

Equipe Sols & Environnement : Perspectives de développement du laboratoire

Outre la poursuite des actions et des programmes engagés, le développement et la reconnaissance du laboratoire nécessite de renforcer ses recherches sur des thèmes contribuant à une meilleure connaissance de la qualité et du fonctionnement des sols fortement affectés par les polluants métalliques. Ils s'articulent en trois points complémentaires que présentent les paragraphes ci-dessous.

1.4.1 – Dysfonctionnements engendrés par les ETM sur le cycle du carbone

Les matières organiques, qui rassemblent des formes variées (solides, solubles ou organismes vivants), sont connues pour jouer un rôle essentiel dans les sols et les cycles biogéochimiques (Balesdent et al, 2005 ; Lamy, 2006). Ce rôle est lié à leur grande réactivité en lien avec l'existence de nombreux groupements fonctionnels réactifs (principalement de type carboxylique ou phénolique).

Dans la littérature, les matières organiques sont fréquemment présentées comme ayant une influence soit sur la solubilisation de certains éléments comme les ETM, soit à l'opposé sur leur immobilisation notamment par adsorption ou complexation. Sur le plan environnemental, il peut en résulter dans le premier cas, un accroissement des dangers et de l'imprégnation de la biosphère, et dans le second cas, une réduction de la mobilité et de la biodisponibilité des polluants du fait du piégeage de ceux-ci dans les sols. Le caractère labile des matières organiques pose toutefois, dans le cas d'un stockage des ETM dans le sol, le problème d'un relargage et d'une redistribution possibles des ET à plus ou moins long terme.

Cette ambivalence du comportement, commandée principalement par les conditions physico-chimiques de l'écosystème sol, fait que l'étude des matières organiques constitue un thème de recherche encore peu étudié bien qu'il pourrait améliorer les connaissances sur la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité des ETM dans les sols. Si les extractions chimiques, séquentielles ou sélectives, apportent des éléments de réponse en renseignant sur les phases porteuses des polluants, elles ne peuvent suffire à elles seules pour rendre compte des relations entre les ETM et les matières organiques.

Parmi la diversité des formes des matières organiques présentes dans les sols, les résidus de végétaux et plus particulièrement les matières organiques particulaires (MOP) représentent un thème de recherche d'un intérêt majeur. Les résidus grossiers, contaminés à des degrés très divers, vont subir en se déposant sur le sol un ensemble de processus tant biotiques qu'abiotiques qui vont les fragmenter en particules de plus en plus fines et assurer ainsi leur intégration progressive aux constituants minéraux du sol. Les MOP correspondent à des matériaux organiques figurés dont la taille est généralement comprise entre 20 et 2 000 μm . Leur évolution permanente et rapide fait qu'elles jouent un rôle déterminant dans les cycles biogéochimiques des sols. Pour certains auteurs, leur labilité pourrait même faire de ces MOP un indicateur de la qualité des sols en terme de turn-over du carbone (Balesdent, 1996 ; Wander, 2004).

Sur le plan expérimental, les MOP peuvent être isoler par un fractionnement granulo-densimétrique qui met en œuvre des méthodes non destructives permettant de conserver les liaisons entre les ETM et les phases porteuses (Lamy et al., 1999). Des travaux réalisés en partenariat avec l'Unité de Science du Sol de l'INRA de Versailles sur des échantillons de sols fortement contaminés par les émissions de Metaleurop Nord ont abouti à différencier :

- les fractions légères, riches en matières organiques, de taille supérieure à 20 μm , et qui ont été assimilées aux MOP ;
- les fractions denses, riches en minéraux, de taille supérieure à 50 μm (Lamy et al., 2002).

Pour les quatre sols sélectionnés et quelles que soient les classes granulométriques, les MOP présentent des teneurs en carbone organique nettement supérieures à celles des fractions denses correspondantes, ce qui confirme que ces dernières sont essentiellement minérales. De plus, les teneurs en Cd, Pb et Zn des MOP excèdent aussi celles des fractions denses. Les seules exceptions concernent Pb et Zn et des fractions denses grossières qui pourraient correspondre à des particules métalliques exogènes présentes dans la fraction grossière. Il a aussi été montré que les teneurs en ETM des MOP augmentent avec les teneurs totales du sol.

De plus, plus les MOP sont fines, plus leurs teneurs en Pb et en Zn tendent à être élevées. Ces observations confirment la forte réactivité des MOP du sol. Reste posée toutefois la question des processus responsables de l'enrichissement en ETM des MOP du sol. Leurs concentrations nettement supérieures à celles mesurées habituellement dans les végétaux avant leur incorporation au sol tendent à écarter la voie de la phytoaccumulation. Il pourrait plutôt s'agir de processus abiotiques, de processus en liaison avec l'activité des organismes du sol ou de processus combinés postérieurs à l'incorporation des résidus de matières organiques au sol.

Le projet du laboratoire prévoit de développer des compétences sur les interactions entre ces MOP et les polluants métalliques. Outre le fait que ce thème se situe dans la continuité de travaux réalisés antérieurement sur les sols fortement contaminés par les émissions de Metaleurop Nord (Lamy et al., 2002), il s'inscrit pleinement dans les thèmes développés à ce jour. Il s'agit plus particulièrement :

- de l'étude du comportement et de la dynamique des ETM dans les sols ;
- du développement d'un outil en écotoxicologie reposant sur les isopodes terrestres. Ceux-ci jouent en effet un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'interface sol / litière, et plus précisément dans le cycle du carbone en fragmentant et en dégradant les matières organiques ;
- de l'évaluation d'un mode de gestion des sols fortement contaminés impliquant la phytostabilisation associée ou pas à des amendements minéraux (phytostabilisation, phytostabilisation aidée). Cette technique qui a pour objectif d'immobiliser durablement les ETM dans la rhizosphère modifie considérablement les paramètres physico-chimiques et biologiques des sols et à plus ou moins long terme, les cycles biogéochimiques. La compréhension des interactions entre les polluants et les matières organiques est un élément important dans l'évaluation de la viabilité écologique de ce mode de gestion.

Par ailleurs, d'une façon générale, la gestion des sols fortement contaminés pose la question du devenir des ETM. Cette dynamique des polluants dépend fortement de l'évolution des matières organiques, et parmi celles-ci des MOP. Celle-ci ne peut toutefois être dissociée de l'activité de la pédofaune et de la microflore, facteurs déterminants dans la dynamique des matières organiques. Les résultats attendus avec l'étude des MOP devraient *in fine* contribuer à déterminer si les matières organiques constituent une source ou un puits d'éléments métalliques dans des sols contaminés de longue date. Ont-elles une capacité à modifier durablement la spéciation des polluants et à contribuer à une « atténuation naturelle » (Adriano et al., 2002), c'est-à-dire à accroître les liens entre les constituants organo-minéraux des sols et les ETM, réduisant ainsi la mobilité et la biodisponibilité de ces derniers ?

Le développement de ce thème de recherche dans le cadre de la thèse d'Alena Pohu permettra de renforcer le partenariat avec Isabelle Lamy de l'unité PESSAC de Versailles.

- Adriano D.C., Bolan N.S., Koo B.-J., Naidu R., van der Lelie D., Vangronsveld J., Wenzel W.W. 2002. Natural remediation processes: bioavailability interactions in contaminated soils. Proceedings 17th WCSS, 14-21 August, Thailand, pp 501-1-9.
- Balesdent J. 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *European Journal of Soil Science*, 47, 485-493.
- Balesdent J., Chenu C. et Feller C. 2005. Stockage et recyclage du carbone. *In* : Sols et Environnement. Cours, exercices et études de cas. Girard M.-C., Walter C., Rémy J.-C., Berthelin J. et Morel J.-L. (Eds). Dunod, Paris, Chap. 10.
- Lamy, I., Latrille, C., and Ducaroir, J. (1999). Apport des fractionnements physiques dans l'étude de la dynamique des éléments traces dans les sols. *In* "Spéciation des métaux dans le sol", pp. 56-72. Les Cahiers des Clubs CRIN Paris.
- Lamy I., Ducaroir J., Sterckeman T., Douay F. (2002) - Réactivité des matières organiques. *In* : Baize D., Tercé M. (Eds.), Les éléments métalliques dans les sols – Approches fonctionnelles et spatiales, INRA-Editions, 269-282.
- Lamy I. (2006). Les Interactions Matières Organiques du Sol – Éléments Traces Métalliques : Enjeux Scientifiques et Environnementaux, Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Poitiers: 84pp.
- Wander M. 2004. Soil organic matter fractions and their relevance to soil function. *In*: Magdoff F. and Ray R.W. (Eds) Soil organic matter in sustainable agriculture. *Advances in Agroecology*. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, pp 64-1

1.4.2 – Rôle des mycorhizes dans le fonctionnement de la rhizosphère dans des sols contaminés par les ETM

Le développement de ce thème prolonge les recherches du LSE notamment sur les aspects liés à la phytostabilisation des ETM. Ce mode de gestion concerne plus particulièrement *Miscanthus*, lequel présente l'avantage de fournir une ressource lignocellulosique importante. Plusieurs études réalisées en culture hydroponique ont montré une bonne tolérance de *Miscanthus* aux ETM, ainsi qu'un transfert limité de ces éléments vers les parties aériennes (Arduini *et al.*, 2004 ; Arduini *et al.*, 2006 ; Ezaki *et al.*, 2008).

Ceci a été observé *in situ* dans quelques expérimentations (Visser *et al.* 2001, Lord *et al.* 2005). Néanmoins, ces expérimentations n'ont été menées que sur un maximum d'un à deux cycles végétatifs (Peng *et al.*, 2006 ; Leung *et al.*, 2007). L'utilisation de *Miscanthus* en phytostabilisation va probablement fortement perturber l'écosystème des parcelles agricoles concernées par ce nouveau mode de production (monoculture durant une vingtaine d'années, rhizome, non exportation des feuilles, peu d'intrants, densité du couvert...).

L'écosystème nouvellement installé ne devrait retrouver une stabilité qu'après plusieurs années. Durant cette période de transition, la variabilité des paramètres environnementaux est susceptible d'influer sur la physiologie de la plante et en particulier, sur sa capacité à absorber et/ou à transférer les ETM vers ses parties aériennes. Parmi ceux susceptibles de varier fortement, le degré de mycorhization (association symbiotique entre les racines d'une plante et des champignons dits mycorhiziens) de la plante pourrait jouer un rôle majeur.

De nombreux travaux ont traité du rôle des mycorhizes (ectomycorhizes, mycorhizes à arbuscules ou à vésicules...) dans l'absorption et la toxicité des ETM dans les végétaux (Khan and Kuek, 2000 ; Hall, 2002 ; Schützendubel and Polle, 2002 ; Gaur and Adholeya, 2004). Si l'ensemble s'accorde sur le fait que la mycorhization modifie le comportement des végétaux vis-à-vis des ETM, aucun consensus ne se dégage quant au sens de cette modification. En effet, si le champignon adsorbe sur ses parois une partie des ETM disponibles et en précipite une autre partie à l'intérieur de ses hyphes, l'extension hyphale du réseau racinaire permet à la plante d'accéder à une quantité d'ETM bien supérieure. Le problème est très complexe et il semblerait que la limitation ou l'accentuation de l'absorption racinaire soit dépendante à la fois de l'espèce végétale considérée, de la souche mycorhizienne, des paramètres physico-chimiques du sol, des concentrations en ETM dans le sol et de la spéciation de ces derniers.

Le comportement de *Miscanthus* vis-à-vis des ETM est encore mal connu et peu d'information existe concernant l'influence de la mycorhization sur ce comportement. Cependant, une étude récente mentionne la présence à l'état naturel de *Miscanthus* sur des zones minières fortement contaminées par les ETM. Les auteurs ont observé un taux de mycorhization d'environ 50 % des racines (Leung *et al.* 2007). Dans le but d'utiliser cette plante à des fins de phytostabilisation, le projet du LSE a pour objectif d'évaluer le transfert des ETM vers les parties aériennes de *Miscanthus* sur plusieurs années et d'évaluer les effets au cours du temps d'une association symbiotique sur le transfert des ETM.

Pour cela, le travail envisagé comportera deux volets :

- une approche en milieu contrôlé qui permettra d'étudier l'influence des ETM sur l'interface plante / champignon. L'étude de la relation triangulaire *Miscanthus* / champignon mycorhizien / sols contaminés par des ETM peut apporter dans un premier temps des réponses sur les modes d'adaptation aux polluants de la plante et de ses symbiotes. Dans un second temps, l'étude sur une période suffisamment longue de cette relation triangulaire permettra de comprendre en quoi l'association symbiotique modifie les capacités d'absorption / transfert chez *Miscanthus* ;
- une validation *in situ* des observations obtenues en milieu contrôlé. L'objectif sera alors d'évaluer l'évolution de l'absorption / transfert au cours du temps. En parallèle, il s'agira d'analyser au cours du temps l'influence de *Miscanthus* sur le fonctionnement du sol (respirométrie, analyse des ergostérols, études des spores, cycle du carbone...). Un intérêt tout particulier sera porté sur le degré de mycorhization des racines et sur l'identification des champignons concernés (séquençage) en intégrant une dimension temporelle.

La confrontation des résultats obtenus en laboratoire et *in situ* devrait permettre de préciser le rôle joué par les mycorhizes dans les mécanismes d'absorption et de transfert des ETM chez *Miscanthus*. Les résultats devraient alimenter les réflexions sur l'intérêt de cette plante pour un mode de gestion impliquant la phytostabilisation à vocation énergétique. Le développement des compétences du LSE sur ces aspects se fera en collaboration avec le Laboratoire de Mycologie, Phytopathologie, Environnement de l'ULCO.

- Arduini I., A.Masoni, et al. (2004). Low cadmium application increase *Miscanthus* growth and cadmium translocation. *Environmental and Experimental Botany* 52(2): 89-100.
- Arduini I., L. Ercoli, et al. (2006). Response of *Miscanthus* to toxic cadmium applications during the period of maximum growth
- Ezaki, B., E. Nagao, et al. (2008). Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. *Plant Cell Rep.* 27(5): 951-961.
- Gaur A., A Adholeya (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86(4): 528-534.
- Hall JL (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53(366): 1-11.
- Khan AG, C. Kuek. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 4: 197-207
- Leung, H. M., Z. H. Ye, et al. (2007). Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere* 66(5): 905-15.
- Lord R.A., Atkinson J., Scurlock J.M.O., Lane A.N., Rahman P.K.S.M., Connolly H.E. and Street G. 2005. Biomass, remediation, re-generation (bioregen life project): reusing brownfield sites for renewable energy crops. 15th European Biomass Conference & Exhibition (<http://www.bioregen.eu/downloads/>)
- Peng K., X Li, et al. (2006). Vegetation composition and heavy metal uptake by wild plants at three contaminated sites in Xiangxi area, China. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41(1): 65-76.
- Schützendubel A and A Polle (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1351-1365.
- Visser, P. & Pignatelli, V., with contributions from Jørgensen, U. & Santos Oliveira, J.F. (2001). Utilisation of *Miscanthus*. In M.B. Jones & M. Walsh, *Miscanthus for energy and fibre* (p. 150). London: James and James.

1.4.3 – Développement d'outils en écotoxicologie végétale

Plusieurs thèmes de recherche du laboratoire nécessitent d'une part, de mesurer les dangers environnementaux que présente la contamination des sols par les ETM et d'autre part, d'évaluer l'efficacité des méthodes de remédiation mises en place afin de limiter ces dangers. Les effets des polluants sur les organismes peuvent être plus ou moins perceptibles selon les durées et les intensités d'exposition (Prasad and Strzalka, 2002). A forte dose, ils peuvent provoquer des effets conséquents sur le plan physiologique. Un dysfonctionnement plus ou moins sévère des principales fonctions vitales peut être observé jusqu'à induire la mort de l'organisme. En revanche, des polluants présents à des doses sublétales peuvent perturber certains mécanismes cellulaires dont les conséquences sur le développement de l'organisme ne pourront être ressenties qu'à longs termes. Dans le cadre d'une approche *in situ*, il est donc nécessaire de suivre l'évolution de l'état physiologique des espèces végétales présentes.

L'utilisation de biomarqueurs pour évaluer l'état de stress d'une plante s'est considérablement développée au cours des dix dernières années (Prasad and Strzalka, 2002; Prasad, 2004). La majorité des chercheurs utilisent un à deux tests spécifiques parmi la dizaine couramment utilisée en écotoxicologie. L'analyse directe ou indirecte du stress oxydatif (localisation histochimique, activités des enzymes antioxydantes,...) s'est imposée comme un marqueur pertinent de l'état de stress des végétaux (Bartosz, 1997; Foyer and Noctor, 2005a, b). Cependant, il est à noter qu'une large majorité des études portant sur l'évaluation de la toxicité des ETM s'effectue en milieu contrôlé et à des concentrations en ETM très largement supérieures à celles présentes dans les solutions de sols de sites même très contaminés. La comparaison des résultats d'expérimentations obtenus *in situ* ou en conditions contrôlées mettant en œuvre des concentrations « réalistes » en ETM relève des divergences parfois importantes. L'utilisation spécifique d'un ou deux biomarqueurs peut alors s'avérer insuffisante et conduire à des conclusions erronées (Dotan et al., 2004; Pourrut, 2008).

Le développement d'outils en écotoxicologie végétale au LSE visera à évaluer de façon plus pertinente l'état physiologique des différents modèles végétaux étudiés. Pour cela, la combinaison de deux approches complémentaires, conditions contrôlées et *in situ*, semble pertinente. Les études menées en conditions contrôlées permettront d'adapter, aux modèles retenus, des protocoles existants ou d'en développer de nouveaux. Cette étape rendra possible l'évaluation des effets des ETM sur les végétaux et la compréhension des mécanismes de toxicité en s'affranchissant des variations environnementales (Pourrut, 2008).

Cette approche s'effectuera à plusieurs niveaux :

- évaluation des effets macroscopiques (croissance, statut hydrique, morphologie des feuilles, apparition de nécroses, chloroses...);
- observation histologique de l'organisation cellulaire ;
- étude de l'impact sur le processus photosynthétique : teneur en pigments, efficacité de la photosynthèse ;
- modification de la composition des lipides membranaires ;
- caractérisation des mécanismes de défense et de séquestration des ETM par les végétaux, en particulier via l'étude des phytochélatines ;
- analyse de la perturbation du métabolisme oxydatif (localisation histochimique et quantification des Espèces Réactives de l'Oxygène, activités des enzymes antioxydantes, statut redox) et de ses conséquences (peroxydation lipidique, altérations oxydatives des protéines, des acides nucléiques) ;
- étude des effets génotoxiques des ETM (effets clastogènes par le test des Micronoyaux et mutagènes par le test des Comètes). La technique du test des Comètes ou Comet Assay est une des voies les plus intéressantes que s'apprête à développer le laboratoire. En effet, cette technique couramment utilisée en santé humaine n'a été que peu utilisée dans le domaine végétal pour des raisons de contraintes techniques (Gichner and Mühlfeldová, 2002). Or, ce test est très sensible puisqu'il permet de détecter de simples cassures de brins d'ADN. De plus, moyennant quelques modifications (Collins, 2004), il pourrait permettre d'étudier les effets directs des polluants sur la molécule d'ADN (Comet Assay acellulaire), les effets indirects comme l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques (et non pas seulement de la 8-oxo-guanidine) via l'utilisation de nucléases spécifiques (Fpg, Endo III), les effets indirects sur l'efficacité des systèmes de réparation NER (nucleotide excision repair) ou BER (base excision repair) de l'ADN. Cette technique bien que prometteuse n'a encore été développée sur des cellules végétales. Le projet du LSE inclura la mise au point et l'évaluation de cette méthode sur les modèles végétaux étudiés.

L'approche en milieu contrôlé constituera un préalable indispensable en vue de mettre au point et de sélectionner des biomarqueurs pertinents qui pourront être transposés en condition de terrain dans le but d'évaluer les effets des ETM sur les végétaux. La transposition des techniques mises au point en milieu contrôlé pourrait amener à de possibles adaptations des protocoles, pour tenir compte des contraintes *in situ* (temps d'échantillonnage, mode de conservation des échantillons, variation des conditions environnementales...).

Le développement de ces outils écotoxicologiques, en partenariat étroit avec le Laboratoire de Catalyse et Environnement de l'ULCO, devrait permettre un biomonitoring des sites expérimentaux en intégrant la caractérisation de l'impact des pollutions multi-métalliques sur les végétaux et l'évaluation de l'efficacité des procédés de phytoremédiation que souhaite développer le laboratoire.

- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19, 47-64.
- Collins, A., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I., 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 43, 200-227.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005a. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005b. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Gichner, T., Mühlfeldová, Z., 2002. Induced DNA Damage Measured by the Comet Assay in 10 Weed Species. *Biologia Plantarum* 45, 509-516.
- Pourrut, B., 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. INPT, Toulouse, p. 284.
- Prasad, M.N.V., 2004. Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems, 2nd ed. Narosa Publishing House,, New Delhi, India.
- Prasad, M.N.V., Strzalka, K., 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.