganisms of Rice Allelochemicals in Paddy Soil. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 5043–5049.
- Koszegi, K., Kocsis, J.M., Vatai, G., and Bekassy-Molnar, E. (2017). Antimicrobial Effects of the Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Analecta Tech. Szeged.* *11*, 10–15.
- Kozlov, M.V., Haukioja, E., Bakhtiarov, A.V., Stroganov, D.N., and Zimina, S.N. (2000). Root versus canopy uptake of heavy metals by birch in an industrially polluted area: contrasting behaviour of nickel and copper. *Environ. Pollut.* *107*, 413–420.
- Kraus, R., and Spiteller, G. (1990). Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry* *29*, 1653–1659.
- Kraus, J.M., Walters, D.M., Wesner, J.S., Stricker, C.A., Schmidt, T.S., and Zuellig, R.E. (2014). Metamorphosis Alters Contaminants and Chemical Tracers in Insects: Implications for Food Webs. *Environ. Sci. Technol.* *48*, 10957–10965.
- Krause, G.H., Grafflage, S., Rumich-Bayer, S., and Somersalo, S. (1988). Effects of freezing on plant mesophyll cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* *42*, 311–327.
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., and Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* *23*.
- Kudritsata, S.E., Filman, G.M., Zagorodskaya, L.M., and Chikovanii, D.M. (1986). Carotenoids of *Urtica dioica*. *Chem. Nat. Compd.* *22*, 604–605.
- Kukric, Z., Topalic-Trivunovic, L., Kukavica, B., Matos, S., Pavicic, S., Boroja, M., and Savic, A. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Period. Technol.* *257–272*.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., and McGrath, S.P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* *212*, 75–84.
- Kwok, C.K., Liang, Y., Leung, S.Y., Wang, H., Dong, Y.H., Young, L., Giesy, J.P., and Wong, M.H. (2013). Biotasement accumulation factor (BSAF), bioaccumulation factor (BAF), and contaminant levels in prey fish to indicate the extent of PAHs and OCPs contamination in eggs of waterbirds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *20*, 8425–8434.
- Lal, K., Yadav, R.K., Kaur, R., Bundela, D.S., Khan, M.I., Chaudhary, M., Meena, R.L., Dar, S.R., and Singh, G. (2013). Productivity, essential oil yield, and heavy metal accumulation in lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) under varied wastewater–groundwater irrigation regimes. *Ind. Crops Prod.* *45*, 270–278.
- Lemière, B. (2001). Guide sur le comportement des polluants dans le sol et les nappes (Orléans: Ed. BRGM).
- Levi, E., Dalschaert, X., and Wilmer, J.B.M. (1973). Retention and absorption of foliar applied Cr. *Plant Soil* *38*, 683–686.
- Li, X., and Huang, L. (2015). Toward a New Paradigm for Tailings Phytostabilization—Nature of the Substrates, Amendment Options, and Anthropogenic Pedogenesis. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* *45*, 813–839.
- Limasset, E., Fourny, S., Collet, J., Michel, P., Alary, C., and Laboudigue, A. (2015). Approche REFRINDD pour accompagner les acteurs de la requalification des friches industrielles potentiellement polluées dans une démarche durable : guide méthodologique et prototype d’outil d’accompagnement (ADEME).
- Limmer, M.A., Balouet, J.-C., Karg, F., Vroblesky, D.A., and Burken, J.G. (2011). Phytoscreening for Chlorinated Solvents Using Rapid In Vitro SPME Sampling: Application to Urban Plume in Verl, Germany. *Environ. Sci. Technol.* *45*, 8276–8282.
- Limmer, M.A., Martin, G.D., Watson, C.J., Martinez, C., and Burken, J.G. (2014). Phytoscreening: A Comparison of In Planta Portable GC-MS and In Vitro Analyses. *Groundw. Monit. Remediat.* *34*, 49–56.
- Limmer, M.A., West, D.M., Mu, R., Shi, H., Whitlock, K., and Burken, J.G. (2015). Phytoscreening for perchlorate: rapid analysis of tree sap. *Env. Sci Water Res Technol* *1*, 138–145.
- Linger, P., Müssig, J., Fischer, H., and Kobert, J. (2002). Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. *Ind. Crops Prod.* *16*, 33–42.
- Liu, Y.-N., Guo, Z.-H., Xiao, X.-Y., Wang, S., Jiang, Z.-C., and Zeng, P. (2017). Phytostabilisation potential of giant reed for metals contaminated soil modified with complex organic fertiliser and fly ash: A field experiment. *Sci. Total Environ.* *576*, 292–302.
- Loetscher, Y., Kreuzer, M., and Messikommer, R.E. (2013). Utility of nettle (*Urtica dioica*) in layer diets as a natural yellow colorant for egg yolk. *Anim. Feed Sci. Technol.* *186*, 158–168.
- Lubbe, A., and Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind. Crops Prod.* *34*, 785–801.
- Ma, Y., Fu, S., Zhang, X., Zhao, K., and Chen, H.Y.H. (2017). Intercropping improves soil nutrient availability, soil enzyme activity and tea quantity and quality. *Appl. Soil Ecol.* *119*, 171–178.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., and Kennelley, E.D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* *409*, 579–579.
- Mahendrakumar, N., Thyla, P., Mohanram, P., Raja Kumaran, C., and Jayachandresh, J. (2019). Study on static and dynamic characteristics of nettle–polyester composite micro lathe bed. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part J. Mater. Des. Appl.* *233*, 141–155.
- Maillard, F., Girardclos, O., Assad, M., Zappelini, C., Pérez Mena, J.M., Yung, L., Guyeux, C., Chrétien, S., Bigham, G., Cosio, C., et al. (2016). Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. *Environ. Res.* *148*, 122–126.



- Mann, F.S.-B., Paul J. van den Brink, Reinier M. (2011). Ecological Impacts of Toxic Chemicals (Francisco Sanchez-Bayo).
- Marmioli, M., Pietrini, F., Maestri, E., Zacchini, M., Marmioli, N., and Massacci, A. (2011). Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiol.* *31*, 1319–1334.
- Martikainen, P., and Kaila, L. (2004). Sampling saproxylic beetles: lessons from a 10-year monitoring study. *Biol. Conserv.* *120*, 171–181.
- Mastretta, C., Taghavi, S., Lelie, D. van der, Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C., Barac, T., Boulet, J., Weyens, N., and Vangronsveld, J. (2009). Endophytic Bacteria from Seeds of *Nicotiana Tabacum* Can Reduce Cadmium Phytotoxicity. *Int. J. Phytoremediation* *11*, 251–267.
- Maxted, A.P., Black, C.R., West, H.M., Crout, N.M.J., Mcgrath, S.P., and Young, S.D. (2007). Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant Soil* *290*, 157–172.
- McNear Jr, D.H. (2013). The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. Nat. Educ.
- Meeinkuirt, W., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Tanhan, P., and Chaiyarat, R. (2012). Phytostabilization of a Pb-Contaminated Mine Tailing by Various Tree Species in Pot and Field Trial Experiments. *Int. J. Phytoremediation* *14*, 925–938.
- Meindl, G.A., and Ashman, T.-L. (2013). The effects of aluminum and nickel in nectar on the foraging behavior of bumblebees. *Environ. Pollut.* *177*, 78–81.
- Meirhaeghe, C. (2011). Évaluation de la disponibilité et de l'accessibilité de fibres végétales à usage matériaux en France (Fibres Recherche Développement, ADEME).
- Mench, M., Bussi re, S., Boisson, J., Castaing, E., Vangronsveld, J., Ruttens, A., De Koe, T., Bleeker, P., Assun o, A., and Manceau, A. (2003). Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in-situ treatments. *Plant Soil* *249*, 187–202.
- Mench, M., Schwitzgu bel, J.-P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., and Gupta, S. (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *16*, 876–900.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzgu bel, J.-P., Gawronski, S., Schröder, P., and Vangronsveld, J. (2010). Successes and Limitations of Phytotechnologies at Field Scale: Outcomes, Assessment and Outlook from COST Action 859. *J. Soils Sediments* *10*.
- Mench, M.J., Dellise, M., Bes, C.M., Marchand, L., Kolbas, A., Le Coustumer, P., and Oustr re, N. (2018). Phytomanagement and Remediation of Cu-Contaminated Soils by High Yielding Crops at a Former Wood Preservation Site: Sunflower Biomass and Ionome. *Front. Ecol. Evol.* *6*.
- Mensah, A. (2017). Etude de biopesticides   base d'ortie: Rh ologie d'application et test du pouvoir fongicide. *Rev. Marocaine Prot. Plantes* *1*.
- Merrington, G., Winder, L., and Green, I. (1997). The bioavailability of Cd and Zn from soils amended with sewage sludge to winter wheat and subsequently to the grain aphid *Sitobion avenae*. *Sci. Total Environ.* *205*, 245–254.
- Michels, E., Annicaerta, B., Moor, S.D., Nevel, L.V., Fraeye, M.D., Meiresonne, L., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G., Ok, Y.S., and Meers, E. (2018). Limitations for phytoextraction management on metal-polluted soils with poplar short rotation coppice—evidence from a 6-year field trial. *Int. J. Phytoremediation* *20*, 8–15.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., and Blaudez, D. (2009). Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water. Air. Soil Pollut.* *204*, 89–101.
- Mogren, C.L., and Trumble, J.T. (2010). The impacts of metals and metalloids on insect behavior. *Entomol. Exp. Appl.* *135*, 1–17.
- Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., and Dhankher, O.P. (2016). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Front. Plant Sci.* *7*, 303.
- Nageleisen, L.M., and Bouget, C. (2009). Forest insect studies: methods and techniques, key considerations for standardisation. An overview of the reflections of the Entomological Forest Inventories working group (Inv. Ent. For.) (ONF).
- Naikoo, M.I., Dar, M.I., Khan, F.A., Raghieb, F., and Rajakaruna, N. (2019). Trophic transfer and bioaccumulation of lead along soil–plant–aphid–ladybird food chain. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Nair, P.K.R. (1998). Directions in tropical agroforestry research: past, present, and future. In *Directions in Tropical Agroforestry Research: Adapted from Selected Papers Presented to a Symposium on Tropical Agroforestry Organized in Connection with the Annual Meetings of the American Society of Agronomy*, 5 November 1996, Indianapolis, Indiana, USA, P.K.R. Nair, and C.R. Latt, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 223–245.
- Neilson, E.H., Goodger, J.Q.D., Woodrow, I.E., and Müller, B.L. (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends Plant Sci.* *18*, 250–258.
- Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., and Kennedy, P.G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* *20*, 241–248.
- Nica, D., Bordean, D.M., Gergen, I., Bura, M., Vintila, T., and others (2012). Comparative assessment of trace metal accumulation in celery and nettle leaves. *JHFB* *16*, 217–220.
- Nielsen, M.A., and Trapp, S. (2014). Guide: Tree Coring as an initial screening tool for typical pollutants in the subsurface.

- Nielsen, M.A., Stalder, M., Riis, C., Petersen, J., Kalisz, M., Krupanek, J., Trapp, S., and Broholm, M.M. (2015a). Comparison of tree coring and soil gas sampling for screening of contaminated sites. In 11th International Conference of Phytotechnologies, p.
- Nielsen, M.A., Broholm, M.M., Trapp, S., Kalisz, M., Krupanek, J., Stalder, M., and Martac, E. (2015b). Phytoscreening of BTEX and chlorinated solvents by tree coring. In Ninth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, p.
- Noble, I.R., and Dirzo, R. (1997). Forests as Human-Dominated Ecosystems. *Science* 277, 522–525.
- Nriagu, J.O. (1996). A History of Global Metal Pollution. *Science* 272, 223–223.
- Nsanganwimana, F. (2014). Influence du phytomanagement sur un écosystème contaminé par des métaux : application à *Miscanthus × giganteus*. thesis. Lille 1.
- Oliver, F., Amon, E.U., Breathnach, A., Francis, D.M., Sarathchandra, P., Black, A.K., and Greaves, M.W. (1991). Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*)—histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clin. Exp. Dermatol.* 16, 1–7.
- Ong, C.K. (icraf (1995). The “dark side” of intercropping: manipulation of soil resources.
- van Ooik, T., Rantala, M.J., and Saloniemi, I. (2007). Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*. *Environ. Pollut.* 145, 348–354.
- Orčić, D., Francišковиć, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., and Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.* 143, 48–53.
- Otles, S., and Yalcin, B. (2012). Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *Sci. World J.* 2012, 1–12.
- Pandey, J., Verma, R.K., and Singh, S. (2019). Suitability of aromatic plants for phytoremediation of heavy metal contaminated areas: a review. *Int. J. Phytoremediation* 21, 405–418.
- Pauksztó, A., and Mirosławski, J. (2019). Using stinging nettle (*Urtica dioica* L.) to assess the influence of long term emission upon pollution with metals of the Tatra National Park area (Poland). *Atmospheric Pollut. Res.* 10, 73–79.
- Pavlidis, G., and Tsihrintzis, V.A. (2018). Environmental Benefits and Control of Pollution to Surface Water and Groundwater by Agroforestry Systems: a Review. *Water Resour. Manag.* 32, 1–29.
- Pellissier, F. (1993). Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria laccata*. *J. Chem. Ecol.* 19, 2105–2114.
- Pellissier, F. (1998). The role of soil community in plant population dynamics: is allelopathy a key component? *Trends Ecol. Evol.* 13, 407.
- Pérez-de-Mora, A., Madejón, P., Burgos, P., Cabrera, F., Lepp, N.W., and Madejón, E. (2011). Phytostabilization of semiarid soils residually contaminated with trace elements using by-products: Sustainability and risks. *Environ. Pollut.* 159, 3018–3027.
- Perrin, R.M. (1975). The role of the perennial stinging nettle, *Urtica dioica*, as a reservoir of beneficial natural enemies. *Ann. Appl. Biol.* 81, 289–297.
- Perrin, R.M. (1976). The population dynamics of the stinging nettle aphid, *Microlophium carnosum* (Bukt.). *Ecol. Entomol.* 1, 31–40.
- Phanthavongsa, P. (2018). Etude de deux modalités de phytomanagement testées sur un terrain de gestion de sédiments contaminés par des métaux et métalloïdes. thesis. Bourgogne Franche-Comté.
- Phanthavongsa, P., Chalot, M., Papin, A., Lacercat-Didier, L., Roy, S., Blaudez, D., and Bert, V. (2017). Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. *Environ. Exp. Bot.* 143, 72–81.
- Pidlisnyuk, V., Erickson, L., Stefanovska, T., Popelka, J., Hettiarachchi, G., Davis, L., and Trögl, J. (2019). Potential phytomanagement of military polluted sites and biomass production using biofuel crop *miscanthus x giganteus*. *Environ. Pollut.* 249, 330–337.
- Pietrini, F., Passatore, L., Patti, V., Francocci, F., Giovannozzi, A., and Zacchini, M. (2019). Morpho-Physiological and Metal Accumulation Responses of Hemp Plants (*Cannabis Sativa* L.) Grown on Soil from an Agro-Industrial Contaminated Area. *Water* 11, 808.
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., and Romani, A. (2008). Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9127–9132.
- Prach, K. (Ceskoslovenska A.V., and Wade, P.M. (1992). Population characteristics of expansive perennial herbs. *Preslia CSFR*.
- Prasad, P.N., Mark, J.E., Kandil, S.H., and Kafafi, Z.H. (2013). *Science and Technology of Polymers and Advanced Materials: Emerging Technologies and Business Opportunities* (Springer Science & Business Media).
- Przybyłowicz, W.J., Mesjasz Przybyłowicz, J., Migula, P., Głowacka, E., Nakonieczny, M., and Augustyniak, M. (2003). Functional analysis of metals distribution in organs of the beetle *Chrysolina pardalina* exposed to excess of nickel by Micro-PIXE. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 210, 343–348.
- Pulford, I.D., and Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environ. Int.* 29, 529–540.
- Puntieri, J.G., and Pyšek, P. (1993). The Effects of Physical Support and Density on Biomass Production and Size Hierarchies of *Galium aparine* Populations. *Oikos* 67, 279–284.

- Radman, S., Coga, L., Fabek, S., Benko, B., Zutic, I., and Toth, N. (2018). Yield and Mineral Content of Stinging Nettle as Affected by Nitrogen Fertilization.
- Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., Simonovska, J., and Srbinoska, M. (2013). Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Qual. Life Banja Luka - APEIRON*.
- Rainbow, P.S. (2007). Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environ. Int.* *33*, 576–582.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., and Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* *30*, 1562–1574.
- Rascio, N., and Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* *180*, 169–181.
- Reddy, K.J., Wang, L., and Gloss, S.P. (1995). Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. *Plant Soil* *171*, 53–58.
- Reeves, R.D. (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. In *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, J.-L. Morel, G. Echevarria, and N. Goncharova, eds. (Springer Netherlands), pp. 25–52.
- Regnault-Roger, C., Philogene, B., and Vincent, C. (2008). *Biopesticides d'origine végétale (2e éd.)* (Lavoisier).
- Reigosa Roger, M., Pedrol, N., Gonzalez, L. (2006). *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* (Dordrecht, Netherlands: Springer).
- Rejlová, L., Chrtěk, J., Trávníček, P., Lučanová, M., Vít, P., and Urfus, T. (2019). Polyploid evolution: The ultimate way to grasp the nettle. *PLOS ONE* *14*, e0218389.
- Rice, E.L. (1985). Allelopathy — An Overview. In *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms*, G.A. Cooper-Driver, T. Swain, and E.E. Conn, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 81–105.
- Rimmer, C.C., Miller, E.K., McFarland, K.P., Taylor, R.J., and Faccio, S.D. (2010). Mercury bioaccumulation and trophic transfer in the terrestrial food web of a montane forest. *Ecotoxicology* *19*, 697–709.
- Rivest, D., Cogliastro, A., and Olivier, A. (2009). Tree-based intercropping systems increase growth and nutrient status of hybrid poplar: A case study from two Northeastern American experiments. *J. Environ. Manage.* *91*, 432–440.
- Robinson, B.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., and Schulin, R. (2009). The Phytomanagement of Trace Elements in Soil. *Crit. Rev. Plant Sci.* *28*, 240–266.
- Rockwood, D.L., Naidu, C.V., Carter, D.R., Rahmani, M., Spriggs, T.A., Lin, C., Alker, G.R., Isebrands, J.G., and Segrest, S.A. (2004). Short-rotation woody crops and phytoremediation: Opportunities for agroforestry? *Agrofor. Syst.* *61*, 51–63.
- Rodenhouse, N.L., Lowe, W.H., Gebauer, R.L.E., McFarland, K.P., and Bank, M.S. (2019). Mercury bioaccumulation in temperate forest food webs associated with headwater streams. *Sci. Total Environ.* *665*, 1125–1134.
- Roschek, B., Fink, R.C., McMichael, M., and Alberte, R.S. (2009). Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis. *Phytother. Res.* *23*, 920–926.
- Rosnitschek-Schimmel, I. (1983). Biomass and Nitrogen Partitioning in a Perennial and an Annual Nitrophilic Species of *Urtica*. *Z. Für Pflanzenphysiol.* *109*, 215–225.
- Ruttens, A., Boulet, J., Weyens, N., Smeets, K., Adriaensen, K., Meers, E., Slycken, S.V., Tack, F., Meiresonne, L., Thewys, T., et al. (2011). Short Rotation Coppice Culture of Willows and Poplars as Energy Crops on Metal Contaminated Agricultural Soils. *Int. J. Phytoremediation* *13*, 194–207.
- Rutto, L.K., Xu, Y., Ramirez, E., and Brandt, M. (2013). Mineral Properties and Dietary Value of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.).
- Sajfrtová, M., Sovová, H., Opletal, L., and Bártlová, M. (2005). Near-critical extraction of  $\beta$ -sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *J. Supercrit. Fluids* *35*, 111–118.
- Salim, R., Al-Subu, M.M., and Atallah, A. (1993). Effects of root and foliar treatments with lead, cadmium, and copper on the uptake distribution and growth of radish plants. *Environ. Int.* *19*, 393–404.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., and Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* *13*, 468–474.
- Sauvé, S., Dumestre, A., McBride, M., and Hendershot, W. (1998). Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . *Environ. Toxicol. Chem.* *17*, 1481–1489.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.-L., and Badot, P.-M. (2002). Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* *48*, 571–579.
- Schmidt, T., and Schlegel, H.G. (1989). Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. *FEMS Microbiol. Lett.* *62*, 315–328.
- Schneider-Maunoury, L., Leclercq, S., Clément, C., Covès, H., Lambourdière, J., Sauve, M., Richard, F., Seloisse, M.-A., and Taschen, E. (2018). Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecol.* *31*, 59–68.
- Schreck, E., Laplanche, C., Le Guédard, M., Bessoule, J.-J., Austruy, A., Xiong, T., Foucault, Y., and Dumat, C. (2013). Influence of fine process particles enriched with metals and metalloids on *Lactuca sativa* L. leaf fatty acid composition following air and/or soil-plant field exposure. *Environ. Pollut.* *179*, 242–249.
- Seigler, D.S. (1996). Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions. *Agron. J.* *88*, 876–885.
- Selim, H.M., Sparks, D.L., and Sparks, D.L. (2001). *Heavy Metals Release in Soils* (CRC Press).

- Selosse, M.-A., Baudoin, E., and Vandenkoornhuysse, P. (2004). Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C. R. Biol.* *327*, 639–648.
- Selosse, M.-A., Schneider-Maunoury, L., and Martos, F. (2018). Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytol.* *217*, 968–972.
- Shah, D.U. (2013). Developing plant fibre composites for structural applications by optimising composite parameters: a critical review. *J. Mater. Sci.* *48*, 6083–6107.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., and Niazi, N.K. (2017). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *J. Hazard. Mater.* *325*, 36–58.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., and Poonia, P. (2009). Phytomining: A review. *Miner. Eng.* *22*, 1007–1019.
- Singh, H.P., Batish, D.R., and Kohli, R.K. (2001a). Allelopathy in Agroecosystems: An Overview. *J. Crop Prod.* *4*, 1–41.
- Singh, H.P., Kohli, R.K., and Batish, D.R. (2001b). Allelopathic interference of *Populus deltoides* with some winter season crops. *Agronomie* *21*, 139–146.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic Press).
- Song, W.-Y., Sohn, E.J., Martinoia, E., Lee, Y.J., Yang, Y.-Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., and Lee, Y. (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* *21*, 914–919.
- Šrutek, M. (1997). Growth responses of *Urtica dioica* L. to different water table depth. *Plant Ecol.* *130*, 163–169.
- Šrůtek, M., and Teckelmann, M. (1998). Review of biology and ecology of *Urtica dioica*.
- Stanojević, L.P., Stanković, M.Z., Stanojević, J.S., Cvetković, D.J., Cakić, M.D., Ilić, D.P., and Nikolić, V.D. (2016). The effect of the extraction techniques on the yield, kinetics and total phenolic and flavonoids content of aqueous-methanolic extracts from nettle roots (*Urtica dioica* L.). *Technol. Acta* *39*.
- Stephan, J.G., Albertsson, J., Wang, L., and Porcel, M. (2016). Weeds within willow short-rotation coppices alter the arthropod community and improve biological control of the blue willow beetle. *BioControl* *61*, 103–114.
- Sumner, M.E. (1999). *Handbook of Soil Science* (CRC Press).
- Suryawan, I.G.P.A., Suardana, N.P.G., Winaya, I.N.S., Suyasa, I.W.B., and Nindhia, T.G.T. (2017). Study of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) Fibers reinforced green composite materials : a review. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* *201*, 012001.
- Symondson, W.O.C., Sunderland, K.D., and Greenstone, M.H. (2002). Can Generalist Predators be Effective Biocontrol Agents? *Annu. Rev. Entomol.* *47*, 561–594.
- Synowiec, A., and Nowicka-Poleć, A. (2016). Effect of aqueous extracts of selected medicinal plants on germination of windgrass [*Apera spica-venti* (L.) P. Beauv.] and lambsquarters (*Chenopodium album* L.) seeds. *Acta Agrobot.* *69*.
- Tack, F.M., and Verloo, M.G. (1996). Metal contents in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as affected by soil characteristics. *Sci. Total Environ.* *192*, 31–39.
- Tan, K.H. (2010). *Principles of Soil Chemistry* (CRC Press).
- Tarradellas, J., Bitton, G., and Rossel, D. (1996). *Soil Ecotoxicology* (CRC Press).
- Taylor, K. (2009). Biological Flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *J. Ecol.* *97*, 1436–1458.
- Tibi A., Therond O. (2017). Evaluation des services écosystémiques rendus par les écosystèmes agricoles. Une contribution au programme EFESI. Synthèse du rapport d'étude, Inra (France), 118 pages.
- Toubal, S., Bouchenak, O., Elhaddad, D., Yahiaoui, K., Boumaza, S., and Arab, K. (2018). MALDI-TOF MS Detection of Endophytic Bacteria Associated with Great Nettle (*Urtica dioica* L.), Grown in Algeria. *Pol. J. Microbiol.* *67*, 67–72.
- 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., and Kidd, P.S. (2017). Aided phytostabilisation reduces metal toxicity, improves soil fertility and enhances microbial activity in Cu-rich mine tailings. *J. Environ. Manage.* *186*, 301–313.
- Trouvelot, A., Kough, J.L., and Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Estimation of vesicular arbuscular mycorrhizal infection levels. Research for methods having a functional significance. *Physiol. Genet. Asp. Mycorrhizae Asp. Physiol. Genet. Mycorrhizes Proc. 1st Eur. Symp. Mycorrhizae Dijon 1-5 July 1985*.
- Tudoreanu, L., and Phillips, C.J.C. (2004). Modeling Cadmium Uptake and Accumulation in Plants. In *Advances in Agronomy*, (Academic Press), pp. 121–157.
- Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustoš, P., Zupan, M., and Wenzel, W.W. (2007). Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environ. Pollut.* *148*, 107–114.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Muñoz, M., and Dumat, C. (2010). Foliar Lead Uptake by Lettuce Exposed to Atmospheric Fallouts. *Environ. Sci. Technol.* *44*, 1036–1042.
- Van Noordwijk, M., and Hairiah, K. (2000). Tree-soil-crop interactions (International Centre for Research in Agroforestry).
- Van Parijs, J., Joosen, H.M., Peumans, W.J., Geuns, J.M., and Van Laere, A.J. (1992). Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Arch. Microbiol.* *158*, 19–25.

- Van Slycken, S., Witters, N., Meiresonne, L., Meers, E., Ruttens, A., Van Peteghem, P., Weyens, N., Tack, F.M.G., and Vangronsveld, J. (2013). Field evaluation of willow under short rotation coppice for phytomanagement of metal-polluted agricultural soils. *Int. J. Phytoremediation* *15*, 677–689.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., et al. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *16*, 765–794.
- Vierheilig, H., Iseli, B., Alt, M., Raikhel, N., Wiemken, A., and Boller, T. (1996). Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant Soil* *183*, 131–136.
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., and Peijnenburg, W.J.G.M. (2004). Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environ. Sci. Technol.* *38*, 4705–4712.
- Viktorova, J., Jandova, Z., Madlenakova, M., Prouzova, P., Bartunek, V., Vrchatova, B., Lovecka, P., Musilova, L., and Macek, T. (2016). Native Phytoremediation Potential of *Urtica dioica* for Removal of PCBs and Heavy Metals Can Be Improved by Genetic Manipulations Using Constitutive CaMV 35S Promoter. *PLoS One* *11*, e0167927.
- Vogl, C.R., and Hartl, A. (2003). Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: A review. *Am. J. Altern. Agric.* *18*, 119–128.
- Wallace, W.G., and Luoma, S.N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *257*, 125–137.
- Wan, X., Lei, M., and Chen, T. (2016). Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* *563–564*, 796–802.
- Wang, X., Zhang, C., Qiu, B., Ashraf, U., Azad, R., Wu, J., and Ali, S. (2017). Biotransfer of Cd along a soil-plant-mealybug-ladybird food chain: A comparison with host plants. *Chemosphere* *168*, 699–706.
- Wang, X.-C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J.-H., Cai, D., and Li, J.-Q. (2015). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Mol. Ecol. Resour.* *15*, 573–586.
- Watanabe, T., and Osaki, M. (2002). Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* *33*, 1247–1260.
- Welch, R.M., and Shuman, D.L. (1995). Micronutrient Nutrition of Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* *14*, 49–82.
- Wenneker, M., Verdel, M.S.W., Groeneveld, R.M.W., Kempenaar, C., van Beuningen, A.R., and Janse, J.D. (1999). *Ralstonia* (Pseudomonas) *solanacearum* Race 3 (Biovar 2) in Surface Water and Natural Weed Hosts: First Report on Stinging Nettle (*Urtica dioica*). *Eur. J. Plant Pathol.* *105*, 307–315.
- Weston, L.A., Skoneczny, D., Weston, P.A., and Weidenhamer, J.D. (2015). Metabolic profiling: An overview—New approaches for the detection and functional analysis of biologically active secondary plant products. *J. Allelochem Interact* *1*, 15–27.
- Whiting, S.N., de Souza, M.P., and Terry, N. (2001). Rhizosphere Bacteria Mobilize Zn for Hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* *35*, 3144–3150.
- Winder, L., Merrington, G., and Green, I. (1999). The tri-trophic transfer of Zn from the agricultural use of sewage sludge. *Sci. Total Environ.* *229*, 73–81.
- Witters, N., Mendelsohn, R.O., Van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., Tack, F., Carleer, R., and Vangronsveld, J. (2012). Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study. I: Energy production and carbon dioxide abatement. *Biomass Bioenergy* *39*, 454–469.
- Wojcik, P. (2004). Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization [Review]. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* *12*.
- Wright, G., Woodward, C., Peri, L., Weisberg, P.J., and Gustin, M.S. (2014). Application of tree rings [dendrochemistry] for detecting historical trends in air Hg concentrations across multiple scales. *Biogeochemistry* *120*, 149–162.
- Wu, Z.-Y., Liu, J., Provan, J., Wang, H., Chen, C.-J., Cadotte, M.W., Luo, Y.-H., Amorim, B.S., Li, D.-Z., and Milne, R.I. (2018). Testing Darwin’s transoceanic dispersal hypothesis for the inland nettle family (Urticaceae). *Ecol. Lett.* *21*, 1515–1529.
- Xiong, T., Leveque, T., Shahid, M., Foucault, Y., Mombo, S., and Dumat, C. (2014a). Lead and cadmium phytoavailability and human bioaccessibility for vegetables exposed to soil or atmospheric pollution by process ultrafine particles. *J. Environ. Qual.* *43*, 1593–1600.
- Xiong, T.-T., Leveque, T., Austruy, A., Goix, S., Schreck, E., Dappe, V., Sobanska, S., Foucault, Y., and Dumat, C. (2014b). Foliar uptake and metal(loid) bioaccessibility in vegetables exposed to particulate matter. *Environ. Geochem. Health* *36*, 897–909.
- Yallew, T.B., Kumar, P., and Singh, I. (2016). Mechanical Behavior of Nettle/Wool Fabric Reinforced Polyethylene Composites. *J. Nat. Fibers* *13*, 610–618.
- Yung, L., Lagron, J., Cazaux, D., Limmer, M., and Chalot, M. (2017). Phytoscreening as an efficient tool to delineate chlorinated solvent sources at a chlor-alkali facility. *Chemosphere* *174*, 82–89.
- Zabel, J., and Tschardtke, T. (1998). Does fragmentation of *Urtica* habitats affect phytophagous and predatory insects differentially? *Oecologia* *116*, 419–425.
- Zapata-Carbonell, J., Bégeot, C., Carry, N., Choulet, F., Delhaultal, P., Gillet, F., Girardclos, O., Mouly, A., and Chalot, M. (2019). Spontaneous ecological recovery of vegetation in a red gypsum landfill: *Betula pendula* dominates after 10 years of inactivity. *Ecol. Eng.* *132*, 31–40.
- Zappellini, C. (2018). Étude des communautés microbiennes rhizosphériques de ligneux indigènes de sols anthropogéniques, issus d’effluents industriels. thesis. Bourgogne Franche-Comté.

- Zappellini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., et al. (2015). Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol. Biochem.* *90*, 101–110.
- Zhang, C., Wang, X., Ashraf, U., Qiu, B., and Ali, S. (2017). Transfer of lead (Pb) in the soil-plant-mealybug-ladybird beetle food chain, a comparison between two host plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *143*, 289–295.
- Zhang, S., Li, T., Huang, H., Zou, T., Zhang, X., Yu, H., Zheng, Z., and Wang, Y. (2012). Cd accumulation and phytostabilization potential of dominant plants surrounding mining tailings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *19*, 3879–3888.
- Zeng, P., Guo, Z., Xiao, X., Peng, C., Huang, B., and Feng, W. (2019a). Complementarity of co-planting a hyperaccumulator with three metal(loid)-tolerant species for metal(loid)-contaminated soil remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *169*, 306–315.
- Zeng, P., Guo, Z., Xiao, X., and Peng, C. (2019b). Effects of tree-herb co-planting on the bacterial community composition and the relationship between specific microorganisms and enzymatic activities in metal(loid)-contaminated soil. *Chemosphere* *220*, 237–248.
- Zeng, R.S., Mallik, A.U., Luo, S.M. (2008b). *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry* (New York, NY: Springer New York).
- Zhao, F.J., Lombi, E., and McGrath, S.P. (2003). Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* *249*, 37–43.
- Zheljazkov, V.D., Craker, L.E., and Xing, B. (2006). Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environ. Exp. Bot.* *58*, 9–16.
- Zheng, D., Liu, X., Jin, D., Li, H., and Li, X. (2018). Mercury bioaccumulation in arthropods from typical community habitats in a zinc-smelting area. *Environ. Geochem. Health* *40*, 1329–1337.
- Zu, Y., Qin, L., Zhan, F., Wu, J., Li, Y., Chen, J., Wang, J., and Hu, W. (2017). Effects of Intercropping of *Sonchus asper* and *Vicia faba* on Plant Cadmium Accumulation and Root Responses. *Pedosphere*.



ÉCOLE DOCTORALE  
Environnements - Santé  
Bourgogne | Franche-Comté

Loïc YUNG

## FONCTIONNEMENT ET PERFORMANCES DU DISPOSITIF AGROFORESTIER PEUPLIER-ORTIE EN CONTEXTE DE PHYTOMANAGEMENT

Mots-clés: agroforesterie, biodiversité, éléments traces métalliques, ortie, phytomanagement, services écosystémiques

### Résumé

Les contaminations entraînent des dégradations générant des dysfonctionnements des sols et des atteintes à leurs fonctions écologiques. Le phytomanagement, qui utilise des espèces végétales pour extraire, contenir ou dégrader des polluants, apparaît comme une solution adaptée pour produire de la biomasse végétale tout en favorisant la réhabilitation de ces sols délaissés. Les approches récentes s'accordent sur l'importance des associations végétales dans l'optimisation de ces dispositifs. Ce projet de thèse s'articule autour d'un dispositif agroforestier novateur, associant la grande ortie (*Urtica dioica* L.) à une plante modèle dans le domaine, le peuplier. Dans des plantations de peuplier, l'ortie offre de nouvelles perspectives liées à son aptitude à se développer spontanément sur des sites contaminés et à la qualité de sa fibre végétale, utilisables pour la fabrication de biomatériaux.

A partir de deux sites ateliers contaminés par les éléments trace métalliques (ETM) et différentes approches disciplinaires, ces travaux ont permis i) de mieux comprendre le fonctionnement de ce dispositif peuplier-ortie à l'interface rhizosphérique et sa réponse aux ETM *via* des approches de barcoding environnemental et de métabolomique ciblée ii) d'appréhender le rôle des plantes modèles dans la restauration écologique de ces sites au travers d'études phytosociologique et entomologique et évaluer l'implication des communautés associées dans les flux d'ETM par une approche écotoxicologique, et finalement iii) de caractériser et optimiser le potentiel économique de ce dispositif selon une approche agroécologique. Enfin, cette thèse ambitionne d'être un travail de référence pour les futurs projets de phytomanagement basés sur des associations arbres – orties.

Keywords: agroforestry, biodiversity, trace metals, nettle, phytomanagement, ecosystemic services

### Abstract

Contamination generates soil degradations and dysfunction, affecting many ecological function. Phytomanagement, which uses plants to extract, contain or degrade contaminants, represents a suitable solution for producing plant biomass while promoting the rehabilitation of these marginal lands. Recent approaches highlight the importance of plant associations to improve the efficiency of phytomanagement applications. This thesis focused on an innovative agroforestry system, combining stinging nettle (*Urtica dioica* L.) with a model plant for phytomanagement, poplars. Within poplar plantations, nettle offers new perspectives related to its ability to spontaneously develop at contaminated sites and to the quality of its plant fibre, which can be used for the manufacture of biomaterials.

Based on two field trials conducted at trace metals (TM) contaminated sites and several scientific fields, the present work enables i) to better understand the functioning of this poplar-nettle agrosystem at the rhizospheric interface and its response to TM using environmental barcoding and a targeted metabolomics approaches, ii) to estimate its involvement in the ecological restoration of these sites through phytosociological and entomological studies and to determine the role of these communities on TM flows through an ecotoxicological approach, and finally iii) to evaluate and optimize the economic potential of this system through an agroecological approach. Finally, this thesis aims to be a reference work for future phytomanagement projects based on tree - nettle associations.